

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO INTERFERON DO TIPO I NA INDUÇÃO DA UNFOLDED PROTEIN RESPONSE DURANTE A INFECÇÃO PELA BACTÉRIA INTRACELULAR *BRUCELLA ABORTUS*

David Martins dos Santos¹, Erika Sousa Guimarães², Marco Túlio Ribeiro Gomes³, Priscila Carneiro Gomes³, Sergio Costa Oliveira⁴

1. Estudante de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
2. Bolsista de pós-doutorado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG
3. Pós-doutorado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG
4. Professor titular do Depto. de Bioquímica e Imunologia da UFMG

Resumo

Brucella abortus (Ba) é uma bactéria patogênica que causa a doença brucelose e aborto em bovinos acarretando em grande prejuízo ao país. Sabe-se que a Ba usa do Retículo Endoplasmático (RE) para sobreviver e replicar. Durante a infecção, diversos patógenos bacterianos induzem o estresse no RE e levam à ativação da Unfolded Protein Response (UPR), este leva à inibição da tradução de mRNA quando o RE está sobrecarregado para garantir homeostase celular. Tendo em conhecimento o receptor STING presente no RE que reconhece o DNA citosólico induzindo Interferon (IFN) do tipo I e genes da resposta imune inata, o trabalho tem como objetivo elucidar o papel do IFN do tipo I na indução da UPR durante a infecção pela bactéria intracelular *B. abortus*. Para isso, diversos experimentos foram feitos utilizando macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMDMs), através dos quais pode-se concluir uma relação da UPR com a imunidade inata do hospedeiro durante a infecção por *Brucella abortus*.

Autorização legal: CEUA Nº 87/2017

Palavras-chave: BMDMs, Retículo Endoplasmático, Imunidade Inata.

Apoio financeiro: CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG

Introdução

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos gram-negativos (Corbel e Morgan, 1984) que utilizam o RE do hospedeiro como nicho replicativo. B.a é adquirida principalmente através do contato com animais infectados e através do consumo de leite e derivados contaminados (Nicoletti, 1989) e é a espécie mais difundida no mundo (Corbel, 1997). Em humanos, pode causar febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas e, em animais, afeta principalmente os órgãos reprodutivos, causando aborto e infertilidade (Young, 1988).

Interferons (IFNs) foram descritos como uma das moléculas mais importantes em infecções virais (Issacs, Lindenmann e Valentine, 1957). Recentemente, estudos demonstraram que produtos bacterianos, como LPS e DNA, conseguem ativar cascatas de sinalização que levam à produção de altos níveis de IFN-I (Monroe, McWhirter e Vance, 2010). Nosso grupo demonstrou que camundongos IFN- α 1R KO são mais resistentes à infecção por B.a, indicando que IFN-I é determinante na sobrevivência e proliferação dessa bactéria no hospedeiro (de Almeida et al., 2011).

O retículo endoplasmático (RE) é crucial no controle da homeostase celular, controlando o processamento e enovelamento de proteínas. Quando sobrecarregado, há acúmulo de proteínas mal dobradas, induzindo estresse do RE e disparando o início da Unfolded Protein Response (UPR), uma via de sinalização bem conservada nos eucariotos (Brewer et al., 1997; Ron, Walter, 2007) que pode reduzir o estresse no RE. Em mamíferos, a UPR é ativada através de uma ação coordenada de três principais sensores transmembrana: inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), PKR-like ER kinase (PERK) e activating transcription factor 6 α (ATF6 α) (Celli, Tsolis, 2015). A ocorrência simultânea de estresse no retículo, UPR e ativação de vias da imunidade inata já foi descrita em diversas patologias crônicas (Hasnain et al., 2012) e está envolvida em diversas doenças associadas à produção de citocinas pró-inflamatórias (Shenderov et al., 2014; Grootjans et al., 2016).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo elucidar o papel do IFN-I na UPR induzida por B.a, contribuindo para o entendimento da influência do reconhecimento do DNA bacteriano citosólico na indução da UPR e na resposta imune inata contra esse patógeno.

Metodologia

Foram utilizados camundongos selvagens 129Ev/Sv e camundongos geneticamente deficientes para o receptor do IFN do tipo I (IFN- α 1R KO).

A cepa virulenta de B.a da linhagem S2308 foi crescida em meio *Brucella* Broth líquido (BB), a 37 °C. Após três dias de crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada e o sedimento ressuspenso em tampão salina fosfato. Aliquotas destas culturas foram diluídas e plaqueadas em meio BB solidificado para titulação.

Foi feita extração de macrófagos da medula óssea dos camundongos (BMDMs) que foram sacrificados através de deslocamento cervical para remoção dos fêmures e tíbias. As células da medula foram extraídas através da ruptura das extremidades proximal e distal dos ossos e injeção de HBSS, de forma a remover toda a medula do interior do osso. O material obtido foi centrifugado, ressuspendido em meio DMEM e transferido para uma placa contendo DMEM 10% de LCCM. Após incubação overnight a 37°C as células não aderentes foram coletadas, contadas e plaqueadas em placas na concentração de 5×10^5 células por mL em meio DMEM 10% de LCCM (Gomes et al., 2013). Estes BMDMs foram infectados com B.a (MOI 100), diluídas em 250µL de meio por poço, no 10º dia de cultura. A placa de cultura foi então incubada à 37°C, por 24h.

As dosagens de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL6 e CXCL10 foram feitas nos sobrenadantes das culturas celulares através de ELISA.

Para avaliação da expressão gênica dos componentes da UPR, o RNA extraído dos BMDMs infectados com B. a e pré-tratados ou não com o inibidor da UPR (TUDCA), foi purificado e reversamente transcrito utilizando random primers. Primers para componentes downstream das vias de IRE1, PERK e ATF6 (XBP1, CHOP e BiP, respectivamente) foram utilizados nas reações de qPCR para quantificar a expressão gênica. Tunicamicina (1µg/mL), indutor químico de estresse RE, foi utilizado como controle positivo da ativação de UPR (de Jong et al., 2013). Os BMDMs foram plaqueados em placas em concentração de 5×10^5 células por poço. As células foram tratadas com TUDCA (1mg/mL) por ½ hora, antes da infecção com B.a. Para bloqueio do IFN β , BMDMs foram tratados por ½ hora com 10 U/mL de anticorpo murino anti-IFN β e então infectados com B.a.

Para avaliar o papel da UPR na replicação bacteriana, foi feito bloqueio da UPR com TUDCA em BMDMs e o UFC intracelular foi avaliado 24h após a infecção. No 10º dia, o meio de cultura foi aspirado e adicionada a bactéria. A placa de cultura foi centrifugada para que as bactérias entrassem em contato com os BMDMs. Após ½ hora de incubação à 37°C, cada poço foi lavado com HBSS para retirada de bactérias não internalizadas e adicionado 500 µL de meio DMEM com 10% de SFB, 1% HEPES 1M e 10% LCCM. A placa de cultura foi então incubada à 37°C. 24h após a infecção, estas células foram lisadas e diluições dos lisados foram plaqueadas em meio BB sólido. Após 3 dias de incubação à 37°C, o número de unidades formadas de colônias foi determinado por contagem (Smith et al., 2013).

Resultados e Discussão

Para avaliação da indução da UPR pela bactéria intracelular *B. abortus*, macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 foram infectados conforme descrito acima e a expressão de BiP, XBP1(s) e CHOP determinada por qPCR. Foi observado que a bactéria *B. abortus* é capaz de induzir os eixos ATF6 (BiP) e IRE1 (XBP1s) da UPR, mas não PERK (CHOP). Ainda, a utilização do inibidor da UPR, TUDCA, é eficiente em bloquear a ativação de ATF6 (BiP) e de IRE1 (XBP1) frente à infecção por *B. abortus*, observando menor crescimento da bactéria quando feito.

Dessa maneira, buscando avaliar se outras moléculas relacionadas à via do interferon são afetadas pela UPR, BMDMs de camundongos C57BL/6 foram infectados conforme descrito acima e a expressão de proteínas ligadoras de guanilato (GBP) – GBP2, GBP3, GBP5 – e do fator regulatório de interferon do tipo 1 (IRF-1) foram avaliados. Nossos dados mostram que a expressão de GBP2, GBP3 e GBP5, assim como de IRF-1 é alterada mediante o bloqueio da UPR com TUDCA, evidenciando que a UPR é crucial para a expressão de moléculas relacionadas à via do IFN do tipo I (CXCL10). O bloqueio da UPR com TUDCA mostrou reduzir drasticamente a expressão de IFN β . Demonstrando assim o papel crucial da UPR induzida pela bactéria *B. abortus* na indução das vias ligadas ao Interferon do Tipo I.

Tendo em mente que a resposta do IFN do tipo I é crucial para a indução da UPR na infecção por *B. abortus*. Assim, com o objetivo de determinar se o IFN do tipo I desempenha papel na indução da UPR, BMDMs de animais selvagens (129Sv/Ev) foram infectados com a bactéria *B. abortus*, conforme já descrito, e a expressão de BiP determinada por qPCR. Os resultados apontam que a ausência do receptor do IFN do tipo I não afeta a ativação dos eixos ATF6 (BiP) e de IRE1 (XBP1s) da UPR na infecção por *B. abortus*. Então, para determinar se o IFN do tipo I é capaz de induzir a UPR diretamente, de forma independente da sinalização ligada ao seu receptor, anticorpos anti-IFN β foram utilizados previamente à infecção e a UPR avaliada. Observou-se que o bloqueio do IFN- β , leva à redução da UPR, observado pela redução de BiP e de XBP1(s). Portanto, nossos resultados sugerem que o IFN- β produzido durante a infecção por *B. abortus* é crucial na indução da UPR.

Por fim, para observar o crescimento bacteriano, BMDMs de animais selvagens (129Sv/Ev) foram infectados com a bactéria *B. abortus* a fim de comparação entre as células tratadas ou não com IFN- β recombinante. Foram feitas as contagens de UFC (Unidades Formadoras de Colônias), *in vitro*, e observação de microscopia de fluorescência com contagem do número de *B. abortus* intracelular nestes macrófagos. Os resultados indicaram que o IFN- β favoreceu o crescimento da bactéria *B. abortus* nesses BMDMs.

Conclusões

Pelos resultados obtidos no projeto, pode-se concluir uma relação da UPR com a imunidade inata do hospedeiro. Existe uma indução da UPR, durante a infecção pela bactéria *B. abortus*, ativando os eixos ATF6 e IRE1 sensores da UPR. Também foi mostrado que, durante a infecção por *Brucella*, existe produção da citocina inflamatória IL-6 e CXCL10 sendo estas relacionadas à UPR. Tendo isto em mente, foi esclarecido que a ausência do receptor do IFN do tipo I não parece afetar a indução da UPR, durante a infecção. Entretanto, a expressão de IFN- β , bem como de diversas vias ligadas ao IFN-I, como expressão de GBP2, GBP3, GBP5 e a expressão de IRF-1, são diminuídas com o bloqueio da UPR, demonstrando uma relação crucial entre IFN do

tipo I e UPR que necessita ser melhor entendida através de futuros experimentos. Os resultados também ajudam a concluir que existe uma importância do IFN- β para o crescimento bacteriano, observados com o número de UFC e de bactérias intracelulares em macrófagos.

Os resultados obtidos durante à execução do projeto possuem um impacto extremamente relevante no que diz respeito ao entendimento dos mecanismos envolvidos na manipulação da UPR por patógenos bacterianos, especialmente aqueles que utilizam o RE como nicho replicativo. Ainda, tendo em vista que a UPR vem sendo tratada como possível alvo terapêutico tanto em doenças infecciosas como inflamatórias, novos dados nessa área podem aumentar nosso entendimento da ligação entre respostas imunes e sinalização no RE, não só no contexto de doenças infecciosas, mas também em doenças como câncer, obesidade e doenças neurodegenerativas.

Referências bibliográficas

Corbel MJ, Morgan, WJB (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. Holt, J.G., editor. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, p.377-388.

Corbel MJ (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2):213-221.

Nicoletti PL (1989). Relationship between animal and human disease. In: *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Young, E.J. and Corbel, M.J. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p.41-51.

Young EJ (1988). Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica (APMIS) Supplementum*. 3:17-20.

World Health Organization (1998). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting, Geneva.

Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC (1957) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927):268–273.

Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE (2010) Induction of type I interferons by bacteria. *Cell Microbiol* 12(7): 881–890.

de Almeida LA et al., (2011) MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to *Brucella abortus* infection. *PLoS One*, 6.

Brewer JW et al., (1997) A Pathway Distinct from the Mammalian Unfolded Protein Response Regulates Expression of Endoplasmic Reticulum Chaperones in Non-Stressed Cells. *The EMBO Journal* 16.23: 7207–7216.

Ron D, Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.

Celli, J, Tsolis, RM. (2015) Bacteria, the ER and the Unfolded Protein Response: Friends or Foes? *Nature Reviews. Microbiology*, 13(2), 71–82.

Hasnain SZ et al., (2012) The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 90, 260–270.

Shenderov K et al., (2014). Cutting edge: endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1beta in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *J. Immunol.* 192 2029–2033.

Grootjans J et al., (2016) The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 16, 8: 469-484.

Gomes MTR et al., (2013) Critical Role of ASC Inflammasomes and Bacterial Type IV Secretion System in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection. *J Immunol* 190: 3629-3638,

Smith JA et al., (2013) *Brucella* induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS Pathog* 9: e1003785.

de Jong M. F., Starr T., Winter M. G., den Hartigh A. B., Child R., Knodler L. A., et al. . (2013). Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. *MBio* 4:e00418-12.