



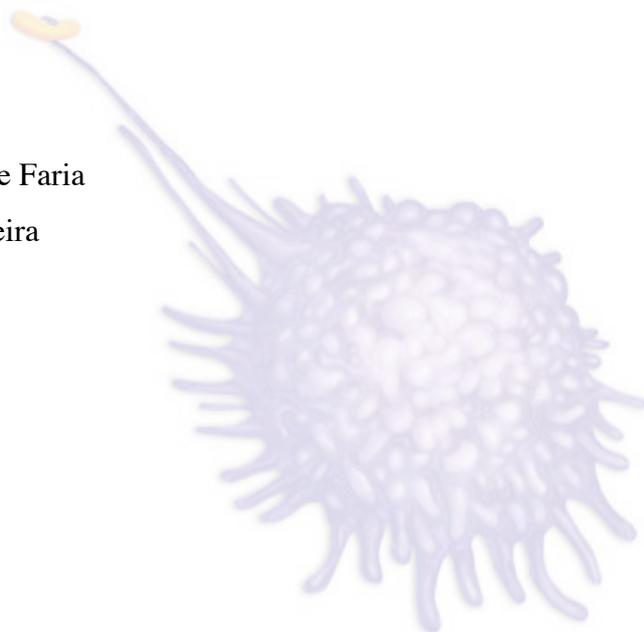
Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

MARIANA CAMILA GONÇALVES MIRANDA

*Alterações imunológicas na mucosa intestinal de  
camundongos com diabetes tipo 1*

**Orientadora:** Dra. Ana Maria Caetano de Faria

**Co-orientador:** Dr. Rafael Pires de Oliveira



Belo Horizonte  
Fevereiro de 2016

MARIANA CAMILA GONÇALVES MIRANDA

*Alterações imunológicas na mucosa intestinal de  
camundongos com diabetes tipo 1*

**Orientadora:** Dra. Ana Maria Caetano de Faria

**Co-orientador:** Dr. Rafael Pires de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de mestre.

Belo Horizonte

Fevereiro de 2016

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus em primeiro lugar por me dar forças e determinação para seguir sempre em frente. Aos meus pais pelo carinho e ensinamentos que fazem de mim o que sou, a eles dedico esse trabalho. Aos meus irmãos Adriana, Jan, Iandra Débora e Tiago por sempre me apoiarem. Em especial, agradeço muito ao Tácio, por estar sempre do meu lado em cada detalhe da minha vida, me ensinando a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por todo amor e carinho eu sou muito feliz com você.

Agradeço a professora Ana Maria, a quem tenho profunda admiração, por me ajudar a crescer e por permitir que eu faça parte da equipe incrível que é o laboratório de imunobiologia.

Ao professor Rafael Pires, um amigo, que com sabedoria e dedicação me ajudou em todos os momentos do mestrado e por todos os bons conselhos que nunca vou deixar de seguir.

À Thaís, por todos ensinamentos desde o início, na iniciação científica e principalmente o apoio agora nesta reta final.

À professora Denise, por toda atenção e cuidado com este trabalho.

Agradeço imensamente à Sarah, que é mais do que uma amiga, esteve sempre do meu lado dentro e fora do laboratório, e participou intensamente desta conquista. Agradeço pela amizade, pelos conselhos (que nem sempre consigo seguir, rs), pelo carinho, pela companhia noite a dentro em todos os experimentos e por absolutamente tudo!

Aos amigos, Deus colocou as pessoas certas no meu caminho e sou muito grata a isso. Ao Guilherme que me diverte tanto com suas teorias. À Samara principalmente pelo amor aos GATOS. À Nathalia por todas as risadas e “nathalices”. A Luísa que me apoia tanto obrigada pelo carinho. À Adna pelas conversas risadas e amizade. Ao Mauro, sempre atencioso disposto a ajudar em tudo, muito obrigada pela amizade. À Dani, tao querida, por tudo durante todos estes anos. À Andrezza que se tornou uma pessoa muito especial, obrigada pelas histórias e pelo carinho. À Ciça pela animação e pelas risadas. Ao Thalisson, que não

me deu as prometidas castanhas do Pará. À Ju e Nubia sempre tão fofas e atenciosas, Ao Luiz e Gabi por todas as rizadas e bons momentos. À Yse, a quem eu recorro a todo momento, pra rir ou pra chorar. À Camila e Ju e por estarem sempre presente estes anos e por se tornarem grandes amigas. À Hortência, que ficou pouquinho, mais se fez muito importante. Ao Hermes e Ildinha pelo cuidado e carinho com os animais sempre.

À todos amigos do LIB, que são amigo para a vida toda, obrigada pela convivência e ótimas conversas. Agradeço a cada um que fez parte de alguma forma de tudo isso.

## Resumo

O diabetes *mellitus* do tipo 1 é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis. Pode se manifestar nos anos iniciais da vida e grande porcentagem de indivíduos com diabetes são crianças. A doença leva à perda em massa das células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina causada por uma resposta inflamatória mediada por linfócitos T CD4 e CD8. O desenvolvimento da doença é marcado pela quebra da tolerância imunológica ao próprio e diversos fatores como componentes alimentares e variações na microbiota podem determinar o ponto de início da pancreatite e do diabetes. É através da mucosa intestinal que o sistema imune tem contato com a maioria dos antígenos externos e a integridade dos componentes da mucosa é determinante para o estabelecimento de tolerância imunológica a esses antígenos, um fenômeno classicamente denominado tolerância oral e análogo à tolerância aos autocomponentes. Neste estudo mostramos que camundongos NOD que desenvolvem espontaneamente o diabetes do tipo 1 possuem defeitos na mucosa intestinal que impedem o estabelecimento adequado da tolerância oral. A análise morfológica do intestino delgado não mostrou sinais clínicos de inflamação ou alteração na frequência de linfócitos T intraepiteliais, porém essa linhagem tem os mecanismos de barreira imunológica do intestino delgado prejudicados com menor produção de muco e de secreção de IgA no lúmen. A redução da frequência de linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) observada nesses camundongos pode contribuir para a diminuição de SIgA. A dificuldade de induzir tolerância oral não foi devido a uma alteração na frequência de linfócitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) nos linfonodos mesentéricos. Além disso, demonstramos que o desenvolvimento do diabetes estava associado a um desbalanço nas frequências de macrófagos intestinais que secretam IL-10 e macrófagos derivados de monócitos com perfil pró inflamatório no intestino delgado. Devido à estreita relação entre o pâncreas e o intestino e à comunicação entre esses dois órgãos através do linfonodo pancreático, perturbações na mucosa intestinal podem interferir no desenvolvimento da diabetes do tipo 1. Compreender os fatores e alterações na mucosa intestinal que estão associados à patogênese do diabetes do tipo 1 é o primeiro passo para a criação de novas estratégias terapêuticas via mucosa que sejam seguras e bem-sucedidas na prevenção e tratamento dessa doença.

**Palavras chave:** diabetes tipo 1, tolerância oral, intestino delgado, mucosa, macrófago.

## Abstract

Type 1 diabetes is a chronic autoimmune disease that affects genetically susceptible individuals. It can manifest in the early years of life, and a large percentage of individuals with diabetes are children. The disease leads to massive loss of pancreatic  $\beta$  cells producing insulin caused by an inflammatory response mediated by  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells. Development diabetes is characterized by the breakdown of immunological tolerance to self antigens, and several factors such as dietary components and changes in the microbiota play a crucial role in the onset of pancreatitis and diabetes. The contact of immune system with the external antigens occurs mostly through the intestinal mucosa, and the integrity of its components is critical for the establishment of tolerance to these antigens, the classical phenomenon known as oral tolerance. In the present study, we showed that NOD mice, a mouse that develops spontaneously type 1 diabetes, presented defects in the intestinal mucosa that lead to the breakdown of oral tolerance. A morphological analysis of the small intestine of these mice did not show clinical signs of inflammation neither change in intraepithelial T lymphocytes frequency, but this strain presented defects in the intestinal barrier such as reduced production of mucus and the secretion of IgA in the intestinal lumen. The reduction in the frequency of B1 lymphocytes ( $CD19^+ CD5^+$ ) seen in these mice may contribute to the diminished sIgA found. The impaired oral tolerance was not due to a change in frequency of regulatory T cells ( $CD4^+ FoxP3^+$ ) in mesenteric lymph nodes. Furthermore we demonstrate that the development of diabetes was associated with an imbalance of resident macrophages which secrete IL-10 and monocyte-derived macrophages with a pro-inflammatory profile in small intestine. Because of the close relationship between the pancreas and the intestine, and the communication between them through the pancreatic lymph node, disturbances in intestinal mucosa can interfere with the development of type 1 diabetes. To understand the factors and changes in intestinal mucosa related to pathogenesis of type 1 diabetes is the first step for creation of new therapeutic strategies that are safe and successful for type 1 diabetes.

**Keywords:** type 1 diabetes, oral tolerance, small intestine, mucosa, macrophage.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> O tecido linfoide associado ao intestino (GALT).....	14
<b>Figura 2:</b> Representação do esquema de binarização da imagem utilizado para análise da produção de muco. Processamento e cálculos realizados com o auxílio do software ImageJ.	29
<b>Figura 3:</b> Imunofenotipagem de células TCD4 e B da placa de Peyer e linfonodo mesentérico. (A), .....	34
<b>Figura 4:</b> Imunofenotipagem de células apresentadoras de antígenos (APCs).....	35
<b>Figura 5:</b> Análise do ensaio de fagocitose.....	36
<b>Figura 6:</b> Infiltrado inflamatório nas ilhotas $\beta$ pancreáticas de camundongos NOD.....	39
<b>Figura 7:</b> Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD. ....	41
<b>Figura 8:</b> Frequência de linfócitos T CD4+Foxp3+.....	42
<b>Figura 9:</b> Avaliação histopatológica do intestino delgado de camundongos NOD e NOR. ...	43
<b>Figura 10:</b> Frequência de linfócitos intraepiteliais no intestino delgado de camundongos NOD e NOR.....	44
<b>Figura 11:</b> Frequência de células caliciformes e produção de mucos no intestino delgado de camundongos NOD e NOR. ....	45
<b>Figura 12:</b> Concentração de IgA secretória (sIgA) no lavado intestinal de camundongos NOD e NOR.....	47
<b>Figura 13:</b> Frequência de linfócitos T CD4+, B e B1 nas placas de Peyer de camundongos NOD e NOR.: .....	48
<b>Figura 14:</b> Frequência de macrófagos na lâmina própria do intestino de camundongos NOD. ....	50
<b>Figura 15:</b> Frequência de macrófagos residentes e não residentes em camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos. ....	51
<b>Figura 16:</b> Capacidade de fagocitose de macrófagos da lâmina própria do intestino de camundongos NOD e NOR. ....	52
<b>Figura 17:</b> Produção da citocina IL-10 no intestino delgado de camundongos NOD durante o desenvolvimento da diabetes tipo 1.....	53

## Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. Estado da Arte.....	12
1.2. Uma breve introdução à Mucosa Intestinal .....	12
1.1. Tolerância Oral e suas aplicações .....	15
1.2. Células Apresentadoras de Antígenos na Mucosa Intestinal .....	17
2. Diabetes autoimune .....	19
2.1. Patogênese e componentes genéticos.....	19
2.2. Modelos animais: NOD, um modelo valioso de diabetes autoimune .....	21
2.3. A arte circunstancial: A Diabetes e o Intestino.....	23
3. Material e Métodos.....	26
3.1. Animais .....	26
3.2. Avaliação da incidência de diabetes autoimune .....	26
3.3. Obtenção das amostras.....	26
3.4. Coleta do lavado intestinal.....	27
3.5. Avaliação histológica.....	27
3.5.1. Avaliação histopatológica do pâncreas .....	27
3.5.2. Avaliação histopatológica do intestino delgado.....	28
3.6. Tratamento para indução de Tolerância Oral.....	29
3.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de imunoglobulinas .....	29
3.8. Obtenção de suspensões celulares dos órgãos linfoides .....	31
3.9. Obtenção de células da lâmina própria intestinal .....	32
3.10. Citometria de Fluxo.....	32
3.10.1. Imunofenotipagem.....	32
3.10.2. Estratégias de determinação das populações de interesse .....	33
3.10.3. Ensaio de fagocitose com esferas (beads) .....	35
4. Resultados.....	38
4.1. Pâncreas de camundongos NOD apresentam infiltrado inflamatório progressivo durante o desenvolvimento da diabetes tipo 1.....	38
4.2. Camundongos NOD são refratários à indução de tolerância oral.....	39
4.3. Avaliação histopatológica da mucosa intestinal de camundongos NOD.....	42
4.4. Camundongos NOD apresentaram redução na produção de IgA secretória.....	46
4.5. Camundongos NOD apresentaram frequência reduzida de células B1 nas placas de Peyer .....	47
4.6. Avaliação da frequência de macrófagos residentes do intestino durante a progressão da diabetes em camundongos NOD.....	48

5. Discussão.....	56
6. Conclusão.....	67
7. Perspectivas.....	69
8. Referências.....	71

## **Introdução**

## 1. Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) consiste em um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia como resultado de defeitos na produção da insulina ou sua ação. Dentre os tipos de diabetes, a diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis. Representa de 5% a 10% dos casos de diabetes *mellitus*. A incidência de DM1 vem crescendo consideravelmente particularmente na população infantil. Trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Gale, 2005). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) em 2015, 542 mil crianças de 0 a 14 anos foram diagnosticadas com DM1 no mundo, sendo cerca de 32 mil crianças no Brasil. Nessa doença, ocorrem distúrbios metabólicos devido à destruição das células  $\beta$  pancreáticas pela atividade desregulada de linfócitos auto reativos. A perda gradual das células produtoras de insulina leva ao aumento dos níveis de glicose sérica. A diabetes constitui a principal causa de amputação de membros inferiores, insuficiência renal e cegueira entre adultos assim como de doenças cardiovasculares, morte prematura e mortalidade perinatal (“Diretrizes-Sbd-2015,” 2015).

O tratamento atual da diabetes autoimune consiste na administração de insulina exógena e monitoramento constante da glicemia. O tratamento não tem efeito sobre a patogênese e os eventos imunológicos envolvidos na doença. Um melhor entendimento da relação entre o desenvolvimento do diabetes e alterações em outros compartimentos do corpo como a mucosa intestinal pode representar um avanço na compreensão da patogênese da doença e na geração de novas ferramentas de intervenção na sua evolução.

Nosso grupo de pesquisa tem alcançado resultados substanciais na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias crônicas utilizando o intestino como um importante sítio de modulação do sistema imune. A mucosa intestinal, o maior órgão linfóide do corpo, é constantemente estimulado por antígenos como a dieta e a microbiota. Fisiologicamente, esses contatos promovem respostas imunológicas reguladoras que garantem a homeostase intestinal. O estímulo imunogênico no ambiente intestinal leva à indução preferencial de células T e B reguladoras que migram para sítios inflamatórios e agem modulando a inflamação através da secreção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina IL-10 e TGF- $\beta$ . Esse fenômeno foi denominado tolerância oral (Faria and Weiner 2006; Weiner et al

2011; Pabst and Mowat 2012).

Em sua tese de doutorado, Rafael Pires de Oliveira mostrou os efeitos da administração por via oral da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* produtora da proteína de choque térmico HSP65 em camundongos NOD, modelo murino de diabetes do tipo 1. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a secreção de HSP65 na mucosa intestinal induz a formação de células T CD4+ reguladoras específicas no intestino. Essas células migram para os sítios inflamados onde a proteína HSP é altamente expressa e atuam modulando a inflamação local (Rezende et al 2012).

A utilização da indução de tolerância oral na mucosa intestinal a HSP65 preveniu a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Rezende et al., 2012) e colite ulcerativa em camundongos (Gomes-Santos et al., 2014). Entretanto, esse tratamento oral não foi capaz de impedir o desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD, um modelo murino de diabetes autoimune. Isto nos levou a testar a indução de tolerância oral nesses animais que confirmou a hipótese de que a capacidade de indução de tolerância oral estava comprometida nos camundongos NOD. Além disto, essa falha no estabelecimento de tolerância oral indicava que essa linhagem apresenta defeitos na geração de mecanismos imunorreguladores na mucosa intestinal. O trabalho de Rafael Pires durante seu doutorado concluiu que camundongos NOD diabéticos apresentam um desequilíbrio entre células T efetoras e reguladoras no intestino, com frequência aumentada de células Th17 e predominância de células dendríticas com perfil inflamatório no tecido linfóide associado à mucosa intestinal.

Com bases nesses experimentos, investigamos neste estudo as alterações nos elementos imunorreguladores da mucosa intestinal de camundongos NOD durante o desenvolvimento espontâneo do diabetes tipo 1 com o objetivo de avançar no entendimento do impacto da estimulação da mucosa intestinal pela microbiota e pelos antígenos da dieta no desenvolvimento da diabetes. Além disso, nossa meta foi formular maneiras de intervenção positiva nesse importante componente da fisiologia imunológica, o intestino.

Polimorfismos em diferentes regiões do genoma já foram associados à predisposição ao diabetes, os *loci* são denominados pelo próprio nome da doença, *IDDM* do inglês *insulin dependent diabetes mellitus*. Vários *IDDM* já foram identificados no genoma humano. O *IDDM 1* contem os genes do HLA, o HLA DR3-DQ2 e DR4-DQ8 são os tipos mais

frequentes de MHC envolvidos na predisposição ao diabetes em humanos, possuir estes alelos indica ter 50% da predisposição genética a DM1. Esses mesmos alelos estão relacionados a outras desordens autoimunes, como por exemplo, a doença celíaca. (Kantárová & Buc, 2007). Regiões de IDDM incluem também genes associados à imunorregulação, como AIRE, IL-2r, CTLA-4, PD-1.

Apesar do forte peso do fator genético, como toda doença autoimune, a DM1 também é altamente influenciada por fatores ambientais, alimentares e a microbiota. A região geográfica, forma de nascimento, dieta, infecções e uso de antibióticos tem sido associados ao desenvolvimento da DM1 (Wen et al., 2008). Dispomos de um modelo animal extremamente valioso para o estudo da diabetes, o camundongo NOD (*non obese diabetic*). Este camundongo possui variações genéticas que o levam a apresentar susceptibilidade ao diabetes tipo 1, porém o efetivo desenvolvimento da doença varia de acordo com o ambiente e condições em que o animal é mantido.

Diante da variedade de fatores orquestrando o desenvolvimento do diabetes, é necessária uma análise ampla e minuciosa dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença com o objetivo de propor novas estratégias que possam controlar a epidemia em curso.

### **1.1.Estado da Arte**

### **1.2. Uma breve introdução à Mucosa Intestinal**

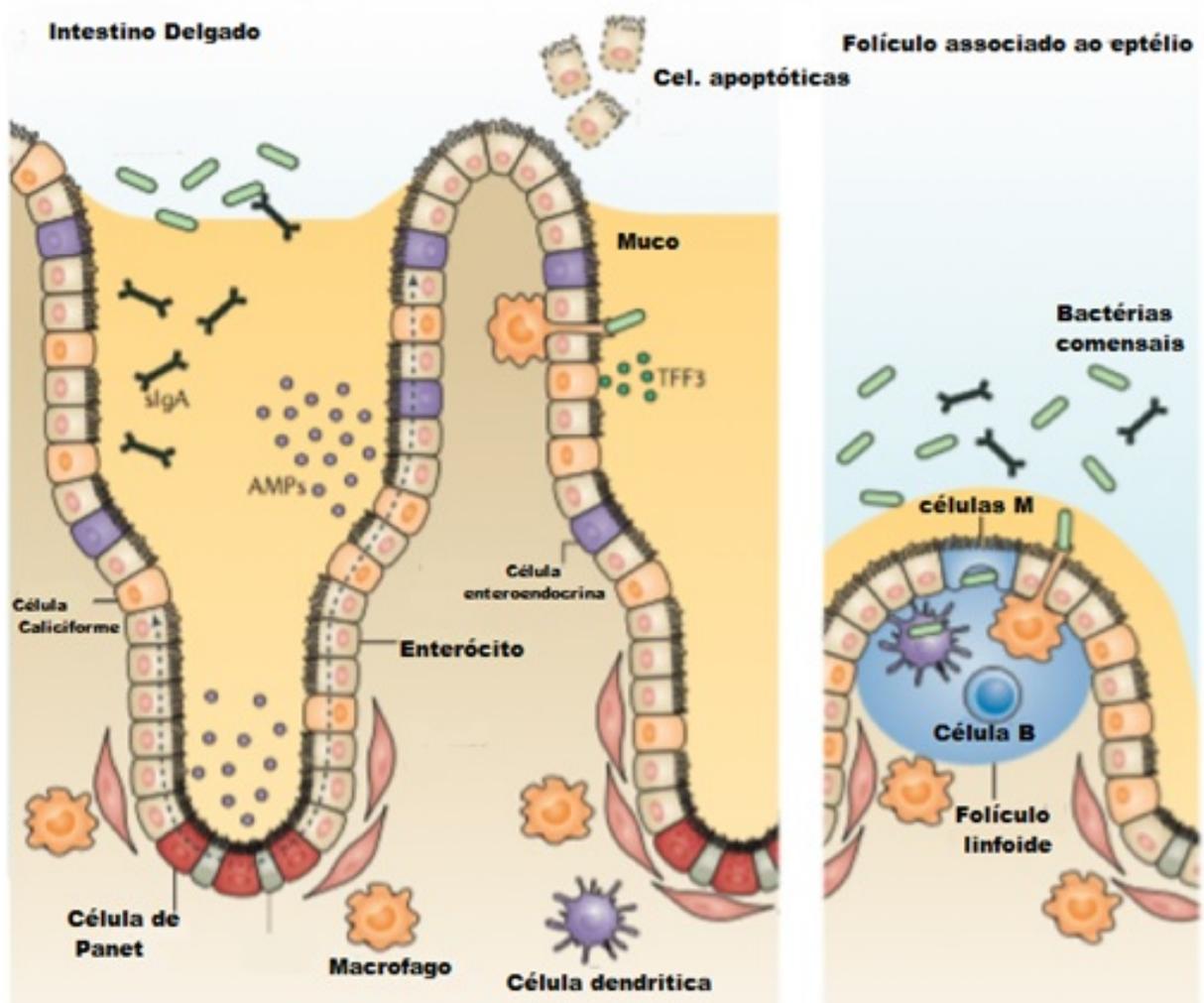
A mucosa intestinal está associada a um extenso e complexo tecido linfóide chamado, em inglês, de *mucosal associated lymphoid tissue* (MALT). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é o componente mais bem estudado do MALT e constitui-se de uma extensa e variada rede de células e folículos linfóides distribuídos ao longo do intestino. Isto porque a mucosa intestinal é a maior superfície de contato do corpo com o ambiente externo. Estima-se que aproximadamente 30 kg de proteínas da dieta entram em contato com o intestino humano durante um ano e, em média, 190g dessas proteínas são absorvidas diariamente no intestino (Brandtzaeg, 1998). Além disso, o sistema imune associado à mucosa é constantemente estimulado pelas bactérias que colonizam o intestino. Este constante estímulo antigênico (dieta e microbiota) é fundamental para a maturação imunológica. A

importância da microbiota para a maturação do sistema imune é evidenciada por camundongos *germ-free* (mantidos em condições isentas de germes) que apresentam o tecido linfóide associado à mucosa pouco desenvolvido e apresentam baixos níveis séricos de IgA e IgG (Macpherson & Harris, 2004). De maneira similar, camundongos adultos mantidos, desde o desmame, sob dieta balanceada contendo apenas aminoácidos livres em substituição às proteínas inteiras apresentam atrofia de órgãos e tecidos linfóides, principalmente os associados ao intestino delgado que é o sítio de absorção de proteínas (da Silva Menezes et al., 2003; Paula-Silva et al., 2015)

O GALT é composto pelas placas de Peyer, folículos linfóides isolados e o apêndice que são agregados linfóides presentes na submucosa ao longo do intestino delgado e grosso (Brandtzaeg, Kiyono, Pabst, & Russell, 2008). Os linfonodos mesentéricos e cecais que drenam o intestino delgado e grosso são os maiores linfonodos do corpo. Logo abaixo do epitélio, encontra-se a lâmina própria que é composta por células linfóides e mielóides tais como linfócitos, macrófagos e células dendríticas (Howard L. Weiner, da Cunha, Quintana, & Wu, 2011). Essas células estão envolvidas no equilíbrio da resposta imune no intestino.

Uma única camada de células epiteliais separa o tecido linfóide dos antígenos presentes no lúmen. Essa camada é composta por células epiteliais (enterócitos), células caliciformes, células de Paneth e células enteroendócrinas. A secreção de proteínas antimicrobianas e mucina pelas células de Paneth e células caliciformes, respectivamente, estabelece uma barreira que minimiza a exposição contínua a estímulos presentes no lúmen. (Crosnier, Stamataki, & Lewis, 2006).

A IgA secretória é a imunoglobulina predominante no intestino e compreende mais um mecanismo de barreira epitelial. É produzida por plasmócitos na lâmina própria e translocada para o lúmen através de um receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR - *polymeric immunoglobulin receptor*) presente nas células epiteliais (Johansen & Kaetzel, 2011). Uma vez secretada, a IgA torna-se parte da matriz de muco e atua como um anticorpo neutralizante que se liga a toxinas e receptores de adesão de microrganismos presentes no lúmen. Ao contrário de outras classes de imunoglobulina, a IgA não estimula uma resposta efetora inflamatória e, por esse motivo, pode ser considerada uma imunoglobulina anti-inflamatória (Goll & van Beelen Granlund, 2015; Oliver Pabst, 2012).



**Figura 1: O tecido linfóide associado ao intestino (GALT).**

Células epiteliais do intestino formando uma interface física e química entre comunidades microbianas no lúmen e o tecido linfóide associado à mucosa (GALT). As células-tronco do epitélio intestinal controlam a renovação contínua da camada de células epiteliais. Células epiteliais diferenciadas, com a exceção de as células de Paneth, migram para cima do eixo cripta-vilo, como indicado pelas setas tracejadas. Células caliciformes secretoras e células de Paneth secretam muco e proteínas antimicrobianas (AMPs), respectivamente. A translocação de IgA secretora contribui para a função de barreira do epitélio especializado da mucosa. Células M (microfold cells) e células caliciformes medeiam o transporte de antígenos luminiais e bactérias vivas através da barreira epitelial para as células dendríticas (DC) e macrófagos residentes do intestino. Além disso, as células dendríticas e macrófagos que expressam CX3CR1, receptor da quimiocina fractalcina, podem emitir projeções através do epitélio intestinal e captar antígenos (O Pabst & Mowat, 2012). (Mazzini, Massimiliano, Penna, & Rescigno, 2014; Niess, 2005). (Adaptado de Peterson, 2014)

O contato antigênico pela mucosa pode levar a três principais consequências: a) uma reposta imune local com produção de IgA secretória (imunização local); b) uma reposta inflamatória

sistêmica com produção de anticorpos séricos específicos (imunização oral) que ocorre apenas mediante condições especiais de administração oral de antígenos; ou c) mais frequentemente, um fenômeno denominado tolerância oral (A. M. C. Faria & Weiner, 2006) .

### **1.1.Tolerância Oral e suas aplicações**

O fenômeno da tolerância oral refere-se aos mecanismos imunológicos desencadeados no GALT em resposta a antígenos ingeridos por via oral gerando homeostase da mucosa e imunorregulação de respostas inflamatórias sistêmicas. A indução da tolerância oral é capaz de suprimir a resposta imune humoral e celular, reduzindo os níveis de anticorpos séricos e a produção de citocinas (Afuwape, Turner, & Strobel, 2004; A. M. C. Faria et al., 2003), além de bloquear a reação de hipersensibilidade tardia – DTH ( a M. Mowat, Strobel, Drummond, & Ferguson, 1982). Foi demonstrado que a tolerância oral é uma ferramenta potencial para suprimir diversas imunopatologias (A. M. C. Faria & Weiner, 2006). Trabalhos recentes do nosso grupo mostram o efeito da indução da tolerância oral a proteínas administradas por via oral na prevenção da encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Rezende et al., 2013), na rejeição de transplantes prevenindo o efeito GVHD (do inglês, graft-versus-host disease) (Mercadante et al., 2014) e na colite ulcerativa experimental (Gomes Santos, 2012).

Para que o fenômeno ocorra, é necessário que os antígenos presentes na dieta penetrem a barreira da mucosa e tenha acesso a lâmina própria onde interagem com as células do sistema imune (Castro-Sánchez & Martín-Villa, 2013). As proteínas são degradadas no trato gastrointestinal durante o processo digestório e, poucos minutos após a ingestão dos alimentos, haptenos são encontrados na lâmina própria. Algumas proteínas, no entanto, entram intactas à lâmina própria (Husby et al., 1985). A apresentação desses antígenos na mucosa desencadeia a produção de citocinas com atividade supressora como a IL-10 e o TGF- $\beta$ . Inicialmente, essa atividade observada na mucosa intestinal foi atribuída a um aumento de células do tipo Th2 levando à supressão de células do tipo Th1 (Howard L Weiner, 1992; Howard L Weiner et al., 1994). Posteriormente, foi observado que a apresentação de antígenos na mucosa intestinal leva à indução de células T reguladoras antígeno-específicas que secretam preferencialmente as citocinas TGF- $\beta$ . , IL-10 e IL-4. Essas células reguladoras migram para os órgãos linfóides onde elas controlam/suprimem a resposta inflamatória (Faria & Weiner, 2005).

Três mecanismos não excludentes foram descritos para explicar o fenômeno da tolerância oral, e estão relacionados à dose do antígeno ingerido e à forma de administração. São eles: anergia, deleção clonal e regulação ativa induzida pela formação de células T reguladoras (A. M. C. Faria & Weiner, 2006). Ao contrário do que se imaginava, o antígeno tolerado não é ignorado pelo sistema imune. Ao contrário, a indução de tolerância é um processo ativo que envolve alta reatividade de linfócitos T (Castro-Junior et al., 2012).

As células T reguladoras foram descritas em 1995 por Sakaguchi e seus colaboradores como uma população de células T CD4<sup>+</sup> com capacidade supressora. Os autores demonstraram que essas células expressam constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2, o CD25. Essas células ficaram conhecidas como T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). Posteriormente, foi identificado o principal fator de transcrição dessa população linfóide, o Foxp3 (forkhead box P3) (Hori, 2003; Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003). Os trabalhos de Sakaguchi demonstraram que as células reguladoras autorreativas são geradas no timo, células reguladoras naturais (nTreg). No entanto, células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> reativas a antígenos externos também podem ser geradas em órgãos linfóides da periferia a partir de células T naïve, as chamadas células reguladoras induzidas (iTreg), sendo o intestino um sítio privilegiado para a indução dessas células. A presença da molécula neuropilina 1 na superfície das nTreg é capaz de diferenciá-las das iTregs (Weiss et al., 2012).

Outra importante população de células reguladoras são células TCD4<sup>+</sup> que expressam em sua superfície LAP (*latency associated peptide*). O LAP é um peptídeo que está associado de forma não covalente ao domínio amino-terminal do TGF- $\beta$ 1, formando um complexo de TGF- $\beta$ 1 latente (Howard L Weiner & Wu, 2011). Essas células T foram identificadas como células supressoras em estudos de modelos murinos de inflamação intestinal e denominadas Th3. O mecanismo supressor pelo qual essas células inibem a reatividade inflamatória de outros linfócitos T efetores ocorre através da liberação de TGF- $\beta$ 1. Essa citocina está presente em abundância no intestino, é capaz de promover, em linfócitos B, a troca de isotipo de imunoglobulinas para IgA e é fundamental na homeostase do intestino e de todo o corpo já que camundongos geneticamente deficientes em TGF- $\beta$ 1 apresentam eventos inflamatórios multifocais e morrem com 20 dias de idade (Shull et al., 1992). A produção aumentada de TGF- $\beta$ 1 foi detectada em diversos estudos sobre tolerância oral, o que demonstra a sua grande

importância no desenvolvimento deste fenômeno (A. M. C. Faria et al., 2003; H L Weiner, 2001).

## **1.2.Células Apresentadoras de Antígenos na Mucosa Intestinal**

As células apresentadoras de antígenos têm um papel central na conversão de células TCD4<sup>+</sup> em células reguladoras. Macrófagos residentes do intestino e células dendríticas (DCs) são fundamentais ao processo de manutenção do equilíbrio das respostas pro- e anti-inflamatórias. (Kelsall, 2008).

As DCs, são células apresentadoras profissionais que direcionam a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> efectoras, incluindo Th1, Th2, Th17, T reguladoras e células T CD8<sup>+</sup> (Coomes & Powrie, 2009). Várias populações de células dendríticas já foram descritas, e seu papel e fenótipo está intimamente relacionado ao microambiente. O sistema imune de mucosa possui um ambiente único, como já foi descrito anteriormente, o que favorece um perfil de células dendríticas CD103<sup>+</sup> capazes de produzir citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , ácido retinóico e expressar moléculas tolerogênicas como CTLA-4 e PDL-1 (Kelsall, 2008). A captação de antígenos pelas células dendríticas CD103<sup>+</sup> na lâmina própria do intestino delgado leva ao desencadeamento de uma resposta anti-inflamatória. Essas DCs migram para os linfonodos mesentéricos de uma maneira CCR7 dependente onde são capazes de direcionar a conversão de células TCD4<sup>+</sup> em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induzidas (iTregs) (Worbs, 2006). Além disso, elas podem induzir, em linfócitos T, a expressão de moléculas CCR9 e  $\alpha 4\beta 7$  que facilitam a sua migração para a mucosa intestinal (Coomes & Maloy, 2007).

As DCs participam na diferenciação de células B produtoras de IgA (BIgA<sup>+</sup>). Como classicamente as DCs são migratórias, essas células também migram para áreas ricas em células T dos linfonodos mesentéricos após ativação via receptores da imunidade inata (Kelsall, 2008).

Os macrófagos intestinais são células alta capacidade fagocítica e que possuem baixa capacidade migratória. Assim como as células dendríticas, os macrófagos residentes da mucosa intestinal têm características singulares típicas do tecido em que residem e, dessa forma, não podem ser classificados dentro do atual paradigma M1/M2 (A. M. Mowat & Bain,

2011). O intestino delgado abriga a maior população de macrófagos de todo o corpo, superando em números expressivos a população de células dendríticas nesse órgão. (B. Y. S. Lee, Starkey, & Gordon, 1985).

Os macrófagos residentes da mucosa intestinal têm como função a manutenção da integridade do epitélio através da secreção de PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>), entre outros mediadores que estimulam a renovação das células epiteliais (Calum C. Bain & Mowat, 2011) e a fagocitose de microrganismos que ganham a mucosa intestinal sem contudo, desencadear uma resposta inflamatória (Smythies et al., 2005). Desta forma, os macrófagos residentes do intestino, apesar de expressarem TLRs, permanecem em um estado em que são pouco responsivos à ativação inflamatória via esses receptores. Primordialmente, os macrófagos residentes expressam CX3CR1 e secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Takada et al., 2010) que, na presença de TGF- $\beta$ , contribuem para a manutenção do seu estado não inflamatório. (Denning, Wang, Patel, Williams, & Pulendran, 2007; Smith et al., 2011).

A IL-10 secretada por macrófagos intestinais contribui com a formação do ambiente tolerogênico necessário para a manutenção das células da mucosa, em destaque as células T reguladoras. Foi demonstrado que a IL-10 produzida por macrófagos residentes é necessária para a diferenciação e manutenção das células Treg. Camundongos deficientes em CX3CR1 têm reduzida população de macrófagos e células reguladoras no intestino, sendo que a tolerância oral não pode ser induzida nesses animais (Hadis et al., 2011). A origem e manutenção dessas células no intestino ainda levanta intensos debates na literatura. A população de monócitos do sangue é heterogênea e, segundo o paradigma corrente, uma população de monócitos Ly6C<sup>low</sup> circulantes daria origem aos macrófagos residentes e outra população Ly6C<sup>hi</sup> aos macrófagos inflamatórios (Geissmann, Jung, & Littman, 2003). Segundo Mowat, monócitos Ly6C<sup>hi</sup> migram para o intestino de uma maneira dependente de CCR2 e podem dar origem a macrófagos residentes ou inflamatórios de acordo com as condições do microambiente intestinal (A. M. Mowat & Bain, 2011). A população de macrófagos intestinais muda consideravelmente frente a uma perturbação na homeostase. Alterações no microambiente levam à acumulação de monócitos Ly6C<sup>hi</sup> que se diferenciam em macrófagos com características pró inflamatórias. Os macrófagos inflamatórios no intestino desempenham um importante papel na infamação do intestino através da secreção de citocinas como IL-6, IL-12, IL-23 e IL-1 $\beta$  (C C Bain et al., 2013; Calum C. Bain & Mowat, 2014a).

A células apresentadoras de antígenos (APCs) da mucosa intestinal mantêm o ambiente tolerogênico necessário para a manutenção da homeostase local. Como descrito, essas células estão intimamente relacionadas com a geração e manutenção de células T com perfil regulador no intestino e alterações nas subpopulações de APCs levam a um desequilíbrio de mediadores pro e anti-inflamatórios e ao surgimento de doenças inflamatórias locais com repercussões em outros sítios do corpo que tenham conexão direta com o intestino (Bouma & Strober, 2003). A estreita ligação entre o pâncreas e o intestino já foi demonstrada (Turley, Lee, Dutton-Swain, Mathis, & Benoist, 2005), sendo assim, torna-se indispensável avaliar alterações na mucosa intestinal que possam estar relacionadas ao desenvolvimento da diabetes autoimune.

## **2. Diabetes autoimune**

### **2.1. Patogênese e componentes genéticos**

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis. Representa de 5% a 10% dos casos de diabetes *mellitus*. Trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Gale, 2005).

Em indivíduos diabéticos é desencadeada uma resposta inflamatória contra antígenos do pâncreas. Estes antígenos são transportados por células dendríticas para o linfonodo pancreático onde irão ativar células T CD4<sup>+</sup> específicas, que migram para as ilhotas de Langerhans e iniciam uma resposta inflamatória dando origem à insulite (Yadav et al., 2004). Os mecanismos de destruição das células  $\beta$  pancreáticas envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias, liberação de radicais livres, ação de granzima e perforina e a indução de apoptose via Fas/Fas-L (Mathis, Vence, & Benoist, 2001; Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 1998). Já foi demonstrada a grande importância da resposta de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> na patogênese da DM1, sendo que a inflamação nas ilhotas é mediada principalmente por células Th1 e Th17. As células do tipo Th1 secretam citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2, que são mediadores chave da autoreatividade às células  $\beta$  pancreáticas. Inicialmente foi demonstrado que a transferência de células Th1 para camundongos NOD neonatos (modelo murino de

estudo da doença que será detalhado mais adiante) era suficiente para desencadear a diabetes (Katz, Benoist, & Mathis, 1995). Além disso, camundongos que não expressam o receptor de IFN- $\gamma$  falham em desenvolver a diabetes (Wang et al., 1997). A identificação das células Th17 proporcionou avanços no entendimento da patogênese da DM1, porém o completo esclarecimento de seu papel na doença apenas começa a ser desvendado (Haskins & Cooke, 2011; Shao et al., 2012). Já foi demonstrado que a frequência de células Th17 está aumentada em pacientes com diabetes tipo 1 (Honkanen et al., 2010). A importância dessas células na doença foi confirmada por estudos que mostram que o bloqueio da ação da IL-17 em camundongos NOD leva à redução do escore clínico da doença (Emamaullee, Davis, Merani, & Toso, 2009). Uma possível hipótese para explicar o papel das células Th17 é o ambiente favorável à conversão de Th17, como por exemplo, a alta secreção de IL-6 e IL-1 $\beta$  por monócitos, e ao mesmo tempo uma incapacidade de ação células Treg em indivíduos suscetíveis (Shao et al., 2012).

A participação das células Treg na patogenia do diabetes tipo 1 é notável, sendo que a progressão da diabetes é controlada por células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Bluestone & Tang, 2005; Shao et al., 2012). Porém, alguns autores sugerem que o seu efeito não estaria relacionado a alterações na frequência dessas células, mas sim a deficiências na sua capacidade funcional de supressão (D'Alise et al., 2008). Alguns autores sugerem um defeito, nos indivíduos diabéticos, na produção ou ação de IL-2, citocina fundamental para a sobrevivência e proliferação das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Setoguchi, Hori, Takahashi, & Sakaguchi, 2005; Sgouroudis, Kornete, & Piccirillo, 2011).

Já foram identificados polimorfismos em diferentes regiões do genoma que são associados à predisposição a diabetes. Os *loci* relacionados ao diabetes mellitus tipo 1 (DM1) são denominados pelo mesmo nome da doença, *IDDM*, do inglês *insulin dependent diabetes mellitus*. Vários *IDDM* foram identificados no genoma humano. O *IDDM 1* contém os genes do HLA, o HLA DR3-DQ2 e DR4-DQ8 são os tipos mais frequentes de MHC envolvidos na predisposição ao diabetes em humanos. Esses alelos são responsáveis por 50% da predisposição genética a DM1. Esses mesmos alelos são relacionados a outras desordens autoimunes como, por exemplo, a doença celíaca. (Kantárová & Buc, 2007). Regiões de *IDDM* incluem também genes associados à imunorregulação como AIRE, IL-2R, CTLA-4, PD-1. A ação efetora do células T e B inflamatórias juntamente com defeitos no mecanismo de imunorregulação leva a uma contínua destruição das ilhotas e à redução significativa da

massa de células  $\beta$  (entre 70 a 90%), o que resulta na perda progressiva da capacidade de produzir e secretar insulina e leva, a longo prazo, a um estado de deficiência absoluta desse hormônio (Tooley, Waldron-Lynch, & Herold, 2012).

Apesar do forte peso do fator genético, como toda doença autoimune, o DM1 também é muito influenciada por fatores ambientais, alimentares e pela microbiota. A região geográfica, forma de nascimento, dieta, infecções e uso de antibióticos tem sido associados ao desenvolvimento da DM1 (Wen et al., 2008).

Diante da variedade de fatores orquestrando o desenvolvimento do diabetes, é necessária uma análise ampla e minuciosa dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença com o objetivo de propor novas estratégias que possam controlar o curso da doença.

## **2.2. Modelos animais: NOD, um modelo valioso de diabetes autoimune**

Os modelos animais são de fundamental importância no auxílio do entendimento da patogênese e etiologia do DM1. Existem muitos modelos animais de diabetes tipo 1 que são divididos em modelos químicos e espontâneos. Em cada modelo, a maneira como animal desenvolve a doença pode variar, sendo que a escolha do modelo se dá em função do objetivo de estudo.

Foram descritos modelos químicos que utilizam a administração de estreptozotocina (STZ) ou aloxano, substâncias tóxicas para as células  $\beta$  pancreáticas, em animais experimentais. Ambos podem induzir a hiperglicemia com baixas doses de administração. Seu uso leva a efeitos específicos pois essas drogas são transportadas para as células  $\beta$  pancreáticas a partir do transportador de glicose GLUT2. Há outros modelos de animais com predisposição genética que desenvolvem espontaneamente a doença (King & Bowe, 2015). Dois modelos animais são amplamente utilizados em estudos do DM1, o rato BB do inglês *Bio-breeding*, um rato que desenvolve espontaneamente o diabetes e o camundongo NOD (*non obese diabetic*). Ambos os modelos apresentam muita similaridade com o DM1 em humanos, porém, como a diabetes é claramente uma doença mediada por células T, os camundongos NOD apresentam grande vantagem sobre os ratos BB que são linfopênicos. (Pearson, Wong, & Wen, 2015).

O camundongo NOD (*non obese diabetic*) é um modelo espontâneo de diabetes tipo 1. Trata-se de uma linhagem isogênica de camundongos que foi desenvolvida por Makino e colaboradores em 1980 no Japão. A seleção de caracteres em uma linhagem não isogênica com propensão ao desenvolvimento de catarata, Jcl:ICR, a partir de cruzamentos sucessivos entre irmãos, levou à criação de uma nova linhagem de camundongos com predisposição ao desenvolvimento espontâneo de diabetes. O camundongo NOD é um excelente modelo de doença autoimune e uma importante ferramenta para se entender e explorar os mecanismos de tolerância (Anderson & Bluestone, 2005).

A incidência da doença nesses animais varia com o sexo, sendo maior a frequência em fêmeas (60% a 80%) do que em machos (20% a 30%). A incidência também é muito influenciada pela ação de fatores ambientais. Camundongos mantidos em condições livres de patógenos específicos (*specific pathogen free*, SPF) têm maior propensão a desenvolver DM1 (Jean François Bach, 2002).

Assim como em humanos, o mais importante fator genético associado à doença é o MHC sendo que camundongos NOD expressam a molécula de MHC-II I-A<sup>g7</sup>, gene ortólogo ao HLA-DQ em humanos (Kanagawa, Martin, Vaupel, Carrasco-Marin, & Unanue, 1998). Os demais genes associados ao diabetes estão espalhado pelo genoma e, em camundongos, são chamados *idd* (*insulin dependent diabetes*) (Pearson et al., 2015).

Estudos histopatológicos demonstram que é possível observar células dendríticas e macrófagos na periferia das ilhotas  $\beta$  pancreáticas de camundongos NOD de 3 a 4 semanas de idade (Jansen et al., 1994). Esse infiltrado periférico precede o infiltrado de linfócitos que é observado por volta da oitava ou décima semana e é necessário para o desenvolvimento da doença. Quando macrófagos e células dendríticas são depletados, camundongos NOD não apresentam infiltrado inflamatório no pâncreas e não desenvolvem a doença (Nikolic, Geutskens, van Rooijen, Drexhage, & Leenen, 2005). Similarmente, essas células também são identificadas em infiltrados pancreáticos de humanos diabéticos (Willcox, Richardson, Bone, Foulis, & Morgan, 2009).

As células T autorreativas no camundongo NOD são específicas para antígenos presentes nas ilhotas  $\beta$  pancreáticas, incluindo epitópos da insulina, glicose-6-fosfatase,

glutamato descarboxilase (GAD65) e proteína transportadora de zinco (ZNT8). Similarmente esses são antígenos alvo encontrados em humanos com diabetes (Pearson et al., 2015). Vários estudos levantam hipóteses para a causa da autoreatividade típica do diabetes. Alguns mostram defeitos na seleção negativa que podem estar relacionados a uma ligação ineficiente de peptídeos próprios ao MHC no timo (Kishimoto & Sprent, 2001), alguns identificaram alterações morfológicas no timo (Dardenne, 1993), outros ainda propõem que a expressão alterada do gene da AIRE está envolvida e que a formação de células T autoreativas no timo ocorre de uma maneira dependente da idade (He et al., 2013).

Devido ao imenso valor dessa linhagem como modelo experimental, o camundongo NOD é utilizado amplamente como ferramenta de estudo do DM1. Muitos estudos utilizam, como controle, linhagens isogênicas não relacionadas ao NOD, mas resistentes ao desenvolvimento do diabetes, tais como camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6. Com o objetivo de minimizar a heterogeneidade genética em estudos comparativos, foi desenvolvida a linhagem NOR (NOR/LtJ – *non obese resistant*) como controle mais apropriado. (Prochazka, Serreze, Frankel, & Leiter, 1992).

Camundongos NOR são uma linhagem congênica recombinante em que regiões limitadas do genoma de camundongos NOD/LtJ foram substituídas por porções do genoma de camundongos C57BLKS/J. Apesar de compartilhar a maior parte do genoma com o NOD, incluindo o haplótipo de MHC-II I-A<sup>g7</sup> e muitos outros *loci idd*, os camundongos NOR são resistentes à insulite e não desenvolvem diabetes. Nesses camundongos, os alelos de resistência recebidos da linhagem C57BLKS estão localizados nos cromossomos 1, 2 e 4 favorecendo o estado de resistência à autoimunidade (Serreze et al., 1994).

### **2.3. A arte circunstancial: A Diabetes e o Intestino**

O desenvolvimento do pâncreas ocorre a partir da endoderma do intestino, o que demonstra uma estreita relação entre esses dois órgãos. Estudos recentes demonstram que o intestino e o tecido linfóide associado a ele podem ser fortes reguladores da progressão da insulite. O papel das células do sistema imune associadas ao intestino na patogênese do DM1 tem se tornado cada vez mais claro por estudos pioneiros mostrando que a dieta e a microbiota estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da diabetes autoimune (O. Vaarala, Atkinson, & Neu, 2008). Foi demonstrado que o linfonodo pancreático (PLN) drena

antígenos próprios do pâncreas, mas também drena antígenos externos do trato gastrointestinal e da cavidade peritoneal. Além disso, perturbações na fisiologia do intestino parecem ter um impacto direto na ativação de células T reativas às células  $\beta$  pancreáticas. (Turley et al., 2005). A organização do tecido linfóide associado à mucosa intestinal bem como a integridade da barreira de células epiteliais são essenciais para a composição do microambiente necessário para a manutenção da homeostase do organismo. A perda ou alteração de algum desses componentes pode levar ao estado de doença, como demonstra um estudo realizado em ratos com DM1 (*biobreding rats*) que apresentam aumento da permeabilidade intestinal em associação com o desenvolvimento do DM1 (Neu et al., 2005). Em camundongos NOD, o aumento da permeabilidade intestinal também foi associado ao desenvolvimento do diabetes. No modelo estudado, a infecção com uma bactéria que causa quebra da barreira epitelial, *Citrobacter rodentium*, acelera o desenvolvimento do diabetes. (a. S. Lee et al., 2010). Estudos em animais e em humanos relatam ainda que a manipulação de componentes da dieta pode acelerar ou impedir o desenvolvimento do DM1 (Knip et al., 2010; Visser et al., 2010). Além disso, a exposição a antígenos alimentares constituintes do trigo podem desencadear autoimunidade a células  $\beta$  em crianças com predisposição genética (Norris, 2003).

A microbiota intestinal é composta de uma grande diversidade de microrganismos que constantemente estimula e modifica o sistema imune do hospedeiro. Existe uma rede complexa de interações entre esses dois componentes, de forma que as modificações ocorrem em uma via de mão dupla. Evidências recentes sugerem que as bactérias do intestino desempenham um papel primordial no desenvolvimento do diabetes em modelos animais e em humanos (Atkinson & Chervonsky, 2012). Em camundongos NOD, a incidência da doença aumenta à medida que os animais são mantidos em condições de maior controle sanitário e da microbiota (Bach, 2002). Uma resposta anormal de células T contra a própria microbiota foi demonstrada em camundongos NOD, o que sugere que não apenas alterações na composição microbiana, mas também falhas em tolerar as bactérias comensais podem estar envolvidas na patogênese da doença (Alam et al., 2010; He et al., 2013).

As evidências de que a diabetes autoimune pode ser influenciada por componentes do intestino fundamenta este trabalho. Os competentes intestinais e células do sistema imune associados à mucosa ainda são pouco estudados nesse contexto, porém o entendimento do papel dessas interações entre a mucosa intestinal e o pâncreas pode levar a novas estratégias

terapêuticas para o diabetes tipo 1.

## **Material e Métodos**

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos NOD (*non-obese diabetic*), fêmeas, obtidos do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da UNIFESP sendo sua origem o Jackson Laboratory nos Estados Unidos. E camundongos NOR (*non obese resistant*) fêmeas obtidos diretamente do Jackson Laboratory. As Colônias desses animais foram geradas e mantidas no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB, UFMG, sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água ad libitum.

Para que os camundongos NOD desenvolvessem a diabetes autoimune espontaneamente e em alta taxa, estes foram mantidos em condições de extrema limpeza e cuidado (microisoladores, água e ração esterilizados e dispostos em estantes ventiladas com filtração de ar). Essa condição é essencial para a suscetibilidade à doença, como bem relatado pela literatura (Anderson & Bluestone, 2005).

#### **3.2. Avaliação da incidência de diabetes autoimune**

Os níveis glicêmicos foram monitorados semanalmente através da coleta de uma mínima amostra do sangue periférico obtido da cauda para dosagem em fitas apropriadas para glicosímetro automático (Accu-Check Active – Roche). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram duas medidas seguidas de glicose superiores a 250mg/dl.

#### **3.3. Obtenção das amostras**

Os animais foram anestesiados utilizando 100µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7 mg/Kg) e Xilazina (0,33mg/Kg). Em seguida foi coletado, sangue, linfonodos mesentéricos e pancreáticos, pâncreas, placas de Peyer, intestinos.

### **3.4. Coleta do lavado intestinal**

O conteúdo do intestino delgado foi coletado logo após a retirada do mesmo para a dosagem de IgA secretória (sIgA). Uma perfusão de 10ml de salina tamponada (PBS) 1x gelada utilizando seringa e agulha por uma das extremidades do intestino foi realizada e o lavado intestinal foi coletado em tubos Falcon de 15ml pela outra extremidade. Após a coleta, o conteúdo foi centrifugado a 4 °C, na velocidade de 1200 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado no mesmo dia para a dosagem de sIgA.

### **3.5. Avaliação histológica**

Amostras do intestino delgado e pâncreas de camundongos foram colhidas ao final de cada tempo experimental e armazenadas em formalina tamponada a 10%. Após, o material foi desidratado em soluções crescentes de alcoóis, clarificado em xilol e incluído em parafina. Foram obtidos cortes de 5 µm para posterior coloração. A coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) foi utilizada para a avaliação do infiltrado inflamatório nas células β pancreáticas no pâncreas e avaliação de linfócitos intraepiteliais, tamanho das vilosidades e presença ou ausência de infiltrado inflamatório no intestino delgado.

A técnica de ácido periódico + reativo de Schiff (PAS) (*do inglês Periodic acid-Schiff*), foi utilizada para a análise de células caliciformes no intestino delgado.

Foram obtidas imagens das lâminas histológicas a partir do microscópio Olympus BX41 (Olympus, Center Valley, PA, USA).

#### **3.5.1. Avaliação histopatológica do pâncreas**

Todas as ilhotas de cada animal foram contadas e avaliadas quanto à progressão da insulite. Foi atribuído um número de 0 a 3 para ilhotas sem insulite, com peri-insulite ou insulite invasiva com <50% de acometimento e >50% de acometimento respectivamente. A avaliação foi feita de acordo com a frequência de ilhotas com diferentes estágios de acometimento em cada animal.

### 3.5.2. Avaliação histopatológica do intestino delgado

- **Altura das vilosidades:**

Apenas vilosidades com conjuntivo visível e epitélio definido, foram medidas. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 4 secções diferentes, 20 vilosidades por animal, utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 10X.

- **Contagem de linfócitos intraepiteliais (IEL):**

Foram capturadas imagens de lâminas histológicas coradas com H&E no aumento de 200X em microscópio óptico. Os IEL foram identificados pela sua localização característica: basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular. Para cada animal, foram contados 500 enterócitos, segundo a descrição de Ferguson e Murray (1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

- **Contagem de células caliciformes:**

O epitélio intestinal foi examinado em lâminas histológicas coradas com PAS em aumento de 100X em microscópio óptico. As células caliciformes foram identificadas pela sua coloração em tom de rosa escuro. Foi considerado 5 cm de superfície do vilio em cada animal. As células caliciformes foram quantificadas neste intervalo. O resultado foi expresso em quantidade média de células caliciformes por centímetro de superfície do vilão.

- **Determinação do tamanho da célula caliciforme:**

O tamanho da célula caliciforme representa a área produtora de muco de cada célula identificada, a medição foi feita com o auxílio do software ImageJ. Foram consideradas duas sessões fotografadas no aumento de 100X de lâminas histológicas coradas com PAS para cada animal.

A imagem foi binarizada para posterior quantificação dos pixels e tamanho médio de cada célula.



**Figura 2:** *Representação do esquema de binarização da imagem utilizado para análise da produção de muco.*

Processamento e cálculos realizados com o auxílio do software ImageJ.

### **3.6. Tratamento para indução de Tolerância Oral**

Camundongos NOD fêmeas de 6 semanas de idade receberam tratamento oral com solução contendo 4 mg/ml de ovalbumina (OVA, grau 3, Sigma) (Grupo OVA oral) por ingestão voluntária por 24 horas. Como o consumo médio de líquido dos camundongos no nosso biotério é de 5 ml/dia (da Silva Menezes et al., 2003; A. de Faria et al., 1998; Oliveira, Santiago, Ficker, Gomes-Santos, & Faria, 2015) a dose final de OVA consumida por via oral ao final do dia é de 20 mg. O grupo controle recebeu apenas água. Sete dias depois, os animais foram imunizados com uma injeção i.p. de 0,2 ml de solução salina contendo 10µg de OVA e 1mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)<sub>3</sub>]. Quatorze dias após a primeira imunização, os camundongos receberam a mesma dose de OVA solúvel em salina, via intraperitoneal. Sete dias depois, o soro foi coletado para testes..

### **3.7. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para medida de imunoglobulinas**

A determinação dos títulos de anticorpos séricos IgG1 anti-OVA, e IgA no lavado intestinal bem como a quantificação de citocinas no tecido intestinal foram determinados por ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*.

- **Medida de IgG1 anti-OVA**

Placas de poliestireno (Sarstedt) foram sensibilizadas com 2 µg de ovalbumina por poço em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. No dia posterior, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 0,25% de caseína por uma hora a temperatura

ambiente (200  $\mu$ l/poço). O soro foi diluído a partir de 1:200. Foram feitas diluições seriadas (1:2) e utilizado soro de animal não imunizado como controle negativo da reação. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e, então, lavadas com salina-tween e expostas a solução contendo anticorpos anti-IgG1 de camundongos ligados a peroxidase (*goat anti-mouse* IgG1-HRP, Southern Bioetch). Após uma hora de incubação a 37°C, finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100  $\mu$ l/poço, A reação foi paralisada pela adição de 20  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em comprimento de onda de 492 nm

O resultado de cada animal foi calculado utilizado o método do somatório das absorbâncias em 8 diluições do soro (entre 1:100 e 1:12,800). Este método representa mais precisamente os títulos de anti-corpos séricos como foi previamente descrito em (Carvalho & Vaz, 1996; Oliveira et al., 2015).

- **Medida de IgA secretória**

As placas de poliestireno (Sarstedt) foram sensibilizadas com 100 $\mu$ l/poço de solução contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1 mg mL<sup>-1</sup> (Southern Biotechnology) e diluídos (1:2000) em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. No dia posterior as placas foram bloqueadas com PBS-caseína PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200  $\mu$ l/poço).

O sobrenadante do muco foi diluído 1:80. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) As placas foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas, cinco vezes com salina-tween. Anticorpos anti-IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100  $\mu$ L/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37 °C. A seguir, foram lavadas e adicionou-se uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) em um diluição 1:10000 (100  $\mu$ l/poço) em PBS-0,25% caseína durante uma hora a temperatura ambiente. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL

de tampão citrato 100  $\mu$ l/poço, A reação foi paralisada pela adição de 20  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em comprimento de onda de 492 nm.

Essa reação de ELISA acima descrita teve como controle positivo (padrão), anticorpos purificados IgA (10 mg mL<sup>-1</sup>) de camundongo (Southern Biotechnology) em uma diluição 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

- **Determinação da produção de citocinas**

As placas (*Nunc-Immuno Plates MaxiSorp*) foram incubadas com solução de anticorpo monoclonal anti-IL10 murino diluído em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas overnight a 4°C. No dia posterior as placas foram bloqueadas com PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200  $\mu$ l/poço). Em seguida, os sobrenadantes dos extratos de intestino foram adicionados às placas e as mesmas foram incubadas overnight a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas nOVAMENTE com salina com 0,05% de Tween-20 e posteriormente foi adicionado o anticorpo monoclonal conjugado com biotina específico para a citocina em questão. Após 2 horas de incubação, as placas foram nOVAMENTE lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma) diluída 1:15000 vezes em PBS contendo 0,5% caseína durante uma hora a 37 °C. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100  $\mu$ l/poço, A reação foi paralisada pela adição de 20  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em comprimento de onda de 492 nm.

### **3.8.Obtenção de suspensões celulares dos órgãos linfoides**

Foi utilizado meio RPMI 1640 (Life Technologies) enriquecido com 2nM de L-glutamina, 50mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina, 1mM de piruvato de sódio,

0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado.

As suspensões de células das placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e pancreáticos foram preparados a partir da maceração sobre filtros de nylon (cell strainer BD). Após centrifugação as células foram ressuspensas em meio RPMI e contadas em câmara de Neubauer utilizando-se o corante eritrocina. Para os experimentos em que foram avaliadas células apresentadoras de antígenos, anteriormente a maceração, os tecidos foram digeridos durante 1h a 37°C com meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Life Technologies) contendo 0.17 mg/ml de Liberase TL (Roche) e 30µg/ml de DNase I (Roche).

### **3.9.Obtenção de células da lâmina própria intestinal**

O intestino delgado foi disposto em placas de Petri contendo HBSS gelado para posterior processamento. As placas de Peyer foram removidas do intestino e após delicada e minuciosa remoção de muco, fezes e tecido gorduroso aderido aos intestinos, os mesmos foram abertos longitudinalmente e fracionados em porções de cerca de 2cm. Depois de 3 lavagens com agitação manual e filtração do tecido em rede de metal, os tecidos foram incubados durante 15 minutos a 37 em HBSS contendo 0.15mg/ml de DTT (Dithiothreitol, Sigma) para desestruturação da camada epitelial. Posteriormente os tecidos foram agitados manualmente para remoção das células epiteliais e filtrados novamente. O tecido restante foi então incubado por 1h a 37°C em meio IMDM (Life Technologies) contendo 10% de SFB, 0.17 mg/ml de Liberase TL (Roche) e 30µg/ml de DNase I (Roche) para desagregar a matrix extracelular e permitir extração dos leucócitos. Após este período as células foram centrifugadas, lavadas e filtradas por duas vezes em filtros de nylon (cell strainer, BD) de 70µm e 40µm. A concentração celular foi determinada e as células isoladas foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

### **3.10. Citometria de Fluxo**

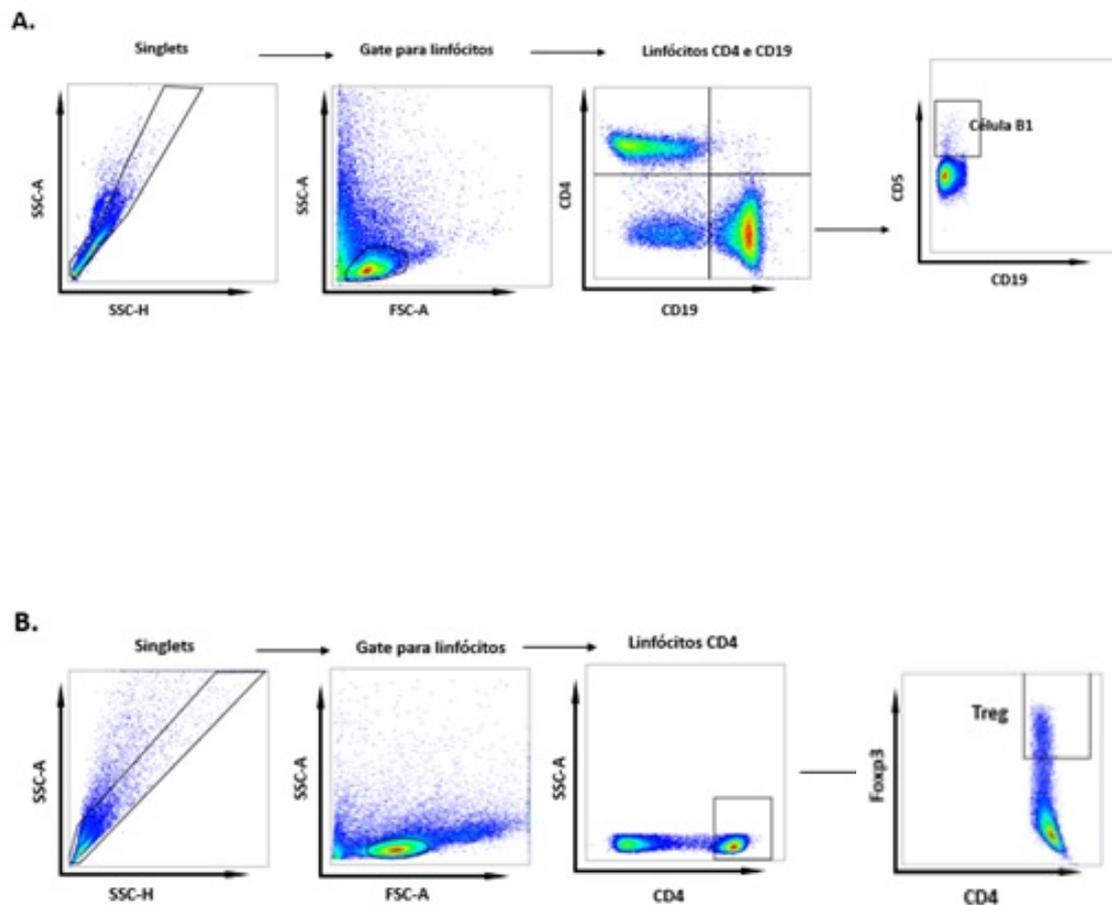
#### **3.10.1. Imunofenotipagem**

Depois de isoladas dos órgãos linfoides, as células foram incubadas em tubos de poliestireno por 10min com anticorpo Fc-block (BD Pharmingen) e então por mais 20

minutos a 4°C com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para moléculas de superfície. Para a marcação intracelular do fator de transcrição Foxp3, após essa primeira etapa, foi utilizado kit de fixação/permeabilização comercial (e-Bioscience) e em seguida as amostras foram incubadas por mais trinta minutos com anticorpos anti-foxp3 de camundongo. Após as lavagens com PBS-BSA (albumina sérica bovina 0.5%), as amostras foram fixadas com paraformaldeído 3% durante 30 minutos, lavadas e armazenadas em PBS-BSA a 4°C para leitura no citômetro. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura de seis parâmetros FACScalibur, acoplado a um computador com o software Cell Quest ou em FACScanto, acoplados a um computador com o software Diva. A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (*Forward Scatter x Side Scatter*), foram delimitadas as populações de interesse e, a partir destas, foram gravados 50 mil eventos para análise de linfócitos e 300 mil eventos para APCs para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra. Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. A estratégia para determinação de cada população de interesse está esquematizada nas **Figuras 3 e 4**.

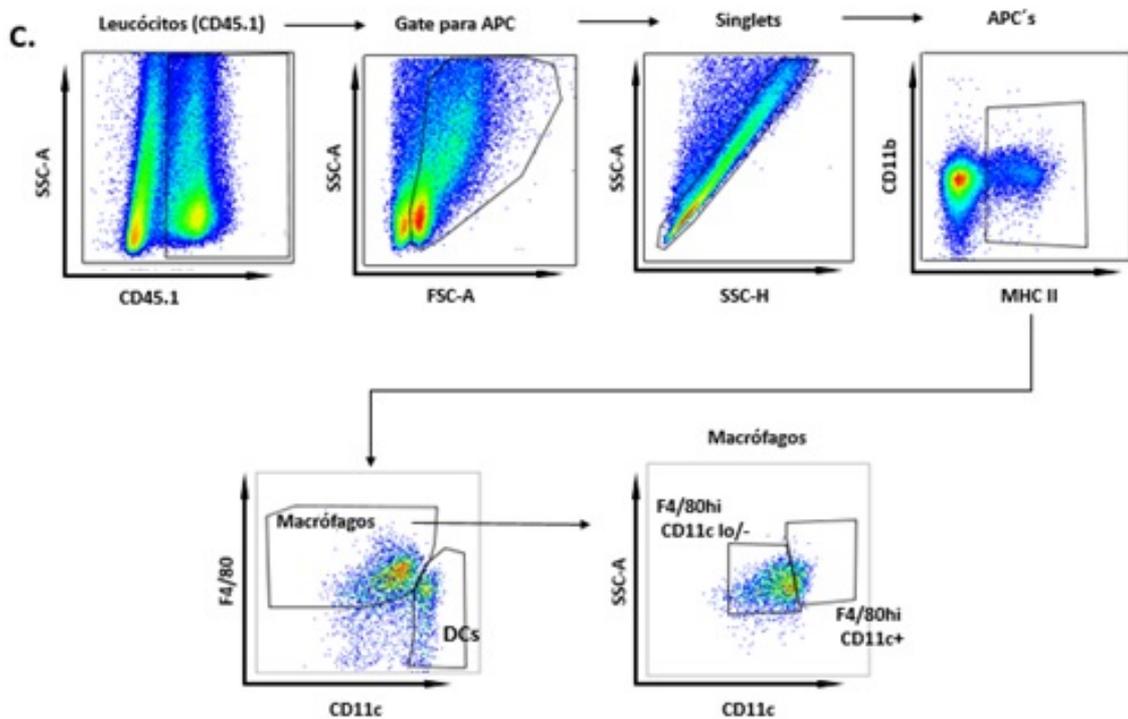
### **3.10.2. Estratégias de determinação das populações de interesse**

As células extraídas das placas de Peyer foram avaliadas por citometria de fluxo. Células B e T CD4<sup>+</sup> foram identificadas através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (*gate* para linfócitos) e posterior separação de células CD19<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (linfócitos B e T). Em seguida, foram selecionadas células CD5<sup>+</sup> (B1). Os *dot plots* da figura 3 representam a estratégia de análise.



**Figura 3: Imunofenotipagem de células TCD4 e B da placa de Peyer e linfonodo mesentérico.**

(A), As células foram extraídas das placas de Peyer e, devido a dificuldade de obtenção de um número grande de células do órgão, avaliamos cada grupo em pool de células. Em seguida, foi feita a avaliação por citometria de fluxo. Os linfócitos T e B foram identificadas através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para linfócitos) e posterior separação pela expressão de CD4, CD19 e CD5. (B) As células foram extraídas dos linfonodos mesentéricos. Em seguida, foi feita a avaliação por citometria de fluxo. Os linfócitos T foram identificadas através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para linfócitos) e posterior separação pela expressão de CD4, CD44 e Foxp3. Os dot plots representam a estratégia de análise das células das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos.

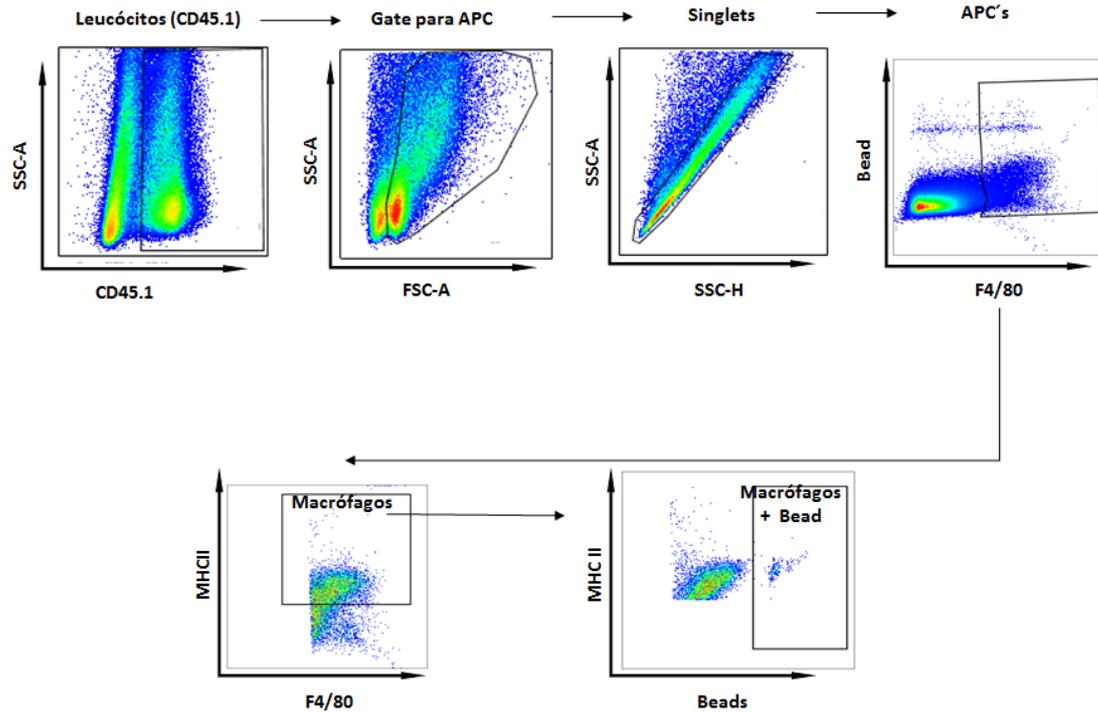


**Figura 4: Imunofenotipagem de células apresentadoras de antígenos (APCs).**

As células extraídas da lâmina própria do intestino delgado foram avaliadas por citometria de fluxo. Foram selecionadas células CD45.1+ (leucócitos totais), com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para APCs) e não agregadas entre si (singlets). Em seguida, foram selecionadas as APCs pela expressão de MHC II e CD11b. Dessas células, as que possuíam expressão elevada de F4/80 (hi) e média ou baixa expressão de CD11c (med/low) foram consideradas macrófagos. As células restantes (CD11chi) foram consideradas células dendríticas (DCs). Os macrófagos foram separados pela expressão de CD11c em duas populações identificadas. Os dot plots representam a estratégia de análise utilizada.

### 3.10.3. Ensaio de fagocitose com esferas (beads)

As células da lamina própria do intestino marcadas com anticorpos anti CD45.1, F4/80 e MHC II de camundongo foram incubadas por 45 min a 37°C na presença de microesferas fluorescentes (Fluoresbrite Plain Yellow Gold 1- $\mu$ m Microspheres). As células foram, então, lavadas 5 vezes e armazenadas em PBS-BSA a 4°C para leitura no citômetro. A estratégia de análise está demonstrada na **Figura 5**.



**Figura 5: Análise do ensaio de fagocitose.**

As células extraídas da lâmina própria do intestino delgado e incubadas com as esferas (beads) foram avaliadas por citometria de fluxo. Primeiramente, foram selecionadas células expressando CD45.1 (leucócitos totais), com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para APCs) e não agregadas entre si (singlets). Em seguida, foram selecionados macrófagos pela expressão de F4/80. Dessas células, as que possuíam expressão elevada de MHCII (hi) foram consideradas macrófagos. Em seguida, foi quantificada a população de macrófagos positiva para as beads. Os dot plots representam a estratégia de análise utilizada.

## **Resultados**

## 4. Resultados

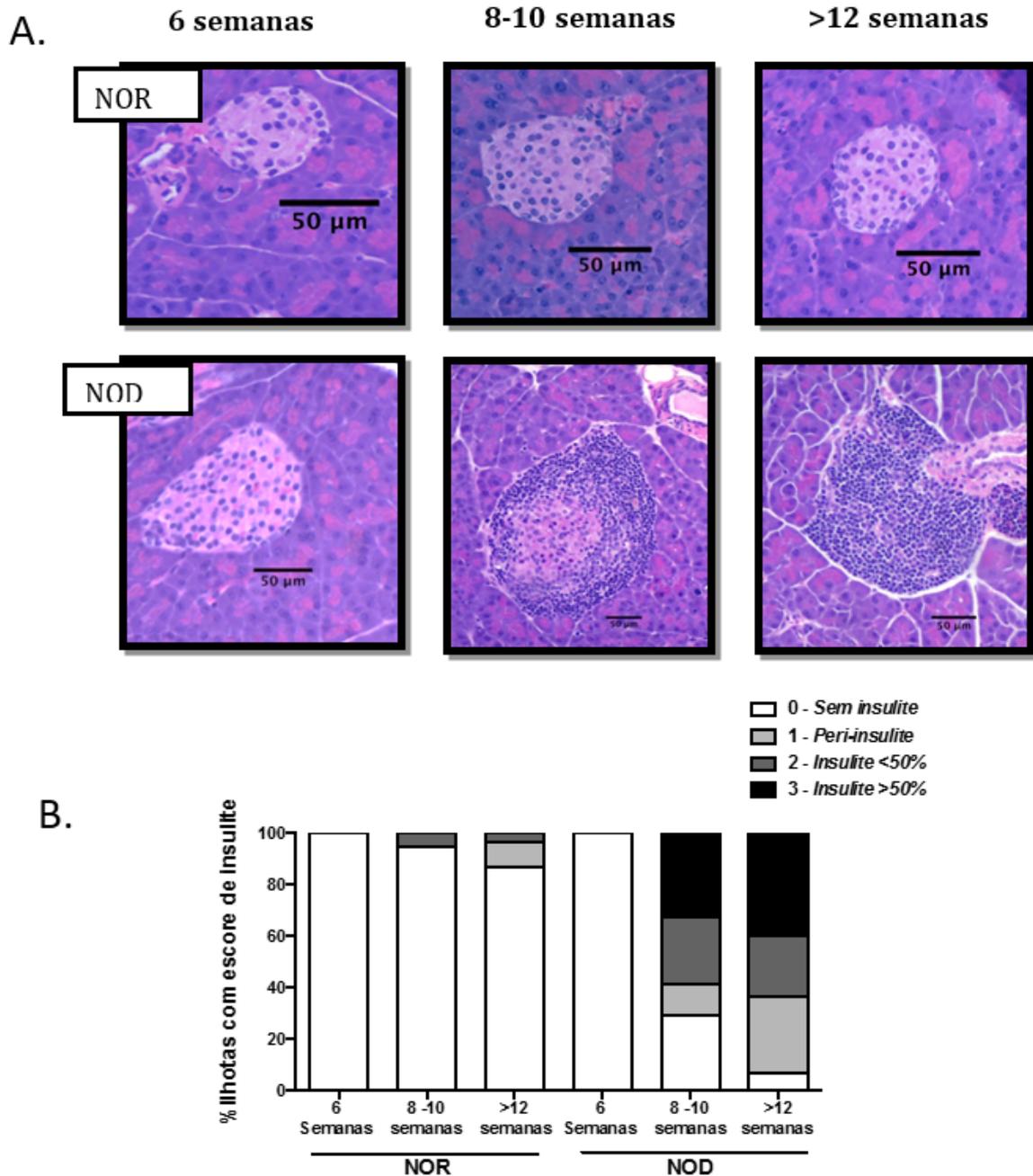
### 4.1. Pâncreas de camundongos NOD apresentam infiltrado inflamatório progressivo durante o desenvolvimento da diabetes tipo 1.

Camundongos NOD desenvolvem diabetes espontaneamente. O estabelecimento da doença se dá geralmente por volta de 12 a 14 semanas de idade em fêmeas podendo surgir também em idades mais avançadas. Estudos histológicos mostram que é possível observar o início do infiltrado inflamatório em camundongos com três a quatro semanas de idade (Anderson & Bluestone, 2005). Essa reação inicial é chamada de peri-insulite que consiste na presença de poucas células inflamatórias circundando a ilhota  $\beta$  pancreática. O infiltrado pode progredir e invadir as ilhotas nas semanas que se seguem tornando-se uma insulite invasiva. Dessa forma, na décima semana de vida, grande parte dos camundongos NOD apresentam alta porcentagem de ilhotas  $\beta$  com grave insulite. A partir de então, ocorre a destruição das células  $\beta$  e a queda da produção da insulina que pode ser constatada por altos níveis de glicose no sangue.

Com o objetivo de avaliar a progressão da doença em nosso modelo, analisamos cortes histológicos com coloração em H&E do pâncreas de camundongos NOD e NOR com 3 diferentes idades: seis semanas, oito a 10 semanas e acima de 12 semanas (**Figura 6**).

A glicemia foi avaliada em todos os grupos e somente os camundongos NOD com idade maior que 12 semanas apresentavam elevados índices glicêmicos ( $>250\text{mg/d}$ ) sendo considerados diabéticos.

Conforme esperado, os camundongos NOD apresentam infiltrado inflamatório progressivo com o avanço da idade, sendo possível observar uma grande presença de células inflamatórias após a oitava semana e acometimento generalizado da ilhota após a décima segunda semana. Já os camundongos NOR, que compartilham o mesmo fundo genético que camundongos NOD, porém com genes de resistência ao diabetes, apresentam pouco ou nenhum infiltrado em todos os tempos de vida (**Figura 6**).



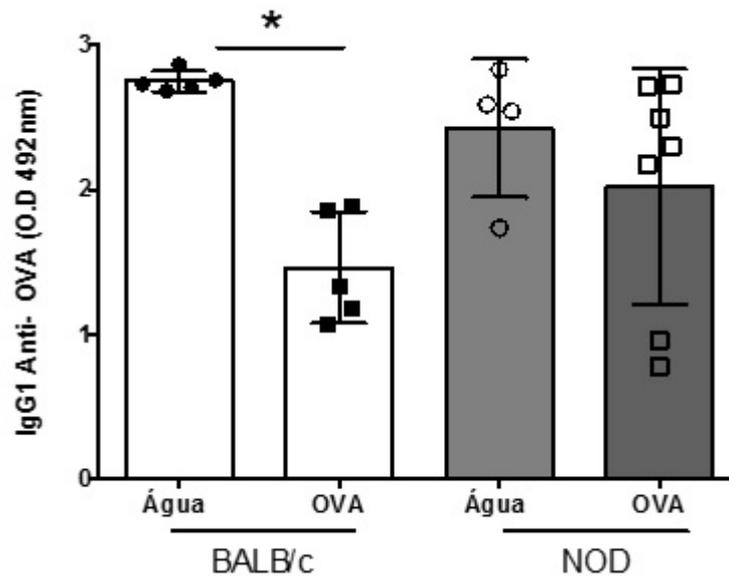
**Figura 6: Infiltrado inflamatório nas ilhotas  $\beta$  pancreáticas de camundongos NOD.**

(A) Fotos representativas de cortes histológicos do pâncreas de camundongos NOD e NOR com 6 semanas, 8 a 10 semanas e acima de 12 semanas de idade corados por hematoxilina e eosina (H&E) e examinados no microscópio ótico no aumento de 40x. (B) Foi avaliado o estágio de progressão da insulite em cada ilhota  $\beta$  pancreática de todos animais e atribuído valores de escore: sem insulite = 0, Peri insulite = 1, insulite invasiva < 50% = 2, insulite invasiva > 50% = 3. O gráfico representa a porcentagem de cada estágio identificado (n= 4 animais por grupo).

#### **4.2. Camundongos NOD são refratários à indução de tolerância oral.**

Em experimentos preliminares do nosso grupo, observamos que existe uma dificuldade em se estabelecer a tolerância oral em camundongos NOD fêmeas (Oliveira, 2014). A tolerância oral é classicamente definida como a supressão da resposta imune a antígenos que tenham sido previamente administrado por via oral (Faria and Weiner, 2006). Este fenômeno leva a formação de células reguladoras na periferia que participam de uma resposta local e sistêmica. Falhas na indução de tolerância oral podem levar a desordens como doenças inflamatórias intestinais (A. M. C. Faria & Weiner, 2006) e estão geralmente associadas a defeitos na geração de mecanismos imunorreguladores na mucosa intestinal. Nos experimentos anteriores do nosso grupo com esses camundongos (Oliveira, 2014), não estava clara a associação entre os defeitos na indução de tolerância oral e o desenvolvimento da diabetes tipo 1.

Em nosso modelo experimental, o infiltrado inflamatório mais evidente que leva ao estabelecimento da diabetes foi detectado após a oitava semana de idade, não sendo observado em camundongos NOD com 6 semanas. Com o objetivo de relacionar a capacidade de indução da tolerância oral com a progressão da insulite, avaliamos o estabelecimento da tolerância oral em camundongos com 7 semanas de idade (Figura 7). Camundongos NOD fêmeas e camundongos BALB/c, foram submetidos ao protocolo de indução de tolerância oral pelo tratamento com solução salina contendo 4 mg/ml de ovalbumina (OVA) e imunização com o mesmo antígeno 7 dias depois. Ao término do protocolo experimental, os camundongos foram eutanasiados e a produção de anticorpos IgG1 anti-OVA foi medida por ELISA. O protocolo utilizado, de ingestão contínua do antígeno, favorece o estabelecimento da tolerância oral como já foi demonstrado pelo nosso grupo (Oliveira et al., 2015). Como esperado, os camundongos BALB/c tratados por via oral com OVA apresentaram uma redução dos títulos de anticorpos específicos (IgG1) anti-OVA quando comparados a seus controles não tratados. No entanto, não houve diferença significativa na produção de IgG1 anti-OVA entre os grupos de camundongos NOD que receberam OVA ou apenas água por via oral. Assim, o estabelecimento da tolerância oral estava comprometido em camundongos NOD antes mesmo da progressão da insulite.

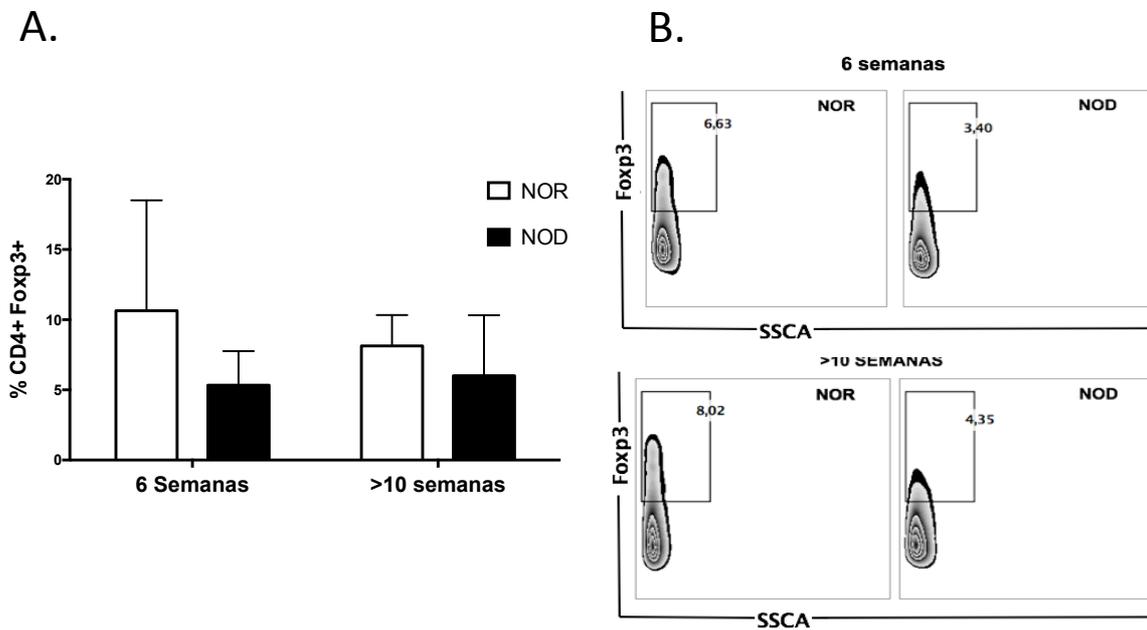


**Figura 7: Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD.**

Camundongos NOD de 7 semanas de idade receberam de solução contendo 4mg/ml de OVAAlbumina (grupo OVA oral) ou apenas água (grupo água) por ingestão voluntária por 24 horas. Sete dias depois, os animais foram imunizados i.p. com 10 ug de OVA e 1mg de hidróxido de alumínio – Al(OH)<sub>3</sub>. Quatorze dias depois, os camundongos receberam um booster de 10 ug de ovalbumina (OVA) solúvel. Os anticorpos IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA. As barras representam a média ± SEM do somatório da absorbância de cada amostra.

Para que a tolerância oral ocorra, é necessário que células dendríticas CD103<sup>+</sup> carregando antígenos da lâmina própria migrem para os linfonodos mesentéricos onde auxiliam na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naive em células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (O Pabst & Mowat, 2012). Foi demonstrado pelo nosso grupo que a frequência de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> é reduzida em camundongos NOD diabéticos (>12 semanas de idade) quando comparados com camundongos resistentes a diabetes NOR da mesma idade (Oliveira, 2014). As células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induzidas são indispensáveis para a indução da tolerância oral já que a eliminação dessas células impede completamente o estabelecimento dessa tolerância em camundongos (Hadis et al., 2011). Diante disso, avaliamos a frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD em idades anteriores aos sinais clínicos da doença e comparamos com seus controles NOR da mesma idade (Figura 8). Contudo, apesar de observada uma aparente redução na frequência média de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD, a análise estatística desses dados não mostrou diferença significativa entre os grupos. Isto nos indicou que a dificuldade de indução de tolerância nesses animais pode ser devido a alterações em outros componentes

imunorreguladores da mucosa intestinal.

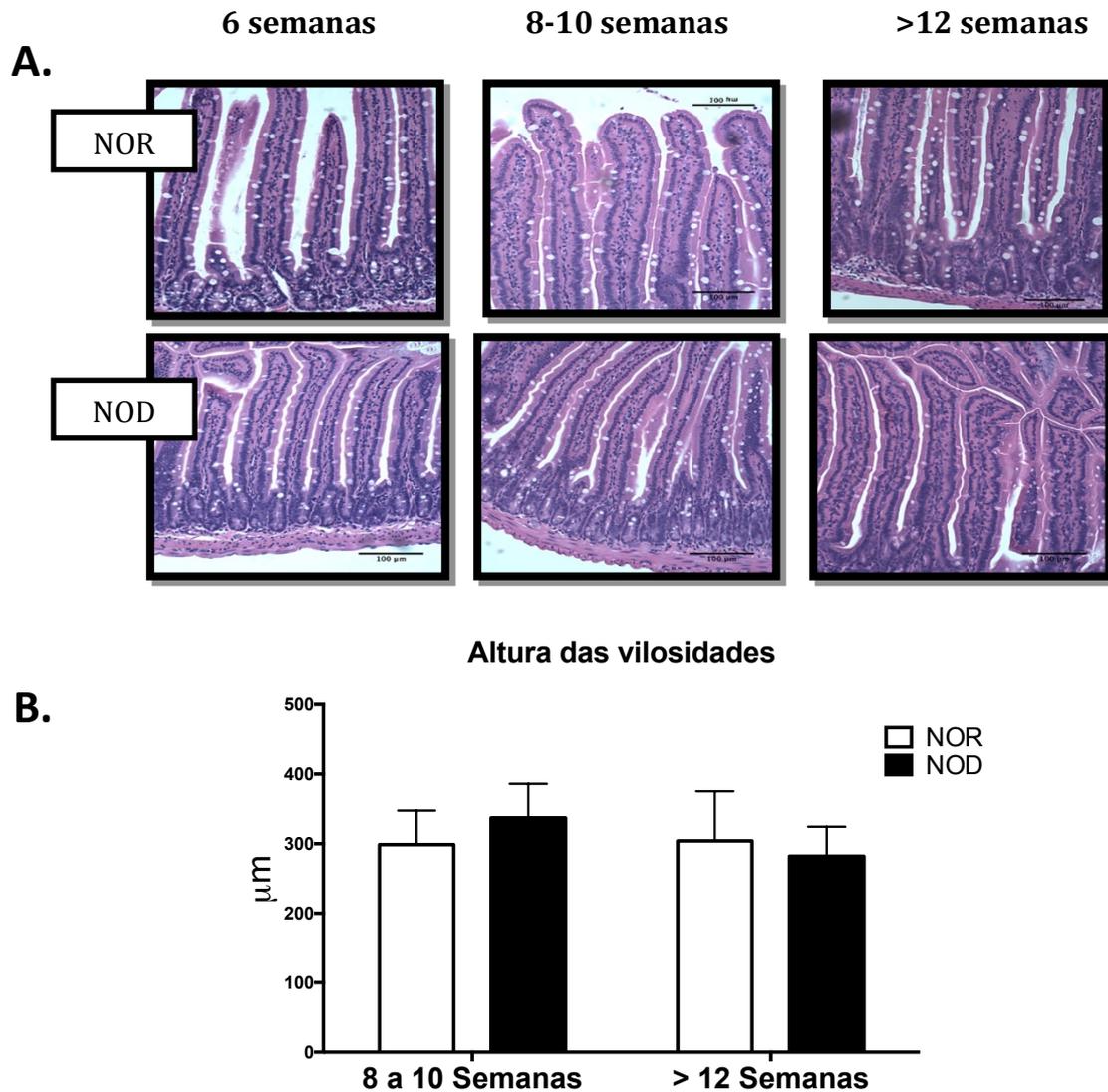


**Figura 8: Frequência de linfócitos T CD4+Foxp3+ nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD e NOR.**

As células foram isoladas dos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD e NOR de 6 semanas e >10 semanas de idade. Imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo. Identificou-se células T CD4+ Foxp3+. (a), Gráfico representativo dos valores obtidos, cada valor representa células de pools de 2 camundongos. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada pool do grupo (teste t). Grupo de 6 semanas (n=3). Grupo > 10 semanas (n=4). (b) Dot plot representativo da separação da população de células T CD4+ Foxp3+ dos linfonodos mesentéricos.

### 4.3. Avaliação histopatológica da mucosa intestinal de camundongos NOD

Dada a importância dos componentes da mucosa intestinal para o estabelecimento da tolerância oral, avaliamos o intestino delgado de camundongos NOD e NOR em busca de possíveis alterações morfológicas que pudessem levar à perda do equilíbrio e homeostase intestinal, contribuindo assim para a dificuldade de indução da tolerância oral em camundongos NOD (**Figura 9**). A partir da análise histológica, consideramos como normais os aspectos histológicos em todos os grupos. Tanto a arquitetura do intestino, a altura das vilosidades, e a celularidade da lâmina própria de camundongos NOD e NOR são comparáveis e normais.

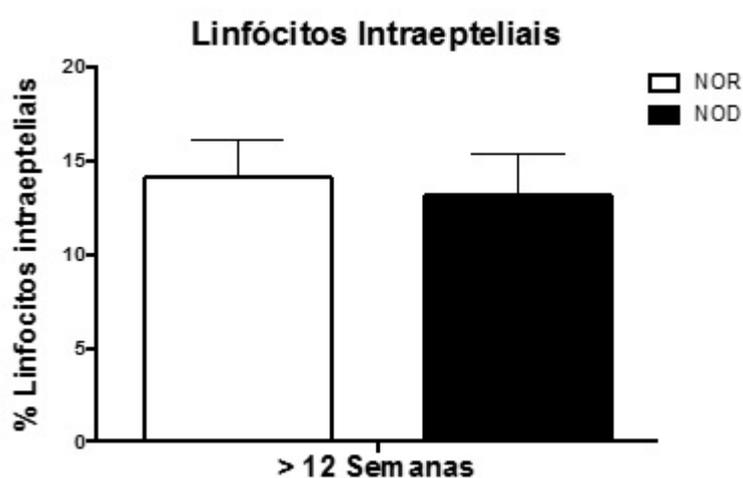


**Figura 9: Avaliação histopatológica do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.**

(A) Fotos representativas de Cortes histológicos do intestino delgado de camundongos NOD e NOR com 6 semanas, 8 a 10 semanas e acima de 12 semanas. Coloração H&E, aumento de 100x (n = 4 animais por grupo). (B) Análise morfométrica do vilo de camundongos NOD e NOR de 8 a 10 semanas e acima de 12 semanas. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 4 secções diferentes, sendo no total 20 vilosidades por animal, resultados expressos pela média (n=4). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo (test t).

Avaliamos, também, linfócitos intraepiteliais que são importantes componentes do GALT (**Figura 10**). Eles têm o papel de regular a homeostase através da manutenção da função da barreira epitelial intestinal. Normalmente aumentados durante a infecção e inflamação, regulam a resposta imune inata e adaptativa (Sheridan & Lefrançois, 2010). São,

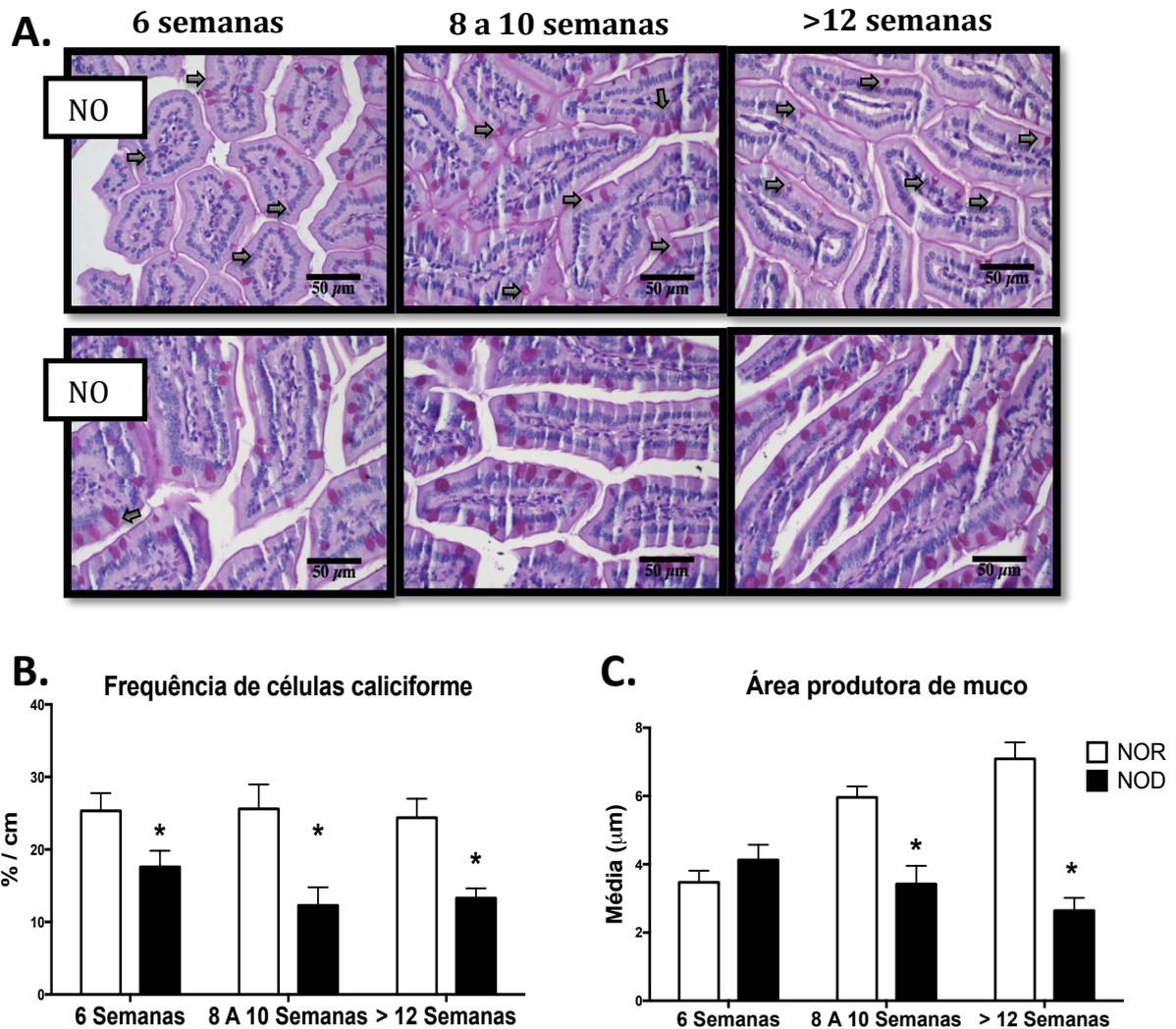
na maioria CD8<sup>+</sup>. com TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Tem sido demonstrado, utilizando modelos de alergia alimentar, que os linfócitos intraepiteliais com TCR  $\gamma\delta$  são de extrema importância para o estabelecimento da tolerância a proteínas da dieta. (Bol-Schoenmakers et al., 2011; Frossard, Asigbetse, Burger, & Eigenmann, 2015). Sendo assim, avaliamos a frequência de linfócitos intraepiteliais entre os enterócitos no intestino delgado de camundongos diabéticos NOD e seus controle NOR da mesma idade. No entanto, não foram observadas diferenças entre os animais das duas linhagens.



**Figura 10: Frequência de linfócitos intraepiteliais no intestino delgado de camundongos NOD e NOR.**

*Frequência de IEL entre enterócitos contados no intestino delgado de camundongos NOD diabéticos e camundongos NOR da mesma idade. A contagem foi realizada em cada amostra considerando um intervalo de 500 enterócitos (n=4 animais por grupo). Contagem feita no aumento de 20x coloração HE. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo.*

Outro parâmetro analisado foi a frequência de células caliciformes no intestino delgado de camundongos NOD e NOR (**Figura 11**).



**Figura 11: Frequência de células caliciformes e produção de mucos no intestino delgado de camundongos NOD e NOR.**

(A) Fotos representativas de cortes histológicos do intestino delgado de camundongos NOD e NOR com 6 semanas, 8 a 10 semanas e acima de 12 semanas. Coloração P.A.S, aumento de 400x. As setas indicam as células caliciformes com o tamanho reduzido em comparação com o controle. (B) Frequência de células caliciformes a cada centímetro de superfície do vilo. (C) Representação gráfica da análise de pixels representando a área celular corada com PAS em lâminas histológicas. Para o estabelecimento desse valor, foram consideradas as medidas de todas as células coradas em 3 campos aleatórios por animal. Aumento de 10x, (n= 4 animais por grupo). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \*= valores de  $P < 0,05$  (teste t). n = 4 camundongos por grupo.

Além da frequência (**Figura 11b**), avaliamos também a produção de muco pelas

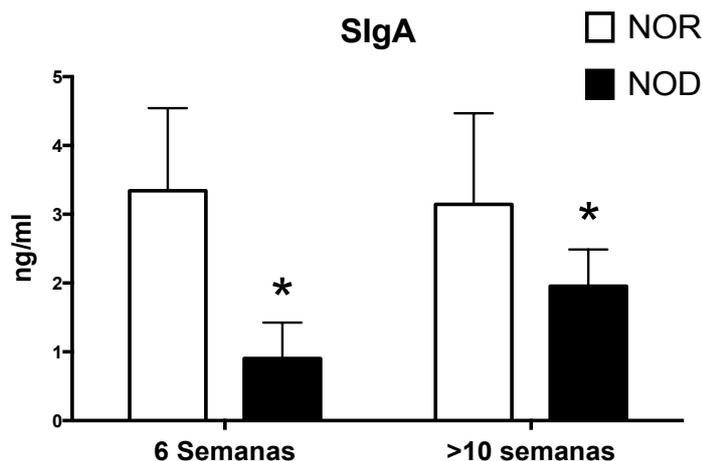
células caliciformes. Para esse fim, utilizamos o método de coloração por PAS que evidencia o muco em um tom rosa escuro e calculamos a área corada com o auxílio do software ImageJ (*Figura 11c*).

A frequência de células caliciformes está reduzida em camundongos NOD de todas as idades quando comparado com seus controles NOR. É possível observar também que camundongos NOD possuem um menor área corada nas células caliciformes, o que indica que seu tamanho está reduzido quando comparado com seus respectivos controles NOR, ou seja, há uma menor produção de muco nos camundongos NOD.

#### **4.4. Camundongos NOD apresentaram redução na produção de IgA secretória**

A partir da análise histológica identificamos que camundongos NOD possuem reduzida frequência de células caliciformes e reduzida produção de muco quando comparado com camundongos controle resistentes à diabetes. Assim como a camada de muco, a IgA presente no lúmen intestinal contribui para os mecanismos de manutenção da barreira e de homeostase da mucosa intestinal.

Desta forma, quantificamos a produção de IgA secretória (SIgA) no muco de camundongos NOD em diferentes estágios do desenvolvimento do diabetes (*Figura 12*). Esses animais apresentaram redução da concentração de IgA no muco intestinal quando comparados com seu controle não diabético NOR. A análise mostrou uma menor produção de SIgA em camundongos NOD a partir da 6<sup>o</sup> semanas de idade e que permanece em idades mais avançadas.

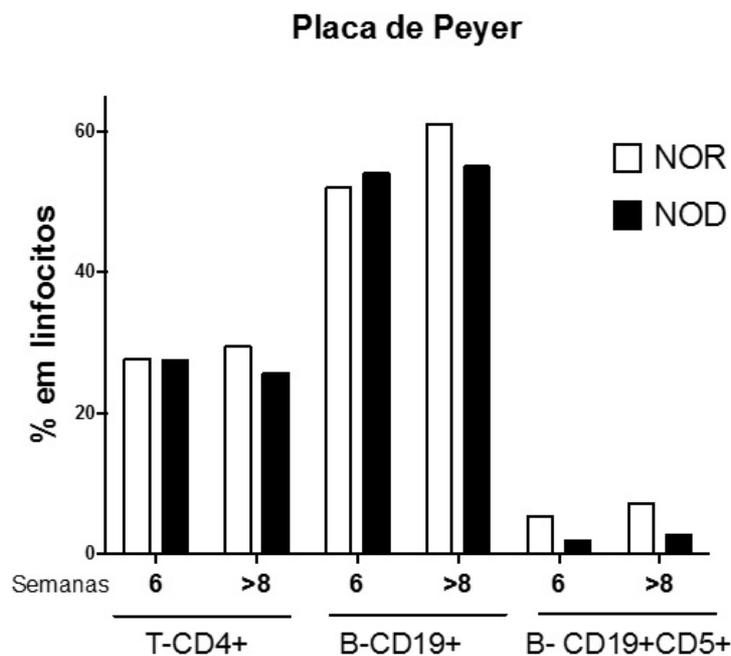


**Figura 12: Concentração de IgA secretória (sIgA) no lavado intestinal de camundongos NOD e NOR.**

Camundongos NOD e NOR de 6 e 8 semanas de idade foram eutanasiados para a posterior coleta do lavado do muco intestinal. A SIgA foi medida pela técnica de ELISA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \*= valores de  $P < 0,05$  (teste t).  $n = 5$  camundongos por grupo.

#### **4.5. Camundongos NOD apresentaram frequência reduzida de células B1 nas placas de Peyer**

As placas de Peyer tem sido descritas como o maior sítio de diferenciação de linfócitos B2 (CD19+ CD5-) produtores de IgA (Rios et al., 2015; Roux, McWilliams, Phillips-Quagliata, & Lamm, 1981). Por outro lado, foi demonstrado que as células B1 (CD19+ CD5+) também estão envolvidas na produção de SIgA (Fagarasan, Watanabe, & Honjo, 2000).



**Figura 13: Frequência de linfócitos T CD4+, B e B1 nas placas de Peyer de camundongos NOD e NOR.**

*Células das placas de Peyer foram isoladas e imunofenotipadas através da técnica de citometria de fluxo. Identificou-se células T CD4+, B (CD19+) e B1 (CD19+ CD5+). As barras representam pools de 4 camundongos em cada grupo.*

Desta forma, avaliamos a frequência de células T CD4+ e B (CD19+) e B1 (CD19+ CD5+) nas placas de Peyer de camundongos NOD e NOR (Figura 13). Embora não tenha sido possível realizar análise estatística dos dados, observamos uma tendência à redução na frequência de células B1 (CD19+ CD5+) em camundongos NOD quando comparamos com seus controles NOR. Essa alteração foi observada em camundongos de 6 semanas de idade e permanece em camundongos com mais de 10 semanas de idade.

#### **4.6. Avaliação da frequência de macrófagos residentes do intestino durante a progressão da diabetes em camundongos NOD.**

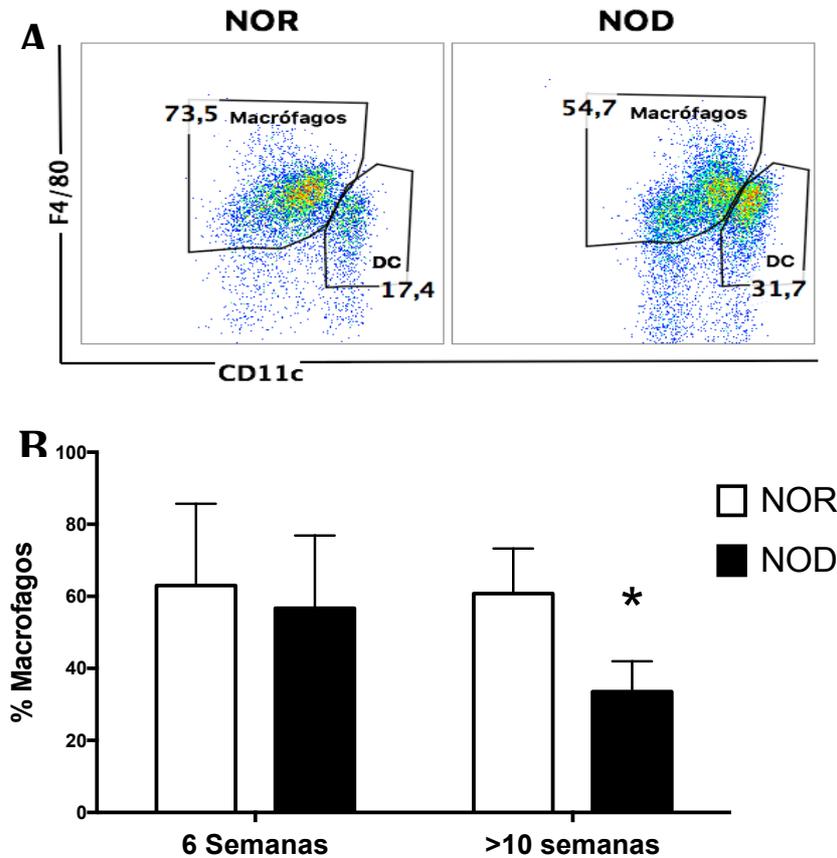
A geração de células T reguladoras induzidas na periferia (iTregs) é um dos mecanismos para o estabelecimento da tolerância oral (Mucida et al., 2005), e um possível defeito na geração dessas células é motivo de intenso debate na literatura envolvendo a patogênese a diabetes autoimune. Sabe-se que esse fenômeno é altamente dependente de populações específicas de células dendríticas e macrófagos. A IL-10 secretada por macrófagos residentes do intestino contribui com a formação do ambiente tolerogênico

necessário para a manutenção de células dendríticas tolerogênicas produtoras de ácido retinóico e TGF- $\beta$  importantes na diferenciação de células T com propriedades reguladoras (Treg) (Coombes & Maloy, 2007).

Em estudos prévios do nosso laboratório, Rafael Pires de Oliveira caracterizou todas as populações de DCs presentes na lâmina própria e nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD comparando com seus controles resistentes à diabetes (Oliveira, 2014). Ele mostrou que as células dendríticas CD103<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> produtoras de ácido retinóico estavam reduzidas nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD. Mostrou ainda que a frequência de células Treg também estava reduzida nesse órgão em camundongos diabéticos e que esses animais apresentavam um aumento na razão entre células T efetoras e reguladoras no intestino, com frequência aumentada de células Th17 e predominância de células dendríticas com perfil inflamatório no tecido linfóide associado à mucosa intestinal. Além disso, foi identificado que a população de macrófagos da lâmina própria do intestino estava reduzido.

Desta forma, nosso objetivo foi caracterizar o perfil de macrófagos presentes na lâmina própria desses camundongos e as populações de macrófagos da lâmina própria no período em quase inicia o infiltrado inflamatório.

Não observamos redução de macrófagos na lâmina própria de camundongos NOD com 6 semanas (**Figura 14**), porém camundongos pré-diabéticos (>10 semanas) que não possuem glicemia alterada mais estão em estágio avançado de insulto apresentaram frequência reduzida de macrófagos. Esse resultado confirma os dados observados anteriormente pelo nosso grupo (Oliveira, 2014) e sugere que a redução de macrófagos na lâmina própria pode estar associada à progressão da inflamação no pâncreas. Assim, o próximo passo foi caracterizar as frequências de populações de macrófagos na mucosa intestinal de camundongos NOD em diferentes estágios da doença.



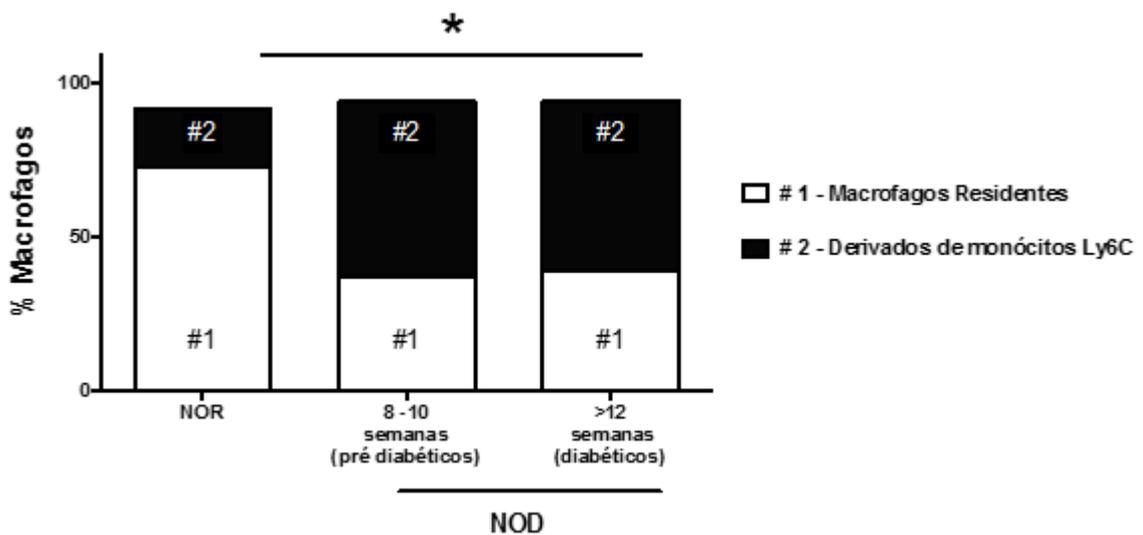
**Figura 14: Frequência de macrófagos na lâmina própria do intestino de camundongos NOD.**

Imunofenotipagem através da técnica de citometria de fluxo para Macrófagos  $CD45.1^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $F4/80^+$ ,  $MHCII^+$  (a), Dot plot representativo mostrando a separação de macrófagos e CDs. Em camundongos NOD e NOR com mais de 10 semanas (b) Gráfico representativo da frequência de macrófagos  $CD45.1^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $F4/80^+$ ,  $MHCII^+$  na lâmina própria do intestino delgado. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo (pool de dois animais) do grupo. \* = valores de  $P < 0,05$  (teste t). O grupo 10 semanas representa a média de dois experimentos, ( $n=7$ ). Grupo 6 semanas ( $n=3$ ).

A população de monócitos da lâmina própria do intestino com expressão alta de  $F4/80$  e  $CD11b$  e baixa ou nenhuma expressão de  $CD11c$  foi definida como macrófagos residentes do intestino. Essa população de macrófagos secreta altos níveis de IL-10 e participa na diferenciação de células T reguladoras (Denning et al., 2007). As células dendríticas são identificadas pela alta expressão de  $CD11c$  e baixa expressão de  $F4/80$ . Entretanto, uma população de monócitos  $F4/80^+$  que também expressa altos níveis de  $CD11c$  pode ser encontrada no intestino. Brian Kelsall e colaboradores foram os primeiros a mostrar que as

células que formam essa população  $F4/80^{hi} CD11c^{+}$  são macrófagos. Tais macrófagos são derivados de monócitos  $Ly6C^{hi}$  e podem diferenciar-se em macrófagos reguladores ou inflamatórios de acordo com as condições do microambiente em que se encontram (Rivollier, He, Kole, Valatas, & Kelsall, 2012).

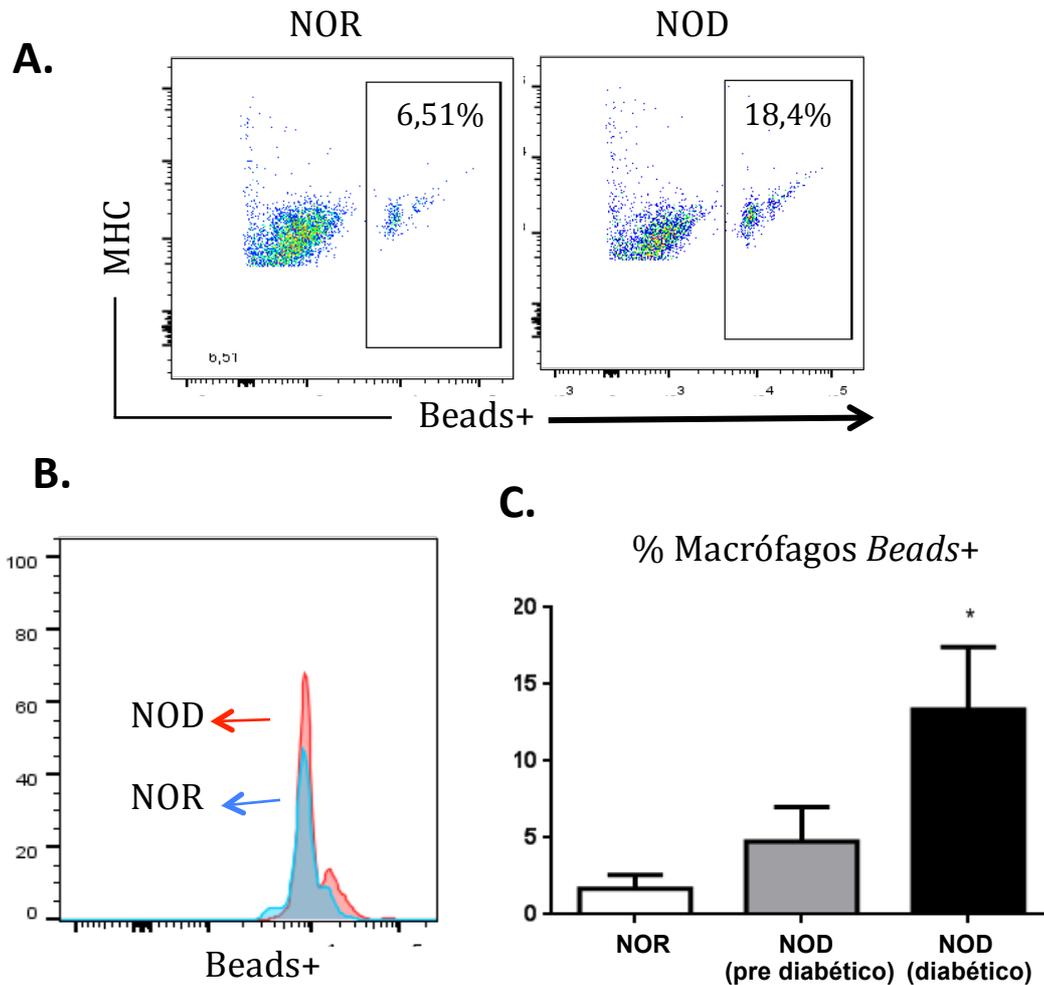
Neste estudo, identificamos que a frequência de macrófagos residentes ( $F4/80^{+} CD11c^{lo/-}$ ) estava reduzida na lâmina própria do intestino delgado em camundongos NOD e que a população de monócitos inflamatórios ( $F4/80^{+} CD11c^{+}$ ) estava aumentada. **Figura 15.**



**Figura 15: Frequência de macrófagos residentes e não residentes em camundongos NOR e NOD pré-diabéticos e diabéticos.**

Células isoladas da lâmina própria de camundongos NOD e NOR de 6 semanas e >10 semanas de idade foram imunofenotipadas através da técnica de citometria de fluxo. Macrófagos ( $CD45.1^{+}, CD11b^{+}, F4/80^{+}, MHCII^{+}$ ). O  $CD11c$  foi utilizado para separar as duas subpopulações de macrófagos do intestino. Gráfico representativo da frequência de macrófagos  $CD45.1^{+}CD11b^{+}F4/80^{+}MHCII^{+}CD11c^{lo/-}$  e  $CD45.1^{+}CD11b^{+}F4/80^{+}MHCII^{+}CD11c^{+}$  na lâmina própria do intestino delgado. As barras representam a média dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \* = valores de  $P < 0,05$  (teste t).  $n = 4$  camundongos por grupo.

Além da frequência, avaliamos uma propriedade funcional dessa população de macrófagos  $CD45.1^{+} F4/80^{+} MHCII^{+}$  presente na lâmina própria do intestino delgado: a fagocitose, **Figura 16.**



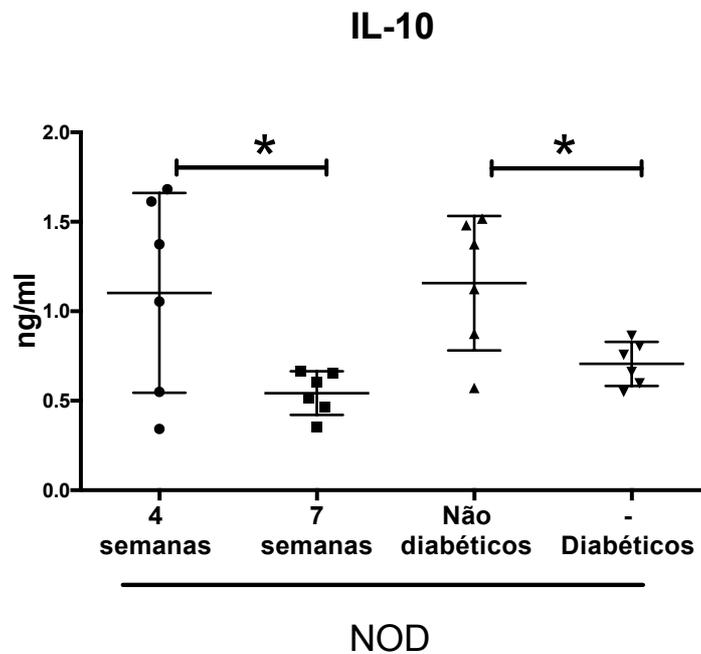
**Figura 16: Capacidade de fagocitose de macrófagos da lâmina própria do intestino de camundongos NOD e NOR.**

Células  $CD45.1^+$   $F4/80^+$   $MHC^+$  foram isoladas da lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD e NOR e incubadas com esferas (beads) acopladas a Fluoresbrite Plain Yellow Gold por 45 min a 37 graus. Os resultados representam a frequência de células contendo essas esferas no citoplasma (beads+). (a) Dot plot representativo da separação da população de macrófagos (células  $CD45.1^+$   $F4/80^+$   $MHCII^+$ ) da lâmina própria, (b) histograma representativo da marcação com fluoresceína (FITC), (c) gráfico representando a frequência de macrófagos contendo esferas fluorescentes encontradas para cada animal. As barras representam a média dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \* representa valores de  $P < 0,05$  (teste t).  $n = 4$  camundongos por grupo.

Para este fim, utilizamos esferas (beads) fluorescentes e avaliamos a capacidade das células de internalizar essas esferas por citometria de fluxo. **Figura 16.** Incubamos as células marcadas com as esferas e posteriormente avaliamos as frequências de células  $beads^+$  por

citometria de fluxo. A população de macrófagos da lâmina própria de camundongos diabéticos mostrou uma maior atividade fagocítica quando comparada com a população de macrófagos de camundongos NOD.

Como a frequência de macrófagos residentes estava reduzida na lâmina própria de camundongos NOD e dada a alta capacidade de secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 por essas células (Coombes & Maloy, 2007), medimos a produção de IL-10 no extrato do intestino delgado. O ensaio foi realizado em camundongos NOD com diferentes idades e estágios do desenvolvimento da diabetes, inclusive camundongos NOD com mais de 12 semanas que não desenvolveram diabetes (*Figura 17*).



**Figura 17: Produção da citocina IL-10 no intestino delgado de camundongos NOD durante o desenvolvimento da diabetes tipo 1.**

Concentração da citocina IL-10 detectada pela técnica de ELISA em extrato de intestino delgado. As barras representam a média dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \* = valores de  $P < 0,05$  (teste t).  $n = 6$  camundongos por grupo.

Observamos redução na concentração de IL-10 no tecido intestinal de camundongos NOD com insulite em progressão ou com a doença estabelecida. Além disso, a variação em grupos de animais com 4 semanas de idade e animais não diabéticos foi muito grande. O

resultado nos mostra que a produção de IL-10 no intestino delgado está relacionada ao desenvolvimento da doença e que os níveis se reduziram com a progressão da doença.



## 5. Discussão

A diabetes *mellitus* do tipo 1 é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis. Pode se manifestar nos anos iniciais da vida, por isso uma grande porcentagem de indivíduos com diabetes são crianças. A doença leva a perda em massa das células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina e o tratamento consiste na administração de insulina exógena para controle da hiperglicemia. O uso de modelos animais auxiliam no entendimento da patogênese da doença de forma que o conhecimento amplo sobre os mecanismos possam criar novas ferramentas terapêuticas.

Utilizamos, em nossos estudos, um camundongo que desenvolve a diabetes espontaneamente de maneira muito similar àquela observada em humanos, de forma que a cinética de eventos que levam a inflamação das células  $\beta$  pancreáticas e a presença de autoanticorpos no modelo se assemelham às características da diabetes em humanos (Pearson et al., 2015). A pancreatite, em nosso modelo, estava de acordo com o que é descrito na literatura. A figura 6 mostra um infiltrado inflamatório extenso após a oitava semana de idade em camundongos NOD e o total acometimento das ilhotas em camundongos diabéticos. Também foi confirmado que os camundongos NOR utilizados como controle não apresentavam infiltrado inflamatório. Uma observação importante é relativa ao tamanho e formato das ilhotas  $\beta$  pancreáticas em camundongos NOD. Em todos os grupos avaliados, a morfologia das ilhotas  $\beta$  pancreáticas foi muito distinta daquela observada em camundongos NOR. Essa observação está de acordo com Pelegri e colaboradores (Pelegri et al., 2001) que mostraram que camundongos NOD contêm ilhotas imaturas e mal formadas antes do desmame e elas se tornam grandes e de formato irregular durante o desenvolvimento do animal.

O fator genético influencia fortemente o desenvolvimento da diabetes autoimune, entretanto apenas 50% de sua manifestação é devido à predisposição genética. O ambiente, localização geográfica, alimentação e variações na microbiota são fatores que podem determinar o ponto crucial que leva ao início da resposta contra antígenos próprios desencadeando a reação inflamatória contra as células produtoras de insulina (Herold, Vignali, Cooke, & Bluestone, 2013). Sua etiologia é ainda desconhecida, dada a influência de diversas variáveis, mas sabe-se que o desenvolvimento da doença é marcado pela quebra da tolerância imunológica aos próprios componentes e ainda que a grande parte dos genes

relacionados à diabetes tipo 1 (IDDM) são responsáveis pelo controle de mecanismos de tolerância imunológica (Kantárová & Buc, 2007).

É através da tolerância imunológica central que o organismo previne a reação patológica contra próprio e previne a autoimunidade. Os mecanismos envolvidos na tolerância imunológica central envolvem a eliminação de linfócitos T com alta afinidade para os autocomponentes e a formação de linfócitos T reguladores ( $CD4^+CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup>) autorreativos no timo. Defeitos na tolerância central em camundongos NOD têm sido alvo de discussão em alguns trabalhos (He et al., 2013; Kishimoto & Sprent, 2001) e a quebra da tolerância também tem sido observada em humanos que desenvolvem a diabetes tipo 1 (Jeker, Bour-Jordan, & Bluestone, 2012). A tolerância oral, de maneira análoga à tolerância central aos autocomponentes, é capaz de regular a reatividade imunológica inflamatória a antígenos externos que entram em contato com o corpo por via oral. Esse fenômeno depende da conversão de células T  $CD4^+$  virgens (*naive*) em células T  $CD4^+$  Foxp3<sup>+</sup> reguladoras no intestino. Em estudos prévios do nosso grupo, mostramos que o fenômeno da tolerância oral não é estabelecido em camundongos NOD (Oliveira 2014). No presente estudo, demonstramos que a dificuldade na indução de tolerância oral ocorreu mesmo antes do desenvolvimento da pancreatite (Figura 7). Tal prejuízo foi observado também por Presa e colaboradores, em um trabalho em que eles descrevem o defeito na indução de tolerância oral em camundongos NOD utilizando um modelo de administração de peptídeos acoplados à subunidade B da toxina colérica (CTB) (Presa 2013).

Estabelecer tolerância imunológica a antígenos externos é importante para a manutenção da homeostase da mucosa intestinal, pois a estimulação antigênica por proteínas da dieta e da microbiota é constante no intestino. Defeitos nesse mecanismo levam a alterações sistêmicas e doenças inflamatórias crônicas do intestino. Em indivíduos com doença inflamatória intestinal (DII), já foi demonstrada a presença de reatividade inflamatória a componentes da dieta e da microbiota (Duchmann et al., 1995). Tem sido demonstrado também que camundongos NOD apresentam reatividade a antígenos da microbiota (He et al., 2013). Nossos resultados sugerem que isto pode ser devido ao fato desses animais apresentarem defeitos intrínsecos nos mecanismos de geração de tolerância oral.

Uma possível explicação para o defeito observado no estabelecimento da tolerância oral poderia ser a redução da frequência de células T reguladoras  $CD4^+$  Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos

mesentéricos como já demonstrado anteriormente (Hadis et al., 2011). Contudo, em nossa análise, a frequência de células  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  em camundongos NOD foi comparável ao controle (camundongos NOR) (Figura 8). Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por He e colaboradores, que também não encontraram alteração na frequência de células T reguladoras nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD de diferentes idades (He et al., 2013). Nossa hipótese é que outros componentes imunorreguladores da mucosa intestinal desses animais podem estar alterados a ponto de interferirem na indução de tolerância oral. Sabemos que outras células T e B com propriedades imunorreguladoras são importantes na manutenção da homeostase intestinal. As células B reguladoras produtoras de IL-10, por exemplo, já foram descritas como tendo um papel protetor no desenvolvimento da diabetes no NOD (Kleffel et al., 2015). Por outro lado, a citocina IL-10 é fundamental na regulação da mucosa intestinal e camundongos geneticamente deficientes em IL-10 desenvolvem colite espontânea (Gomes-Santos et al., 2012; Kühn, Löhler, Rennick, Rajewsky, & Müller, 1993).

A indução dos mecanismos responsáveis pela tolerância oral ocorre na mucosa intestinal, isso porque o trato gastrointestinal é a maior superfície de contato com o meio ambiente (Moog f. 1981). A exposição à grande quantidade de antígenos derivados da alimentação e da microbiota exige uma resposta imune altamente regulada por diferentes tipos de células da mucosa como já discutido aqui. Esses fatores imunorreguladores resultam na produção e manutenção da homeostase intestinal e defeitos na sua produção podem perturbar os mecanismos de tolerância e pode levar a uma resposta imune desacerbada (Howard L Weiner et al., 2011).

Foi demonstrado que o linfonodo pancreático drena antígenos próprios do pâncreas, mas também tem a capacidade de drenar antígenos externos do trato gastrointestinal e da cavidade peritoneal (Turley et al., 2005). Esses achados se alinham com nossos resultados mostrando que a tolerância oral está defeituosa em animais que desenvolvem espontaneamente o diabetes tipo 1 (Figura 7). Ambos sugerem que modificações intestinais ou o prejuízo nos mecanismos de geração de tolerância periférica podem estar relacionados ao desenvolvimento do diabetes tipo 1.

O primeiro indicativo dessa estreita relação é relacionado a alterações da composição da microbiota intestinal. Camundongos NOD são mais susceptíveis a desenvolver diabetes

quando são mantidos em condições rigorosas de controle de microorganismos patogênicos, ambiente SPF (do inglês *specific pathogen free*) (Jean François Bach, 2002). Ainda nesse contexto, o tratamento oral com antibiótico leva ao aumento da produção de IL-10 em camundongos NOD e proteção contra o diabetes (Calcinaro et al., 2005).

Observações clínicas sugerem que um período curto de amamentação com leite materno e a introdução precoce do leite de vaca na alimentação aumenta o risco de desenvolvimento do diabetes tipo 1 (O. Vaarala et al., 2008). Além disso, outro trabalho sugere que a exposição a antígenos alimentares constituintes do trigo também tem efeito positivo na patogênese aumentando a incidência de diabetes em crianças com pré disposição genética (Norris, 2003). Em uma revisão de 2011, Outi Vaarala discute o efeito do leite de vaca na diabetes e levanta a hipótese de que esse efeito pode ser devido a uma quebra da tolerância oral em indivíduos susceptíveis ao diabetes do tipo 1. Dessa forma, a insulina bovina presente no leite de vaca poderia desencadear uma resposta imune inflamatória específica que levaria à destruição das células produtoras de insulina no pâncreas (Outi Vaarala, 2011). Um estudo internacional que aborda fatores de risco da diabetes tipo 1, o TRIGR (do inglês, *Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk*), demonstrou que crianças com pré-disposição genética à diabetes autoimune têm os riscos reduzidos quando o leite de vaca é substituído por uma fórmula que contém caseína hidrolisada (Knip et al., 2010). Essa foi a primeira demonstração de que é possível reduzir a diabetes do tipo 1 em humanos manipulando componentes da dieta na infância.

Baseado nessas evidências, avaliamos os componentes da mucosa de camundongos NOD em busca de alterações que possam contribuir para a quebra da homeostase da mucosa intestinal e ter repercussões inflamatórias no pâncreas. A análise histológica não mostrou alterações na mucosa ou presença de infiltrado inflamatório visível (Figuras 9 e 10) em camundongos NOD quando comparados com os camundongos NOR. Entretanto, verificamos que a proporção de células epiteliais estava alterada em camundongos NOD sendo que esses animais exibiam uma proporção de células caliciformes consideravelmente menor que seus controles resistentes à diabetes (**Figura 11**). As células caliciformes são células epiteliais especializadas na secreção de muco que compõem a camada de proteção intestinal. O muco é composto de diferentes glicoproteínas sendo a MUC2, mucina secretada principalmente pelas células caliciformes, a mais abundante no muco intestinal (Goll & van Beelen Granlund, 2015). Tem sido descrito que a MUC2 é capaz de induzir a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por

células dendríticas CD103<sup>+</sup> da lâmina própria do intestino através da sinalização via receptores galectina-3, Dectina-1 e FcgRIIB. Estes receptores induzem beta catenina, um fator de transcrição requerido pelas células dendríticas CD103<sup>+</sup> que impede a transcrição de citocinas pró inflamatórias, contribuindo assim para a homeostase intestinal e o estabelecimento da tolerância oral (Shan et al., 2013). Além disso, o muco forma uma barreira física entre os microrganismos do lúmen e as células epiteliais. A camada densa de muco possui poros muito pequenos que impedem a passagem de bactérias e minimiza o contato direto com as células do epitélio (Johansson et al., 2008). A importância fisiológica da barreira formada pelo muco é evidente em camundongos geneticamente deficientes para MUC2 que desenvolvem inflamação intestinal espontaneamente (Van der Sluis et al., 2006).

Também observamos níveis reduzidos de IgA secretória em camundongos NOD (Figura 12). A produção local de IgA secretória (SIgA) pelos plasmócitos da lâmina própria ocorre fisiologicamente e essa imunoglobulina é transportada para o lúmen do intestino por um mecanismo dependente do receptor de imunoglobulinas poliméricas (pIgR) localizado na membrana basal das células epiteliais do intestino (Johansen & Kaetzel, 2011). A SIgA é capaz de reduzir a penetração de antígenos através da mucosa, oferecendo um mecanismo protetor através da neutralização de toxinas e bloqueio de receptores de adesão de microrganismos presentes no lúmen intestinal. (Goll & van Beelen Granlund, 2015). Concluimos, então, que os camundongos NOD apresentam dois mecanismos de barreira intestinal prejudicados. A quebra da barreira física formada pelo muco e a redução na produção de IgA secretória podem facilitar o contato direto dos antígenos do lúmen com as células epiteliais. Já foi descrito que a interação direta entre as bactérias do lúmen e receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos pelas células epiteliais pode levar a uma ativação exacerbada das células do sistema imune resultando em inflamação intestinal (Cario, 2005). De fato, em dados obtidos por nosso grupo, foi observado um aumento da frequência de células Th17 na lâmina própria de camundongos NOD (Oliveira 2014). A perda dos mecanismos de barreira podem ser uma explicação para esse fenômeno, pois já foi descrito que o maior contato das células epiteliais com SFB (*segmented filamentous bacteria*) encontrada na microbiota autóctone de camundongos leva a um aumento de células Th17 no intestino (Goto et al., 2014).

Essas alterações intestinais assim como a deficiência na indução de tolerância oral foram observadas em camundongos com 6 semanas, período que coincide com o início do infiltrado inflamatório no pâncreas sugerindo uma correlação entre essas alterações encontradas nos camundongos NOD.

Em estudos anteriores do nosso grupo (Oliveira 2014), foi identificado que a frequência de células dendríticas  $CD103^+CD11b^+$  estava reduzida nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD em comparação com seu controle resistente à diabetes. Estudos têm demonstrado que essa população de células dendríticas tem um papel especial na diferenciação de células B produtoras de IgA. Normalmente, a IgA no intestino é produzida por células B2 ( $CD19^+CD5^-$ ) das placas de Peyer que se diferenciam em células B produtoras de IgA ( $IgA^+$ ) mediante o estímulo de células T  $CD4^+$  secretoras de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-5 (Rios et al., 2015; Roux et al., 1981). As células dendríticas  $CD103^+$  das placas de Peyer induzem a expressão de receptores de migração para a mucosa ( $\alpha4\beta7$ ) nas células B  $IgA^+$  sendo importantes, portanto, no estabelecimento do circuito que leva essas células B de volta à lâmina própria do intestino onde elas se diferenciam em plasmócitos secretores de IgA (J. R. Mora et al., 2006). Mais recentemente, foi demonstrado que células B1 ( $CD19^+CD5^+$ ) também podem se diferenciar em produtoras de IgA em um mecanismo independente de células T, mas dependente de células dendríticas  $CD103^+$  produtoras de ácido retinóico e IL-6 (Fagarasan et al., 2000)(Mora and von Andrian 2009). Além disso, as células dendríticas  $CD103^+$  produzem grandes quantidades de TGF- $\beta$  e têm alta capacidade de ativar células T  $CD4^+$  *naive*, o que indica que essa população também pode estar relacionada de várias maneiras à ativação de células B produtoras de IgA de maneira T dependente (Kelsall, 2008).

Inicialmente, avaliamos a frequência de células B ( $CD19^+$ ) nas placas de Peyer em busca de alterações que pudessem explicar os baixos níveis de SIgA encontrados em camundongos NOD (Figura 13). Observamos que a frequência global de células B ( $CD19^+$ ) não estava alterada em camundongos NOD, mas a frequência de células B1 ( $CD19^+CD5^+$ ) estava reduzida quando comparada com os valores encontrados nos camundongos controle NOR. As células B1 foram originalmente descritas como  $CD19^+CD5^+$  e têm origem na cavidade peritoneal durante o período embrionário (Hayakawa, Hardy, Parks, & Herzenberg, 1983). As células B1 secretam predominantemente IgM, mas, como mencionado anteriormente, a troca de isotipo para IgA também ocorre na população de células B1 da

mucosa intestinal sendo elas responsáveis pela produção de, pelo menos, a metade da IgA secretada no lúmen do intestino (Hardy & Hayakawa, 2015).

A população de células B1 exibe multireatividade e tanto a IgA quanto a IgM secretada por essas células são reativas a antígenos da microbiota. (Jiang et al., 2004) Dessa forma, a redução da IgA secretória no nosso modelo pode, em parte, ser explicada pela diminuição na frequência de células B1 no intestino. Estudos mais detalhados serão necessários, no entanto, para esclarecer os mecanismos envolvidos nessa deficiência..

Células dendríticas (DCs) e macrófagos residentes da mucosa são altamente especializados em manter a homeostase do ambiente intestinal. Essas células da imunidade inata promovem a defesa do organismo contra patógenos e microrganismos comensais e também estão diretamente envolvidas na geração e manutenção de células T reguladoras e na indução de SIgA. Por outro lado, macrófagos e DCs são as primeiras células encontradas no processo inflamatório pancreático que leva ao diabetes e constituem a principal fonte de TNF- $\alpha$ , citocina crítica para a inflamação tecidual (Dahle, Dawe, Ohlsson, & Hedlund, 2012).

O entendimento da biologia dos macrófagos intestinais ainda é motivo de intensos estudos e debates. Sabe-se que os macrófagos residentes do intestino contribuem para a manutenção da barreira epitelial através da secreção de PGE2 (prostaglandina E2), capturam e destroem patógenos sem responder de uma maneira inflamatória, participam do *clearance* apoptótico de células senescentes devido à sua alta capacidade fagocítica e ainda mantêm o ambiente tolerogênico intestinal através da secreção constitutiva de IL-10 (Mowat and Bain 2011). A população de macrófagos intestinais possui características que parecem ser exclusivas e fogem do paradigma de classificação em macrófagos segundo os padrões de ativação M1 e M2. Com já descrito, considera-se os macrófagos M1 como apresentando um papel inflamatório e os M2 um papel resolutivo (Mills, 2012). Os macrófagos intestinais, no entanto, expressam moléculas simultaneamente utilizadas como marcadores de ambos os perfis de ativação (Calum C. Bain & Mowat, 2014a).

Algumas moléculas expressas por macrófagos são compartilhadas com outras células como, por exemplo, as células dendríticas, o que dificulta a sua caracterização. Assim, torna-se necessário o uso de outras moléculas expressas que permitam a exclusão dessas células. Para identificar os macrófagos e excluir as células dendríticas de nossa análise, utilizamos a

expressão alta de F4/80 (células F4/80<sup>hi</sup>) pois células dendríticas expressam baixos níveis dessa molécula, e a ausência de CD11c ou expressão de níveis intermediários dessa molécula. Já as células com alta expressão de CD11c e baixa expressão de F4/80 foram consideradas células dendríticas (Figura 14 a). Esses critérios foram propostos por estudos anteriores do grupo de Brian Kelsall (Rivolier et al, 2012).

Demostramos que a população de macrófagos intestinais (F4/80<sup>hi</sup> MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) estava reduzida em camundongos NOD com mais de 8 semanas (Figura 14 b), período em que a pancreatite já se encontra em estágio avançado nesses animais. A redução na frequência de macrófagos intestinais estava associada também à redução nos níveis de IL-10 no intestino dos camundongos NOD (figura 17). A IL-10 secretada por macrófagos residentes da mucosa intestinal contribui com a formação do ambiente tolerogênico necessário para a manutenção das células da mucosa, em destaque as célula T reguladoras (Treg). Foi demonstrado que a IL-10 produzida por macrófagos intestinais é necessária para a diferenciação e manutenção das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Camundongos geneticamente deficientes no receptor CX3CR1, molécula caracteristicamente expressa por macrófagos produtores de IL-10 no intestino, têm reduzida população de macrófagos e células reguladoras nesse local. A tolerância oral não é estabelecida nesses animais (Hadis et al., 2011). Além disso, já foi descrito que o aumento na frequência de macrófagos produtores de IL-10 no linfonodo pancreático induzido pela administração de uma substância presente na pimenta malagueta (capsaicina) levou à prevenção do diabetes tipo 1 em camundongos NOD (Nevius, Srivastava, & Basu, 2012). Em estudos anteriores do nosso grupo, mostramos também que a deficiência de IL-10 se relaciona diretamente com a dificuldade na indução de tolerância oral (Gomes-Santos et al., 2012).

É importante também ressaltar que, embora os macrófagos intestinais sejam uma fonte importante da IL-10 local, outras células presentes nesse tecido também são produtoras dessa citocina. Entre elas, as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Jankovic, Kugler, & Sher, 2010) e as células B1 (O'Garra et al., 1992). As células B1 não só produzem IL-10 como são capazes de modular a função fagocítica de macrófagos através da secreção dessa citocina (Popi et al 2004). Como encontramos uma redução significativa na frequência de células B1 nas placas de Peyer dos camundongos NOD, esse defeito pode também contribuir para os baixos níveis de IL-10 na mucosa intestinal desses animais. Não examinamos ainda a frequência de células T produtoras de IL-10, mas esta é uma população certamente relevante para a manutenção de

outras células da mucosa incluindo as próprias células epiteliais. Recentemente, Goto e colaboradores (Goto et al., 2015), mostraram que células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 no intestino contribuem para a função de barreira das células epiteliais intestinais por regularem a fucosilação de seu glicocálix. A presença desses resíduos de fucose nessas células tem um papel importante no estabelecimento de nichos de aderência e nutrição para algumas bactérias da microbiota autóctone. Assim, elas são importantes na manutenção de uma microbiota equilibrada no intestino.

Tem sido sugerido que o intestino é composto por duas populações distintas de macrófagos. Uma com características não inflamatórias, os macrófagos residentes da mucosa, e outra população com alto potencial inflamatório desencadeado por perturbações no micro ambiente da mucosa (Platt, Bain, Bordon, Sester, & Mowat, 2010; Rivollier et al., 2012). O grupo de Allan Mowat propõe que, quando a homeostase intestinal é perturbada por algum evento inflamatório ou infeccioso, os monócitos Ly6C<sup>+</sup> que são recrutados para a mucosa através da corrente sanguínea dão origem a uma população de macrófagos com características pro-inflamatória e alta capacidade de produção de citocinas como IL-6, IL12, IL-23 e IL1 $\beta$  no intestino. Essas células podem auxiliar na manutenção de células efetoras do tipo Th17 na mucosa intestinal (Calum C. Bain & Mowat, 2014a)

Brian L. Kelsall e colaboradores caracterizaram uma população de macrófagos na mucosa colônica que expressa níveis altos de F4/80, não expressa CD103 e é positiva para CD11c. Eles confirmaram que se trata de uma subpopulação de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>MHII<sup>+</sup>CD11C<sup>+</sup>) da lâmina própria do cólon derivada de monócitos. Tais células podem se diferenciar em macrófagos reguladores ou inflamatórios de acordo com as condições do micro ambiente em que se encontram (Rivollier et al., 2012). Neste estudo, nós utilizamos a mesma estratégia para caracterizar a população de macrófagos presente na lamina própria de camundongos NOD.

Camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos apresentam um balanço entre macrófagos residentes (F4/80<sup>+</sup>MHII<sup>+</sup>CD11C<sup>lo/-</sup>) e macrófagos derivados de monócitos (F4/80<sup>+</sup>MHII<sup>+</sup>CD11C<sup>+</sup>) alterado quando comparados com camundongos NOR (figura 15). Essa alteração pode estar diretamente relacionada aos resultados obtidos previamente por Rafael Pires de Oliveira em estudos no nosso laboratório que indicam uma proporção aumentada de células Th17 em relação às células T reguladoras na lâmina própria do intestino

de camundongos NOD diabéticos (Oliveira, 2014).

Um outro trabalho descreve uma população de macrófagos similar com capacidade de reagir de forma pro-inflamatória mediante a perturbações inflamatórias no ambiente do intestino (C C Bain et al., 2013).

Identificamos ainda que a atividade fagocítica dos macrófagos da lâmina própria de camundongos NOD foi maior que aquela encontrada em camundongos NOR (figura16) e que o aumento dessa atividade era proporcional ao desenvolvimento da pancreatite e o surgimento do diabetes. O aumento na atividade fagocítica pode indicar uma maior ativação dos macrófagos de camundongos diabéticos, tendo em vista que a subpopulação de macrófagos derivados de monócitos estava aumentada nesses animais. Nosso resultado está de acordo com estudo prévio (Rivollier et al., 2012) mostrando que a população de macrófagos  $F4/80^+MHII^+CD11C^+$  tem alta capacidade de fagocitar esferas de plástico. A realização de um novo ensaio utilizando um agente que ative receptores de reconhecimento padrão (PRR) em macrófagos pode ser interessante pois seria possível avaliar se a ativação dos macrófagos e a resposta inflamatória é similar àquela desencadeada por esferas.

O conjunto de alterações observadas na mucosa de camundongos NOD pode contribuir para a formação, nesses animais, de um ambiente intestinal desfavorável ao estabelecimento da tolerância oral e para o aumento da reatividade a antígenos do lúmen intestinal. Além disso, os defeitos na reatividade imunológica no intestino podem ter repercussões sistêmicas e favorecerem o desenvolvimento da pancreatite e a progressão do diabetes. Acreditamos que o entendimento da relação entre as alterações da mucosa intestinal e a inflamação pancreática pode auxiliar no entendimento da patogênese da diabetes do tipo 1 também podem ampliar as possibilidades de intervenção clínica eficaz para a prevenção e tratamento da doença.



## 6. Conclusão

O infiltrado inflamatório agressivo é observado no pâncreas de camundongos modelo para a diabetes autoimune. Estes animais são refratários para indução de tolerância oral mesmo antes do desenvolvimento da doença.

Não há sinais histológicos de inflamação no intestino delgado destes animais porem a homeostase intestinal é perdida devido a defeitos intrínsecos nos mecanismos de barreira imunológica.

A produção de muco e IgA estão reduzidos nestes animais o que pode ser explicado por alterações na frequência de células específicas no GALT.

Camundongos NOD apresentam alteradas frequências de células B na placa de Peyer .

O ambiente tolerogênico intestinal necessário para o estabelecimento da tolerância oral pode estar prejudicado devido a alterações na frequência de macrófagos reguladores e inflamatórios no intestino que leva a redução da IL-10 secretada no intestino.

A alteração de populações intestinais está relacionada ao desenvolvimento da diabetes nestes animais.

Estas observações auxiliam no entendimento da fisiologia do sistema imune em organismos susceptíveis a diabetes. Entender os eventos relacionados ao desenvolvimento da doença proporciona ferramentas que podem ser eficaz estratégias de prevenção do diabetes.



## 7. Perspectivas

Comparar a capacidade de indução de tolerância oral entre as linhagens NOD e NOR;

Avaliar a composição do MUCO em camundongos NOD. Determinar a concentração de proteínas MUC2;

Avaliar a reatividade da IgA secretória e os mecanismos envolvidos na deficiência deste anticorpo no muco de camundongos NOD;

Avaliar a composição da microbiota e a presença de bactérias SFB e relacionar com o desenvolvimento do diabetes;

Realizar ensaios *in vitro* com macrófagos isolados da mucosa de camundongos NOD e avaliar a produção de citocinas após o estímulo;

Propor estratégias de imunomodulação que possam reverter as modificações observadas na mucosa de camundongos diabéticos e melhorar ou reduzir a incidência da doença.



## 8. Referências

- A.M.C., F., & H.L., W. (2005). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 206, 232–259. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x>
- Afuwape, A. O., Turner, M. W., & Strobel, S. (2004). Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), 40–48. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02400.x>
- Alam, C., Valkonen, S., Palagani, V., Jalava, J., Eerola, E., & Hänninen, A. (2010). Inflammatory tendencies and overproduction of IL-17 in the colon of young NOD mice are counteracted with diet change. *Diabetes*, 59(9), 2237–2246. <http://doi.org/10.2337/db10-0147>
- Anderson, M. S., & Bluestone, J. A. (2005). THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 447–485. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643>
- Atkinson, M. A., & Chervonsky, A. (2012). Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia*, 55(11), 2868–77. <http://doi.org/10.1007/s00125-012-2672-4>
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2011). Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. *European Journal of Immunology*, 41, 2494–2498. <http://doi.org/10.1002/eji.201141714>
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014a). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, 260(1), 102–117. <http://doi.org/10.1111/imr.12192>
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014b). The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cellular Immunology*, 291(1-2), 41–48. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.012>
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., ... Mowat, A. M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, 6(3), 498–510. <http://doi.org/10.1038/mi.2012.89>
- Bluestone, J. A., & Tang, Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 638–42. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2005.09.002>
- Bol-Schoenmakers, M., Marcondes Rezende, M., Bleumink, R., Boon, L., Man, S., Hassing, I., ... Smit, J. J. (2011). Regulation by intestinal gammadelta T cells during establishment of food allergic sensitization in mice. *Allergy*, 66(3), 331–340. <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02479.x>
- Bouma, G., & Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Immunology*, 3(7), 521–33.

<http://doi.org/10.1038/nri1132>

- Brandtzaeg, P. (1998). Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition Reviews*, *56*(1), S5–S18. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01645.x>
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*, *1*(1), 31–37. <http://doi.org/10.1038/mi.2007.9>
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., ... Dotta, F. (2005). Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, *48*(8), 1565–1575. <http://doi.org/10.1007/s00125-005-1831-2>
- Cario, E. (2005). Bacterial Interactions With Cells of the Intestinal Mucosa: Toll-Like Receptors and Nod2. *Gut*, *54*(8), 1182–1193. <http://doi.org/10.1136/gut.2004.062794>
- Carvalho, C. R., & Vaz, N. M. (1996). Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scandinavian Journal of Immunology*, *43*(6), 613–8.
- Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Gomes-Santos, A. C., Cunha, A. P., Silva Steinberg, R., Nascimento, D. S., ... Vaz, N. M. (2012). Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cellular Immunology*, *280*(2), 171–81. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.004>
- Castro-Sánchez, P., & Martín-Villa, J. M. (2013). Gut immune system and oral tolerance. *British Journal of Nutrition*, *109*(S2), S3–S11. <http://doi.org/10.1017/S0007114512005223>
- Coombes, J. L., & Maloy, K. J. (2007). Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Seminars in Immunology*, *19*(2), 116–126. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.01.001>
- Coombes, J. L., & Powrie, F. (2009). Europe PMC Funders Group Dendritic cells in intestinal immune regulation, *8*(6), 435–446. <http://doi.org/10.1038/nri2335>. Dendritic
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, *7*(5), 349–359. <http://doi.org/10.1038/nrg1840>
- D'Alise, A. M., Auyeung, V., Feuerer, M., Nishio, J., Fontenot, J., Benoist, C., & Mathis, D. (2008). The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19857–62. <http://doi.org/10.1073/pnas.0810713105>
- da Silva Menezes, J., de Sousa Mucida, D., Cara, D. C., Alvarez-Leite, J. I., Russo, M., Vaz, N. M., & Caetano de Faria, A. M. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical

- role in the maturation of the immune system. *International Immunology*, *15*(3), 447–455. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxg043>
- Dahle, E., Dawe, K., Ohlsson, L., & Hedlund, G. (2012). Dendritic Cells and Macrophages Are the First and Major Producers of TNF- $\alpha$  in Pancreatic Islets in the Nonobese Diabetic Mouse.
- Dardenne, M. (1993). Characterization of the Extracellular Matrix-Containing Giant Perivascular Spaces in the NOD Mouse Thymus, *42*(January), 134–140.
- de Faria, A., Ficker, S., Speziali, E., Menezes, J., Stransky, B., Silva Rodrigues, V., & Vaz, N. (1998). Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, *102*(1), 67–80. [http://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00024-4](http://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00024-4)
- Denning, T. L., Wang, Y., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, *8*(10), 1086–1094. <http://doi.org/10.1038/ni1511>
- Diretrizes-Sbd-2015. (2015).
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., & Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology*, *102*, 448–455. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03836.x>
- Emamaullee, J., Davis, J., Merani, S., & Toso, C. (2009). Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, *58*(June). <http://doi.org/10.2337/db08-1113>.
- Fagarasan, S., Watanabe, N., & Honjo, T. (2000). Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunological Reviews*, *176*(3), 205–15. <http://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.00604.x>
- Faria, A. M. C., Maron, R., Ficker, S. M., Slavin, A. J., Spahn, T., & Weiner, H. L. (2003). Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-B/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, *20*(2), 135–145. [http://doi.org/10.1016/S0896-8411\(02\)00112-9](http://doi.org/10.1016/S0896-8411(02)00112-9)
- Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*, *13*(2-4), 143–57. <http://doi.org/10.1080/17402520600876804>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330–336.

<http://doi.org/10.1038/ni904>

- Frossard, C. P., Asigbetse, K. E., Burger, D., & Eigenmann, P. A. (2015). Gut T cell receptor- $\gamma\delta^+$  intraepithelial lymphocytes are activated selectively by cholera toxin to break oral tolerance in mice. *Clinical & Experimental Immunology*, *180*(1), 118–130. <http://doi.org/10.1111/cei.12561>
- Gale, E. a M. (2005). Type 1 diabetes in the young: The harvest of sorrow goes on. *Diabetologia*, *48*(8), 1435–1438. <http://doi.org/10.1007/s00125-005-1833-0>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, *19*(1), 71–82. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Goll, R., & van Beelen Granlund, A. (2015). Intestinal barrier homeostasis in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *50*(1), 3–12. <http://doi.org/10.3109/00365521.2014.971425>
- Gomes-Santos, A. C., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., Cruz, D. N., ... Faria, A. M. C. (2012). New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clinical & Developmental Immunology*, *2012*, 560817. <http://doi.org/10.1155/2012/560817>
- Goto, Y., Lamichhane, A., Kamioka, M., Sato, S., Honda, K., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2015). IL-10-producing CD4+ T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut. *Scientific Reports*, *5*, 15918. <http://doi.org/10.1038/srep15918>
- Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M. G., ... Ivanov, I. I. (2014). Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity*, *40*(4), 594–607. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.005>
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*, *34*(2), 237–246. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2015). Perspectives on fetal derived CD5<sup>+</sup> B1 B cells. *European Journal of Immunology*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1002/eji.201445146>
- Haskins, K., & Cooke, A. (2011). CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Current Opinion in Immunology*, *23*(6), 739–45. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.004>
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R., & Herzenberg, L. A. (1983). The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *157*(1), 202–18.
- He, Q., Morillon, Y. M., Spidale, N. a, Kroger, C. J., Liu, B., Sartor, R. B., ... Tisch, R. (2013). Thymic development of autoreactive T cells in NOD mice is regulated in an age-

- dependent manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(12), 5858–66. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1302273>
- Herold, K. C., Vignali, D. a. a., Cooke, A., & Bluestone, J. a. (2013). Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 243–256. <http://doi.org/10.1038/nri3422>
- Honkanen, J., Nieminen, J. K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H. M., Ilonen, J., ... Vaarala, O. (2010). IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes. *The Journal of Immunology*, 185(3), 1959–1967. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1000788>
- Hori, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057–1061. <http://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Jankovic, D., Kugler, D. G., & Sher, a. (2010). IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunology*, 3(3), 239–246. <http://doi.org/10.1038/mi.2010.8>
- Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P. J., Dardenne, M., & Drexhage, H. A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, 43(5), 667–675. <http://doi.org/10.2337/diabetes.43.5.667>
- Jean François Bach. (2002). S Usceptibility To a Utoimmune and a Llergic D Iseases. *New England Journal of Medicine*, 347(12), 911–920.
- Jeker, L. T., Bour-Jordan, H., & Bluestone, J. a. (2012). Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3), a007807. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007807>
- Jiang, H. Q., Thurnheer, M. C., Zuercher, a. W., Boiko, N. V., Bos, N. a., & Cebra, J. J. (2004). Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host. *Vaccine*, 22, 805–811. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.022>
- Johansen, F.-E., & Kaetzel, C. S. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunology*, 4(6), 598–602. <http://doi.org/10.1038/mi.2011.37>
- Johansson, M. E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15064–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Kanagawa, O., Martin, S. M., Vaupel, B. A., Carrasco-Marin, E., & Unanue, E. R. (1998). Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1721–4.
- Kantárová, D., & Buc, M. (2007). Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in

- humans. *Physiol Res.*, 56(3), 255–266.
- Katz, J. D., Benoist, C., & Mathis, D. (1995). T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*, 268(5214), 1185–1188.
- Kelsall, B. (2008). Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunology*, 1(6), 460–469. <http://doi.org/10.1038/mi.2008.61>
- King, A., & Bowe, J. (2015). Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>
- Kishimoto, H., & Sprent, J. (2001). A defect in central tolerance in NOD mice. *Nature Immunology*, 2(11), 1025–31. <http://doi.org/10.1038/ni726>
- Kleffel, S., Vergani, A., Tezza, S., Ben Nasr, M., Niewczas, M. a., Wong, S., ... Fiorina, P. (2015). Interleukin-10+ Regulatory B Cells Arise Within Antigen- Experienced CD40+ B Cells to Maintain Tolerance to Islet Autoantigens. *Diabetes*, 64(1), 158–171. <http://doi.org/10.2337/db13-1639>
- Knip, M., Virtanen, S. M., Seppä, K., Ilonen, J., Savilahti, E., Vaarala, O., ... Akerblom, H. K. (2010). Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *The New England Journal of Medicine*, 363(20), 1900–1908. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1004809>
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–74. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P)
- Lee, a. S., Gibson, D. L., Zhang, Y., Sham, H. P., Vallance, B. a., & Dutz, J. P. (2010). Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia*, 53(4), 741–748. <http://doi.org/10.1007/s00125-009-1626-y>
- Lee, B. Y. S., Starkey, P. M., & Gordon, S. (1985). QUANTITATIVE ANALYSIS OF TOTAL MACROPHAGE CONTENT IN ADULT MOUSE TISSUES *Imrnunochemical Studies With Monoclonal Antibody F4/80*, 161(March).
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 4(6), 478–485. <http://doi.org/10.1038/nri1373>
- Mathis, D., Vence, L., & Benoist, C. (2001). B-cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414(6865), 792–798. <http://doi.org/10.1038/414792a>
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to

- CD103+ Dendritic Cells. *Immunity*, 40(2), 248–261.  
<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>
- Mercadante, A. C. T., Perobelli, S. M., Alves, A. P. G., Goncalves-Silva, T., Mello, W., Gomes-Santos, A. C., ... Bonomo, A. (2014). Oral Combined Therapy with Probiotics and Alloantigen Induces B Cell-Dependent Long-Lasting Specific Tolerance. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1928–1937. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1301034>
- Mills, C. D. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(6), 463–88.  
<http://doi.org/03b91cfa635b86ee,7acd81f604dc8b0c> [pii]
- Mora, J. R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.-Y., Junt, T., Senman, B., ... von Andrian, U. H. (2006). Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science*, 314(5802), 1157–1160. <http://doi.org/10.1126/science.1132742>
- Mora, J. R., & von Andrian, U. H. (2009). Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Seminars in Immunology*, 21(1), 28–35.  
<http://doi.org/10.1016/j.smim.2008.08.002>
- Mowat, a M., Strobel, S., Drummond, H. E., & Ferguson, a. (1982). Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*, 45(1), 105–13.
- Mowat, A. M., & Bain, C. C. (2011). Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Journal of Innate Immunity*, 3(6), 550–64.  
<http://doi.org/10.1159/000329099>
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., Lafaille, M. A. C. de, ... Lafaille, M. A. C. De. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *115(7)*, 1923–1933. <http://doi.org/10.1172/JCI24487>.The
- Neu, J., Reverte, C. M., Mackey, A. D., Liboni, K., Tuhacek-tenace, L. M., Hatch, M., ... Atkinson, M. (2005). Changes in Intestinal Morphology and Permeability in the BioBreeding Rat Before the Onset of Type 1 Diabetes, (May), 589–595.
- Nevius, E., Srivastava, P. K., & Basu, S. (2012). Oral ingestion of Capsaicin, the pungent component of chili pepper, enhances a discreet population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. *Mucosal Immunology*, 5(1), 76–86.  
<http://doi.org/10.1038/mi.2011.50>
- Niess, J. H. (2005). CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science*, 307(5707), 254–258.  
<http://doi.org/10.1126/science.1102901>
- Nikolic, T., Geutskens, S. B., van Rooijen, N., Drexhage, H. a, & Leenen, P. J. M. (2005). Dendritic cells and macrophages are essential for the retention of lymphocytes in (peri)-

- insulinitis of the nonobese diabetic mouse: a phagocyte depletion study. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(4), 487–501. <http://doi.org/10.1038/labinvest.3700238>
- Norris, J. M. (2003). Timing of Initial Cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity. *Jama*, 290(13), 1713. <http://doi.org/10.1001/jama.290.13.1713>
- O'Garra, a, Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., & Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European Journal of Immunology*, 22, 711–717. <http://doi.org/10.1002/eji.1830220314>
- Oliveira, R. P., Santiago, A. F., Ficker, S. M., Gomes-Santos, A. C., & Faria, A. M. C. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *Journal of Immunological Methods*, 421, 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2015.02.005>
- Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*, 12(12), 821–832. <http://doi.org/10.1038/nri3322>
- Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–239. <http://doi.org/10.1038/mi.2012.4>
- Paula-Silva, J., Santiago, A. F., Oliveira, R. P., Rosa, M. L. P., Carvalho, C. R., Amaral, J. F., & Faria, A. M. C. (2015). Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. *The British Journal of Nutrition*, 1–9. <http://doi.org/10.1017/S0007114515000173>
- Pearson, J. a., Wong, F. S., & Wen, L. (2015). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.019>
- Pelegri, C., Rosmalen, J. G., Durant, S., Throsby, M., Alvès, V., Coulaud, J., ... Homo-Delarche, F. (2001). Islet endocrine-cell behavior from birth onward in mice with the nonobese diabetic genetic background. *Molecular Medicine*, 7(5), 311–9.
- Platt, A. M., Bain, C. C., Bordon, Y., Sester, D. P., & Mowat, A. M. (2010). An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6843–6854. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903987>
- Prochazka, M., Serreze, D. V., Frankel, W. N., & Leiter, E. H. (1992). NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes*, 41(1), 98–106. <http://doi.org/10.2337/diabetes.41.1.98>
- Rabinovitch, A., & Suarez-Pinzon, W. L. (1998). Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology*, 55(8), 1139–1149. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00492-9](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00492-9)
- Rezende, R. M., Oliveira, R. P., Medeiros, S. R., Gomes-Santos, A. C., Alves, A. C., Loli, F. G., ... Faria, A. M. C. (2013). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents

- experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*, 40, 45–57. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.012>
- Rios, D., Wood, M. B., Li, J., Chassaing, B., Gewirtz, A. T., & Williams, I. R. (2015). Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunology*, (April), 1–10. <http://doi.org/10.1038/mi.2015.121>
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., & Kelsall, B. L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *Journal of Experimental Medicine*, 209(1), 139–155. <http://doi.org/10.1084/jem.20101387>
- Roux, M. E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M., & Lamm, M. E. (1981). Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cellular Immunology*, 61(1), 141–53.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 155(3), 1151–1164. <http://doi.org/186/7/3808> [pii]
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 723–735. <http://doi.org/10.1084/jem.20041982>
- Sgouroudis, E., Kornete, M., & Piccirillo, C. a. (2011). IL-2 production by dendritic cells promotes Foxp3(+) regulatory T-cell expansion in autoimmune-resistant NOD congenic mice. *Autoimmunity*, 44(August), 406–414. <http://doi.org/10.3109/08916934.2010.536795>
- Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J. R., Walland, a C., Bornstein, V. U., Chen, K., ... Cerutti, A. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6157), 447–53. <http://doi.org/10.1126/science.1237910>
- Shao, S., He, F., Yang, Y., Yuan, G., Zhang, M., & Yu, X. (2012). Th17 cells in type 1 diabetes. *Cellular Immunology*, 280(1), 16–21. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.001>
- Sheridan, B. S., & Lefrançois, L. (2010). Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. *Current Gastroenterology Reports*, 12(6), 513–521. <http://doi.org/10.1007/s11894-010-0148-6>
- SHULL, M. M., ORMSBY, I., KIER, A. B., PAWLOWSKI, S., DIEBOLD, R. J., YIN, M., ... DOETSCHMAN, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 356, 133–135.
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., & Wahl, S. M. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal*

*Immunology*, 4(1), 31–42. <http://doi.org/10.1038/mi.2010.66>

- Smythies, L. E., Sellers, M., Clements, R. H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W. H., ... Smith, P. D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 66–75. <http://doi.org/10.1172/JCI200519229>
- Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M. T., Honda, H., Oshima, Y., ... Hibi, T. (2010). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Contributes to Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation by Composition of IL-10-Producing Regulatory Macrophage Subset. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2671–2676. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0804012>
- Tooley, J. E., Waldron-Lynch, F., & Herold, K. C. (2012). New and future immunomodulatory therapy in type 1 diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 173–81. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.001>
- Turley, S. J., Lee, J.-W., Dutton-Swain, N., Mathis, D., & Benoist, C. (2005). Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17729–17733. <http://doi.org/10.1073/pnas.0509006102>
- Vaarala, O. (2011). The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 18(4), 241–247. <http://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283488218>
- Vaarala, O., Atkinson, M. a., & Neu, J. (2008). The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Diabetes*, 57(10), 2555–2562. <http://doi.org/10.2337/db08-0331>
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., ... Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–129. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Visser, J. T. J., Lammers, K., Hoogendijk, a., Boer, M. W., Brugman, S., Beijer-Liefers, S., ... Rozing, J. (2010). Restoration of impaired intestinal barrier function by the hydrolysed casein diet contributes to the prevention of type 1 diabetes in the diabetes-prone BioBreeding rat. *Diabetologia*, 53(12), 2621–2628. <http://doi.org/10.1007/s00125-010-1903-9>
- Wang, B., André, I., Gonzalez, A., Katz, J. D., Aguet, M., Benoist, C., & Mathis, D. (1997). Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13844–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13844>
- Weiner, H. L. (1992). By Samia J. Khoury,\* Wayne W Hancock,t and Howard L . Weiner\*. *Journal of Experimental Medicine*, 176(November).
- Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*, 182, 207–214.

<http://doi.org/1820117> [pii]

- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 241(1), 241–59. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x>
- Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., Ai-sabbagh, A., Santos, L., ... Hafier, D. A. (1994). ORAL TOLERANCE: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal.
- Weiner, H. L., & Wu, H. Y. (2011). Oral tolerance. *Immunologic Research*, 241(3), 241–259. <http://doi.org/10.1385/IR:28:3:265>
- Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M. a, Parkhurst, C. N., ... Lafaille, J. J. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1723–42, S1. <http://doi.org/10.1084/jem.20120914>
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., ... Chervonsky, A. V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455(7216), 1109–1113. <http://doi.org/10.1038/nature07336>
- Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K., & Morgan, N. G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 155(2), 173–181. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x>
- Worbs, T. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 519–527. <http://doi.org/10.1084/jem.20052016>
- Yadav, D., Judkowski, V., Flodstrom-Tullberg, M., Sterling, L., Redmond, W. L., Sherman, L., & Sarvetnick, N. (2004). B7-2 (CD86) controls the priming of autoreactive CD4 T cell response against pancreatic islets. *Journal of Immunology*, 173(6), 3631–3639. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3631>