

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Microambientes e sensores imunológicos no intestino: homeostase e inflamação

Maria Cecília Campos Canesso

Belo Horizonte

2018

Maria Cecília Campos Canesso

Microambientes e sensores imunológicos no intestino: homeostase e inflamação

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

Orientadora: Prof. Dr. Ana Maria Caetano de Faria
(Dep. Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira
(Dep. Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel de Souza Mucida
(The Rockefeller University, New York, EUA)

Belo Horizonte

2018

043

Canesso, Maria Cecília Campos.

Microambientes e sensores imunológicos no intestino: homeostase e inflamação [manuscrito] / Maria Cecília Campos Canesso. – 2018.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Coorientadores: Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira, Prof. Dr. Daniel de Souza Mucida.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Homeostase. 3. Inflamação. 4. Microbioma Gastrointestinal. 5. Doenças Inflamatórias Intestinais I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Oliveira, Sérgio Costa. III. Mucida, Daniel de Souza. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIA CECILIA CAMPOS CANESSO. Aos vinte e sete dias do mês de novembro de 2018 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Microambientes e sensores imunológicos no intestino: homeostase e inflamação", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Marcelo Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dra. Alessandra Filardy (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Daniel de Sousa Mucida - Coorientador (Rockefeller University - NYC), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de novembro de 2018.

Dr. Marcelo Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dra. Alessandra Filardy (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (UFMG)

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Dr. Daniel de Sousa Mucida - Coorientador (Rockefeller University - NYC)

Dr. Sérgio Costa Oliveira - Coorientador (UFMG)

Dr. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Ana por todo o apoio, suporte e amizade dedicados a mim durante estes anos em que estive no Lib. Por acreditar e "comprar" absolutamente todas as minhas idéias malucas e passar tardes e mais tardes discutindo imunologia comigo quando eu aparecia na sua sala com resultados novos. Por toda a positividade com todos os "deadlines" e por não medir esforços para conseguir tudo o que eu precisava para completar cada experimento. Muito obrigada também por ser amiga e conselheira quando tive que tomar decisões muito importantes pra minha carreira e pra vida. Você é o meu exemplo de cientista exemplar sem deixar de ser humano. "Vamos aperfeiçoando o imperfeito".

Gostaria de agradecer também ao meu co-orientador Sergio Costa pelo encorajamento e suporte em tudo. Por todas as tardes no cafezinho da Ildinha com a pergunta clássica "cadê o paper?". Por abrir as portas e me incorporar no seu laboratório, por todas as discussões e orientações essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi com você que é possível fazer ciência bem feita (sólida) mesmo com as dificuldades no nosso país. Obrigada também por todos os momentos descontraídos e risadas mesmo quando o assunto deveria ser sério.

Agradeço ao meu co-orientador do doutorado sanduíche Daniel por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim tanto durante o doutorado sanduíche quanto para o pós-doutorado. Obrigada por todas as discussões científicas, por estar sempre antenado a tudo que fazemos sempre disposto a ajudar e por todo suporte com as dificuldades que tive "no meio do caminho".

Agradeço à Daria por todos os ensinamentos, por dividir comigo seus conhecimentos e experimentos intermináveis "that comes for free", por todas as horas e horas de discussões científicas, emails intermináveis e por estar sempre disposta a me ajudar em todos os momentos e situações diferentes.

Agradeço à Lu Lemos pelo companheirismo em todos os experimentos, manhãs e fins de tarde no carro indo e voltando da UFMG, noites e madrugadas no lab com direito a macarrão do Pi e pelas conversas intermináveis. Você foi essencial.

Agradeço ao Tiago Bruno por toda a sua ajuda com qualquer assunto em que se envolvia um computador (desde os mais simples até complexas análises de bioinformática), sempre pronto pra me ajudar e com um chocolate ao lado. Estou muito feliz em estarmos no mesmo lab de novo, como nos velhos tempos.

Gostaria de agradecer a todos os Lib amigos: Tati, Mari, Dantinhas, Luíz, Maurinho, Ju, Núbia, Lícia, Naty, Sarah, Helder, Caixeta, Marizinha, Isabela, Gabi e Adna que alegraram todos os meus dias da fila do microondas pra esquentar marmitas ao cafezinho de todas as tardes. Em especial ao Thalison que aguentou todas as minhas 'lições' e apertos científicos com chocolates de cupuaçu.

Aos membros antigos do lab que foram também um exemplo: Ana Cristina, Thaís, Rafa Pires e principalmente ao Rafa Rezende por todos os socorros via Skype.

À Angel por todo apoio, credibilidade, ajuda, amizade e por ser esse exemplo de cientista mulher que você é e sempre foi pra mim.

À Ildinha e ao Hermes que sempre davam um jeitinho pra tudo funcionar bem mesmo parecendo impossível. Aos cafezinhos, confidências e risadas de todas as tardes, sem falar dos pastéis mais gostosos do mundo.

Aos amigos de Bases e amigos do departamento que estavam sempre prontos a ajudar seja com reagentes (que não foram poucos) ou compartilhando os mesmos apertos. Em especial à Elany, a baiana mais mineira que já conheci.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da Rockefeller University (Laboratory of Mucosal Immunology e Laboratory of Lymphocyte Dynamics): Angelina, Mariya, Paul, Fanny, Roham, Aneta, Zack, Ainsley, Bê, David, Telmo, Ju, Carla, Arien, Cissa, Luka, Jony, Alex, Giulia, Johanne e Gabriel pelo companheirismo de todos os dias no lab, por estarem sempre dispostos e prontos a ajudar "no matter what" e por todas discussões científicas e não científicas também. Agradeço em especial ao Bê por fazer tudo parecer fácil e leve, pelos sorrisos e abraços essenciais "to keep it going", melhores expressos e chocolates de todos.

Às minhas amigas Mariya, Ainsley e Carla por me fazer me sentir em casa mesmo quando eu estava muito longe dela. "You guys are the best!". Mariya muito obrigada por ser a melhor roommate e por ser meu "responsible adult", "big one" não

seria o mesmo sem você. Ju obrigada por trazer um pouquinho do nossa Brasil pra NY, por estar "sempre aqui" pro que der e vier, e por me integrar na sua família.

Agradeço a todos os meus amigos por sempre me darem força, por entender os meus atrasos e ausências quando tinha que estar no lab, pelos momentos de distração necessários pra "chegar lá". Vocês são um presente que a vida me deu.

Meu agradecimento mais que especial e à quem dedico essa tese: minha família. Pops, Mamis e João vocês são meu exemplo de vida! Muito obrigada por sempre me apoiar, por serem os primeiros a acreditar em mim e me incentivar a seguir todos os meus sonhos, mesmo quando isso quer dizer ficar longe de vocês por algum tempo. Por me aguentar com todo o meu estresse pós experimentos que não funcionaram ou pré apresentações científicas. Muito obrigada ainda é pouco! A torcida de vocês foi essencial para que este doutorado acontecesse da maneira que eu queria.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O tecido linfóide associado à mucosa intestinal enfrenta o desafio de tolerar antígenos da dieta e da microbiota enquanto exclui ou elimina os patógenos gastrointestinais. Interações não reguladas entre os antígenos luminais e essas células imunes no intestino podem levar a doenças graves, como alergia alimentar, doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais (IBD). Este estudo abordou como as respostas imunes nos diferentes microambientes do intestino bem como os seus sensores afetam a homeostase intestinal. Descrevemos aqui duas maneiras distintas pelas quais o sistema imune mantém a homeostase intestinal: através da compartimentalização das respostas imunes específicas em microambientes intestinais distintos, e por sensores imunológicos capazes de detectar componentes presentes no ambiente intestinal. Demonstramos que os linfonodos mesentéricos (mLNs) são imunologicamente únicos de acordo com o segmento intestinal funcional que eles drenam. As assinaturas gênicas de células estromais e dendríticas, bem como a polarização de células T contra o mesmo antígeno luminal diferiram entre mLNs ao longo do intestino, sendo os mLNs que drenam do intestino delgado proximal mais tolerogênicos e os mLNs distais ambientes mais pró-inflamatórios. Essa dicotomia compartimentalizada pode ser perturbada por infecção duodenal, remoção cirúrgica de mLNs distais selecionados ou liberação de antígeno ectópico, impactando as respostas imunes. Com relação à percepção dos ambientes intestinais, mostramos que o STING, sensor de dinucleotídeos cíclicos e adaptador de receptores de DNA intracelular, é ativado também por produtos liberados pela microbiota. A ausência de STING leva a defeitos em mecanismos de proteção da mucosa intestinal, como menor produção de muco e níveis de IgA secretória, frequências alteradas de IELs e ILCs além de impactar a composição da microbiota intestinal para um perfil mais pró-inflamatório. O STING é ainda importante para desenvolvimento e função de células Treg, sendo os camundongos STING^{-/-} mais susceptíveis à colite e infecção bacteriana entérica. Dessa forma, distúrbios dos microambientes intestinais bem como a ausência de sensores desses ambientes, como o STING, influenciam as respostas imunes nesses locais e podem levar a condições inflamatórias e susceptibilidades a doenças.

Palavras chave: Homeostase intestinal, Tolerância, Inflamação, STING.

ABSTRACT

The gut-associated lymphoid tissue faces the challenge of tolerating foreign nutrients and the symbiotic microbiome while excluding or eliminating gastrointestinal pathogens. Unregulated interactions between luminal antigens and the immune cells at the intestinal mucosa can lead to severe diseases such as food allergy, Celiac disease and inflammatory bowel diseases. This study addressed how immune responses in different gut microenvironments as well as their sensors affect intestinal homeostasis. We observed that the maintenance of intestinal homeostasis can be achieved in at least two different ways: through the compartmentalization of the specific immune responses to each distinct intestinal microenvironment, and by the immunological sensors of the components present in the intestinal environment. Herein we report that mesenteric lymph nodes (mLNs) are immunologically unique according to the functional gut segment they drain. Stromal and dendritic cell gene signatures as well as adaptive T cell polarization against the same luminal antigen differed between mLNs along the intestine, the proximal small intestine–draining mLNs preferentially giving rise to tolerogenic and the distal mLNs to pro-inflammatory T cell responses. This compartmentalized dichotomy could be perturbed by duodenal infection, surgical removal of select distal mLNs or ectopic antigen delivery, impacting immune responses. Regarding the perception of the intestinal environment, we show that STING, a cyclic dinucleotide sensor and adaptor molecule for intracellular DNA receptors, is also activated by microbiota products. The absence of STING leads to defective protective mechanisms of intestinal mucosa, such as lower mucus production and secretory IgA levels, altered frequencies of IELs and ILCs, besides impacting the composition of the intestinal microbiota toward a more pro-inflammatory profile. STING is also important for the development and function of Treg cells, being STING^{-/-} mice more susceptible to colitis and enteric bacterial infection. Therefore, disorders of the intestinal microenvironments as well as the absence of these environments' sensors, in this case of STING, influence the immune responses in these places and can lead to inflammatory conditions and higher susceptibility to diseases.

Key words: Intestinal Homeostasis, Tolerance, Inflammation, STING.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ambiente imunológico intestinal.....	21
Figura 2: Sinalização dependente de STING.....	42
Figura 3: Rede linfática intestinal e mLNs.....	81
Figura 4: Imagem 3D dos vasos linfáticos ao longo do intestino de camundongos C57BL/6 SPF e GF.....	82
Figura 5: Caracterização da drenagem linfática aferente e eferente de mLN.....	84
Figura 6: Absorção de retinol da dieta pela rede linfática intestinal e mLNs.....	86
Figura 7: Perfil gênico de células estromais nos diferentes mLNs.....	89
Figura 8: As propriedades das DCs diferem ao longo da cadeia de mLNs.....	92
Figura 9: Análise de células Treg nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF.....	95
Figura 10: Ativação de células OT-II CD45.1 no mLNs após gavagem com OVA....	97
Figura 11: Polarização de células T CD4 ⁺ por antígenos da dieta diferem ao longo da cadeia de mLNs.....	98
Figura 12: Polarização de células T CD4 ⁺ nos mLNs por antígenos da dieta injetados diretamente no lúmen do duodeno ou íleo.....	99
Figura 13: Polarização de células T CD4 ⁺ por antígenos da microbiota diferiram ao longo da cadeia de mLNs.....	101
Figura 14: Susceptibilidade à infecção entérica (<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium) varia de acordo com o local da resposta imune gerada ao antígeno.....	104
Figura 15: Susceptibilidade à infecção entérica (<i>Citrobacter rodentium</i>) varia de acordo com o local da resposta imune gerada ao antígeno.....	106
Figura 16: Tolerância oral após remoção seletiva do mLN duodenal ou distal.....	108
Figura 17: A infecção duodenal leva a um conflito imunológico compartimentalizado no D-mLN.....	110

Figura 18: Alterações imunológicas persistentes após eliminação de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (S.v.) nos mLNs.....	112
Figura 19: Frequência reduzida de células Treg após <i>Strongyloides venezuelensis</i> nos mLNs proximais.....	114
Figura 20: Infecção restrita ao duodeno leva ao comprometimento da tolerância oral.....	116
Figura 21: Ativação de STING pela microbiota comensal.....	119
Figura 22: Alterações na estrutura da mucosa intestinal em camundongos STING ^{-/-}	122
Figura 23: Produção de muco é afetada na mucosa de camundongos STING ^{-/-}	124
Figura 24: Mecanismos imunes envolvidos na proteção da mucosa são alterados nos camundongos STING ^{-/-}	126
Figura 25: Composição da microbiota na ausência de STING.....	128
Figura 26: Frequência alterada de linfócitos intra-epiteliais (IELs) em camundongos STING ^{-/-}	130
Figura 27: Frequência de células T na <i>lamina propria</i> de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING ^{-/-}	132
Figura 28: Estratégia de <i>gates</i> utilizada para análise de linfócitos inatos (ILCs)....	133
Figura 29: Frequência alterada de linfócitos inatos (ILCs) em camundongos STING ^{-/-}	134
Figura 30: Frequência de células T reguladoras na <i>lamina propria</i> do cólon (cLP) e linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING ^{-/-}	136
Figura 31: Camundongos STING ^{-/-} foram mais susceptíveis a colite induzida por DSS	140
Figura 32: Frequência de células T reguladoras na <i>lamina propria</i> do cólon (cLP) e linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos C57BL/6 (B6) selvagens e STING ^{-/-} tratados com DSS.....	141

Figura 33: Camundongos STING ^{-/-} foram mais susceptíveis a colite induzida por células T e infecção entérica.....	143
Figura 34: Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R ^{-/-} são mais susceptíveis a colite induzida por DSS.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2	Ausente em melanoma 2
AHR	Hiperreatividade brônquica ou aérea
APC	Células apresentadoras de antígenos
Treg	Células T reguladoras
CD	Doença de Crohn
cGAS	GMP-AMP sintase cíclica
DC	Célula dendrítica
DDX41	Helicase 41 <i>DEAD-box</i>
DSS	Sulfato de sódio dextrano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
IBD	Doenças inflamatórias intestinais
IEL	Linfócitos intraepiteliais
IEC	Células epiteliais intestinais
ILC	Linfócitos inatos
IFN	Interferon
IFI16	Proteína 16 indutora de interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRF3	Fator regulador do interferon 3
iTregs	Células T reguladoras induzidas
LP	Lamina própria
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mLN	Linfonodo mesentérico
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa-light-enhancer</i> da cadeia de células B ativadas
NKT	Células T natural Killer
NLR	Receptores do tipo NOD
nTregs	Células T reguladoras naturais
PP	Placa de Peyer

RALDH	Enzima sintetizadora de ácido retinóico
RA	Ácido retinóico
SFB	Bactérias Segmentadas Filamentosas
SIgA	Imunoglobulina A secretória
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th	Célula T auxiliar
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UC	Colite ulcerativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Mucosa intestinal e homeostase.....	20
1.2. Indução de respostas imunes na mucosa.....	22
1.2.1. Respostas protetoras da mucosa: o epitélio e IELs.....	23
1.2.2. As ILCs e sua interação com o epitélio e as células imunes.....	23
1.2.3. A IgA secretória.....	25
1.2.4. Células T reguladoras e tolerância oral.....	26
1.2.5. Células T efetoras na mucosa intestinal e seu papel protetor.....	30
1.3. Doenças inflamatórias intestinais e a quebra da homeostase intestinal.....	31
1.3.1. Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais.....	34
1.4. Microbiota intestinal.....	35
1.4.1. Microbiota e sistema imune.....	37
1.5. Sensores imunológicos na mucosa intestinal.....	38
1.5.1. STING, o sensor de ácidos nucleicos.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo geral.....	46
2.2. Objetivos específicos.....	47
2.2.1. Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais.....	47
2.2.2. Sensores imunológicos do microambiente intestinal.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais.....	50
3.1.1. Animais.....	50
3.1.2. Citometria de fluxo.....	51
3.1.3. Limpeza de tecidos, "light sheet microscopy" e reconstrução de imagens.....	52
3.1.4. Biodistribuição de ³ H-retinol.....	53
3.1.5. Marcação e biodistribuição de ¹²⁵ I-OVA.....	53
3.1.6. Segmentação de linfonodos mesentéricos.....	53
3.1.7. Extração de APCs e linfócitos de linfonodos.....	54
3.1.8. Isolamento de células estromais de linfonodos.....	54
3.1.9. Extração de células da lamina propria do intestino delgado e grosso.....	54

3.1.10 Isolamento de células para RNA-seq.....	55
3.1.11 Preparação e sequenciamento da biblioteca de RNA-seq.....	55
3.1.12 Análise de dados de RNA-seq.....	57
3.1.13 Ensaio de atividade RALDH.....	57
3.1.14 Transferência de células T.....	57
3.1.15 Administração de antígeno oral.....	58
3.1.16 Passagem e infecção de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	58
3.1.17 Injeção de CT-OVA intestinal.....	58
3.1.18 Infecção por <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium-OVA.....	59
3.1.19 <i>Citrobacter rodentium</i> e <i>Citrobater rodentium</i> -OVA.....	60
3.1.20 Imunização por alumínio e desafio antigênico das vias aéreas.....	60
3.1.21 Lavagem broncoalveolar (LBA), histologia pulmonar e análise de infiltrado por citometria de fluxo.....	61
3.1.22 IgG1 anti-OVA e IgE total.....	61
3.1.23 Colonização e depleção de <i>Segmented Filamentous Bacteria</i> (SFB).....	61
3.1.24 Cirurgia de remoção dos mLNs.....	62
3.1.25 Rastreamento de "Fast Green".....	63
3.1.26 Análises estatísticas.....	63
3.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal.....	64
3.2.1 Animais.....	64
3.2.2 Indução de colite experimental por <i>Dextran Sodium Sulfate</i> (DSS).....	64
3.2.3 Avaliação macroscópica do desenvolvimento da colite.....	64
3.2.4 Avaliação do peso corpóreo dos camundongos.....	65
3.2.5 Comprimento do cólon.....	65
3.2.6 Avaliações histológicas e imunohistoquímicas do cólon.....	65
3.2.7 Teste de permeabilidade intestinal.....	66
3.2.8 Depleção da microbiota intestinal com uso de antibióticos.....	67
3.2.9 Monocolonização dos camundongos <i>germ-free</i> com <i>Bacteroides thetaiomicon</i>	67
3.2.10 Extração de células para citometria de fluxo e cultura celular.....	68
3.2.11 Contagem de células.....	68
3.2.12 Cultivo de células.....	68

3.2.13 Separação de leucócitos da <i>lamina propria</i> e linfócitos intraepiteliais.....	69
3.2.14 Citometria de fluxo.....	69
3.2.15 Separação de células (" <i>cell sorting</i> ").....	70
3.2.16 Ensaio de supressão de células T reguladoras " <i>in vitro</i> "......	71
3.2.17 Indução de colite por transferência de células T.....	72
3.2.18 Preparação de extratos de tecidos.....	72
3.2.19 Determinação de IgA secretória.....	72
3.2.20 Coleta sanguínea e obtenção de soro.....	72
3.2.21 Medida da produção de citocinas por ELISA.....	73
3.2.22 Quantificação da expressão de mRNA através de qPCR em tempo real.....	74
3.2.23 Isolamento do conteúdo fecal e DNA da microbiota das fezes.....	75
3.2.24 Sequenciamento de DNA da microbiota e análise bioinformática.....	76
3.2.25 Transfecção de células da " <i>lamina propria</i> "......	76
3.2.26 Cultura de células e transfecção de ácidos nucléicos para microscopia confocal.....	77
3.2.27 Imunofluorescência e microscopia confocal.....	77
3.2.28 Infecção por <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium e translocação bacteriana...78	
3.2.29 Análises estatísticas.....	78
4. RESULTADOS.....	79
4.1 Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais.....	80
4.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal.....	117
5. DISCUSSÃO.....	146
5.1 Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais.....	147
5.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal.....	154
6. CONCLUSÕES.....	162
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
8. ANEXOS.....	191
8.1 Anexo 1: Compartmentalized gut lymph nod drainage dictates adaptive immune responses. <i>Nature</i> 2019.	
8.2 Anexo 2: The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. <i>Mucosal Immunology</i> 2017.	

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mucosa intestinal e homeostase

O trato gastrointestinal é o maior sítio de interação do organismo com o meio externo. A mucosa do intestino delgado humano é estimada em 300 m² (Moog, 1981). Essa extensa superfície entra em contato com componentes da dieta diariamente, representando fonte constante de nutrientes e de estímulo antigênico. Já a porção distal do intestino humano é habitado por mais de 100 trilhões de microorganismos comensais (Gill et al., 2006).

A quantidade de bactérias que habita o intestino aumenta do intestino delgado para o cólon, onde se encontra a maior concentração de bactérias intestinais. Já a região proximal do intestino é o local de maior contato com antígenos da dieta sendo esta a região de absorção de nutrientes. Dessa forma, a mucosa intestinal é diferenciada ao longo do intestino e especializada em desenvolver respostas imunes específicas a cada microambiente que a compõe.

A mucosa intestinal abriga mais linfócitos do que todos os órgãos linfoides em conjunto (Mowat, 2003). A camada epitelial desempenha função importante de barreira física da mucosa e ainda sustenta células responsáveis pela secreção de peptídeos anti- microbianos e pela secreção de citocinas. Além disto, a camada epitelial aloja glândulas produtoras de muco, que formam barreira física importante à invasão microbiana (Bienenstock & Befus, 1980). Em contato com as células epiteliais, compondo a barreira epitelial, estão os linfócitos intraepiteliais (IEL - de *intraepithelial lymphocytes*) que possuem atividade citotóxica atuando também na defesa contra patógenos (Cheroutre, Lambolez, & Mucida, 2011; Shires, Theodoridis, & Hayday, 2001).

A *lamina própria* da camada da mucosa é reconhecida pela riqueza de células do sistema imune como mastócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, e desempenha importante papel na parte do processamento e apresentação de antígenos, diferenciação celular, além de alojar plasmócitos produtores de imunoglobulina A (IgA) (Izcue, Coombes, & Powrie, 2009; Mowat, 2003).

Em condições fisiológicas ocorrem dois principais eventos imunológicos na

mucosa intestinal: a indução de tolerância imunológica às bactérias comensais e às proteínas da dieta e a produção de IgA secretória (sIgA) (A. M. Faria & Weiner, 2006). Várias estruturas e compartimentos na mucosa intestinal estão envolvidos na manutenção desse ambiente tolerogênico (Uhlir & Powrie, 2003). O primeiro contato do antígeno que entra pela via oral se dá no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT, de *gut associated lymphoid tissue*). Esse é composto por estruturas linfóides locais organizadas como as placas de Peyer (PP) e os linfonodos mesentéricos (mLNs - de *mesenteric lymph nodes*), além das células epiteliais do vilo intestinal, linfócitos intraepiteliais (IEL - de *intraepithelial lymphocytes*) e por outros linfócitos distribuídos na *lamina propria* (LP) intestinal (Figura 1). Esses compartimentos são distintos em sua arquitetura, densidade de células imunes, composição e função (Bienenstock & Befus, 1980; Izcue et al., 2009; Mowat, 2003).

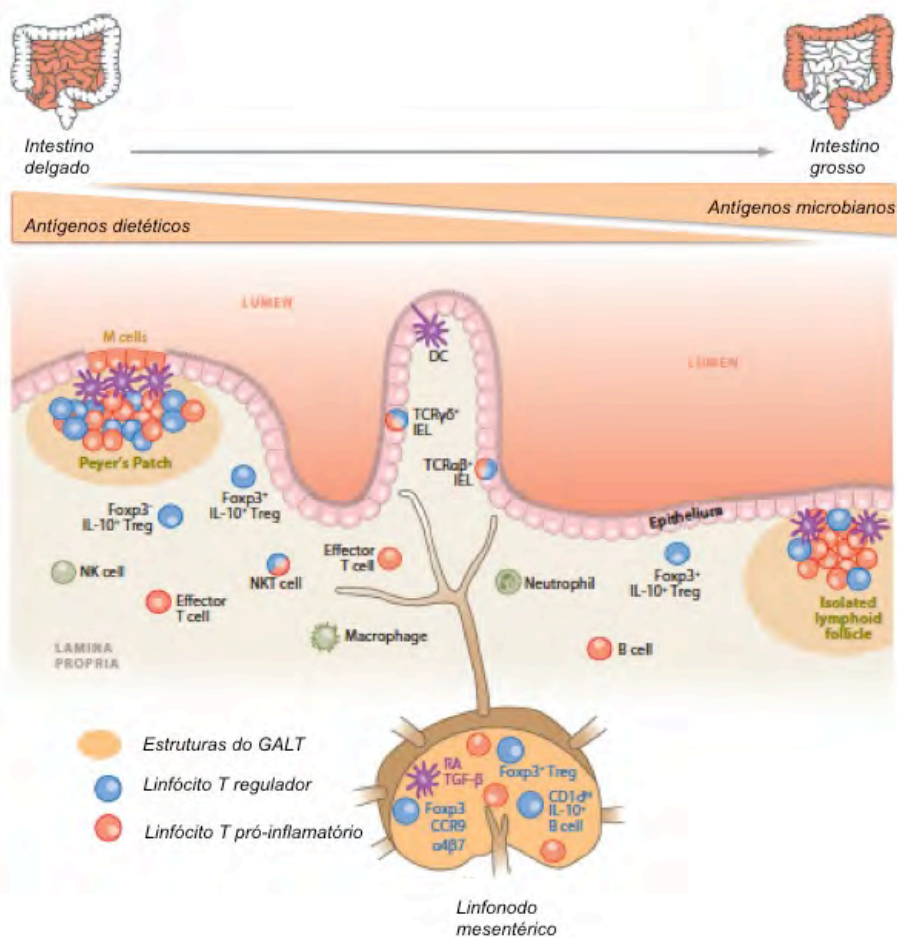


Figura 1: Ambiente imunológico intestinal. As respostas imunes no intestino ocorrem em células do epitélio, *lamina propria* e tecido linfóide associado a mucosa.

A mucosa contém células especializadas na captação e apresentação do antígeno, imunidade antimicrobiana e manutenção de tolerância aos antígenos provenientes da dieta e da microbiota. Abreviaturas: IEL: linfócitos intraepiteliais, NKT: células T natural Killer, DC: células dendríticas, Treg: células T reguladoras. Adaptado de (Izcue et al., 2009)

1.2 Indução de respostas imunes na mucosa

Os sítios de indução da resposta imune na mucosa são as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos. As PP são agregados linfoides macroscópicos que se localizam ao longo de todo intestino delgado, e são compostas por folículos de células B intercaladas com áreas de células T (Hamada et al., 2002). Os mLNs são os maiores linfonodos do corpo e servem como um cruzamento entre as vias periférica e de recirculação da mucosa. Para que uma resposta imune seja induzida na mucosa, o antígeno deve ter acesso às células apresentadoras de antígeno (APC). A absorção de antígenos ocorre através de uma variedade de mecanismos, incluindo a passagem por células M presentes nas PP, a absorção por células epiteliais colunares e a captação direta por células dendríticas (DCs). Essas células podem estender seus dendritos (prolongamentos) através do epitélio e captam o antígeno no lúmen intestinal (Rescigno et al., 2001). Ainda existe uma via alternativa, que é a entrada do antígeno diretamente pelas células do epitélio (Mowat, 2003).

Após captura e processamento, as APCs podem apresentar os antígenos diretamente para células T na PP ou após migração para os linfonodos, sendo esses locais importantes para ativação de linfócitos e produção de sIgA (Mowat & Agace, 2014). A sIgA contribui para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que estas reduzem a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal. Diversas citocinas incluindo TGF- β (de *transforming growth factor beta*), IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6 são necessárias para promover a troca de classe e a maturação para sIgA (Brandtzaeg, 1998; Suzuki & Fagarasan, 2009). As células ativadas nos linfonodos intestinais sofrem diferenciação e migram para a mucosa, onde atuam nas respostas imunes locais. Como os linfonodos conectam o sistema imune periférico e sistêmico, as respostas induzidas na mucosa apresentam também repercussões em todo o organismo (Mowat & Agace, 2014).

1.2.1. Respostas protetoras da mucosa: o epitélio e IELs

A maioria das células epiteliais do intestino (IECs) são enterócitos absorptivos, adaptados para funções metabólicas e digestivas. Entretanto, outras linhagens especializadas de IECs desempenham funções diferentes. IECs secretórias, incluindo células caliciformes e células de Paneth são especializadas em manter a barreira intestinal. A secreção no lúmen de mucinas e peptídeos antimicrobianos pelas células caliciformes e células de Paneth, respectivamente, estabelecem uma barreira física e bioquímica evitando o contato dos microorganismos com as células epiteliais e células imunes adjacentes (Gallo & Hooper, 2012; Y. S. Kim & Ho, 2010).

A secreção de mucinas glicosiladas no lúmen intestinal pelas células caliciformes cria a primeira linha de defesa contra invasão bacteriana. A mais abundante das mucinas, mucina 2 (MUC2), possui um papel importante na organização da camada de muco na superfície epitelial do cólon (Johansson et al., 2008). A importância das mucinas produzidas pelas células caliciformes é evidenciada pelo desenvolvimento de colite espontânea e predisposição a câncer de cólon observada nos camundongos deficientes para MUC2 (Van der Sluis et al., 2006; Velcich et al., 2002).

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) estão em contato direto com as células epiteliais e em proximidade imediata com antígenos do lúmen intestinal formando assim a primeira linha de defesa imune contra patógenos. Os IELs representam uma heterogênea população de linfócitos T dependendo do rearranjo do receptor de células T (TCR) que eles possuem ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) e da expressão de formas homodiméricas ($\alpha\alpha$) ou heterodiméricas ($\alpha\beta$) de CD8, bem como da co-expressão de CD4 (Cheroutre et al., 2011; Hoytema van Konijnenburg & Mucida, 2017). Além da citotoxicidade em resposta a antígenos do lúmen, outras funções conhecidas dos IELs são o reparo da barreira epitelial e controle do crescimento e rotatividade das células epiteliais, indução de mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgA e seu papel na tolerância oral dependente de IL-10 (Komano et al., 1995; Mengel et al., 1995; Shires et al., 2001).

1.2.2 As ILCs e sua interação com o epitélio e as células imunes

Recentemente foram identificados novos tipos celulares do sistema imune

inato, os chamados linfócitos inatos (ILCs, de *innate lymphoid cells*), que estão presentes predominantemente nas mucosas. Os ILCs são derivados da linhagem de células hematopoiéticas e são caracterizados por apresentar morfologia celular clássica de linfócitos, entretanto eles não expressam moléculas de superfície celular que identificam outros tipos de células imunes, e por isso os ILCs são definidos como células de linhagem negativa (Lin⁻) (Artis & Spits, 2015; Spits & Di Santo, 2011). Os ILCs expressam receptores de citocinas como o receptor de IL-2 (CD25) e de IL-7 (CD127), mas diferentemente dos linfócitos adaptativos T e B, os ILCs não expressam receptores de rearranjo antigênico somático e, desta maneira, não possuem nenhuma forma de especificidade antigênica (Spits et al., 2013; Spits & Di Santo, 2011).

Os ILCs são atualmente subdivididos em três grandes grupos que possuem padrões de produção de citocinas que espelham o perfil de citocinas secretadas pelos subtipos de células T *helper* (Th) (Spits & Di Santo, 2011). O grupo 1 de ILCs inclui as células NK e as ILC1s, que atuam na resposta imune contra patógenos intracelulares como vírus e bactérias intracelulares. O grupo 2 inclui as ILC2s (células *helper* naturais 2, nuocytes e células *helper* inatas 2) que produzem citocinas características de células T *helper* 2 (Th2) e promovem resposta imune contra helmintos, bem como fatores que auxiliam o reparo de barreira epitelial. Já as ILC3s incluem os linfócitos indutores de tecido (LTi, de *lymphoid tissue inducer*), que são necessários para o desenvolvimento de linfonodos, placas de Peyer e estruturas linfoides ectópicas, além de NRC⁺ e NRC⁻ (receptor de citotoxicidade natural) e ILC3s, que atuam na resposta imune a bactérias (Artis & Spits, 2015; Spits et al., 2013; Zook & Kee, 2016).

Na mucosa intestinal os ILCs parecem ser particularmente importantes para regulação da barreira epitelial e defesa contra patógenos. Devido a sua localização estratégica e pelo fato destas células serem ativadas primariamente por receptores de citocinas, os ILCs são umas das primeiras células a reagir contra patógenos induzindo resposta contra infecção e modulando a resposta imune adaptativa. Tem sido demonstrado ainda importante papel das ILCs em algumas doenças como infecções por *Citrobacter rodentium*, *Nippostrongylus brasiliensis* e colite, sendo a sua ativação inapropriada relacionada a patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes (Buonocore et al., 2010; Hoyler et al., 2012; Klose & Artis, 2016;

Sonnenberg, Monticelli, Elloso, Fouser, & Artis, 2011).

1.2.3 A IgA secretória

A manutenção de um ambiente tolerogênico na mucosa intestinal conta também com a ação da sIgA, a principal classe de imunoglobulina na mucosa intestinal. A sIgA é produzida na forma dimérica, sendo as duas unidades unidas por uma cadeia polipeptídica J. Grandes quantidades de IgA são constitutivamente secretadas por plasmócitos intestinais para revestir e conter a microbiota comensal em condições normais de homeostase, podendo ser de maneira dependente de células T (TD) ou independente de células T (TI) (Bunker et al., 2015; Macpherson et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que as sIgA não são específicas a um único táxon de bactérias, mas são poli-reativas, com ampla reatividade a um subconjunto diversificado, porém definido, da microbiota comensal (Bunker et al., 2017). Esses anticorpos surgem em baixas frequências entre células B *naive* e são selecionadas no repertório de IgA após recirculação nas placas de Payer. Diferentemente do que era pensado, esse processo de seleção acontece independentemente de antígenos da microbiota ou da dieta (Bunker et al., 2017), sugerindo um mecanismo endógeno homeostático induzindo a produção de IgA poli-reativa com especificidade inata à microbiota.

Estudos em camundongos deficientes em AID (de *activation-induced cytosine deaminase*), em que não acontece a mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgA, mostraram que estes camundongos exibem hiperplasia linfóide do intestino e alteração na composição da microbiota, favorecendo assim o crescimento de classes específicas de bactérias (Suzuki et al., 2004). Por outro lado, têm sido demonstrado também um papel da microbiota comensal influenciando ativamente a produção de sIgA (Hapfelmeier et al., 2010). Um exemplo são os produtos da microbiota reconhecidos por receptores do tipo Toll (TLR) presentes nas células epiteliais que resultam em mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgA2 (He et al., 2007), um processo que potencialmente afeta interações entre o sistema imune e a microbiota.

A sIgA é fundamental para reduzir a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal, através da sua capacidade de revestir as bactérias prevenindo sua

adesão ao epitélio, e ainda exerce funções imunológicas não inflamatórias como *clearance* de complexos imunes, neutralização extracelular de patógenos, neutralização intracelular de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e vírus (Sutherland & Fagarasan, 2012). Além disso, a sIgA apresenta reduzida capacidade de ativar a via clássica e alternativa do complemento e é capaz de suprimir o “*burst respiratório*” de neutrófilos, inibir a produção de citocinas induzidas por LPS, como TNF- α e IL-1 por monócitos. Complexos imunes contendo sIgA são capazes de suprimir a atração de neutrófilos, eosinófilos e monócitos, reduzindo dessa forma a atividade pró-inflamatória (Brandtzaeg, 2009; Murthy, Dubose, Banas, Coalson, & Arulanandam, 2006; Strugnell & Wijburg, 2010).

1.2.4 Células T reguladoras e tolerância oral

Além da proteção contra a penetração de bactérias comensais ou patógenos conferida pela produção de sIgA, o segundo principal evento que acontece na mucosa intestinal em condições fisiológicas é a tolerância oral a antígenos da dieta e a antígenos da microbiota (A. M. Faria & Weiner, 2006). A tolerância oral é definida como um estado de baixa reatividade imunológica específica após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (Vaz, Maia, Hanson, & Lynch, 1977). A tolerância oral afeta vários aspectos da resposta imune específica como: produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas (Afuwape, Turner, & Strobel, 2004; Ngan & Kind, 1978); reação de hipersensibilidade tardia – DTH (Mowat, Strobel, Drummond, & Ferguson, 1982) e produção de citocinas (Afuwape et al., 2004; Weiner et al., 1994). Assim, a tolerância oral se apresenta como um evento complexo, ativo e contínuo, que abrange mecanismos celulares e moleculares na sua indução, bem como desencadeia efeitos locais no intestino e sistêmicos no indivíduo como um todo (A. M. Faria & Weiner, 2005).

Os mecanismos sistêmicos e periféricos da tolerância oral são creditados principalmente às células T reguladoras (Treg). Mowat e colaboradores descreveram a indução de células T com funções supressoras na tolerância oral e, desde então, diversos subtipos de Treg, bem como seus marcadores fenotípicos, foram descritos (discutido abaixo) (Mowat, Faria, & Weiner, 2005). Utilizando

modelo experimental de asma, Mucida e colaboradores mostraram que camundongos deficientes em Tregs naturais (nTregs) são altamente suscetíveis à indução de tolerância oral (Mucida et al., 2005). A exposição oral ao antígeno nesses animais leva à geração de Tregs periféricas antígeno-específicas que expressam o fator de transcrição *foxp3* (Foxp3, de *Forkhead box p3*) e CTLA-4. Esse trabalho mostra que a indução da tolerância oral não requer nTregs derivadas do timo já que Tregs com características similares são induzidas na periferia pela administração oral de antígeno. Entretanto, a tolerância é reduzida quando TGF- β é bloqueado. Esse trabalho é consistente com a ideia de que a administração oral de antígeno induz Tregs antígeno-específicas em um processo que requer TGF- β para indução de Foxp3 e, portanto, de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ periféricas. Corroborando esses dados, foi demonstrado mais tarde que a tolerância oral não pode ser induzida na ausência de células Tregs induzidas na periferia (iTregs ou pTregs) (Curotto de Lafaille et al., 2008). Evidências demonstram ainda que a geração dessas células Treg periféricas depende da apresentação de antígeno pelas APCs em um microambiente rico em TGF- β , IL-2 e/ou o metabólito de vitamina A ácido retinóico (RA) (Bilate & Lafaille, 2012).

Os linfonodos mesentéricos que drenam o intestino (mLNs) representam um importante local de ativação e diferenciação linfocitária para os intestinos delgado e grosso (; Izcue et al., 2009). As APCs, particularmente as DCs migratórias, migram continuamente através dos vasos linfáticos que drenam o intestino para os mLNs. Lá, as DCs apresentam antígenos derivados do intestino para células T CD4⁺ *naive* (Diehl et al., 2013; D. Esterhazy et al., 2016), instruindo-as a diferenciá-las em células pTreg Foxp3⁺ imunossupressoras ou células T *helper* pró-inflamatórias (Th). Antígenos administrados por via oral geralmente induzem células pTreg, que são cruciais para o controle de respostas inflamatórias. Este processo depende da produção de ácido retinóico (RA) e de TGF- β (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2007) pelas DCs migratórias, particularmente CD11b⁻ e das DCs integrina α E (CD103)⁺ (Idoyaga et al., 2013; Worbs et al., 2006). Em contraste, DCs migratórias CD11b⁺ induzem eficientemente a diferenciação de células CD4⁺ em células Th efectoras (D. Esterhazy et al., 2016).

Estudos mais recentes sugerem que, além das DCs migratórias CD103⁺, células estromais não-hematopoéticas sésseis dos mLNs também contribuem para os níveis mais altos de RA presentes nos mLNs (Roosendaal & Mebius, 2011). Eles expressam níveis substancialmente mais elevados de RALDH (*retinal aldehyde dehydrogenase* - enzima que sintetiza o RA) em comparação com células do estroma no LN periférico que drena a pele (pLN), e o RA derivado das células do estroma dos mLNs podem induzir diretamente a expressão de moléculas de *homing* para o intestino em células T ativadas (Hammerschmidt et al., 2008; Molenaar et al., 2009; Pezoldt et al., 2018).

O TGF- β desempenha um papel crucial no intestino, capaz de apresentar efeitos pleiotrópicos na diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celular, afetando múltiplos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, carcinogênese, fibrose, cicatrização de feridas e respostas imunes (Cazac & Roes, 2000). O TGF- β é secretado na forma de um precursor ligado ao peptídeo associado à latência (LAP) e pode atuar na forma livre, após a clivagem desse peptídeo, ou ligado à membrana celular (Oida & Weiner, 2010). O TGF- β é importante para manutenção da homeostase intestinal e na tolerância imunológica aos auto componentes. Ele é fundamental na troca de isotipo para IgA (Cazac & Roes, 2000), na indução e manutenção de células T *helper* 17 (Th17) e de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturais ou induzidas e na supressão de células T efectoras (Li, Wan, Sanjabi, Robertson, & Flavell, 2006; Pyzik & Piccirillo, 2007; Taylor, 2009).

Assim como o TGF- β , a IL-10 possui um papel importante na homeostase intestinal. Ela atua na maturação de células dendríticas, regula negativamente a expressão de MHCII e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 prevenindo apresentação de antígeno, além de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias (Gomes-Santos et al., 2012; Skeen, Miller, Shinnick, & Ziegler, 1996). Um dos seus efeitos mais estudados é na manutenção da expressão de Foxp3 e regulação da sua função em células Treg (Hofmann, Rosen-Wolff, Tsokos, & Hedrich, 2012; Paul, Khare, & Gasche, 2012).

Outra citocina com papel importante na atividade imunorregulatória da mucosa intestinal são os interferons do tipo I (IFN-I). Uma vez expressos e

secretados pela célula, os IFN-I (como os IFN- α s , IFN- β s) se ligam ao seu receptor comum (IFNAR) que é expresso em quase todos os tipos celulares. Apesar de possuir o mesmo receptor, eles promovem diferentes efeitos dependendo do subtipo do IFN, tipo celular e contexto (sinais de outras citocinas) (Ivashkiv & Donlin, 2014; Thomas et al., 2011). Os IFN-I também são cruciais para produção de citocinas anti-inflamatórias, expansão e manutenção das células Treg, promovendo homeostase intestinal e podendo suprimir respostas imunes (Cho & Kelsall, 2014). Tem sido demonstrado ainda que IFN-I são capazes de induzir a renovação de células epiteliais e reparo (L. Sun et al., 2015).

Diferentes populações de células T reguladoras já foram descritas, como as células Tr1, células Th3, células Treg que expressam Foxp3 e células Treg CD4⁺ LAP⁺. Tregs do tipo Tr1 são células CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ que se diferenciam a partir de linfócitos T CD4⁺ após a exposição crônica a antígenos e suas funções supressoras são atribuídas principalmente à ação da IL-10. Já as células Th3 exercem suas propriedades imunossupressoras principalmente via TGF- β (Roncarolo, Bacchetta, Bordignon, Narula, & Levings, 2001; Weiner, 2001).

A expressão estável da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e, principalmente, a expressão do fator de transcrição Foxp3, têm sido apontados como específicos para proteção em doenças autoimunes, sendo o gene Foxp3 responsável por regular negativamente a ativação de células T (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003; Kaspruwicz, Smallwood, Tyznik, & Ziegler, 2003; Kuniyasu et al., 2000). Linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ estão presentes em todos os órgãos do corpo e constituem aproximadamente 10% do total da população de células T CD4⁺. Entretanto, na lâmina própria do intestino essas células representam uma proporção maior, sendo mais 30% das células T CD4⁺ no cólon e cerca de 20% na lâmina própria do intestino delgado. Células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulam as respostas imunes através de diferentes mecanismos, entre eles estão a inibição por contato e secreção de citocinas moduladoras como IL-10 e TGF- β (Tanoue, Atarashi, & Honda, 2016).

Outros tipos de células T reguladora periférica descritas por ter uma função importante na homeostase intestinal são as células CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ e CD4⁺ CD25⁻ LAP⁺. O LAP é um propeptídeo que está não covalentemente associado ao domínio

amino-terminal do TGF- β , formando um complexo de TGF-latente (Weiner, da Cunha, Quintana, & Wu, 2011). Quando essa forma precursora é liberada da célula, ela é clivada por enzimas como a trombospondina-1 e o TGF- β ativo é liberado. As células T reguladoras CD4⁺ LAP⁺ exercem sua função supressora através de inibição por contato e pelos efeitos derivados da ação do TGF- β (Chen, Yan, Bando, Kuchroo, & Weiner, 2008; Nakamura et al., 2004).

1.2.5 Células T efectoras na mucosa intestinal e seu papel protetor

Células T CD4⁺ e células T CD8⁺ são encontradas na *lamina propria* na razão de aproximadamente 2:1. Essas células são derivadas de células T convencionais que foram primadas em órgãos secundários linfoides. Consistente com essa ideia, a maioria das células T CD4⁺ e T CD8⁺ da *lamina propria* apresentam características de células efectoras de memória. As células T CD4⁺ do intestino são altamente diversas, contemplando subtipos de células T *helper* 1 (Th1) produtoras de IFN- γ , T *helper* 2 (Th2) produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13, T *helper* 17 (Th17) produtoras de IL-17, T *helper* 22 (Th22) produtoras de IL-22, além das células Treg discutidas anteriormente (Ivanov et al., 2006; Sathaliyawala et al., 2013; J. Zhu & Paul, 2010).

Exposição à microbiota no início da vida influencia o desenvolvimento das linhagens de células T *helper* (Th) e insuficiente contato com a microbiota resulta em desequilíbrio de respostas imunes levando à doenças inflamatórias intestinais e alergia (Koloski, Bret, & Radford-Smith, 2008). Este estímulo da microbiota parece ser crucial na formação de respostas imunes com perfil mais voltado para Th2, provavelmente por induzir a diferenciação de outro subtipo de células Th, incluindo Th1, Th17 e Treg. De fato, a colonização de camundongos isentos de germes (*germ-free* - GF) com certos tipos de bactérias induz o desenvolvimento de células Th1 no baço, Th17 no intestino e Treg (Atarashi et al., 2011; Ivanov et al., 2009; Mazmanian, Liu, Tzianabos, & Kasper, 2005).

As células Th1 desempenham um papel importante na proteção contra infecções intestinais bacterianas doenças autoimunes, enquanto as células Th2 são essenciais nas infecções por helmintos, além de estarem envolvidas em reações alérgicas contra antígenos da dieta (Maloy & Powrie, 2011). Tradicionalmente

acredita-se que as células Th1 são as principais células efetoras na patogênese da doença de Crohn, entretanto algumas evidências indicam também a atuação de células Th17 na inflamação intestinal (Kobayashi et al., 2008).

Células Th17 também possuem importante função no intestino. Essas células constituem um subconjunto de linfócitos T CD4⁺ que expressam ROR γ t (*retinoic acid-receptor-related orphan receptor gamma*) na presença de TGF- β , IL-1 β , e IL-6, sendo o seu desenvolvimento também modulado pela microbiota comensal. Dentre os componentes da microbiota capazes de induzir a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em Th17 estão as *Segmented Filamentous Bacteria* (SFB), um patobionte que coloniza preferencialmente o íleo e cólon (Atarashi et al., 2015; Ivanov et al., 2009; Sano et al., 2015). Os linfócitos Th17 atuam através da secreção de citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22, atraindo neutrófilos, induzindo a liberação de peptídeos antimicrobianos e promovendo reparo do tecido. Porém, respostas Th17 descontroladas provocam dano tecidual, como ocorre, por exemplo, na inflamação intestinal. Dessa forma, o sistema imune apresenta vários mecanismos para controlar a atividade das células Th17, entre eles a ação das células Treg (Huber, Gagliani, & Flavell, 2012).

1.3 Doenças inflamatórias intestinais e a quebra da homeostase intestinal

Mesmo com todos os mecanismos imuno-reguladores presentes na mucosa intestinal citados acima, tais como a camada de muco, células epiteliais e IELs, citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , células T reguladoras tolerogênicas e ILCs (A. M. Faria & Weiner, 2006); alguns indivíduos ainda desenvolvem doenças como alergias e doença inflamatória intestinal (IBD, de *inflammatory bowel disease*). As IBDs são inflamações crônicas e recorrentes do intestino, que compreendem duas formas clínicas principais: a doença de Crohn (CD, de *Crohn disease*) e a colite ulcerativa (UC, de *ulcerative colitis*). Apesar da taxa de mortalidade ser baixa, as IBDs estão associadas à alta morbidade e comprometimento da qualidade de vida do paciente (Ferguson, Peterman, Hubner, Philpott, & Shellin, 2007; Ferguson, Shelling, Browning, Huebner, & Petermann, 2007).

A principal diferença entre UC e CD se baseia na natureza e na localização das lesões. A CD caracteriza-se por um envolvimento transmural e descontínuo do

intestino, podendo atingir todo o tubo digestivo, sendo, porém, mais comum no íleo e cólon. Já a UC é caracterizada por uma inflamação contínua, restrita ao cólon e reto, e afeta somente a camada mucosa do intestino (Ferguson, Shelling, et al., 2007; Khor, Gardet, & Xavier, 2011).

A etiologia das IBDs não está totalmente clara, porém é conhecido o envolvimento de fatores ambientais, genéticos e resposta imune. Os genes relacionados ao desenvolvimento das IBDs possuem funções em várias vias essenciais para a manutenção da homeostase intestinal, incluindo função epitelial, defesa contra micróbios, regulação das respostas imunes inatas, geração de espécies reativas de oxigênio, autofagia e regulação das respostas imunes adaptativas (Khor et al., 2011).

Nas IBDs, ocorre uma desregulação das células imunológicas, sendo que a redução da atividade de células reguladoras e o aumento de células efetoras participam do desenvolvimento e exacerbação dessas doenças (Bouma & Strober, 2003). Fatores ambientais como microbiota intestinal e dieta também estão envolvidos no desenvolvimento das IBDs (Friswell, Campbell, & Rhodes, 2010; Khor et al., 2011; Shiga et al., 2012).

No caso de doenças alérgicas, a alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imunológica adversa às proteínas alimentares que afeta em torno de 6% das crianças e de 3 a 4% dos adultos (Sicherer & Sampson, 2006). Uma falha nos mecanismos da tolerância oral resulta em hipersensibilidade alimentar (Chehade & Mayer, 2005). Esta resposta imunológica adversa aos alimentos pode ser dependente de IgE ou não. O desenvolvimento de uma resposta mediada por IgE a um alergênico é resultado de uma série de interações moleculares e celulares envolvendo APCs, células T e células B. As APCs apresentam pequenos fragmentos de peptídeos em conjunto com as moléculas de MHC de classe II às células T, chamado "primeiro sinal", que leva à proliferação de células T e à geração de citocinas que promovem o "segundo sinal", culminando com ativação de células Th2. Os linfócitos Th2 e as citocinas liberadas por estes ativam os linfócitos B específicos para os antígenos alergênicos e, sob a influência do ligante CD40 e de citocinas, principalmente IL-4, os linfócitos B sofrem a troca de isotipo de IgM para IgE (Fuleihan, 1998). Os anticorpos IgE específicos para o antígeno se ligam aos receptores de superfície de mastócitos, basófilos, macrófagos e outras APCs,

armando o sistema imunológica para a reação alérgica que ocorrerá no próximo contato com esse antígeno específico (Sampson, 1999).

Em uma nova exposição ao antígeno, ocorre a ligação cruzada entre o antígeno e a IgE ligada aos mastócitos com consequente degranulação e secreção de mediadores pré-formados como histamina, enzimas e fatores quimiotáticos que são responsáveis pelos sintomas das reações alérgicas. Histamina, prostaglandinas e leucotrienos promovem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. Fatores quimiotáticos atraem eosinófilos que liberam outros mediadores prolongando a resposta alérgica (Anderson, 1997; Fuleihan, 1998). A alergia alimentar conduz, portanto, a uma hiper-atividade imunológica e a um quadro inflamatório (Bufe, 1998). As citocinas Th2 influenciam uma variedade de eventos associados com a inflamação alérgica crônica. IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE e o aumento da expressão das moléculas de adesão celular (VCAM-1) seletivas para eosinófilos/basófilos. IL-5 e IL-9 induzem a maturação de eosinófilos. IL-3 e IL-9 promovem o desenvolvimento de mastócitos. IL-4, IL-9 e IL-13 aumentam a produção de muco pelas células caliciformes da mucosa (Kay, 2000).

Além da alergia alimentar, alergias que acometem as vias respiratórias, como a asma, tem se tornado cada vez mais comum nos dias atuais. A asma é uma inflamação pulmonar crônica, caracterizada pela obstrução reversível do fluxo aéreo, hiperreatividade brônquica ou aérea (AHR, de airway hyperreactivity), grande produção de muco e altos níveis de IgE (Bousquet & Michel, 1992). A gravidade da doença está associada com a intensidade do infiltrado eosinofílico acompanhado com produção de citocinas tipo-2 (IL-4 e IL-5 e IL-13) e os níveis de IgE (Gleich & Kita, 1997; Holgate, 1999).

Fatores ambientais como poluição, fungos, ácaros domésticos e cigarros, associados com uma predisposição genética, contribuem enormemente para a severidade da doença. Estudos epidemiológicos relatam grandes diferenças na prevalência da asma entre regiões geográficas, "sociais" e em populações com diferentes hábitos, como animais de estimação (Holgate, 1999; Shapiro & Stout, 2002). A qualidade do ar (dentro e fora de casa) afeta o desenvolvimento de doenças respiratórias. Poluentes como ozônio, dióxido de enxofre e dióxido de nitrogênio, além de matéria particulada menor que 2.5 μM , têm sido associados às

alergias e à exacerbação da asma em crianças. Estes poluentes podem afetar diretamente as células envolvidas no desenvolvimento da doença, como também indiretamente, modificando a apresentação do alérgeno (Saxon & Diaz-Sanchez, 2005).

1.3.1 Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais

Atualmente existem diversos modelos murinos para estudo da inflamação intestinal. Tradicionalmente, os modelos murinos de colite têm sido divididos em três tipos principais: a) aqueles que são induzidos por manipulação genética, b) aqueles que dependem da transferência de populações de células CD4⁺ CD45RB^{high} para hospedeiros imunodeficientes e c) modelos de colite induzida por agentes químicos (Strober, Fuss, & Mannon, 2007).

No segundo tipo de modelo citado, a transferência de células CD4⁺ CD45RB^{high} (indicando células *naive*) para camundongos imunodeficientes (RAG^{-/-}) induz o desenvolvimento de colite crônica devido à expansão das células transferidas. Na ausência de células Treg, as células T *naive* proliferam e convertem em células efetoras patogênicas Th1 / Th17. Entretanto, a co-transferência de células CD4⁺ CD45RB^{low} (indicando células experimentadas com perfil regulatório - Treg) inibe o desenvolvimento da doença. A inflamação acomete desde o cécum até o reto e o infiltrado inflamatório é caracterizado principalmente por macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Características da doença podem ser vistas pelo desenvolvimento de lesões histopatológicas incluindo hiperplasia epitelial e inflamação transmural focal (Leach, Bean, Mauze, Coffman, & Powrie, 1996; Morrissey, Charrier, Braddy, Liggitt, & Watson, 1993). Este modelo representa uma valiosa ferramenta para avaliar também a eficiência de células Treg no seu papel supressor.

Considerando o terceiro tipo modelo experimental citado, um protocolo amplamente utilizado para se estudar a inflamação intestinal é a colite induzida pela administração oral do sulfato de sódio dextrano (DSS). O modelo de colite induzido por DSS foi originalmente descrito em 1990 (Okayasu et al., 1990) e desde então, foi amplamente utilizado devido à facilidade na indução. Na colite aguda, ocorre perda de peso, sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e estrutura glandular do intestino. O infiltrado inflamatório é composto

principalmente por neutrófilos que infiltram a base das criptas intestinais, afetando a estabilidade do epitélio intestinal (Kawada, Arihiro, & Mizoguchi, 2007; Kitajima, Takuma, & Morimoto, 1999; Melgar, Karlsson, & Michaelsson, 2005; Okayasu et al., 1990).

O mecanismo pelo qual o DSS promove a colite ainda não foi esclarecido, mas foi sugerido que o DSS tem efeitos tóxicos no epitélio, aumentando a exposição aos antígenos luminais pela destruição do conteúdo de mucina ou alterando a função dos macrófagos devido a fagocitose do DSS (Kitajima et al., 1999; Ni, Chen, & Hollander, 1996). Dessa forma, a perda da homeostase do epitélio intestinal causada pelo efeito tóxico direto do agente químico consistiria em um evento inicial importante para a inflamação da mucosa nesse modelo (Kitajima et al., 1999; Poritz et al., 2007). Além disso, a colite induzida por DSS pode ser causada pela interferência do DSS na interação fisiológica entre linfócitos intraepiteliais, células epiteliais e proteínas de matriz extracelular, como também a um aumento na expressão dos receptores das moléculas de adesão (Ni et al., 1996).

Existem ainda modelos murinos para estudo da inflamação das mucosas pela quebra da tolerância natural a antígenos que entram em contato com o corpo pela via oral (antígenos da dieta) ou pelas vias aéreas. Nesse caso, a quebra dos mecanismos de regulação imune nas mucosas (principalmente envolvendo as células pTreg) leva ao desenvolvimento de alergias alimentares ou inflamação eosinofílica das vias aéreas (asma). No modelo de asma experimental, os camundongos são expostos ao antígeno pela via oral (gavagem ou água de beber), seguidos de duas imunizações com o antígeno mais adjuvante sete dias após a administração do antígeno e sete dias após a primeira imunização. Para o teste de alergia, os camundongos são desafiados com solução contendo o antígeno intranasal quatorze dias após a primeira imunização. Os níveis de IgE, eosinófilos e resposta Th2 são então avaliados como mensuração de resposta alérgica (Mucida et al., 2005; Russo et al., 2001).

1.4 Microbiota intestinal

Os micro-organismos são integrantes fundamentais na construção da Terra e tem sido essenciais na evolução da vida muito antes do surgimento dos Eucariotos.

Os microorganismos vivem em comunidades bem organizadas nas diversas regiões da biosfera. A associação entre a comunidade microbiana e seu hospedeiro eucarioto tem demonstrado, atualmente, uma forte interação que vai além de uma simples relação física e que permite uma variedade de benefícios fisiológicos (Bik, 2009).

Bactérias e vertebrados tem co-evoluído há milhares de anos vivendo em relação de simbiose. Mamíferos são colonizados por microorganismos que estão presentes nas superfícies do corpo cobertas por células epiteliais e expostas ao ambiente externo tais como o trato gastrointestinal, respiratório e a pele (Tlaskalova-Hogenova et al., 2004). Essa relação de simbiose promove diversos benefícios ao hospedeiro, como por exemplo, defesa contra a colonização de patógenos oportunistas, suplementação de nutrientes essenciais, bem como, metabolismo de composto não-digestíveis, desenvolvimento da arquitetura intestinal, e principalmente, na regulação do sistema imune (Baumgart & Carding, 2007; Hooper & Macpherson, 2010; Macpherson & Harris, 2004; Round & Mazmanian, 2009).

A colonização do TGI por microorganismos inicia-se desde o nascimento e é modificada posteriormente por fatores como dieta, uso de antibióticos, fatores genéticos e outros fatores ambientais (Ayres, Trinidad, & Vance, 2012; Maslowski & Mackay, 2011; Smits et al., 2017). Nos humanos, essa relação simbiótica é estabelecida durante os primeiros 2-3 anos de vida (MacDonald, 1995). A partir do nascimento, a colonização bacteriana no trato intestinal é drasticamente aumentada devido aos contatos do bebê com o ambiente externo e com a microbiota da mãe (Cebra, 1999). Em animais *germ-free* (GF), nos quais a microbiota foi introduzida (convencionalizados), o aparecimento de plasmócitos secretores de IgA na mucosa é diretamente proporcional à colonização bacteriana (Crabbe, Bazin, Eyssen, & Heremans, 1968). A composição da microbiota intestinal é de extrema importância para a saúde geral do indivíduo, pois tanto a resposta imune local quanto a sistêmica apresentam-se comprometidas em sua ausência (Canesso et al., 2014; Maslowski et al., 2009; Mazmanian, Round, & Kasper, 2008).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas técnicas como a metagenômica, que identifica por meio do 16S rRNA microbiano, tem possibilitado o estudo do genoma microbiano. O projeto de elucidação do genoma da microbiota humana (microbioma) tem sido desenvolvido desde 2007 (Turnbaugh et al., 2007) e

permite identificar bactérias antes não identificadas por não serem estas cultiváveis. Estima-se que o número de bactérias da microbiota é 10 vezes superior ao número de células do indivíduo humano e que o genoma da nossa microbiota ultrapasse em 100 vezes o número de nossos genes (Ley, Peterson, & Gordon, 2006; Turnbaugh et al., 2007). Dessa forma, alguns autores consideram a existência de um "superorganismo" dentro do organismo humano (Eberl, 2010).

As comunidades microbianas comensais no intestino apresentam alta diversidade no nível de espécie, porém baixa diversidade em nível de filo. Em todos os vertebrados a microbiota comensal intestinal é dominada por dois filios: os Gram-negativos Bacteroidetes e os Gram-positivos Firmicutes, compreendendo cerca de 90% dos filios presentes no intestino. Os outros 10% da população total pertencem predominantemente aos filios Proteobacteria e Actinobacteria (Gallo & Hooper, 2012; Gill et al., 2006).

O número de bactérias da microbiota aumenta ao longo do intestino, sendo o cólon o local de maior concentração bacteriana. Por outro lado, a estimulação pelos antígenos dietéticos ocorre, na maior parte, no intestino delgado, local de digestão e absorção de nutrientes (Izcue et al., 2009; Mowat & Agace, 2014). A exposição diária a grandes quantidades de antígenos vindos da dieta e da microbiota faz com que o intestino seja um local extremamente regulado pelo sistema imune, sendo apto a manter o balanço entre respostas protetoras contra patógenos e tolerância (D. Esterhazy et al., 2016).

1.4.1 Microbiota e sistema imune

O sistema imune tem se desenvolvido e co-evoluído de uma maneira bem eficiente para controlar e viver com a população de microorganismos com o qual está associado. Para que exista essa relação, o hospedeiro se protege contra invasões microbianas, lesões e também as reações indesejadas contra antígenos presentes nos alimentos, enquanto os microorganismos intestinais necessitam de proteção contra microorganismos competitivos e contra a própria resposta imune do hospedeiro (Backhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005).

A chave para coexistência da microbiota comensal e as células imunes da mucosa é a capacidade de manter a segregação entre o hospedeiro e os

microorganismos. Esta separação só é possível devido a barreira física e bioquímica formada pelas células epiteliais intestinais (IECs). Além disso, IECs são capazes de perceber e responder a estímulos microbianos para reforçar essa barreira e coordenar uma resposta imune apropriada, indo de tolerância à imunidade contra patógenos (Peterson & Artis, 2014). As IECs produzem substâncias, como peptídeos antimicrobianos, defensinas, IgA, muco, que inibem o crescimento de bactérias indesejáveis (Hooper & Macpherson, 2010).

Interações imunológicas-microbianas bidirecionais regulam o desenvolvimento da imunidade das mucosas e alteram a composição da microbiota, contribuindo para o bem estar geral do hospedeiro. O tecido linfóide associado à mucosa em crianças amadurece ao longo de vários meses após o nascimento, estando este processo intimamente ligado com o desenvolvimento e estabelecimento da microbiota intestinal, além da qualidade dos nutrientes da dieta e metabólitos produzidos pelos comensais (Jain & Walker, 2015). Exemplos desses metabólitos são os ácidos graxos de cadeia curta que são capazes de se ligar a receptores presentes na superfície de células imunes, como o receptor acoplado a proteína G GPR43, modulando a resposta inflamatória nessas células (Macia et al., 2015; Maslowski et al., 2009). Entretanto, interações defeituosas entre a microbiota luminal e o sistema imune intestinal podem levar à inflamação sustentada e ao desenvolvimento de doenças crônicas, como IBD. Dessa forma, a microbiota possui um papel importante na maturação e homeostase do sistema imune.

1.5 Sensores imunológicos na mucosa intestinal

Como já mencionado, a mucosa do intestino é o maior órgão linfóide do corpo e a maior área de contato com o meio externo sendo constantemente exposta a uma plethora de componentes imunologicamente ativos presentes na dieta e na microbiota autóctone (Moog, 1981; Gill et al, 2006; Mowat, 2003). Tais contatos significam, por um lado, um desafio contínuo já que as células imunes locais precisam produzir respostas diferenciadas para os antígenos inócuos ou mesmo tóxicos (tais como os componentes da dieta e da microbiota) e aqueles potencialmente patogênicos (como os agentes infecciosos) sob o risco de comprometer a homeostase da mucosa intestinal ou a integridade do corpo. Por

outro lado, esses mesmos estímulos são fundamentais para a maturação da mucosa, do tecido linfóide associado a ela e mesmo do sistema imune como um todo. Camundongos mantidos sem microbiota (*germ-free*) ou alimentados desde o desmame com uma dieta sem proteínas inteiras (substituídas por aminoácidos não imunogênicos) apresentam alterações na arquitetura e função da mucosa intestinal assim como um déficit no desenvolvimento do sistema imune. A ausência desses estímulos antigênicos resulta em redução de vários mecanismos de proteção e manutenção da imunidade de mucosas tais como linfócitos intra-epiteliais (IEL), células caliciformes, células imunes da lamina própria e produção de IgA secretória. Além disto, algumas alterações imunológicas sistêmicas como a redução na IgA e IgG séricas também foram detectadas nesses animais (K. S. Kim et al., 2016; Menezes et al., 2003; Pereira et al., 1986; Umesaki & Setoyama, 2000; Vitetta, Grundke-Iqbal, Holmes, & Uhr, 1974).

Uma coleção de sensores expressos nas células epiteliais do intestino assim como nas células imunes associadas à mucosa intestinal é responsável pela detecção dos estímulos fornecidos pelos vários componentes da dieta normal. Assim, o metabólito ácido retinoico *all-trans* da vitamina A, por exemplo, produzido por células dendríticas CD103⁺ ALDH⁺ da mucosa intestinal liga-se a receptores nucleares para ácido retinoico (RARs) e ao *peroxisome proliferator-activated receptor* β/δ (PPAR β/δ) ativando a transcrição de genes responsáveis pela diferenciação de linfócitos Treg CD4⁺ Foxp3⁺ na mucosa intestinal (Mucida et al., 2007; Coombes et al., 2007; Schug et al., 2007). Da mesma forma, lipídeos como ômega 3 ou ácido linoileico conjugado (CLA) são capazes de ativar as funções anti-inflamatórias do *peroxisome proliferator-activated receptor* α (PPAR α) em células imunes da mucosa intestinal (Moreira et al., 2018; Yao et al., 2017) enquanto que o cloreto de sódio (NaCl) da dieta, quando em excesso, pode ativar a diferenciação de células Th17 inflamatórias no intestino pela vias de sinalização mediada por SGK1 (*serum/glucocorticoid-regulated kinase 1/ forkhead box protein 1*) (Aguar et al., 2017). As proteínas da dieta, por sua vez, são reconhecidas pelos receptores clonais (imunoglobulina e TCR) expressos pelos linfócitos do intestino induzindo sua ativação e diferenciação em células pTreg nesse local (K. S. Kim et al., 2016).

De forma similar, os produtos da microbiota intestinal também sinalizam via sensores presentes na mucosa intestinal. Uma complexa rede de vias de

sinalização desencadeadas por moléculas derivadas da microbiota comensal através de receptores inatos como receptores do tipo Toll (TLRs, de *Toll-like receptors*), receptores do tipo RIG-I (de *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*), receptores do tipo NOD (NLRs, de *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) são empregados para detecção de patógenos e para manutenção da integridade intestinal em um ambiente altamente ativado (Fukata & Arditi, 2013; S. Hu et al., 2015; Rakoff-Nahoum, Paglino, Eslami-Varzaneh, Edberg, & Medzhitov, 2004). Consistente com este papel, tem sido demonstrado que defeitos nas vias de sinalização de TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9) e receptores RIG-I, NLRs (NOD1, NOD2, NLRP3 e NLRP12) estão envolvidos com o desenvolvimento de colite e câncer colorretal (Fukata & Arditi, 2013; G. Q. Hu et al., 2016; Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Uma das moléculas biologicamente ativas encontrada em abundância no lúmen do intestino é o DNA. A microbiota é capaz de produzir dinucleotídeos cíclicos como mensageiros secundários em resposta a mudanças ambientais para sobrevivência e proliferação (Rudlaff, 2014). Além disso, restos de DNA advindos da dieta são uma fonte de ácidos nucléicos na mucosa intestinal. Outro fator que contribui para as grandes quantidades de ácidos nucléicos livres no intestino é a renovação, em uma taxa extraordinária, da camada de células epiteliais desse órgão. A camada epitelial é renovada por apoptose de células epiteliais ou por extrusão dessas células vivas para controlar o número de células epiteliais na camada única (Crosnier, Stamataki, & Lewis, 2006; Eisenhoffer et al., 2012). Esse processo constante no intestino leva à liberação de ácidos nucléicos no lúmen intestinal.

Vários sensores de DNA são expressos por células epiteliais intestinais e células imunes do tecido linfóide associado à mucosa do intestino. Entre eles estão os receptores intracelulares TLR9 (*Toll-like receptor 9*), cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), AIM2 (de *absent in melanoma 2*) e a molécula adaptadora para receptores de DNA STING (de *stimulator of interferon genes*). Estudos recentes relatam que defeitos na sinalização pelo sensor AIM2 leva ao aumento na suscetibilidade a eventos inflamatórios no intestino (G. Q. Hu et al., 2016; S. Hu et al., 2015). No entanto, os efeitos imunológicos da sinalização pelos ácidos nucléicos na homeostase intestinal ainda são pouco conhecidos. Como para qualquer outro

componente imunologicamente ativo, é de extrema importância que ocorra uma regulação fina entre processos pró- e anti-inflamatórios desencadeados pela presença de ácidos nucleicos intra-citosólicos e extracelulares a fim de manter a homeostase intestinal.

1.5.1 STING, o sensor de ácidos nucleicos

STING (de *stimulator of interferon genes*), também conhecido como TMEM173 / MITA / MPYS / ERIS, é uma proteína transmembrana associada ao retículo endoplasmático que, ao ser ativada, transloca-se para a região perinuclear (Ishikawa & Barber, 2008; Jin et al., 2008; W. Sun et al., 2009; Zhong et al., 2008). Foi descrita inicialmente como uma proteína que interage com a molécula do MHC de classe II, mas a importância desta interação permanece desconhecida (Jin et al., 2008). Estudos posteriores relataram o papel de STING na indução transcricional de interferons do tipo I e genes co-regulados em resposta a ligantes de ácidos nucleicos citosólicos (Burdette & Vance, 2013; Ishikawa, Ma, & Barber, 2009).

STING é um sensor imune inato para dinucleotídeos cíclicos e é também uma molécula adaptadora para alguns receptores de DNA intracelular (Burdette et al., 2011). Os sensores de DNA que estão acima do STING nas vias de sinalização incluem o cGAS (de *cyclic GMP-AMP syntase*), IFI16 (de *interferon gamma inducible protein 16*) e DDX41 (de *DEAD-box helicase 41*), indicando uma importante função do STING em controlar múltiplas vias de reconhecimento de DNA (Burdette & Vance, 2013; L. Sun, Wu, Du, Chen, & Chen, 2013; Unterholzner et al., 2010; Z. Zhang et al., 2011). Os dinucleotídeos cíclicos são moléculas solúveis produzidos por determinadas bactérias, como segundos mensageiros em resposta a mudanças ambientais, ou podem ser gerados pelo receptor cGAS após a ligação de espécies de DNA de fita dupla (viral, bacteriano ou DNA próprio) (Bhat & Fitzgerald, 2014; Burdette & Vance, 2013; Ishikawa & Barber, 2008; O'Neill, 2013). Interessantemente, as bactérias da microbiota também são capazes de produzir dinucleotídeos cíclicos (Romling, 2008; Rudlaff, 2014).

STING é expresso em diversos subtipos celulares como células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B (Ishikawa & Barber, 2008; Wallach & Kovalenko, 2013). Após sua ativação, STING

interage com a proteína TBK-1 (de *TANK-binding kinase 1*), induzindo sua fosforilação. TBK-1 por sua vez promove a fosforilação da molécula IRF3 (de *interferon regulatory factor 3*). Esta interação permite a translocação dos fatores de transcrição IRF3 e NF- κ B (de *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) para o núcleo celular induzindo a produção de citocinas e proteínas, como interferon do tipo I (Figura 2) (Barber, 2015; Bhat & Fitzgerald, 2014).

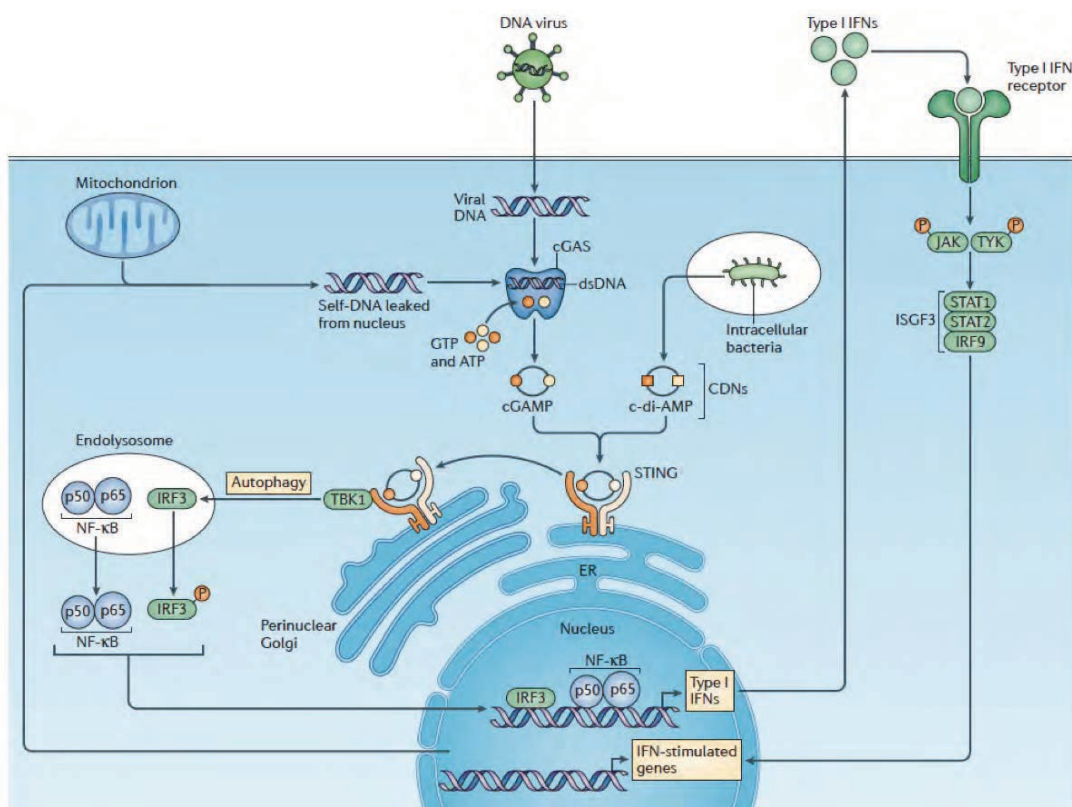


Figura 2: Sinalização dependente de STING. *Stimulator of interferon genes* (STING) é ativado por dinucleotídeos cíclicos (CDNs) produzidos por algumas bactérias ou pelo *cyclic GMP-AMP syntase* (cGAS) o qual, na presença de ATP e GTP catalisa a produção do tipo de CDN chamado cGAMP (*cyclic GMP-AMP*) após a sua ligação à DNA citosólico (de vírus, bactérias ou DNA próprio vindo do núcleo ou mitocôndria). STING é associado com o retículo endoplasmático (ER) e após se ligar aos CDNs, STING forma um complexo com *TANK-binding kinase 1* (TBK1). Este complexo se desloca para região perinuclear do Golgi através de estruturas *pre-autophagosomal-like* para entregar o TBK1 a compartimentos endolisossômicos onde este fosforila o fator de transcrição *interferon regulatory factor 3* (IRF3) e *nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Estimulação das vias de sinalização de IRF3 e NF- κ B

leva à indução de citocinas e proteínas, como interferon do tipo I (IFNs), que possuem atividade anti-patogênica. Adaptado de (Barber, 2015).

Os IFN do tipo I são uma família amplamente expressa de citocinas pleiotrópicas que exercem diferentes funções, incluindo atividade antiviral e antimicrobiana (Hartlova et al., 2015). Paradoxalmente, eles podem também inibir respostas imunes levando à produção de citocinas anti-inflamatórias, sendo que a desregulação na produção dessas citocinas pode contribuir para o desencadeamento ou agravamento de doenças inflamatórias intestinais (Chirido, Millington, Beacock-Sharp, & Mowat, 2005; Cho & Kelsall, 2014; Kole et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado que STING possui um papel importante na resposta imune inata a vários patógenos bacterianos, virais e até mesmo eucarióticos (Barber, 2011a, 2011b). A ausência de STING impede a produção de interferon do tipo I em resposta a plasmídeos transfectados, vírus de DNA e diversas bactérias intracelulares (Koppe et al., 2012; Manzanillo, Shiloh, Portnoy, & Cox, 2012; Sauer et al., 2011). Por outro lado, STING parece ser responsável pelo desenvolvimento de doenças autoimunes devido à geração de respostas imunes inflamatórias contra o DNA próprio ou por alterações genéticas que levam à ativação constitutiva de STING (Dobbs et al., 2015; Gall et al., 2012; Jeremiah et al., 2014). Além disso, têm sido demonstrado ainda o papel de STING na regulação da inflamação intestinal e tumorigênese (J. Ahn, Konno, & Barber, 2015; Q. Zhu et al., 2014). A sinalização dependente de STING parece ser requerida também para a indução da imunidade adaptativa na resposta a vacinas de DNA (Ishikawa et al., 2009). Dessa forma, fica claro que o STING tem uma participação central em diferentes respostas imunes inata e adaptativa.

Por outro lado, altos níveis de DNA e dinucleotídeos cíclicos derivados da microbiota têm sido detectados no intestino (Danilchanka & Mekalanos, 2013; Rudlaff, 2014), e este estímulo pode contribuir para ativação local do STING em condições de *steady state* (de estado estacionário). Apesar do papel da microbiota na homeostase intestinal ser bem documentado (Hooper, Littman, & Macpherson, 2012), a relevância fisiológica da sinalização via STING no processo de imunoregulação intestinal ainda é amplamente desconhecido.

A exposição diária a grandes quantidades de antígenos vindos da dieta e da microbiota faz com que o intestino seja um local extremamente regulado pelo sistema imune, sendo apto a manter o balanço entre respostas protetoras contra patógenos e de tolerância. Essa exposição à antígenos luminiais pode levar à diferenciação de células T efectoras (Th) ou T reguladoras (Treg), entretanto ainda não se sabe como essas duas respostas imunes distintas podem ser induzidas independentemente e de uma maneira que suporta simultaneamente reações tolerogênicas e inflamatórias a diferentes estímulos ao longo do trato gastrointestinal. Sendo assim, este trabalho pretende estudar as respostas imunes nos diferentes microambientes do intestino bem como o papel do STING, como potencial sensor presente na mucosa intestinal para sinais da microbiota, no processo de imunoregulação e homeostase intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar como os diferentes microambientes presentes no intestino e os sensores de componentes luminais (como STING) afetam o estado de homeostase ou inflamação no tecido linfoide associado à mucosa intestinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais

1. Avaliar como a drenagem linfática compartimentalizada do ambiente intestinal contribui para as respostas imunes aos antígenos luminiais, utilizando os seguintes parâmetros:
 - Caracterização da rede linfática que drena o intestino e diferentes mLNs
 - Avaliar a composição e perfil de células estromais e células dendríticas nos diferentes mLNs.
 - Avaliar a indução de respostas imunes a diferentes antígenos lumiais nos diferentes mLNs.

2. Avaliar se a remoção cirúrgica de determinados mLNs influenciam respostas imunes locais e sistêmicas como infecções entéricas e tolerância oral.

3. Avaliar se e como perturbações nos microambientes intestinais alteram as respostas imunes compartimentalizadas, através de:
 - Infecção entérica por diferentes patógenos restritos a específicos ambientes intestinais: *Salmonella enterica* Typhimurium (íleo e ceco); *Segmented Filamentous Bacteria* (íleo e cólon); *Citrobacter rodentium* (ceco e cólon); *Strongyloides venezuelensis* (duodeno).

2.2.2 Sensores imunológicos do microambiente intestinal

1. Avaliar o papel da microbiota na ativação de STING.
2. Avaliar o papel do sensor de ácidos nucleicos STING na homeostase intestinal utilizando os seguintes parâmetros:
 - Avaliar a morfologia do intestino dos camundongos na ausência da molécula STING (utilizando camundongos geneticamente deficientes) através de análises macroscópicas e microscópicas (histológicas) do cólon.
 - Avaliar os efeitos imunológicos no intestino da ausência da molécula STING: Análise fenotípica das populações de linfócitos da *lamina propria* do intestino delgado e cólon e linfonodos mesentéricos; o perfil de citocinas no cólon; a produção de IgA secretória (SIgA) e de IgM sérica.
3. Avaliar os efeitos da ausência da molécula STING em modelos murinos de inflamação intestinal como:
 - Modelo de indução de colite por sulfato de sódio dextrano (DSS).
 - Modelo de colite induzida pela transferência de células T *naive* CD4⁺CD45RB^{high} para camundongos RAG^{-/-}.
 - Modelo de infecção entérica por *Salmonella enterica* Typhimurium.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos estão divididos em partes 1 e 2 de acordo com os objetivos específicos: Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais; Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal.

3.1 Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos selvagens das linhagens C57BL/6J CD45.1 provenientes da Jackson Laboratories, camundongos CD45.2 (C57BL/6) provenientes da Jackson Laboratories ou Taconic Farms, e camundongos CD45.1 transgênicos OT-II foram originalmente comprados da Taconic Farms e mantidos no biotério do Laboratory of Mucosal Immunology da The Rockefeller University. Camundongos B6.Cg-Tg(Ilgax-Venus)1Mnz/J foram gentilmente cedidos por M. Nussenzweig (The Rockefeller University, New York, Estados Unidos) e os camundongos C57BL/6-Tg (Tcra,Tcrb)2Litt/J (7B8tg) foram comprados da Jackson Laboratories ou cedidos por D. Littman (NYU, New York, Estados Unidos). Foram utilizados camundongos machos com 7-12 semanas de idade, mantidos no biotério da Rockefeller University sob condições específicas isentas de patógenos (SPF - *specific pathogen-free*) ou em condições *germ-free*. Camundongos C57BL/6 GF foram generosamente fornecidos por S. Mazmanian (Caltech, Califórnia, Estados Unidos) e importados para isoladores de filmes flexíveis livres de germes (Class Biologically Clean Ltd.). Camundongos monocolonizados com SFB (*Segmented filamentous bacteria*) foram mantidos em isoladores de filme flexível e originalmente colonizados por gavagem com extrato fecal de camundongos monocolonizados com SFB mantidos no laboratório do D. Littman (NYU, New York, Estados Unidos). A colonização com SFB foi verificada por PCR em tempo real usando primers 16S específicos para SFB. Fezes de camundongos GF serviram como controle negativo e fezes de camundongos Taconic C57BL/6 como um controle positivo. Os camundongos foram criados em nosso biotério *germ-free* para manutenção da cepa e mantidos em dieta autoclavável esterilizada (5021, LabDiet, Estados Unidos), a

qual também foi usada para criação e manutenção de camundongos controle SPF (*ex-germ-free*).

Os ratos Wistar fêmea de 6-10 semanas foram comprados do Charles River. Todos os procedimentos animais foram consistentes com as diretrizes do NIH e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Rockefeller University.

3.1.2 Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo em estilo "U" e marcadas com Aqua em PBS, seguidas de incubação com Fc-block e anticorpos anti-marcadores fenotípicos conjugados com diferentes fluorocromos em FACS buffer (PBS, 1% de BSA, 10 mM de EDTA, 0,02% de azida de sódio). As células foram analisadas vivas ou fixadas em 1% PFA/PBS. Para coloração intracelular, as células foram primeiro coradas para epítomos de superfície e depois fixadas, permeabilizadas e coradas de acordo com o protocolo do fabricante (eBioscience 00-5123-43, Califórnia, Estados Unidos). A aquisição das amostras foi feita utilizando o LSRII (BD Bioscience, Califórnia, Estados Unidos) e as análises foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. O índice de divisão celular foi calculado usando a fórmula FlowJo (<http://www.flowjo.com/v765/en/proliferation.html>), em que o índice representa a fração do total de divisões de células sobre o total de células iniciais calculadas.

Os anticorpos utilizados foram comprados da BD Bioscience (Califórnia, Estados Unidos): anti-CD45.2, 560693; anti-CD31, 557355; anti-CD103, 557495; anti-Ly6C, 560595; anti-NK1.1, 562921; anti-SiglecF, 552126; anti-ROR γ t, 562894; anti-IL17A, 56022 and 559502 e anti-V β 14, 553258. Da eBioscience (Califórnia, Estados Unidos): anti-B220, 48-0452-82; anti-CD3e, 48-0031-82; anti-CD4, 83-0042-42; anti-CD8 α , 56-0081-82; anti-CD25, 17-0251-82; anti-CD11b, 47-0112-82; anti-CD11c, 25-0114-82, 17-0114-82 and 56-0114-82; anti-CD45, 25-0451-82; anti-CD45.1, 25-0453-82; anti-CD69; anti-FOXP3, 12-5773-82; anti-GATA3, 12-9966-42; anti-I-A/I-E (MHCII), 46-5321-82 and 56-5321-82; anti-Ly6G, 48-5931-82; anti-

Podoplanin, 25-5381-82; anti-V α 2, 48-5812-82, and Streptavidin, 46-4317-82; ou da Biologend (Califórnia, Estados Unidos): anti-CD8 α , 100744; anti-CD11b, 101236; anti-CD64, 139306; anti-TCR β , 109220; anti-TER119, 116206. Adicionalmente, alguns anticorpos foram comprados da BioXCell e marcados no nosso laboratório: anti CD4, BE0003-1; anti-CD8a, BE0004-1; anti-CD11b, BE007; anti-CD19, BE0150; anti-TCR β , BE00102. Anticorpos biotinilados foram comprados da BD Pharmigen: anti-B220, 553086; anti-CD8a, 553029; anti-Cd11b, 553309; anti-Cd11c, 553800; anti-CD25, 553070; e anti-NK1.1, 553163; anti- TER-119, 553672; ou como segue: anti-IgG1, Bethyl, A90-105B; anti-IgG2c, Bethyl, A90-136B; anti-IgE, eBioscience, 13-5992-82; e anti-Neuropilin, R&D Systems, BAF566. Anticorpos não conjugados utilizados foram: LYVE 1, R and D Systems AF2125; anti-GFP (Aves Labs, GFP-1020); anti-OVA IgG1, Biologend, 520501; anti-IgE, Invitrogen, RMGE00; IgE isotipo controle, eBioscience 554118. Os kits Aqua LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain, L-34965, Cell Trace CFSE e Violet Cell Proliferation (C34554 and C34557) foram comprados da Life Technologies (Califórnia, Estados Unidos).

Para análises de citocinas em células T, as células foram incubadas por 3.5h em meio RPMI 1640 (Califórnia, Estados Unidos) com 10% de soro fetal bovino, Brefeldina A (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma B7651), ionomicina (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma I0634), e phorbol 12-myristate 13 acetate (100 ng ml^{-1} , Sigma P8139). Para análises de citocinas em células dendríticas, as células foram incubadas por 6h em RPMI 10% de soro fetal bovino, GolgiPlug (1 to 1000, BD Biosciences 555029).

3.1.3 Limpeza de tecidos, “light sheet microscopy” e reconstrução de imagens

Para limpeza e coloração de tecido, o protocolo iDISCO foi seguido como detalhado no site continuamente atualizado <http://idisco.info>, com as seguintes especificidades: os tecidos foram corados em anticorpos primários e secundários por 4 dias cada, e foram incluídos em 1 % agarose-TAE antes da desidratação final. Os blocos foram fotografados usando um Ultramicroscope II e um software LaVision. As imagens foram reconstruídas usando o software Imaris 8.

3.1.4 Biodistribuição de ³H-retinol

Os camundongos foram submetidos a jejum de 3 horas antes da gavagem com 150 µl de PBS com ou sem 5 µl de inibidor de formação de quilomícrons Pluronic L-81 (Sigma 435430), seguido por 1 µCi ³H-retinol em 100 µl de azeite 30 minutos depois, e amostrados nos momentos indicados. O soro foi amostrado da veia submandibular (sistêmica) ou da veia porta. A linfa foi coletada do ducto torácico sob anestesia com isoflurano usando uma agulha de vidro feita sob medida (*Micropipette puller, Sutter Instrument*). Os órgãos dissecados foram pesados antes da lise por rompimento mecânico em 0,5 ml de tampão de lise hipertônica com 1% de Triton-X 100. O lisado foi misturado com 7 ml de solução de cintilação Ultima Gold (Perkin Elmer) e acumulação de radioatividade medida num contador de cintilação. A radioatividade de entrada foi estimada pela contagem de 10% do material gavado.

3.1.5 Marcação e biodistribuição de ¹²⁵I-OVA

A iodação de OVA foi realizada conforme descrito anteriormente (D. Esterhazy et al., 2016). Os camundongos foram mantidos em jejum por 3 h antes da gavagem com 4 x 10⁶ CPM ¹²⁵I-OVA e 50 mg de OVA fria (grau III) em 200 µl de PBS. As amostras foram coletadas 1 h e 5 h após gavagem. O peso húmido dos tecidos foi tomado antes da medição da radioatividade num contador gama (Packard Cobra). A radioatividade de entrada foi estimada pela contagem de 10% do material gavado.

3.1.6 Segmentação de linfonodos mesentéricos

Os linfonodos mesentéricos drenando segmentos intestinais foram determinados anatomicamente seguindo os vasos linfáticos ligando o cólon, íleo e jejuno aos seus nódulos linfáticos. Os linfonodos mesentéricos duodenais foram revelados por gavagem de 100 µl de azeite (Sigma) e determinando a maioria dos gânglios proximais do estômago circundados por quilo, indicativo de drenagem duodenal, 1 h após-gavagem.

3.1.7 Extração de APCs e linfócitos de linfonodos

Os tecidos foram dissecados em HBSS frio, suplementados com Mg^{2+} e Ca^{2+} , finamente picotados e incubados em 400 U / ml de Colagenase D (Roche) em HBSS por 25 min a 37°C, 5% de CO_2 . A colagenase foi inativada em gelo por adição de 10% de EDTA. As suspensões de células individuais foram extraídas do tecido ao pipetar para cima e para baixo a solução cinco vezes. Os eritrócitos foram lisados por incubação em tampão de lise de eritrócitos (Sigma) durante 7 min à temperatura ambiente.

3.1.8 Isolamento de células estromais de linfonodos

Os mLNs foram dissecados em 500 μ l de RPMI frio, suplementado com 2% de soro fetal bovino e HEPES (meio de dissecação). Os tecidos foram rompidos com agulhas de 25G, seguido da adição de Liberase TL (Roche) a uma concentração final de 0,25 mg/ml e colagenase D (Roche) a uma concentração final de 400 U/ml. Os tecidos foram incubados a 37°C num agitador orbital a 80 rpm durante 10 minutos, e rompidos à temperatura ambiente pipetando suavemente a solução para cima e para baixo 50 vezes, seguido de mais 20 vezes. A reação foi interrompida colocando a solução em gelo e adicionando 14 ml de meio de dissecação gelado. As células foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 min a 4°C, ressuspendidas em tampão de lise de eritrócitos (Sigma), complementadas com meio de novo, centrifugadas e depois submetidas a marcação com anticorpos.

3.1.9 Extração de células da lamina propria do intestino delgado e grosso

Os intestinos foram separados do mesentério e as placas de Peyer (intestino delgado) e as fezes foram removidas. Para a segmentação do intestino delgado, os 25% superiores do intestino delgado foram considerados como duodeno, os próximos 50% como jejuno e os últimos 25% como íleo. O ceco foi incluído na preparação do intestino grosso. Os intestinos foram cortados longitudinalmente e lavados duas vezes em PBS. O tecido foi cortado em pedaços de 1 cm, o muco foi removido incubando o tecido por 10 min em PBS e 1 μ M DTT. O epitélio foi removido por duas incubações em 25 ml de HBSS + 2% soro fetal bovino + 30 mM

EDTA por 10 min a 37°C a 230 rpm com agitação vigorosa após cada incubação. Os tecidos foram então lavados em PBS sobre uma peneira, depois picados e digeridos em 6 ml de RPMI por segmento intestinal, 2% de soro fetal bovino, 200 µg / ml de DNaseI (Roche) e 2 mg / ml de colagenase 8 (Gibco) por 45 min a 37°C, 5% de CO². As digestões foram pipetadas para cima e para baixo 10 vezes, passadas através de uma rede de 100 µm e a colagenase inativada pela adição de 15 ml de RPMI frio, 2% de soro fetal bovino. As suspensões foram centrifugadas a 1500rpm por 5 min e o pellet de células ressuspendido em 40% Percoll (BD Pharmigen) complementado com RPMI, 2% soro fetal bovino, e separadas por centrifugação em um gradiente de Percoll descontínuo (80% / 40%) a 2300rpm por 25 min em temperatura ambiente. APCs e linfócitos foram isolados da interfase, lavados e corados para análise por citometria de fluxo ou submetidos a reestimulação.

3.1.10 Isolamento de células para RNA-seq

As células foram separadas utilizando o citometro de fluxo de separação de células FACSaria (Becton Dickinson). Células dendríticas (DCs) dos mLNs foram pré-enriquecidas utilizando um Kit de Isolamento de Células Dendríticas Pan (130-100-875, Miltenyi Biotec) e Colunas de Separação LS MACS (Miltenyi Biotec). Camundongos C57BL/6 machos com 10-14 semanas de idade serviram como doadores dos mLNs, e triplicatas ou quadruplicatas biológicas foram coletadas. As DCs foram separadas como Aqua⁻CD45⁺Lin⁻(CD3⁻B220⁻NK1.1⁻CD19⁻)CD11c^{hi}, e as subpopulações adicionais como MHCII^{hi}CD103⁺CD11b⁻ e MHCII^{hi}CD103⁺CD11b⁺. As células estromais não foram pré-enriquecidas e foram separadas como células Aqua⁻CD45⁻TER119⁻CD24⁻TCRβ⁻B220⁻CD11c⁻ e as subpopulações, ainda, como podoplanina⁺CD31⁻ (FRCs) e podoplanina⁺CD31⁺ (LECs). Trezentas células foram separadas diretamente em 25 µl de tampão TCL (Qiagen, 1031576) suplementado com 1% de β-mercaptoetanol. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 5 min, centrifugadas e mantidas a -80°C até processamento posterior.

3.1.11 Preparação e sequenciamento da biblioteca de RNA-seq

O RNA foi isolado utilizando RNAClean XP beads (Agentcourt, A63987) num suporte magnético (DynaMag, Invitrogen 12331D). Os primers de transcrição

reversa foram: P1-RNA-TSO: Biot-
 rArArUrGrArUrArCrGrGrCrGrArCrCrArCrCrGrArUrNrNrNrNrNrNrGrGrG, P1-T31:
 Biot-AATGATACGGCGACCACCGATCG31T, P1-PCR: Biot-
 GAATGATACGGCGACCACCGAT. O RNA foi eluído durante 1 min em RT-cDNA
 synthesis mistura 1 (0,5 µl P1-T31 (20µM), 0,3 µl RNasin plus (Promega, N2615),
 1,5 µl 10 mM dNTP, 3,5 µl 10 mM Tris pH 7,5-0,5 % IGEPAL CA-630 (Sigma) e 1,7
 µl de ddH₂O livre de RNase) e as beads pipetadas para cima e para baixo 10 vezes.
 A amostra eluída foi então incubada por 3 min a 72°C, seguido de 1 min em gelo, e
 então foram adicionados 7,5 ml de mistura 2 (3 µl 5X FS tampão SS, 0,375 µl 100
 mM DTT, 0,375 µl RNasin plus, 0,5 µl P1-RNA-TSO (40µM), 0,75 µl Maxima RT
 Minus H (Thermo Scientific, EP0751), 1,8 µl 5M Betaine (Sigma, B0300), 0,9 µl 50
 mM MgCl₂ e 0,175 µl de ddH₂O livre de RNase). A transcrição reversa (RT) ocorreu
 durante o ciclo térmico de um ciclo (90 min a 42°C), 10 ciclos (2 min a 50°C, 2 min a
 42°C) e um ciclo (15 min 70°C), e o produto foi mantido a 4°C. O cDNA foi então
 amplificado utilizando 15 µl do produto RT, 20 µl 2x KAPA HiFi HS Ready Mix
 (Kapabiosystems, KK2601), 1,5 µl de P1-PCR (10µM) e 3,5 µl de ddH₂O livre de
 RNase. Amplificação ocorreu durante o seguinte ciclo: Um ciclo de 3 min a 98°C, 20
 ciclos (15 seg a 98°C, 20 seg a 67°C, 6 min a 72°C), um ciclo (5 min a 72°C), e
 depois o produto foi mantido a 4°C. 20 µl do produto de PCR foram limpos com 16
 µl de RNAClean XP beads. O cDNA foi eluído em 20 µl de ddH₂O livre de RNase e
 mantido a -20°C. Amplicons isolados foram confirmados para ser de 1500-2000 pb
 de comprimento por um High Sensitivity DNA Assay (Bioanalyzer). A concentração
 de todas as amostras foi medida em um fluorômetro Qubit (Thermo Fisher), todas as
 amostras foram ajustadas para 0,1 ng / µl com ddH₂O e 2,5 µl de cDNA foram
 submetidos à preparação Nextera XT DNA Library (Illumina) usando um Kit Nextera
 XT Index (Illumina, FC-131-1002) e de acordo com o protocolo do fabricante, exceto
 que todos os volumes foram utilizados a 0,5x dos volumes indicados. A qualidade
 da amostra foi novamente verificada por Bioanalyzer, as concentrações da amostra
 foram medidas no fluorômetro Qubit e ajustadas para uma concentração de 4,54 ng
 / µl. Todas as amostras foram agrupadas em igual contribuição e executadas em
 várias faixas. O sequenciamento foi realizado utilizando 75 leituras simples de
 extremidade única em um instrumento NextSeq (Illumina).

3.1.12 Análise de dados de RNA-seq

A expressão gênica foi quantificada utilizando os arquivos *fastq* crus e o transcriptoma de referência de murganho M18 (Gencode-GRCm38.p6) como entrada para *Kallisto* (v.0.43.0) (Bray, Pimentel, Melsted, & Pachter, 2016). As frequências transcritas normalizadas resultantes foram fornecidas ao pacote *R Sleuth* para análise diferencial (v.0.30.0) (Pimentel, Bray, Puente, Melsted, & Pachter, 2017). As análises foram conduzidas no nível do gene, e o teste da razão de verossimilhança foi aplicado para capturar diferenças de expressão gênica entre todos os grupos. Quando testando entre pares de grupos, o teste de *Wald* foi usado para determinar genes expressos diferencialmente. Os genes com log2 fold maiores que 1 ou menores que -1 e uma falsa taxa de descoberta de 0,05 foi considerada significativa para estudos posteriores. A análise de enriquecimento de genes (GSEA) foi realizada pela classificação de genes com base nas alterações log2 fold de comparações pareadas e no conjunto de genes *c5.all.v6.1.symbols.gmt*, subsequente adicionando ao pacote *R fgs.ea* [Ref-fgsea]. Os dados brutos utilizados neste estudo estão disponíveis no Sequence Read Archive (SRA), no momento da adesão: SRP166887. Os dados processados gerados aqui podem ser obtidos no banco de dados Gene Expression Omnibus sob o código de acesso: GSE121811.

3.1.13 Ensaio de atividade RALDH

A atividade de RALDH foi determinada usando o kit Aldefluor (STEMCELLTM Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.1.14 Transferência de células T

Células T CD4⁺ *naive* do baço e linfonodos foram isoladas por seleção negativa utilizando anticorpos biotinizados contra CD8 α , CD25, CD11c, CD11b, TER-119, NK1.1 e B220 e beads anti-biotina MACS (Miltenyi Biotec). A pureza das células T CD4⁺ transgênicas foi verificada por citometria de fluxo (CD45.1⁺V α 2⁺V β 5⁺CD25⁻ para células OT-II, CD45.1⁺V β 14⁺CD25⁻ para células 7B8tg, tipicamente > 90%). As células T foram marcadas utilizando o kit Cell

Trace™ Violet ou CFSE Cell Proliferation Kit (Life Technologies). Para células OT-II, 2×10^6 foram transferidas por injeção retro-orbital sob anestesia com gás isoflurano. Para células 7B8tg, 4×10^5 células foram transferidas para análise de mLNs 60 h pós-transferência e 5000 células para análise 7 dias ou mais após transferência no intestino e mLNs.

3.1.15 Administração de antígeno oral

OVA (grau III, Sigma, A5378) foi administrado a 50 mg em 200 μ l de PBS por gavagem oral, utilizando-se agulhas de gavagem metálica. Duas doses foram administradas com um intervalo de 24 horas. O peptídeo SFB FSGAVPNKTD (feito sob medida com acetilação no N-terminal, LifeTein, LLC) foi administrado como 1 mg ou 5 mg em 200 μ l de PBS por gavagem oral após tratamento intraperitoneal (i.p.) com 1 mg de inibidor da bomba de prótons Omeprazol (Sigma O104) (em 200 μ l de PBS, 1% Tween 80) administrado 24 horas e 15 min antes da gavagem para reduzir a digestão do peptídeo no estômago. Camundongos controle receberam apenas Omeprazol.

3.1.16 Passagem e infecção de Strongyloides venezuelensis

S. venezuelensis foi mantido em ratos Wistar por infecção subcutânea com 30.000 larvas. Dia 6-8 após a infecção o ceco contendo ovos foi colhido e espalhado em papel Whatman que foi colocado num recipiente com água a 28°C. As larvas eclodidas foram coletadas ao longo de 4 dias e o ciclo reiniciado. Os camundongos foram infectados subcutaneamente com 700 larvas / camundongo. A carga parasitária adulta foi avaliada em esfregões epiteliais totais do intestino.

3.1.17 Injeção de CT-OVA intestinal

As células OT-II *naive* foram transferidas para camundongos C57BL/6 com 7 semanas de idade 16 - 24h antes da cirurgia (2×10^6 células para análise de diferenciação de células T nos mLNs e 1×10^5 para infecção subsequente por *Salmonella enterica* Typhimurium-OVA). Os camundongos foram anestesiados por via subcutânea com 100 mg / kg de cetamina (substância controlada fornecida pela

instalação para animais da Universidade Rockefeller), 10 mg / kg de xilazina (Akorn, inc.) e na presença de 5 mg / kg de analgésico Meloxicam (Putney, Inc.) em 0,5 ml de solução salina. A área abdominal foi então raspada, e esterilizada por três ciclos de limpeza com solução de iodo e 70% de etanol seguida de injeção de 20 µl de bupivacaína a 0,25% (Hospira, Inc.) por via intradérmica no local prospectivo da incisão. O camundongo foi colocado em uma esteira térmica e coberto por um plástico cirúrgico estéril com uma abertura acima do abdômen. Todo o trabalho a partir deste ponto foi realizado assepticamente. A pele foi incisada no meio do abdômen e o peritônio foi aberto. 100 µl de solução de PBS esterilizada por filtração contendo 50 mg de OVA e 5 µg de toxina de cólera (CT) foram injetados no duodeno (5 mm após o piloro) ou no íleo (5 mm antes da placa de Payer mais distal) usando uma agulha de 28 1/2 G apontando para o intestino distal. Os músculos peritoneais foram alinhados e suturados com fio absorvível (PDS*II, Ethicon), a pele fechada com autoclips (Ken Scientific Corp.) e a ferida coberta com Triple Antibiotic Ointment (Honeywell Safety Products, EUA). Os camundongos foram colocados em uma gaiola em uma esteira de calor até que acordassem completamente. Para cirurgia simulada (*sham*), os camundongos foram abertos e suturados novamente. Os camundongos que sofreram cirurgias diferentes foram agrupados em gaiolas para misturar os grupos. No dia seguinte, os camundongos foram monitorizados quanto a agilidade e passagem das fezes. Os camundongos foram tratados com 0,3 mg / kg de buprinex (substância controlada) e 5 mg / kg de Meloxicam 24h após o primeiro Meloxicam e por mais 3 dias a cada 24h.

3.1.18 Infecção por *Salmonella enterica* Typhimurium-OVA

Sete dias após a injeção de CT-OVA os animais foram tratados com 20 mg de estreptomicina em 200 µl de PBS. No mesmo dia, a *Salmonella enterica* Typhimurium-OVA cresceu *overnight* até à fase estacionária de crescimento em meio de cultura LB a 300 rpm, 37°C. No dia seguinte, uma alíquota de 100 µl foi subcultivada em 3 ml de meio LB. Após 3,5h, 50 µl do subcultivo foi diluído em 50 ml de PBS, dando origem a uma densidade de 10⁵ CFU por 100 ml, e os camundongos foram imediatamente gavados com 100 ml desta solução. A infecção foi cronometrada de tal forma que decorreram 24h desde a administração da

Streptomicina e os camundongos tinham estado em jejum 4h antes da infecção. O peso corporal inicial foi tomado imediatamente antes da gavagem. Os camundongos foram pesados a cada 24h após a infecção. No estudo de sobrevivência, os camundongos foram sacrificados quando o seu peso atingiu 80% ou menos do seu peso inicial. Para a análise da disseminação de *Salmonella enterica* Typhimurium-OVA, os camundongos foram sacrificados 48h após a infecção e as CFU dos órgãos determinadas por diluições seriadas em placas de Salmonella Shigella Agar.

3.1.19 *Citrobacter rodentium* e *Citrobater rodentium*-OVA

Os camundongos foram infectados com $1-2 \times 10^9$ CFU de *Citrobacter rodentium* ou *Citrobater rodentium*-OVA. Para a infecção por *Citrobater rodentium*-OVA, os camundongos foram mantidos em 100 mg / l de Kanamicina em água de beber, para assegurar que o plasmídeo que expressa OVA não se perdesse. Camundongos controle não infectados foram também mantidos em Kanamicina. A infecção foi monitorizada por plaqueamento de fezes em placas de ágar McConckay. Nove dias após a infecção 2×10^6 células OT-II *naive* foram transferidas e os camundongos foram submetidos a gavagem com OVA como descrito acima.

3.1.20 *Imunização por alumínio e desafio antigênico das vias aéreas*

Sete dias após a administração oral de OVA, 4 μ g de antígeno de OVA livre de endotoxina adsorvido em 40 μ l de Adjuvante Imject™ Alum (Fisher Scientific) foi injectado i.p. em um volume final de 400 μ l feito com PBS. A imunização foi repetida após 7 dias. Para induzir a inflamação das vias aéreas, os camundongos foram anestesiados com gás isoflurano e intra-nasalmente administrados 10 μ g de OVA grau VI estéril em 50 μ l de PBS (25 μ l por narina) nos dias 14, 17 e 21 após a primeira imunização i.p.. A IgE total foi medida para confirmar infecção anterior com *S. venezuelensis* (250-350 ng / ml no plasma comparado a 5-10 ng no plasma de camundongos não infectados) (D. Esterhazy et al., 2016).

3.1.21 Lavagem broncoalveolar (BAL), histologia pulmonar e análise de infiltrado por citometria de fluxo

Os camundongos foram anestesiados por injeção i.p. de 0,35 ml de 2,5% de avertina (Sigma), a traqueia foi canulada e os pulmões foram lavados uma vez com 0,5 ml e depois com 1,0 ml de PBS. Células do BAL totais foram contadas após lise de eritrócitos e coradas para análise por citometria de fluxo. Pulmões foram perfundidos através do ventrículo direito com 10 ml de solução salina para lavar o sangue residual. Um lobo foi digerido em 400 U / ml de colagenase D / HBSS e processado para análise por citometria de fluxo. Os eosinófilos foram determinados como CD45⁺ SSA^{hi} MHCII⁻ CD11b⁺ Ly6G^{int} SiglecF⁺, e DCs como CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻ SiglecF⁻.

3.1.22 IgG1 anti-OVA e IgE total

ELISAS foram realizadas conforme descrito anteriormente (D. Esterhazy et al., 2016).

3.1.23 Colonização e depleção de Segmented Filamentous Bacteria (SFB)

O SFB foi obtido a partir de estoques congelados de conteúdo cecal (mantidos a -80°C por menos de 6 meses) de camundongos monocolonizados com SFB, que foram diluídos em PBS (2 ml / cécum) e passados através de uma rede de 70 µm. Os camundongos foram colonizados com duas gavagens de 0,4 ml de preparação de conteúdo cecal, com intervalo de 24 horas. Para depleção de SFB, camundongos foram tratados com 200 µl de 10 mg/ml de Vancomicina (Sigma V2002) 10, 9 e 8 dias antes da transferência de células 7B8, e as caixas foram trocadas a cada vez para minimizar a recolonização por SFB remanescente nas fezes. A colonização ou depleção foi verificada por PCR em tempo real de DNA fecal (Quick-DNA Fecal/Soil microbe miniprep kit, Zymo research, Cat. No. D6010). A PCR foi realizada na presença da mistura principal de Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, 4367659) em uma máquina de PCR Quant Studio 3 (Applied Biosystems), utilizando primers específicos de SFB 16S (abaixo). O valor

de Ct foi normalizado pelo Ct obtido no PCR usando os primers de 16S universal de bactérias:

SFB Forward: 5'-GAC GCT GAG GCA TGA GAG CAT-3'
SFB Reverse: 5'-GAC GGC ACG GAT TGT TAT TCA-3'
Universal Forward: 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3'
Universal Reverse: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3'

3.1.24 Cirurgia de remoção dos mLNs

Os camundongos foram anestesiados por via i.p. com 100 mg / kg de ketamina (substância controlada fornecida pela instalação para animais da Rockefeller University), 10 mg / kg de xilazina (Akorn, inc.), e na presença de 5 mg / kg de analgésico Meloxicam (Putney, Inc.) em 0,5 ml de solução salina. A área abdominal foi então raspada, e esterilizada por três ciclos de limpeza com solução de iodo e 70% de etanol após injeção intradérmica de 20 µl de bupivacaina a 0,25% (Hospira, Inc.) no local prospectivo da incisão. Os camundongos foram colocados em uma esteira térmica e cobertos por um plástico cirúrgico estéril com uma abertura acima do abdômen. Todos os procedimentos a partir deste momento foram realizado assepticamente. A pele foi incisada no meio do abdome ao longo do eixo antero-posterior do camundongo e o peritônio foi aberto. Para expor os linfonodos ileais e cecais, o ceco foi gentilmente retirado com aplicadores de ponta de algodão embebidos em soro fisiológico. Para expor os linfonodos duodenais superiores, o duodeno foi deslocado para a esquerda logo abaixo do piloro; o mesmo loop foi deslocado para a direita para expor os mLNs duodenais distais. Os mLNs foram removidos segurando o linfonodo com uma pinça e puxando-o suavemente, lentamente e estreitamente, cortando ao redor do nódulo com uma tesoura microcirúrgica, de modo que não ocorresse sangramento. Para operação simulada (grupo controle em que os mLNs não foram removidos, aqui chamado de *sham*), o ceco foi retirado e os linfonodos expostos por 2 min. O ceco foi então colocado de novo na sua posição original e a cavidade peritoneal foi preenchida com 0,5 ml de solução salina pré-aquecida. Os músculos peritoneais foram alinhados e suturados

com fio absorvível (PDS*II, Ethicon), a pele fechada com autoclips (Ken Scientific Corp.) e a ferida coberta com Triple Antibiotic Ointment (Honeywell Safety Products, Estados Unidos). Os camundongos foram mantidos em caixa colocada em uma esteira de calor até acordarem completamente. No dia seguinte, os camundongos foram monitorados quanto a agilidade e passagem das fezes. Os camundongos foram tratados com 0,3 mg / kg de Buprinex (substância controlada) e 5 mg / kg de Meloxicam 24 h após o primeiro Meloxicam e por mais 3 dias a cada 24 h.

3.1.25 Rastreamento de “Fast Green”

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano e a sua cavidade peritoneal exposta. Para o mapeamento do intestino até a drenagem linfonodal, foram injetados 3-5 μ l de *Fast Green* em PBS a 10% na muscular do intestino usando um dispositivo de nano-injeção (Nanoject III, Drummond). O espalhamento da cor verde através dos vasos linfáticos foi seguido até acumular no nódulo linfático de drenagem e até desaparecer novamente atingindo a luz duodenal através do ducto biliar, não mais do que 15 minutos. O mesmo tempo foi aplicado em camundongos nos quais mLNs ileais e cecais foram removidos, mesmo que o corante nunca tenha se acumulado em um linfonodo. Para rastrear efluxo linfático dos mLNs, 1-3 μ l de 10% *Fast Green* foi injetado no centro do mLNs, e efluxo monitorado por 15 min.

3.1.26 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0. Os dados multivariados foram analisados aplicando ANOVA unidirecional e teste post hoc de comparação múltipla de Tukey, comparação entre duas condições de tratamento pelo teste t de Student não pareado de uma cauda. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos selvagens das linhagens C57BL/6 e 129Sv/Ev, camundongos geneticamente deficientes para a molécula STING (STING^{-/-}), para o receptor de interferon do tipo I (IFN- α β R^{-/-}) ou para RAG (de *recombinase activating gene*) (RAG^{-/-}) com 7 a 12 semanas de idade, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG. Os camundongos STING^{-/-} foram gentilmente cedidos pelo Prof. Glen Barber (University of Miami, Miami, USA). Os camundongos convencionais dentro de uma mesmo experimento foram *cohoused* (sexo correspondente) por 4 semanas antes do início do experimento e durante o período experimental. Camundongos GF da linhagem Swiss foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG e mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler e manuseados de acordo com técnicas clássicas de gnotobiologia (Pleasant, 1974). Todos os procedimentos animais foram consistentes com as diretrizes do NIH e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG.

3.2.2 Indução de colite experimental por Dextran Sodium Sulfate (DSS)

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 e STING^{-/-} ou 129Sv/Ev e IFN- α β R^{-/-} foram *co-housed* por 4 semanas antes da indução da colite experimental. Os camundongos receberam 3% de DSS (peso molecular 36.000 - 50.000; MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, Estados Unidos) na água de beber por 8 dias como única fonte líquida. Não houve diferença na quantidade de DSS consumido entre os grupos experimentais. Para os estudos de sobrevivência, após o dia 8 o DSS foi retirado e os camundongos beberam apenas água. Estes camundongos foram monitorados diariamente até 21 dias após o início do tratamento com DSS para análise de sobrevivência dos mesmos.

3.2.3 Avaliação macroscópica do desenvolvimento da colite

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 e STING^{-/-} ou 129Sv/Ev e IFN- α β R^{-/-} tiveram seus sinais clínicos monitorados todos os dias durante o tratamento

com DSS para avaliação da gravidade da colite. Fezes frescas destes camundongos foram coletadas para avaliação da sua consistência e presença de sangue oculto nas fezes utilizando o *Hemaccult cards* (INLAB-Diagnostica, São Paulo, Brasil). A graduação do escore clínico foi dada da seguinte forma: 0 = fezes normais e sem sangue; 1 = fezes com consistência suave; 2 = fezes com consistência pastosa; 3 = fezes com consistência pastosas e positiva para o teste do sangue oculto; 4 = fezes líquidas; 5 = fezes líquidas e sangramento retal moderado; 6 = diarreia, hemorragia e sinais gerais de morbidade, incluindo postura curvada e falta de *grooming*.

3.2.4 Avaliação do peso corpóreo dos camundongos

Os camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} ou 129Sv/Ev e IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} foram pesados antes do início da indução da colite com DSS e durante todo período experimental, sempre no mesmo horário. Para determinar a porcentagem de alteração de peso dos camundongos foi utilizada a seguinte fórmula: porcentagem de peso inicial = $(\text{peso no dia } X \text{ } 100) / (\text{peso no dia } 0)$.

3.2.5 Comprimento do cólon

A mensuração do comprimento do cólon foi feita com o auxílio de uma régua de 20 cm e os resultados obtidos foram utilizados para calcular a média do grupo. Foram retiradas fotos representativas do tamanho dos cólons.

3.2.6 Avaliações histológicas e imunohistoquímicas do cólon

Amostras do intestino delgado de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} e amostras do cólon descendente de camundongos C57BL/6, STING^{-/-} 129Sv/Ev, IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} e RAG^{-/-} foram coletadas e fixadas em formalina. Para análises de colite, no dia 8 após tratamento com DSS ou 7 semanas após a transferência de células T para camundongos RAG^{-/-}, amostras do cólon dos camundongos também foram coletadas e fixadas em formalina. As amostras foram submetidas às etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia (5 μ m) e as fatias de tecido foram coradas com

Hematoxilina e Eosina (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e analisadas em microscópio óptico (Olympus BX43 com a câmera Olympus Q-color 5). O tamanho do vilão do intestino delgado, da cripta do cólon bem como a espessura da sua camada submucosa foram analisados pelo programa ImageProPlus 7.0.

Fatias de tecido do cólon também foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS, de *Periodic acid-Schiff*) (Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos) e analisadas em microscópio óptico (Olympus BX43 com a câmera Olympus Q-color 5) para quantificação do número de células caliciformes por cripta do cólon.

Para análises imunohistoquímicas, os blocos de parafina foram submetidos à secções consecutivas de 4 µm de espessura e montadas em lâminas silanizadas, aplicando o sistema de detecção baseado em peroxidase (Advance HRP) (Dako North America, Carpinteria, Califórnia, Estados Unidos). Recuperação antigênica foi feita em banho d'água a 98°C, com uma solução tampão de citrato (pH 6.0) por 20min. Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio em metil álcool. As amostras foram coradas para mucina-1 com anti-MUC1 (1:50, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e para mucina-2 com anti-MUC2 (1:300, Abcam) e a imunorreatividade foi visualizada através da incubação das lâminas com diaminobenzidina (sistema de substrato DAB, Lab Vision, Fremont, Califórnia, Estados Unidos) por 10 minutos. As alterações histológicas foram analisadas de maneira "duplo-cega". A quantificação de MUC1 foi feita baseada em vesículas coradas ou não com anti-MUC1. As análises histológicas de MUC2 foram baseadas em escores divididos em frequência das células positivas em 10 campos (60x), classificados como: 1+ quando 0-25% das células estavam coradas; 2+ quando 25-50% das células estavam coradas; 3+ quando 50-75% das células estavam coradas e 4+ quando mais de 75% das células estavam coradas e os casos foram classificados como negativos (1+ ou 2+) ou positivos (3+ ou 4+). Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste Exato de Fisher.

3.2.7 Teste de permeabilidade intestinal

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificar a função da barreira de mucosa foi realizado utilizando-se o método do FITC-labeled dextran

(*fluorescein isothiocyanate dextran* FITC). Camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram submetidos a jejum de quatro horas de água e alimento e, após este período, receberam solução estéril por gavagem de FITC-DEXTRAN (F4-Sigma) 0.6mg/g (protegido da luz). Após 4 horas da gavagem (agulha 22G) os animais foram anestesiados e submetidos a sangria. O sangue coletado em tubo eppendorf foi então centrifugado a 10000rpm por 3 minutos a 4°C. Em placa de 96 poços, transferimos 100 µL de cada amostra. Curva padrão foi realizada com concentrações conhecidas de FITC Dextran (inicial 10µg / ml), diluída 1:5. Foi, então, realizada a medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA).

3.2.8 Depleção da microbiota intestinal com uso de antibióticos

Camundongos C57BL/6 foram tratados com um coquetel de antibióticos de amplo espectro em sua água potável continuamente por 21 dias antes da experimentação. O tratamento com antibióticos começou com 3 dias de anfotericina B (0,1 mg / ml a cada 12 horas) administrados por gavagem e, em seguida, os frascos de água foram suplementados com um antibiótico contendo 2 g / l de ampicilina, 2 g / l de neomicina, 1 g / l de metronidazol. Além disso, todos os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de ciprofloxacina (0,2 g / l) por dia e foram gavados com 0,5 g / l de vancomicina a cada 12 h. Não houve crescimento bacteriano nas fezes coletadas no dia 21, as quais foram manuseadas assepticamente, e colocadas em meio de tioglicolato (o limite de detecção para este ensaio foi estabelecido em 1 unidade formadora de colônia [UFC] / mg de fezes). Apenas os camundongos com < 1 CFU / mg de fezes foram definidos como depleção eficiente da microbiota e utilizados em outros experimentos.

3.2.9 Monocolonização dos camundongos germ-free com Bacteroides thetaiomicron

Bacteroides thetaiomicron foi obtida de culturas em fase estacionária que tinham crescido em meio TYG (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% glucose) suplementado com 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,2, cisteína

4,1 mM, histidina 200 mM, CaCl₂ 6,8 mM, FeSO₄ 140 nM, MgSO₄ 81 mM, NaHCO₃ 4,8 mM, NaCl 1,4 mM, hematina 1,9 mM e vitamina K3 5,8 mM. Foram administradas por gavagem 10⁸ CFU (em 100 µl de meio TYG) em animais *germ-free* receptores.

3.2.10 Extração de células para citometria de fluxo e cultura celular

Os linfonodos mesentéricos, órgãos linfoides secundários analisados nesse trabalho, foram extraídos de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} tratados ou não com DSS e macerados com auxílio de lâminas. As suspensões das células foram homogeneizadas e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e ressuspendidas em RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/ml de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 50µM de β-mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido), pH 7,2 (aqui chamado de RPMI completo).

3.2.11 Contagem de células

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células x diluição x } 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ campos}}$$

Para contagem das células, estas foram diluídas em meio RPMI completo (baço diluído 100 vezes e as demais 50 vezes). Após diluição das células, 50µl das células foram diluídas em um tubo contendo 50µl de eritrocina diluída (1:10). A contagem das células foi feita em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer. Após a obtenção do valor real de amostragem de cada órgão, o volume de células foi ajustado para a concentração de 1x10⁶ células/poço para cultura celular e citometria de fluxo.

3.2.12 Cultivo de células

As células dos linfonodos mesentéricos de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram plaqueadas (1x10⁶ células/poço) em placas de 96 poços e incubadas por 48

ou 72 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As células estavam em meio RPMI completo e foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD-28 a 1µm/ml. Os sobrenadantes foram coletados após 48 e 72 horas e congelados em freezer -20°C para posterior análise de concentração de citocinas por ELISA.

3.2.13 Separação de leucócitos da lamina própria e linfócitos intraepiteliais

O intestino delgado e cólon dos camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} tratados ou não com DSS foi removido, retirando o tecido adiposo aderido. Os intestinos delgado e cólons foram abertos longitudinalmente em um papel filtro, para remoção das fezes e das placas de Peyer, e lavados cuidadosamente com solução de HBSS (de *Hank's Balanced Salt Solution*) 1X, contendo 10% de soro fetal bovino, 2mM EDTA e 25mM HEPES. O intestino foi, então, picotado em pequenos pedaços de 0,5 cm e colocados sob agitação lenta. A solução de HBSS 1X foi trocada 4 vezes após intervalo de 15 minutos cada, para limpeza dos tecidos. Os linfócitos intraepiteliais e as células epiteliais foram removidas após incubação em uma solução de HBSS 1x com acréscimo de 1mm de dihidrotreitol (DTT) (Sigma) por 15 minutos a 37°C em agitação lenta. Os linfócitos intraepiteliais foram separados das células epiteliais por gradiente de densidade utilizando Percoll 40% sobreposto por Percoll 80%. Após centrifugação, os linfócitos intraepiteliais formam uma camada circular entre as duas camadas de Percoll, e esta foi coletada para análises. O tecido restante após a remoção das células epiteliais foi incubado por 1 hora a 37°C com colagenase tipo 2 (Sigma) (100U/mg) para separação das células da *lamina própria*. As células foram lavadas, contadas no microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer e submetidas a marcação celular por citometria de fluxo ou cultivadas em placa de cultura (Davies & Parrott, 1981).

3.2.14 Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos (1x10⁶) foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo em estilo "U" e pré-incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores FcγRII/III por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram adicionados 20µl por poço do coquetel de anticorpos monoclonais

anti-marcadores fenotípicos conjugados com diferentes fluorocromos. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Foram utilizadas células não marcadas como controle negativo. Posteriormente, as células foram lavadas com 100µl de PBS-BSA (albumina sérica bovina 0.5%), e centrifugadas a 1200 rpm por 7 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi repetido. Para a marcação intracelular, após essa primeira etapa, foi utilizado kit de fixação/permeabilização comercial (eBioscience, Califórnia, Estados Unidos) e em seguida as amostras foram incubadas por mais 30 minutos com anticorpos anti-Foxp3, anti-T-bet, anti-GATA3 ou anti-RORγt de camundongo. Finalmente, as células marcadas foram ressuspensas em 200µl de solução fixadora (0,5% de formaldeído em PBS1X), incubadas durante 30 minutos, lavadas e armazenadas em PBS-BSA a 4°C. A aquisição das amostras foi feita utilizando o FACSCantoll (BD Bioscience, Califórnia, Estados Unidos) e FACSFortessa (BD Bioscience).

Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4 (FITC), anti-LAP (PE), anti-CD25 (PerCPCy5.5) e anti-Foxp3 (APC) para análise de células T reguladoras apenas. Anti-CD11b, anti-CD11c e anti-FcεR1α (Pacific Blue); anti-CD16/32 e anti-CD19 (BV421); anti-CD8 (PerCPCy5.5); anti-CD4 (PECy7); anti-CD45 (BV570); anti-CD117 (BV605); anti-CD127 (BV510); anti-CD3 (AL700); anti-Foxp3 (APC); anti-RORγt (PE-CF594); anti-T-bet (PE) e anti-GATA3 (AF488) foram utilizados nas análises de células T e linfócitos inatos (ILCs). Para caracterização dos linfócitos intraepiteliais foram utilizados os anticorpos anti-CD45 (APC E-fluor780), anti-CD4 (PECy7), anti-CD8α (V500), anti-CD8β (FITC), anti-TCRαβ (APC) e anti-TCRγδ (PE). Os anticorpos foram adquiridos da Invitrogen (Califórnia, Estados Unidos), BD Pharmingen (Califórnia, Estados Unidos) e R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos). As análises foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas.

3.2.15 Separação de células (“cell sorting”)

Baço de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram coletados e macerados com auxílio de macerador. As suspensões das células foram homogeneizadas e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A lise de hemácias

do baço foi feita com PBS 10X diluído 1:10 em água. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI completo. Para uma primeira etapa de purificação das células, foi utilizado o kit CD4⁺ Microbeads T-cell Isolation (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) separando a maioria das células CD4⁺ das demais células do baço. A fração de células CD4⁻ foram consideradas células apresentadoras de antígeno para o ensaio de supressão de células T reguladoras *in vitro* (abaixo descrito). As células CD4⁺ purificadas foram incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz com anticorpos monoclonais: anti-CD4 (PeCy7), anti-CD62L (APC), anti-CD44 (PE), para marcação de células T *naive* e anti-CD4 (PeCy7) e anti-CD25 (PerCPCy5.5) para marcação de células T reguladoras. As células marcadas foram então separadas em células T *naive* (CD4⁺CD62L⁺CD44^{low}) e células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺) utilizando o FACSArialI (BD Bioscience).

Para o modelo de indução de colite por transferência de células T, células T *naive* CD4⁺CD45RB^{hi} foram isoladas do baço de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} (como descrito anteriormente). As células CD4⁺ purificadas foram incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz com anticorpos monoclonais: anti-CD4 (FITC) e anti-CD45RB (PE). Após a marcação, as células foram então separadas em células T *naive* (CD4⁺CD45RB^{hi}) e células T reguladoras (CD4⁺CD45RB^{low}) utilizando o FACSArialI (BD Bioscience).

3.2.16 Ensaio de supressão de células T reguladoras “*in vitro*”

As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ separadas do baço de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo em estilo "U" nas razões de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 com células T *naive* CD4⁺CD62L⁺CD44^{low} que foram previamente marcadas com CFSE (de *carboxifluorescein succinimidyl ester*) (Invitrogen) para avaliar a proliferação destas células. As células foram estimuladas com anti-CD3e (1µg ml⁻¹, 145-2C11, BioLegend) na presença também de células apresentadoras de antígenos em 200µl de meio RPMI completo. A proliferação e indução de Foxp3 foram avaliadas após 72h por citometria de fluxo (FACSCalibur BD Biosciences) baseada na diluição de CFSE.

3.2.17 Indução de colíte por transferência de células T

As células T *naive* separadas do baço de camundongos C57BL/6 ou STING^{-/-} foram injetadas (5×10^5 células T *naive* por camundongo) intraperitoneal em camundongos imunodeficientes RAG^{-/-} de 7 a 8 semanas de idade. Células T reguladoras de C57BL/6 ou STING^{-/-} foram co-injetadas intraperitoneal ($2,5 \times 10^5$ por camundongo) como descrito previamente (Powrie et al., 1994). Os camundongos recipientes foram monitorados semanalmente para avaliar sinais de desenvolvimento da doença. Aqueles camundongos que perderam mais de 20% do seu peso inicial ou apresentaram sinais graves de doença foram eutanasiados.

3.2.18 Preparação de extratos de tecidos

Amostras do cólon foram coletadas de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}, pesadas e adicionados 1ml de solução tampão contendo 0,05% de Tween-20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto benzotônio, 10 mM de EDTA e 20 KIU de aprotinina A para cada 100mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Foi coletado o sobrenadante das amostras e estes foram mantidos a -20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

3.2.19 Determinação de IgA secretória

Fezes de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram coletadas e mantidas em gelo seco antes de serem pesadas. Foram adicionados 1000µl de PBS 1x gelado para cada 100mg de fezes. As amostras foram trituradas com um homogeneizador e centrifugadas a 1200 rpm durante 20 minutos, a 4°C. Foi coletado o sobrenadante das amostras e utilizado imediatamente para a dosagem de sIgA pelo método de ELISA.

3.2.20 Coleta sanguínea e obtenção de soro

O sangue foi coletado através de sangria da artéria femoral ou axilar com o auxílio de pipeta pasteur e transferidos para tubos, que foram posteriormente incubados por 15 minutos e estufa 37°C. Após este período, as amostras de sangue

foram transferidas para geladeira a 4°C, onde permaneceram por mais 15 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos, seguido da coleta do soro (sobrenadante) com auxílio de pipeta e congelado a -20°C para posteriores análises dos níveis de IgM sérica pelo método de ELISA.

3.2.21 Medida da produção de citocinas por ELISA

Os níveis de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ e TGF- β , foram determinados nos extratos de tecidos, bem como os níveis de IgA secretória (coletada das fezes) e de IgM sérica, pelo método de ELISA de captura utilizando os kits adquiridos da R&D Systems, de acordo com o protocolo do fabricante. Os níveis de IL-10 e TGF- β foram determinados também no sobrenadante de cultura de células dos linfonodos mesentéricos estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 por 48h e 72h, respectivamente. Para as medidas de TGF- β as amostras foram acidificadas e neutralizadas para ativar o TGF- β latente, como descrito anteriormente (A. M. Faria et al., 2003).

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). As placas foram sensibilizadas com 50 μ l/poço de solução dos respectivos anticorpos monoclonal anti-camundongo para citocinas a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após quatro lavagens com PBS-Tween 20 (0,05% - pH=7,4); adicionou-se às placas 200 μ L por poço de tampão bloqueio (1% albumina bovina-BSA em PBS pH=7,4) e estas foram, então, incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 50 μ L/poço dos padrões, com concentrações conhecidas, e das amostras e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight*. Após lavagem das placas, adicionou-se 50 μ l/poço de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 50 μ l/poço de solução de estreptavidina e incubou-se por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo foi adicionado 50 μ l/poço o substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) diluído em tampão citrato (pH=5,0) acrescido de H₂O₂ (30

v/v). As placas foram encubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com a adição de 20 μ l/poço de H₂SO₄ 1M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

3.2.22 Quantificação da expressão de mRNA através de qPCR em tempo real

Amostras do cólon ou da cultura de células da *lamina propria* foram homogenizadas em 0,5ml de TRIZOL (Invitrogen) utilizando-se um homogeneizador de tecidos elétrico (Biosystems). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 min, a uma temperatura de 15°C a 30°C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 100 μ l de Clorofórmio (MERCK), para cada 0,5ml de TRIZOL. Foi realizada agitação em vortex e depois incubação por 3min a 15°-30°C. A amostra homogeneizada foi centrifugada a 12.000g, por 15 min, a 2-8°C. Após centrifugação, o homogenato ficou separado em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior (contendo o RNA). O RNA foi então transferido para um microtubo novo e foi precipitado com isopropanol (MERCK), 250 μ l de isopropanol para cada 0,5ml de TRIZOL. As amostras foram incubadas por 10 min a 15-30°C e então centrifugadas a 12.000g por 10 min a 2-8°C. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 0,5ml de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC) para 0,5ml de TRIZOL. O tubo foi agitado no vortex, para o desprendimento do precipitado. Então, foi feita nova centrifugação a 7.500g por 5 min a 2-8°C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do sedimento que foi, em seguida, diluído em água milli-Q, em volume suficiente para diluir toda a amostra.

A quantificação das amostras de RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano DropTechnologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água ultrapurificada (MilliQ, Millipore) e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água Milli-Q. O RNA foi quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2 μ l da amostra pura. A

concentração foi fornecida em ng/ μ L e a pureza do RNA foi avaliada pela correlação 260/280 (RNA/proteínas). O RNA foi estocado a -80°C .

A transcrição reversa de 2 μ g do RNA total foi feita utilizando Illustra Ready-To-Go reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) Beads (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C .

O Real-time RT-PCR foi feito com um volume final de 10 μ l contendo 5 μ l de SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), 1 μ l da amostra de cDNA, 0,2 μ l de primer sense a 10 μ M, 0,2 μ l de primer anti-sense a 10 μ M e 2 μ l de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando o sistema de real-time PCR ABI7900 (Applied Biosystems). Em resumo, foi feita uma incubação de 60°C por 10 min e outra incubação de 95°C por 10 min. Em seguida, foram feitos 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 min para anelamento, e depois foi feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e rampa de subida lenta de temperatura até 95°C . A expressão relativa foi calculada pelo método $-\Delta\Delta\text{CT}$. Os dados foram demonstrados como unidade de expressão relativa após a normalização em relação ao controle interno do gene β -actin. Todas as reações foram replicadas. Os primers usados foram:

β -actin Forward: 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3'
β -actin Reverse: 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'
IFN- β Forward: 5'-GCC TTT GCC ATC CAA GAG ATG C-3'
IFN- β Reverse: 5'-ACA CTG TCT GCT GGT GGA GTT C-3'
Amphiregulin Forward: 5'-GCC ATT ATG CAG CTG CTT TGG AGC-3'
Amphiregulin Reverse: 5'-TGT TTT TCT TGG GCT TAA TCA CCT-3'

3.2.23 Isolamento do conteúdo fecal e DNA da microbiota das fezes

Amostras de fezes foram extraídas do cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}, ressuspendidas e homogeneizadas em PBS 1x. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante utilizado

para estimulação das células. O DNA fecal foi extraído de amostras de fezes frescas utilizando o QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.24 Sequenciamento de DNA da microbiota e análise bioinformática

O DNA purificado das fezes dos camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foi amplificado na região hiper-variável V3-V4 do RNA ribossomal 16S e sequenciado utilizando a plataforma Illumina-Miseq (Illumina, Califórnia, Estados Unidos), que forneceu *single-end reads* com 300 nucleotídeos de comprimento. Análises subsequentes foram feitas executando o *pipeline* QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology). Resumidamente, sequências de leitura que apresentaram um *score* de qualidade Phred menor que 20 foram removidas. Cada biblioteca foi normalizada pela menor amostra, escolhendo aleatoriamente até que isso corresponda ao número total de leituras. Em seguida, sequências representativas foram agrupadas pelo Uclust nas Unidades Taxonomias Operacionais (de *Operational Taxonomic Units*) por 97% de similaridade e taxonomia atribuída com Pynast contra o banco de dados Greengenes. Sequências quiméricas foram identificadas pelo Usearch61 e removidas antes de analisar e visualizar diversidade. O perfil do microbioma das amostras de camundongos foi avaliado através da análise de coordenadas principais (PCA, de *principal coordinate analysis*) com peso e sem peso (*weighted and unweighted*) UniFrac. A significância estatística entre os dois grupos foi inferida por meio do método Adonis implementado no pacote *vegan* para o ambiente de software estatístico R, como descrito anteriormente (Marino et al., 2017). A abundância diferencial das Unidades Taxonomias Operacionais em cada grupo foi avaliada com o pacote DESeq2. A diversidade alfa em cada grupo foi avaliada por meio do índice de Shannon. Os dados brutos de sequência usados neste experimento estão disponíveis no EMBL-EBI (Identidade de acesso: PRJEB22143).

3.2.25 Transfecção de células da “lamina propria”

Células da *lamina propria* de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram isoladas e cultivadas a 5×10^5 células por poço. Transfecções transientes das células da *lamina propria* foram feitas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) na razão

(em ml) de 1:0,25, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram cultivadas em meio RPMI e transfectadas com DNA da microbiota extraído das fezes de camundongos (3 μ g por poço) ou com dsDNA90 (ligante de STING, utilizado como controle positivo) (3 μ g ml⁻¹). Após 17h, as células foram coletadas e avaliadas para expressão de IFN- β por RT-PCR.

3.2.26 Cultura de células e transfecção de ácidos nucléicos para microscopia confocal

Fibroblastos embriônicos murinos (MEFs, de *murine embryonic fibroblasts*) de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} foram fornecidos pelo Dr. Glen Barber (*University of Miami*). Essas células foram mantidas em meio *Dulbecco's modified Eagle* (GIBCO) completo rico em glicose a 37°C in 5%CO₂/95% de ar em incubadora umidificada. As MEFs foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas esterilizadas um dia antes do experimento e mantidas em meio normal de crescimento. As células foram transfectadas com DNA da microbiota extraído das fezes de camundongos, dsDNA90 ou conteúdo fecal utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). O total de 1 μ g de DNA extraído foi utilizado por poço. A transfecção foi feita por 4h, seguida de remoção do meio de cultura e fixação das células com 4% de paraformaldeído, pH 7.4 por 30 min a temperatura ambiente.

3.2.27 Imunofluorescência e microscopia confocal

Após a fixação das MEFs as lamínulas foram lavadas com PBS 1x e mantidas a 4°C até a realização da imunofluorescência. Permeabilização foi feita por 15 min com 0,3% Triton X-100 em PBS 1x e as células foram subsequentemente bloqueadas por 1h com 1% BSA em PBS 1x a temperatura ambiente, seguida de incubação com anticorpo anti-Sting a 4°C *overnight*. Anticorpo policlonal de coelho contra STING foi fornecido pelo Dr. Glen Barber (*University of Miami*). A detecção do anti-Sting foi feita com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa-546 (Jackson Immuno Research, Pennsylvania, Estados Unidos). Lamínulas foram montadas em lâminas utilizando Prolong Gold com 4,6-

diamidino-2-phenylindole meio de montagem (Invitrogen). As análises macroscópicas foram feitas em sistema Apotome 2.0 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), montado em microscópio Axio Imager adaptado com uma objetiva Plan-APOCHROMAT 40 x 0.8. HXP 120C (iodetos metálicos) foram usados para iluminação, as imagens foram adquiridas como arquivos czi por uma câmera AxioCam HRm utilizando o Zen software (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.2.28 Infecção por *Salmonella enterica* Typhimurium e translocação bacteriana

Para as infecções por *Salmonella*, os camundongos foram inoculados por gavagem com *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028) (10^8 CFU / camundongo) e a mortalidade foi acompanhada. Para a translocação de *Salmonella*, os camundongos foram inoculados com a bactéria e seis dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados, o fígado assepticamente coletado, pesado e homogeneizado em PBS estéril (1:10, p / v). Alíquotas de 0,1 ml de diluições seriadas decimais do homogenato dos fígados foram plaqueadas em ágar MacConkey.

3.2.29 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 6. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student quando os dados consistiam de apenas dois grupos. Quando foram comparados três ou mais grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais

4.1.1 Capacidade absorptiva e rede linfática variam ao longo do intestino e correspondentes mLNs

Múltiplos mecanismos imunes inatos e adaptativos estão presentes no intestino e nos mLNs para prevenir o desenvolvimento de doenças e manter o equilíbrio entre a tolerância imunológica e a vigilância imune inflamatória subpatológica. Os mLNs em camundongos consistem em um LN hepático co-drenando o duodeno, LNs pancreático-duodenal drenando também o duodeno, a cadeia principal de mLNs drenando o duodeno distal, jejuno, íleo, ceco-cólon ascendente proximal, cólon ascendente, cólon transversal e os linfonodos caudais e ilíacos drenando o cólon descendente / distal (Figura 3a) (Carter & Collins, 1974; Gautreaux, Deitch, & Berg, 1994; Houston et al., 2016; Van den Broeck, Derore, & Simoens, 2006). Para entender melhor a via de drenagem do tecido linfático para estes mLNs, criamos uma imagem do sistema linfático intestinal incluindo o intestino, mesentério e mLNs usando imagens 3D de tecidos clareados com solvente (iDISCO) corados com um anticorpo contra o marcador de superfície da célula linfática endotelial (LEC - *lymphatic endothelial cells*) LYVE-1. Imagens do bloco de tecido expuseram as vias linfáticas do intestino que conduzem aos mLNs através dos linfáticos aferentes compartimentalizados no mesentério (Figura 3b e c).

O tamanho e a forma dos mLNs individuais são diferentes entre si, tanto em camundongos C57BL/6 SPF (*specific pathogen free*) quanto nos GF, provavelmente devido às diferentes propriedades do tecido e conteúdo luminal ao longo do intestino (Figura 3d e e). Todos os mLNs exibiram linfáticos altamente arborizados indicativos de seu papel absorptivo. No tecido intestinal, a estrutura linfática seguiu o gradiente intestinal de capacidade de absorção, no sentido proximal - distal (Bernier-Latmani & Petrova, 2017), onde o comprimento dos capilares linfáticos nos vilos diminuiu ao longo do intestino delgado (Figura 4). Nos camundongos GF, os capilares linfáticos dos vilos do duodeno são mais longos quando comparados aos camundongos SPF, consistente com o maior comprimento dos vilos nesses animais (Figura 4). Em contrapartida, os linfáticos do cólon são organizados em duas camadas distintas, não possuem capilares linfáticos e não parecem ser diferentes em camundongos

GF, sugerindo que sua organização estrutural é independente da microbiota (Figura 4).

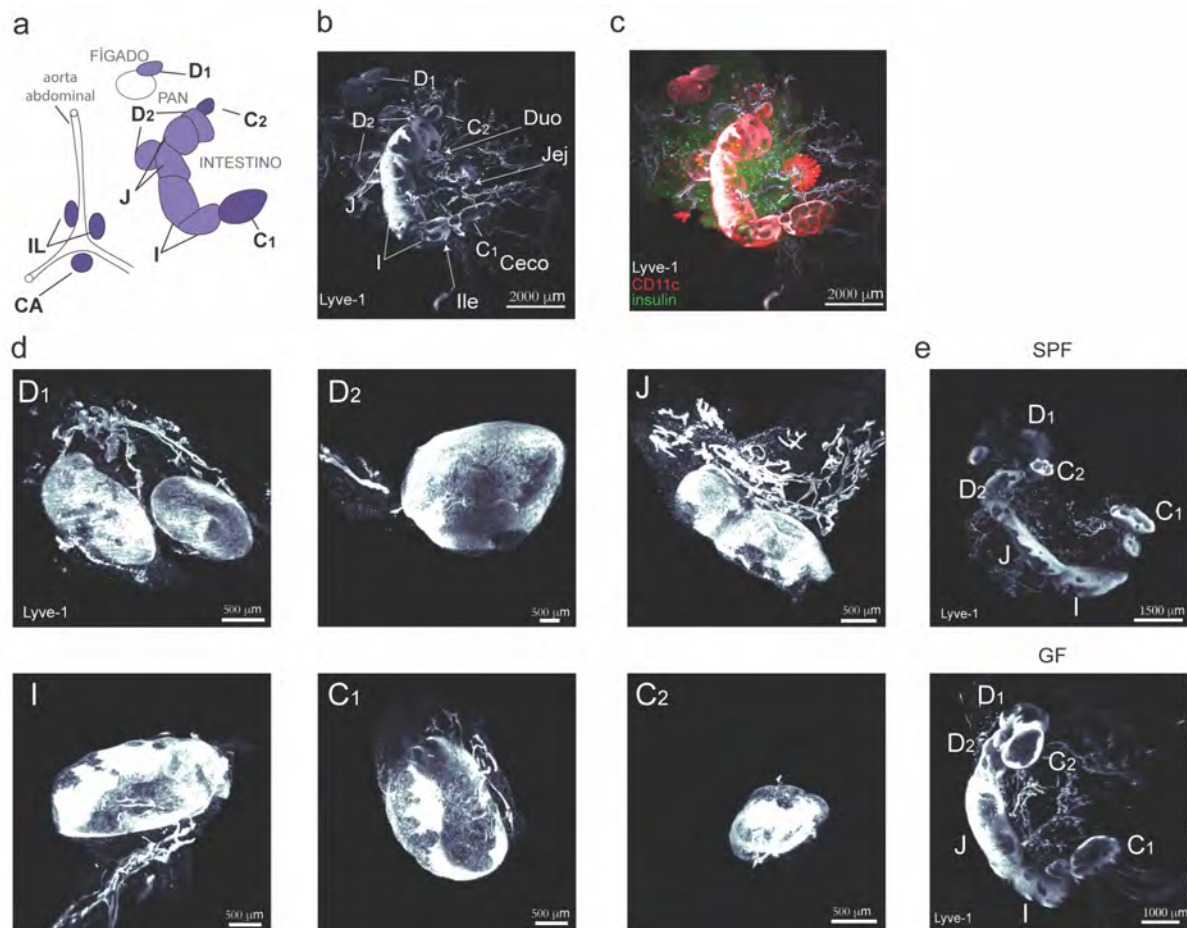


Figura 3: Rede linfática intestinal e mLNs. (a) Esquema dos mLNs e sua posição relativa ao fígado, pâncreas, intestino e artéria inferior. (b, c) Reconstituição 3D da rede linfática (α -LYVE-1) intestinal de camundongos após clareamento do tecido com solvente (iDISCO+) e microscopia *light-sheet*, (c) corada também com anti-GFP (*Itgax^{Venus}* mice) e anti-insulina. (d) mLNs peritoneais de camundongos C57BL/6 (B6) criados em condições SPF individualmente dissecados e (e) todos os mLNs peritoneais de camundongos C57BL/6 SPF e camundongos GF. D / Duo = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J / Jej = jejuno, I / Ile = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN.

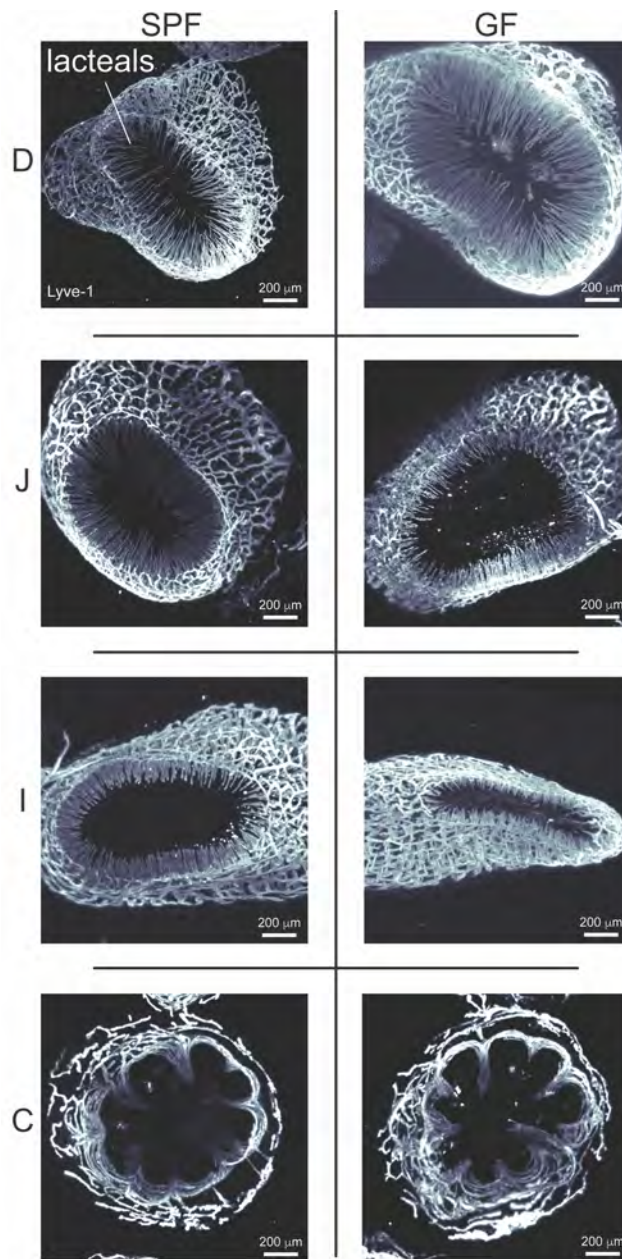


Figura 4: Imagem 3D dos vasos linfáticos ao longo do intestino de camundongos C57BL/6 SPF e GF. (a) Reconstituição 3D da rede linfática (α -LYVE-1) intestinal de camundongos após clareamento do tecido com solvente (iDISCO+) e microscopia *light-sheet* dos vilos e submucosa ao longo do intestino de camundongos C57BL/6 SPF e GF. Vasos linfáticos que se projetam para dentro das vilosidades (*lacteals* - capilares linfáticos) estão apontados. D = duodeno, J = jejuno, I = íleo, C = cólon.

A visualização do tecido clareado também revelou uma rede linfática submucosa aparentemente contínua ao longo do intestino (Figura 5a - d). Entretanto, quando injetamos o corante *Fast Green* na camada muscular do duodeno, jejuno, íleo e ceco foi observado que a drenagem linfática é restrita aos seus respectivos mLNs (Carter & Collins, 1974; Gautreaux et al., 1994; Houston et al., 2016; Van den Broeck et al., 2006).

Quando o corante foi injetado nos mLNs individuais ele não se espalhou para outros mLNs antes de atingir o ducto torácico, sugerindo que a linfa permanece compartimentalizada até atingir a veia subclávia (Figura 5e - l).

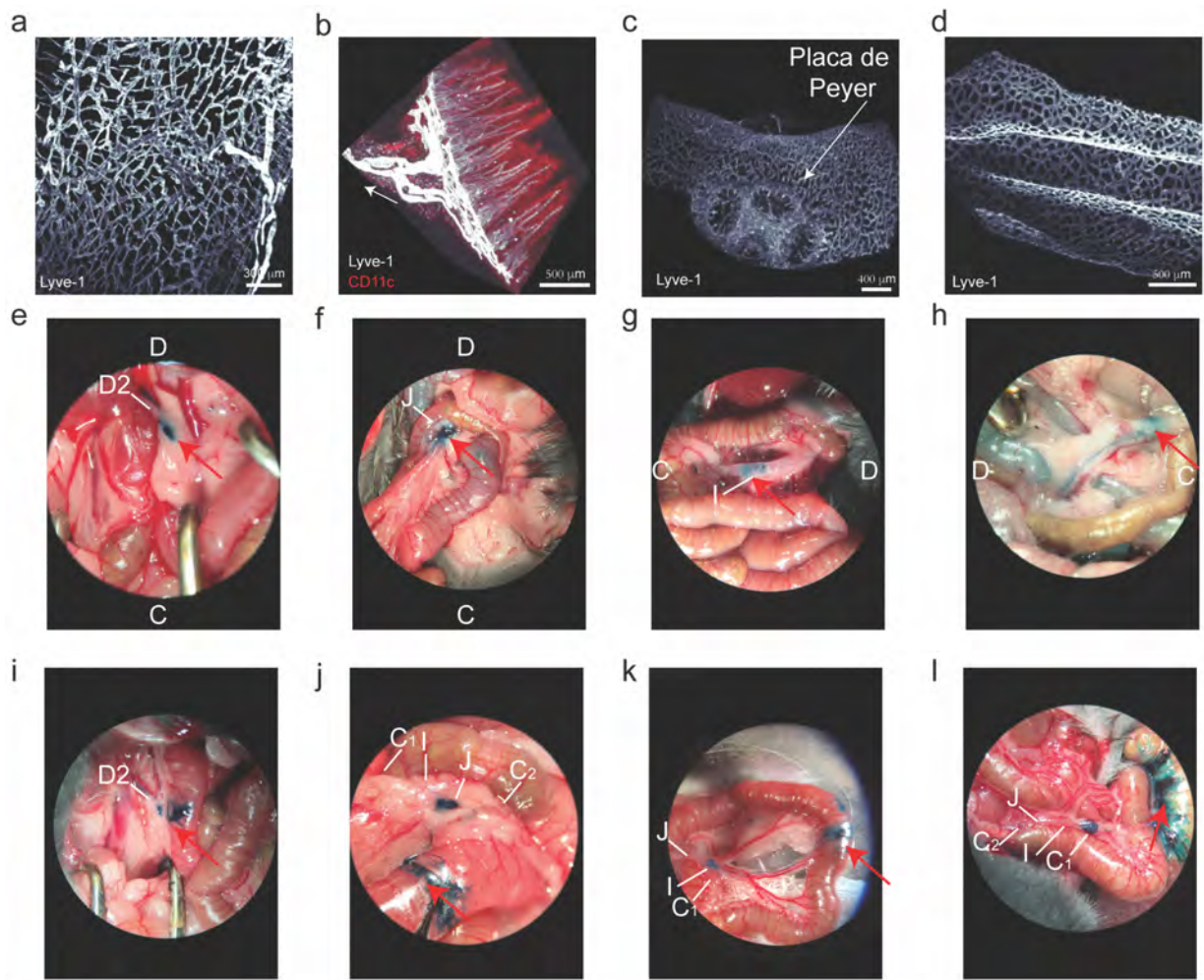


Figura 5: Caracterização da drenagem linfática aferente e eferente de mLN. Reconstituição 3D da rede linfática (α -LYVE-1) intestinal de camundongos após clareamento do tecido com solvente (iDISCO+) e microscopia *light-sheet* no (a, b) duodeno, (c) íleo e (d) cólon destacando a rede linfática submucosa. Seta em (j) denota a direção do fluxo linfático do intestino para os mLNs; CD11c foi revelado usando camundongos Itgax^{Venus} e coloração anti-GFP. Espalhamento de Fast Green quando injetado nos mLNs que drenam o (e) duodeno, (f) jejuno, (g) íleo e (h) ceco-cólon proximal de camundongos C57BL/6 SPF. Espalhamento de Fast Green quando injetado nos linfáticos da camada muscular do (i) duodeno, (j) jejuno, (k) íleo e (l) ceco. As fotos foram tiradas 15 minutos após a injeção de *Fast Green*.

Para explorar como a combinação de capacidade de absorção específica do microambiente intestinal e drenagem compartimentalizada podem resultar em exposição diferencial de nutrientes nos mLNs, nós rastreamos a captação de retinol radiomarcado (^3H -retinol), como um nutriente lipossolúvel e imunomodulador (Mucida et al., 2007), que depende em grande parte do empacotamento em quilomícrons e absorção linfática pelo intestino delgado superior. Os camundongos SPF foram gavados com ^3H -retinol e sua distribuição avaliada 8 h depois.

De fato, a maior parte do retinol foi absorvida no duodeno e isso se refletiu no D-mLN. Este efeito foi dependente da via linfática, pois o tratamento dos camundongos com um inibidor da formação de quilomícrons evitou o efluxo de retinol duodenal para sua drenagem do LN (Figura 6a, b e c), ilustrando que os mLNs são expostos à composição linfática região-específica dos microambientes intestinais. Similarmente, o aumento da capacidade de absorção duodenal e a diminuição da capacidade de absorção ileal de camundongos GF foi exibido pela retenção de retinol correspondente no tecido intestinal e mLNs (Figura 6d - h).

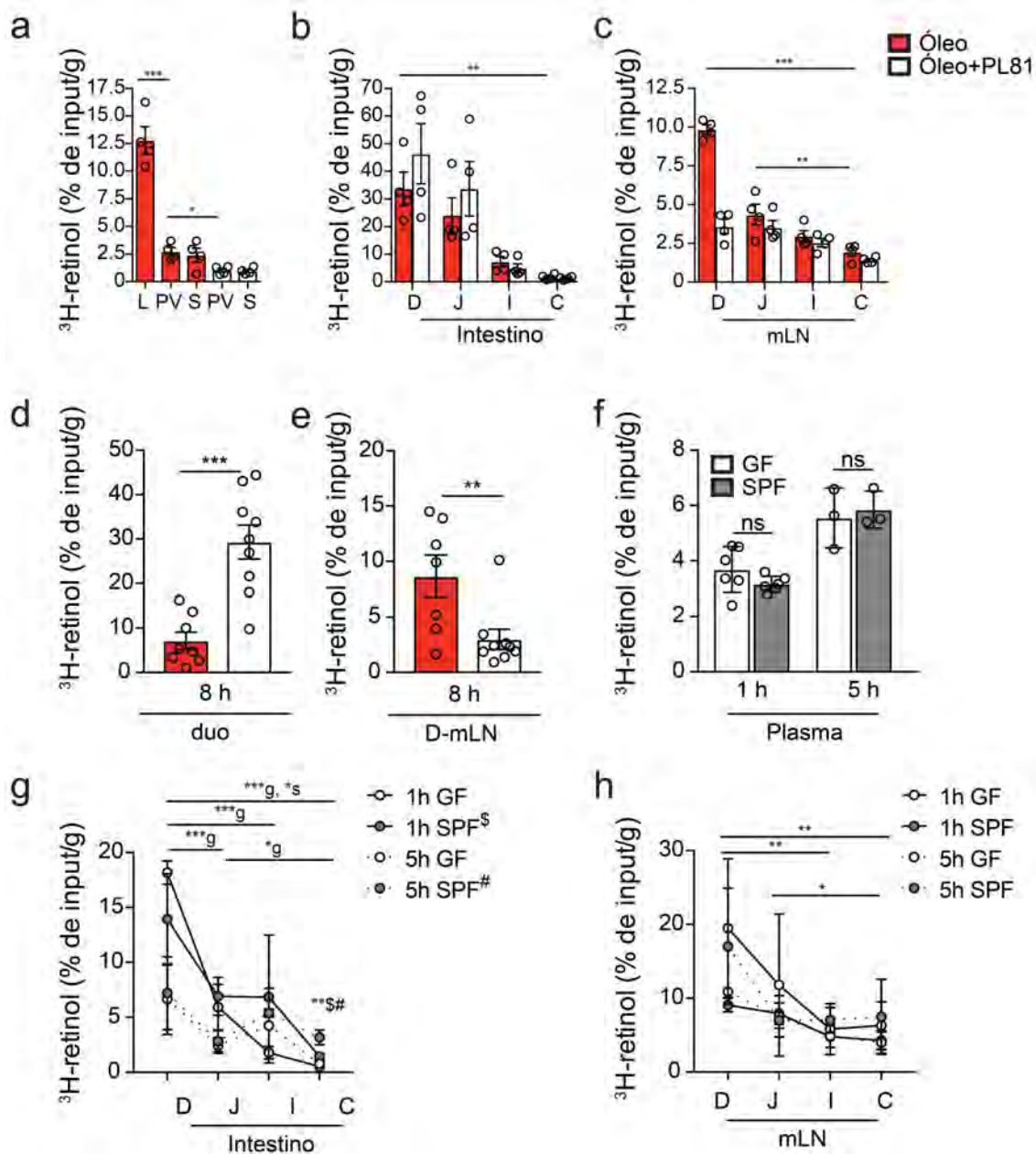


Figura 6: Absorção de retinol da dieta pela rede linfática intestinal e mLNs. (a) Porcentagem de absorção de ^3H -retinol na linfa (L), soro da veia porta (PV) ou soro sistêmico (S), (b) nos seguimentos do intestino ou nos (c) mLNs indicados de camundongos C57BL/6 SPF 3h após gavagem com $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -retinol em $100 \mu\text{l}$ de azeite de oliva, com ou sem pré-tratamento com $5 \mu\text{l}$ de inibidor da formação de quilomícrons (Pluronic-L81) 3h antes da gavagem. (d) Porcentagem de absorção de ^3H -retinol no duodeno e (e) D-mLN de camundongos C57BL/6 SPF 8h após gavagem com $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -retinol em $100 \mu\text{l}$ de azeite de oliva, com ou sem pré-tratamento com $5 \mu\text{l}$ de inibidor da formação de quilomícrons (Pluronic-L81) 3h antes da gavagem. (f) Porcentagem de absorção de ^3H -retinol no plasma sistêmico,

(g) nos seguimentos do intestino ou nos (h) mLNs indicados de camundongos C57BL/6 SPF e GF 1h e 5h após gavagem com 1 μCi ^3H -retinol em 100 μl de azeite de oliva. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. g se refere a GF e s se refere SPF, \$ se refere ao tempo de 1h e # a 5h.

4.1.2 Diferente perfil de expressão gênica em células estromais e DCs entre os mLNs

Os mLNs são compostos por células estromais além de células do sistema imune. Foi demonstrado recentemente que as células estromais dos mLNs (conjunto de mLNs da cadeia principal) promovem um ambiente tolerogênico em comparação com outros LNs não intestinais (Hammerschmidt et al., 2008; Pezoldt et al., 2018; Rodda et al., 2018). Com o intuito de investigar como a drenagem compartimentalizada do intestino pode impactar diferencialmente os mLNs no nível celular, nós analisamos primeiramente o transcriptoma das duas principais populações de células estromais, as células endoteliais linfáticas (LECs) e as células reticulares fibroblásticas (FRCs), isoladas do D-mLN, I-mLN e C-mLN (Figura 7a). A análise de coordenadas principais (PCA) mostrou que as LECs e FRCs apresentam expressão gênica diferencial de acordo com o seguimento do intestino que elas drenam (Figura 7b). As LECs de D-mLN apresentaram uma assinatura metabólica distinta, indicativa de elevado colesterol e manejo de lipoproteínas (*Insig*, *ApoE*), bem como a utilização de ácidos graxos (*Hmgcs1*), provavelmente impulsionada pela linfa carregada de lipídios no intestino delgado proximal (Figura 7c, e e f). As LECs também exibiram um padrão imuno-estimulador distal para proximal, onde o C-mLN é distinto dos D-mLN e I-mLN, sendo as LECs do intestino delgado mais semelhantes entre si, com exceção da via da IL-1 que apareceu mais alta no D-mLN (Figura 7c, e e f).

Os perfis de expressão gênica das FRCs foram afetados de maneira mais pronunciada de acordo com a localização, mais evidentemente nas moléculas de adesão de células imunes e nas vias de ativação entre D-mLN, I-mLN e C-mLNs, os quais foram regulados positivamente no C-mLN, como por exemplo *Icam2*, o ligante de LFA, *CD300lg*, um ligante de CD11b e proteína de complemento *C1qc* (Figura 7d, g e h). As diferenças no intestino delgado foram menos extremas, embora as FRCs de I-mLN exibissem novamente uma assinatura gênica associada à estimulação de leucócitos, principalmente níveis mais altos de *Cxcl5*, uma quimiocina que recruta as células imunes inatas que expressam CXCR2 (Figura 7d, g e h).

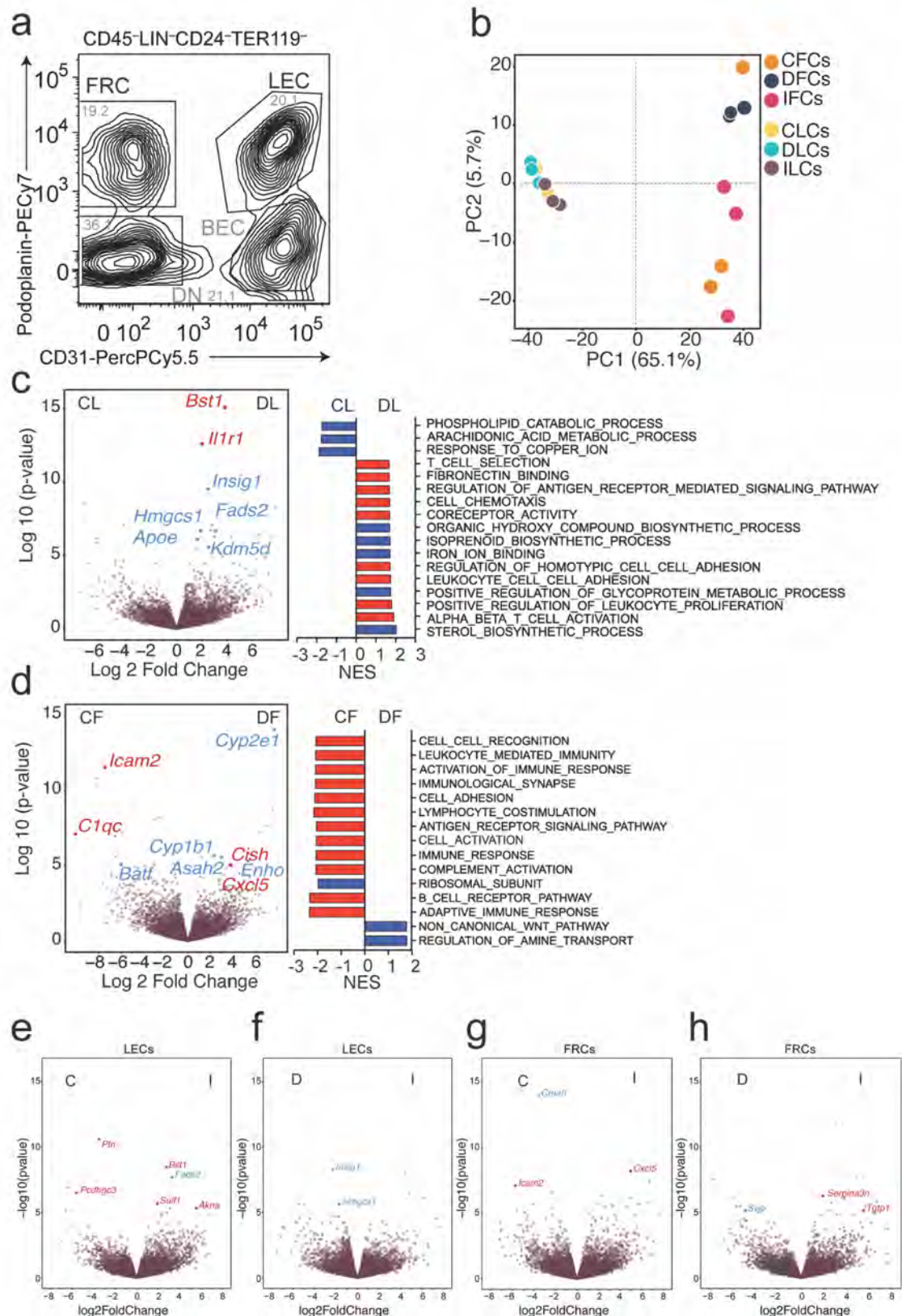


Figura 7: Perfil gênico de células estromais nos diferentes mLNs. (a) Plots representativos mostrando a estratégia de *gate* para o *sorting* de células estromais

edoteliais linfáticas (LECs) e as células reticulares fibroblásticas (FRCs) utilizadas nas análises de RNA-seq. (b) Análise de coordenadas principais (PCA) de RNA-seq de FRCs e LECs isoladas de mLNs duodenais (D), ileais (I) ou ceco-cônicos (C) de camundongos C57BL/6 SPF. *Vulcano plots* representando genes diferencialmente expressos (acima) e gráfico de barras mostrando algumas vias diferencialmente reguladas (abaixo) entre (c) LECs e (d) FRCs dos D-mLN ou C-mLN identificados por RNA-seq. Pontos e barras azuis indicam genes e vias metabólicas, pontos e barras vermelhos mostram genes e vias relacionados à imunidade. *Vulcano plots* representando genes diferencialmente expressos entre (e, f) LECs e (g, h) FRCs isoladas dos I-mLN versus C-mLN ou dos I-mLN versus D-mLN. D = duodeno, I = íleo, C = ceco-colônico mLN. DL = D-mLN LECs; CL = C-mLN LECs; DF = D-mLN FRCs; CF = C-mLN FRCs.

Como foi mostrado previamente que as células estromais influenciam a função das células apresentadoras de antígeno nos mLNs (Pezoldt et al., 2018), nós investigamos se a drenagem linfática específica dos segmentos e microambientes intestinais influencia os perfis de expressão gênica das DCs migratórias, que são conhecidas por iniciar respostas imunes teciduais específicas (Durai & Murphy, 2016). As duas populações de DCs migratórias MHCII^{hi}, CD103⁺CD11b⁻ e CD103⁺CD11b⁺, são altamente representadas nos mLNs e demonstraram suportar respostas tolerogênicas e pró-inflamatórias, respectivamente (Durai & Murphy, 2016; D. Esterhazy et al., 2016). Estes dois subtipos de DCs foram também isoladas do D-mLN, I-mLN e C-mLN de camundongos C57BL/6 SPF (Figura 8a), seguido de RNA-seq. A análise de coordenadas principais (PCA) mostrou que as DCs segregam claramente entre intestino delgado e grosso, e menos entre D-mLN e I-mLN, sendo estes efeitos mais pronunciados entre as DCs CD103⁺CD11b⁺ do que as CD103⁺CD11b⁻ (Figura 8b). O impacto mais forte do microambiente sobre as DCs CD103⁺CD11b⁺ também foi evidente na expressão gênica diferencial e na análise de enriquecimento de genes de vias celulares, embora ambos os subgrupos de DCs migratórias exibissem diferenças imunológicas e metabólicas pela localização em que se encontram nos mLNs (Figura 8b - h).

Interessantemente, ambas as populações de DCs do D-mLN apresentaram uma assinatura menos pró-inflamatória do que suas contrapartes colônicas, isto é: DCs CD103⁺CD11b⁺ do D-mLN expressaram níveis mais baixos de receptores de citocinas inflamatórias e vias tais como interferon ou IL-1 β (Figura 8c); e as DCs CD103⁺CD11b⁻ do D-mLN foram especificamente enriquecidas para *Ccl22*, codificando uma quimiocina associada à migração de Tregs (Gobert et al., 2009), e o fator promotor de Treg *Aldh1a2*, uma enzima limitante da taxa de produção de ácido retinóico (RA) a partir do retinol dietético (Houston et al., 2016; Mucida et al., 2007) (Figura 8d). Um ensaio de atividade enzimática confirmou que a capacidade das DCs de produzir RA foi maior nos mLNs que drenam o intestino delgado do que o intestino grosso, e preservada em DCs CD103⁺CD11b⁻ de camundongos GF (Figura 8i e j), embora a proporção de DCs tolerantes CD103⁺CD11b⁻ para DC classicamente mais pró-inflamatórias CD103⁺CD11b⁺ (D. Esterhazy et al., 2016; Fonseca et al., 2015) foi invertido em todos os mLNs analisados na ausência de uma microbiota (Figura 8k).

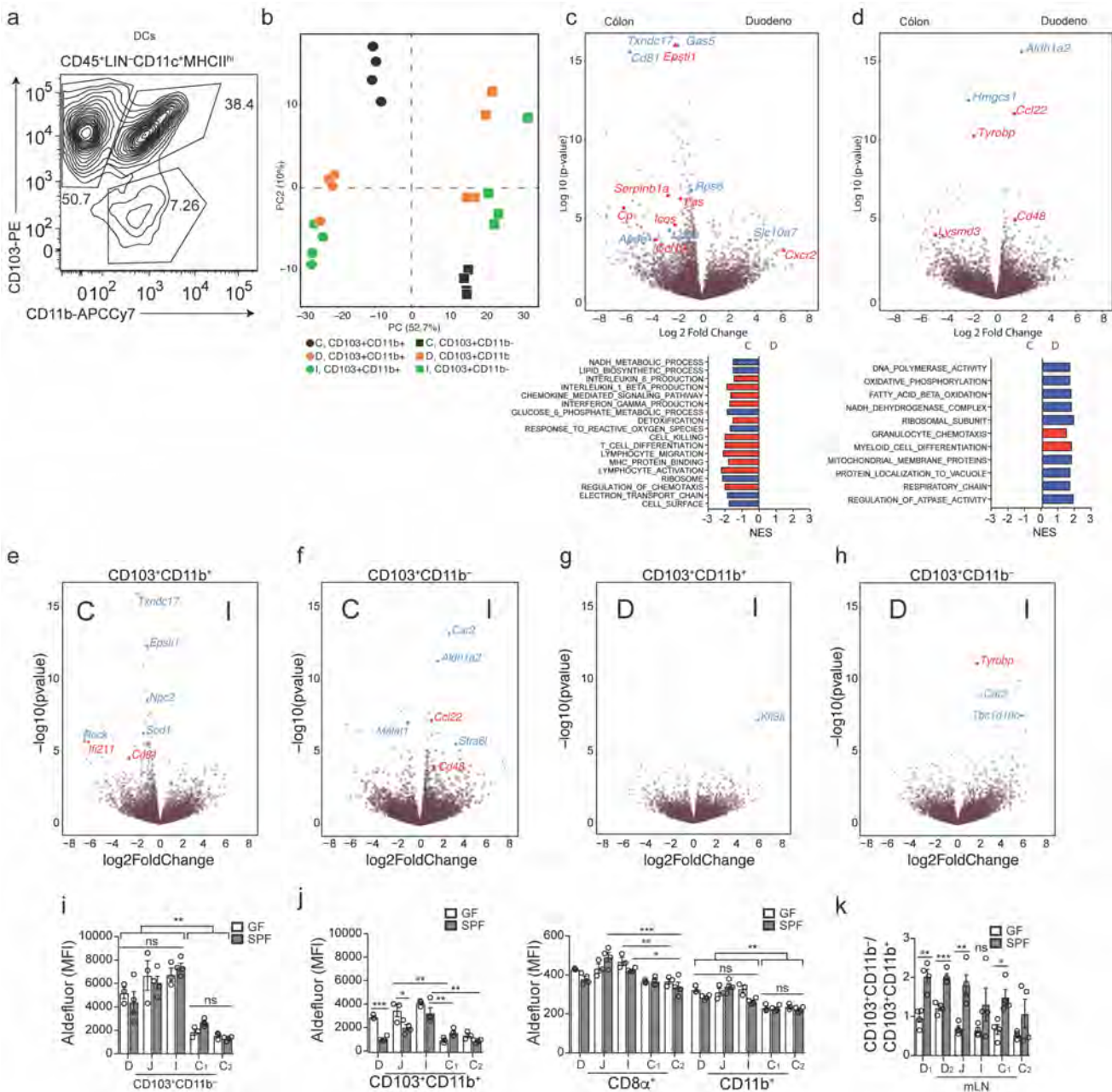


Figura 8: As propriedades das DCs diferem ao longo da cadeia de mLNs. (a) Plots representativos mostrando a estratégia de *gate* para o *sorting* de DCs utilizadas nas análises de RNA-seq. (b) Análise de coordenadas principais (PCA) de RNA-seq de DCs CD103⁺ CD11b⁺ e CD103⁺ CD11b⁻ isoladas de mLNs duodenais (D), ileais (I) ou ceco-cônicos (C) de camundongos C57BL/6 SPF. *Vulcano plots* representando genes diferencialmente expressos (acima) e gráfico de barras mostrando algumas vias diferencialmente reguladas (abaixo) entre DCs (c) CD103⁺ CD11b⁺ e (d) CD103⁺ CD11b⁻ dos D-mLN ou C-mLN identificados por RNA-seq. Pontos e barras azuis indicam genes e vias metabólicas, pontos e barras vermelhas

mostram genes e vias relacionados à imunidade. *Vulcano plots* representando genes diferencialmente expressos entre DCs CD103⁺ CD11b⁺ e CD103⁺ CD11b⁻ isoladas dos (e, f) I-mLN versus C-mLN ou dos (g, h) I-mLN versus D-mLN. Pontos e barras azuis indicam genes e vias metabólicas, pontos e barras vermelhos mostram genes e vias relacionados à imunidade. Intensidade de fluorescência média (MFI) do *fluorescein isothiocyanate–positive boron-dipyrromethene–tagged aminoacetate*, o produto de ALDH do *boron-dipyrromethene–tagged aminoacetaldehyde* (substrato de ALDH não tóxico) (Aldefluor) em DCs (i) CD103⁺ CD11b⁻ and (j) CD103⁺ CD11b⁺ CD8 α ⁺ ou CD11b⁺ isoladas dos mLNs indicados de camundongos C57BL/6 SPF e GF, avaliados por citometria de fluxo 30 min após a adição de substrato. (k) Proporção de DCs CD103⁺ CD11b⁺ e CD103⁺ CD11b⁻ nos mLNs indicados de camundongos SPF e GF determinados por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 3-4 camundongos por grupo. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.3 Indução de células Treg acontece preferencialmente nos mLNs proximais

Como as DCs migratórias desempenham um papel fundamental na diferenciação e ativação das células imunes adaptativas, o próximo passo foi investigar se a polarização de células T CD4⁺ após ativadas também diferiam entre os mLNs e correlacionariam com os perfis de DCs migratórias ou com a presença da microbiota. Embora camundongos GF possuam quantidades reduzidas de células Treg (avaliadas pela coloração de Foxp3) nos intestinos delgado e grosso (Atarashi et al., 2011; K. S. Kim et al., 2016), não houve diferença na frequência de células Treg entre os mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF ao longo do intestino (Figura 9a-c). As células efectoras Th17 e suas correspondentes células supressoras ROR γ t⁺ pTreg podem ser induzidas pela microbiota (Honda & Littman, 2016; Xu et al., 2018; Yang et al., 2014) e, de fato, os camundongos GF apresentaram uma significativa redução nas células ROR γ t⁺ pTreg em todos os mLNs testados (Figura 9d), embora não tenha sido observado uma diminuição significativa nas células ROR γ t⁺ (Th17) (Figura 9e).

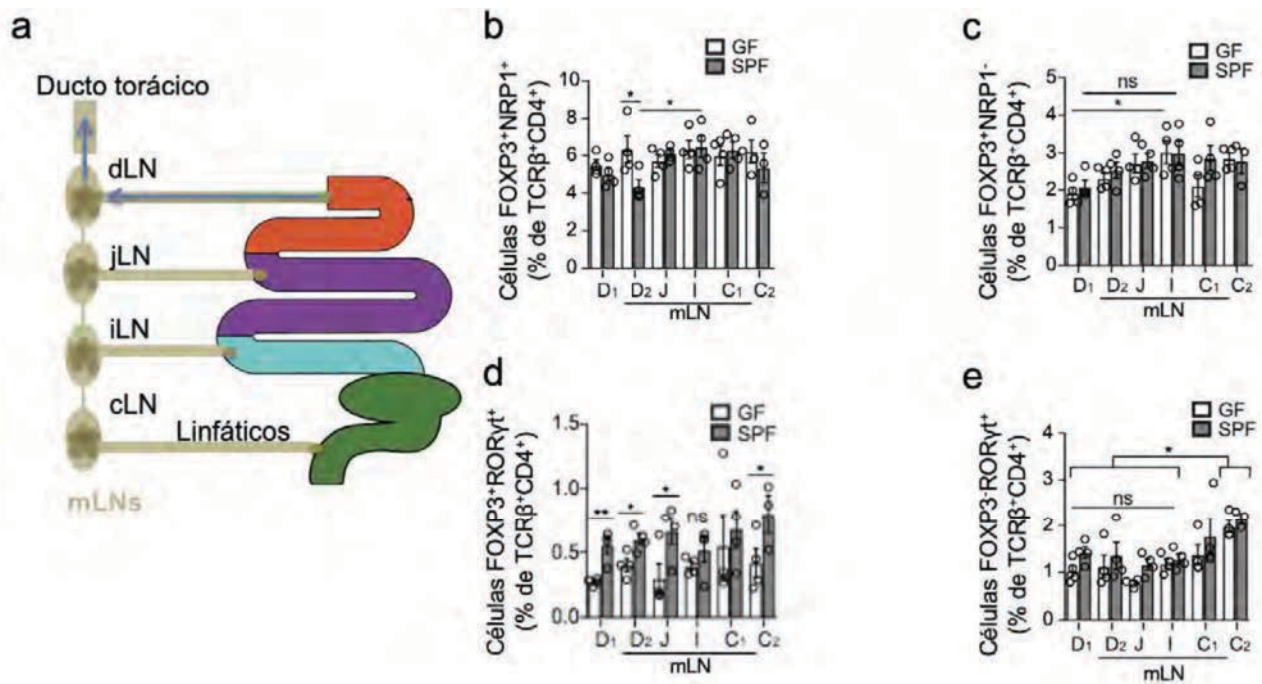


Figura 9: Análise de células Treg nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino. (b) Frequência de células Foxp3⁺ NRP1⁺ e (c) Foxp3⁺ NRP1⁻ entre as células TCRβ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF. (d) Frequência de células Foxp3⁺ Rorγt⁺ e (e) Foxp3⁺ Rorγt⁻ entre as células TCRβ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF.

Para investigar diretamente se a polarização inicial das células T CD4⁺ ocorre de maneira compartimentalizada nos diferentes mLNs, nós transferimos células T CD4⁺ *naive* específicas para Ovalbumina (OVA) (células CD45.1 OT-II) para camundongos C57BL/6 CD45.2 e analisamos sua ativação e polarização 48 h após a exposição a OVA por gavagem (Figura 10a e b) (D. Esterhazy et al., 2016). As células OT-II proliferaram e foram ativadas em todos os mLNs, menos no caudal e no íliaco (Figura 10c), que foram, portanto, excluídos das análises subsequentes. Foi observado que em camundongos GF apenas os D-mLNs retinham células OT-II de maneira igual aos camundongos SPF, enquanto as frequências de OT-II foram muito menores em J-mLNs e I-mLNs e quase indetectáveis nos C-LNs (Figura 10d). De acordo com esses dados, vimos uma absorção diminuída de OVA na parte mais distal do intestino e seus mLNs drenantes em camundongos GF versus C57BL/6 SPF (Figura 10e e f), o que espelha a estrutura linfática alterada em camundongos GF (Figura 4). Estes dados sugerem que um gradiente de disponibilidade de antígenos dita as frequências de células OT-II nos mLNs, uma possibilidade favorecida por frequências semelhantes de OT-II encontradas entre os mLNs na ausência de antígeno (Figura 10g). Entre as células OT-II retidas, observamos um gradiente de indução de pTreg que declinou de maneira proximal a distal (Figura 11a e b). Em camundongos GF, a indução de pTreg foi diminuída em todos os mLNs (Figura 11a e b), mas não devido à falta de ativação em si (Figura 11c), sugerindo que a composição de DCs menos favorável nos mLNs de camundongos GF contribuiu para esse efeito.

Em suporte ao papel de um microambiente local favorável à indução de determinada resposta imune, as células OT-II Th ROR γ t⁺ e OT-II pTreg ROR γ t⁺ exibiram um gradiente ascendente proximal a distal que era independente da microbiota (Figura 11d e e), e correlacionado com um aumento na frequência de IL12/23p40⁺ entre as DCs tolerogênicas (Figura 11f). Da mesma maneira, a injeção de solução contendo OVA direto no lúmen do íleo provocou uma diferenciação celular mais pronunciada de OT-II Th ROR γ t⁺ e OT-II pTreg ROR γ t⁺ do que a administração intra-duodenal de OVA nos respectivos D-mLNs de drenagem, padrão de resposta que foi reforçado pela adição da toxina da cólera (CT) à solução de OVA (Figura 12a-c).

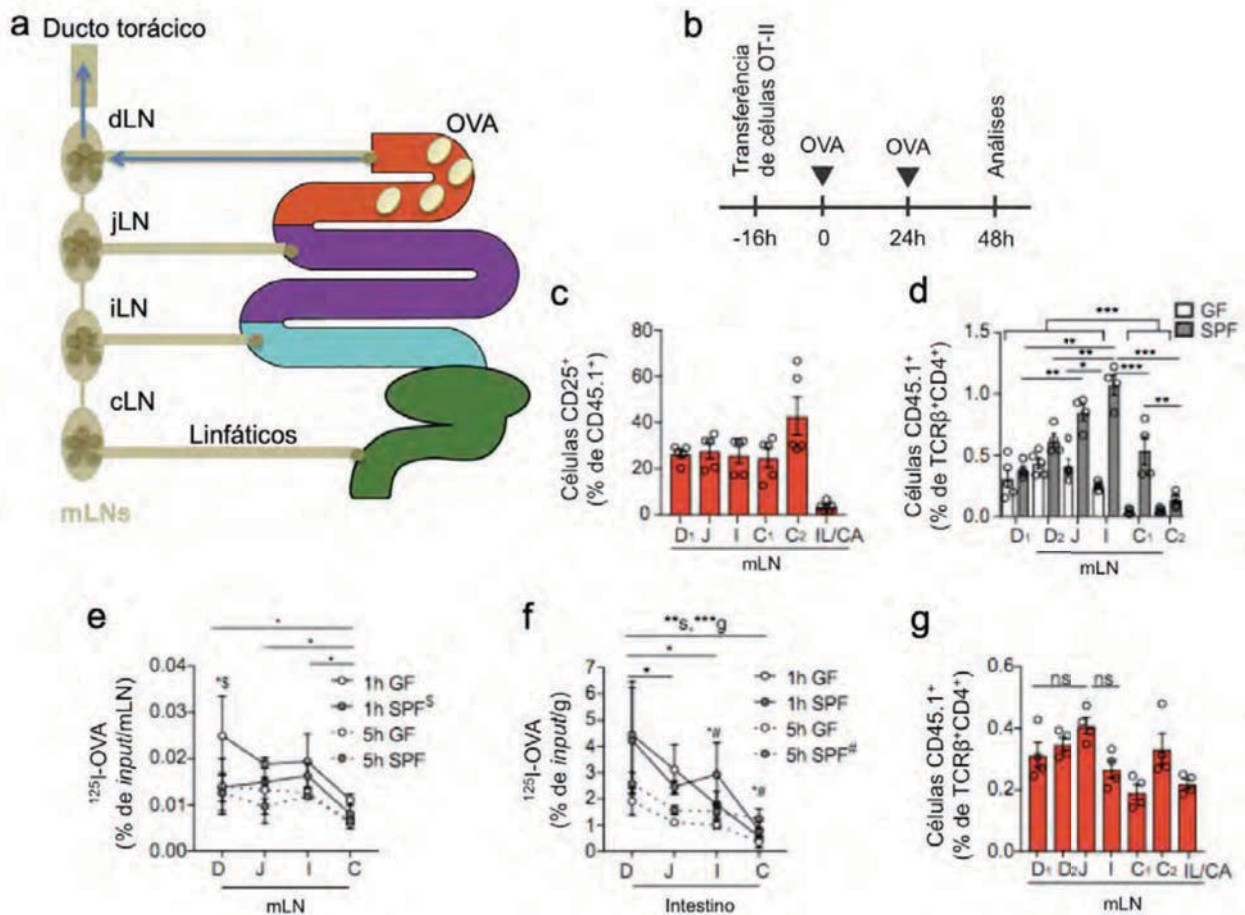


Figura 10: Ativação de células OT-II CD45.1 no mLNs após gavagem com OVA.

(a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino. (b) Esquema do protocolo usado para avaliação de células OT-II. (c) Frequência de células CD25⁺ totais entre células CD45.1⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF. (d) Frequência de células CD45.1⁺ entre células TCRβ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF. (e) Níveis recuperados de ¹²⁵I-OVA nos mLNs e (f) intestino de camundongos C57BL/6 SPF e GF 1h e 5h após gavagem com 4 x 10⁶ CPM de ¹²⁵I-OVA em 50 mg de OVA. (g) Frequência de células CD45.1⁺ entre células TCRβ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF na ausência de gavagem por OVA. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4 camundongos por grupo. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001. g se refere a GF e s se refere SPF, \$ se refere ao tempo de 1h e # a 5h.

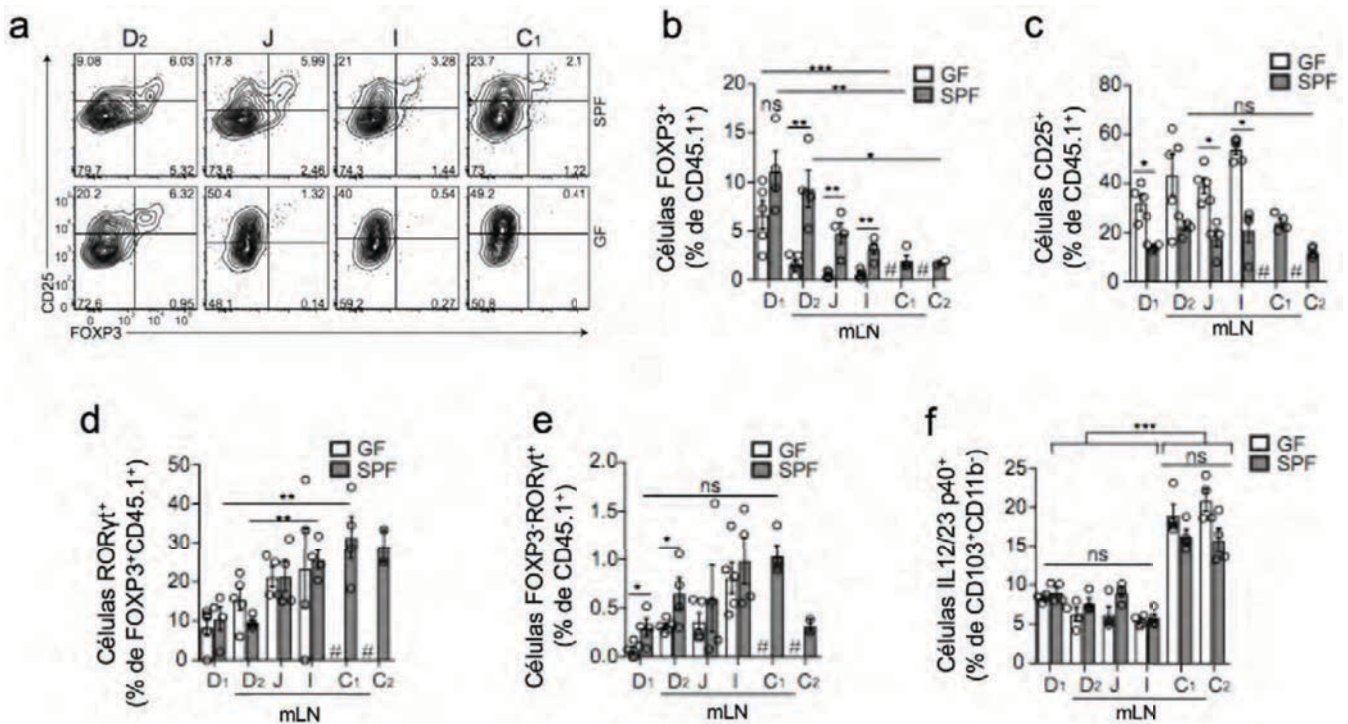


Figura 11: Polarização de células T CD4⁺ por antígenos da dieta diferem ao longo da cadeia de mLNs. (a) Plots de citometria de fluxo representativos da frequência de células Tregs (Foxp3⁺) e células ativadas (CD25⁺) e (b) frequência de células Foxp3⁺ totais entre células OT-II CD45.1⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF. (c) Frequência de células CD25⁺ totais entre células OT-II CD45.1⁺, (d) frequência de células Rorγt⁺ entre Foxp3⁺ CD45.1⁺ e (e) frequência de células Rorγt⁺ entre células OT-II CD45.1⁺ nos mLNs 64h após transferência de 1 x 10⁶ células OT-II CD45.1⁺ *naives* em camundongos hospedeiros C57BL/6 SPF e GF CD45.2 e após 48 h e 24 h de gavagem de OVA antes da análise. (f) Frequência de células IL12/23 p40⁺ entre DCs CD103⁺ CD11b⁻ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF e GF. # indica que menos de 200 células foram recuperadas. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-5 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

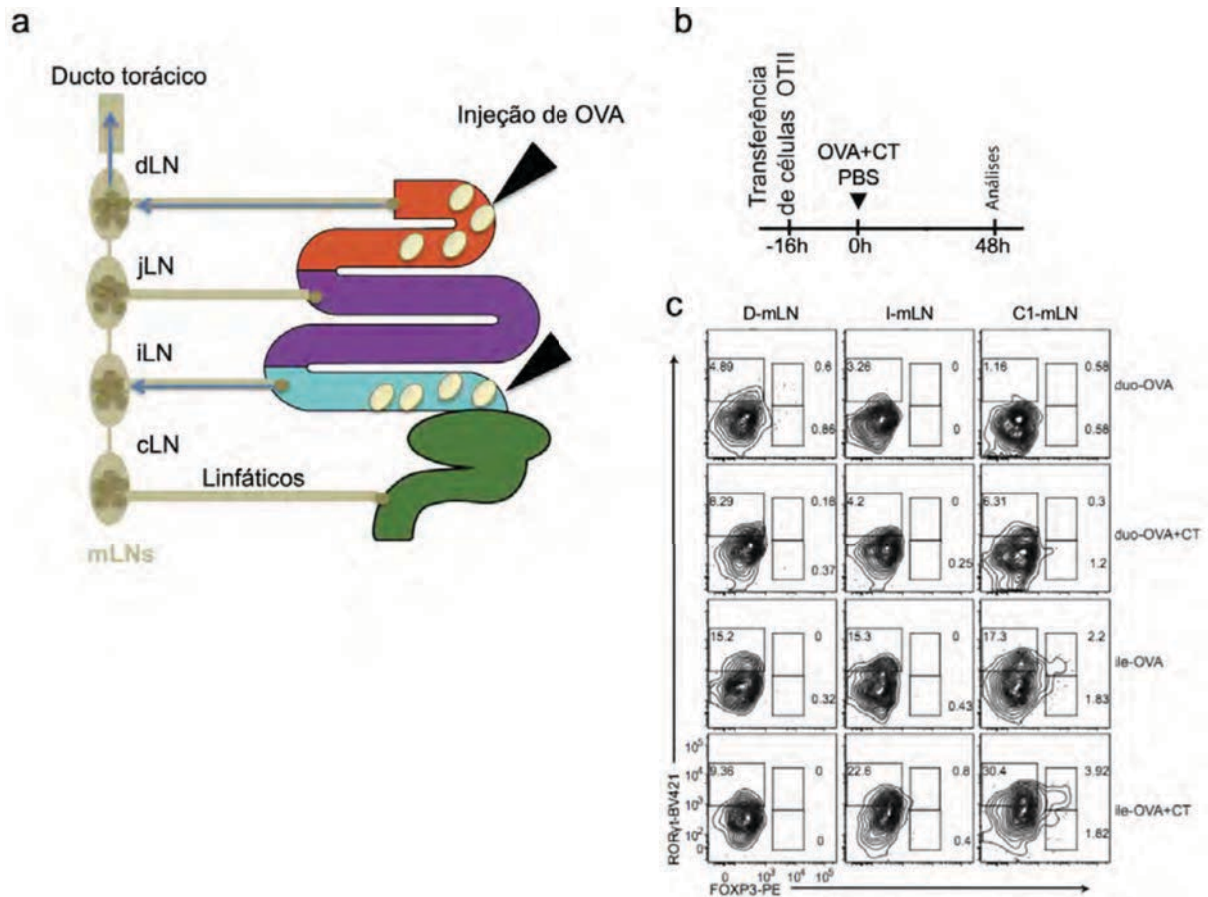


Figura 12: Polarização de células T CD4⁺ nos mLNs por antígenos da dieta injetados diretamente no lúmen do duodeno ou íleo. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino. (b) Esquema do protocolo usado para avaliação de células OT-II. (c) Plots de citometria de fluxo representativos da frequência de células expressando Foxp3⁺ e Rorγt⁺ entre células OT-II CD45.1⁺ nos mLNs 48h após injeção de OVA ou OVA + CT, realizado 16h após transferência de 1×10^6 células OT-II CD45.1⁺ *naïves* em camundongos hospedeiros C57BL/6 SPF CD45.2. D = duodeno, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-5 camundongos por grupo.

4.1.4 Indução de células Th17 acontece preferencialmente nos mLNs distais

Para caracterizar ainda mais a compartimentalização das respostas imunes adaptativas no intestino distal em um ambiente fisiológico, nós analisamos as respostas das células T às Bactérias Segmentadas Filamentosas (SFB), patobiontes que induzem uma forte resposta Th17 e colonizam preferencialmente o íleo e o cólon (Atarashi et al., 2015; Ivanov et al., 2009; Sano et al., 2015). A monocolonização de camundongos GF com SFB levou ao enriquecimento de células T CD4⁺ ROR γ t⁺ nos I-mLN e C-mLN 8 dias após a monocolonização (Figura 13a e b). Para monitorar as respostas às SFB no contexto de uma microbiota completa, células T CD4⁺ específicas para SFB (células transgênicas 7B8tg) (Yang et al., 2014) foram transferidas para camundongos colonizados com SFB 7 dias antes e a polarização dessas células foi analisada 60 h depois da sua transferência. Foi possível recuperar números significativos de células transferidas apenas nos I-mLN e C-mLN, as quais se tornaram ROR γ t⁺ (Figura 13c e d).

Como a polarização de Th17 estava concentrada nos LNs drenando os segmentos distais do intestino, avaliamos se a remoção cirúrgica dos I-mLN e C-mLN anularia as respostas de Th17 específicas às SFB. Foi observado que a remoção dos mLNs distais levou à indução ectópica de células transgênicas 7B8tg em Th17 ROR γ t⁺ nos LNs proximais (D-mLN e J-mLN) e no cólon ascendente mLN (Figura 13c e d). Essa perda de resposta compartimentalizada às SFB também foi refletida no tecido intestinal, uma vez que em camundongos que tiveram os LNs distais removidos foram encontradas células Th17 específicas para SFB no duodeno e jejuno, enquanto elas foram confinadas ao íleo e cólon em camundongos controles sham operados (Figura 13e e f). Essa alteração na resposta de células T nos mLNs e intestino não aconteceu devido ao redirecionamento da linfa (Figura 13h) nem da expansão de SFB no intestino, avaliado por qPCR específico para SFB (Figura 13g).

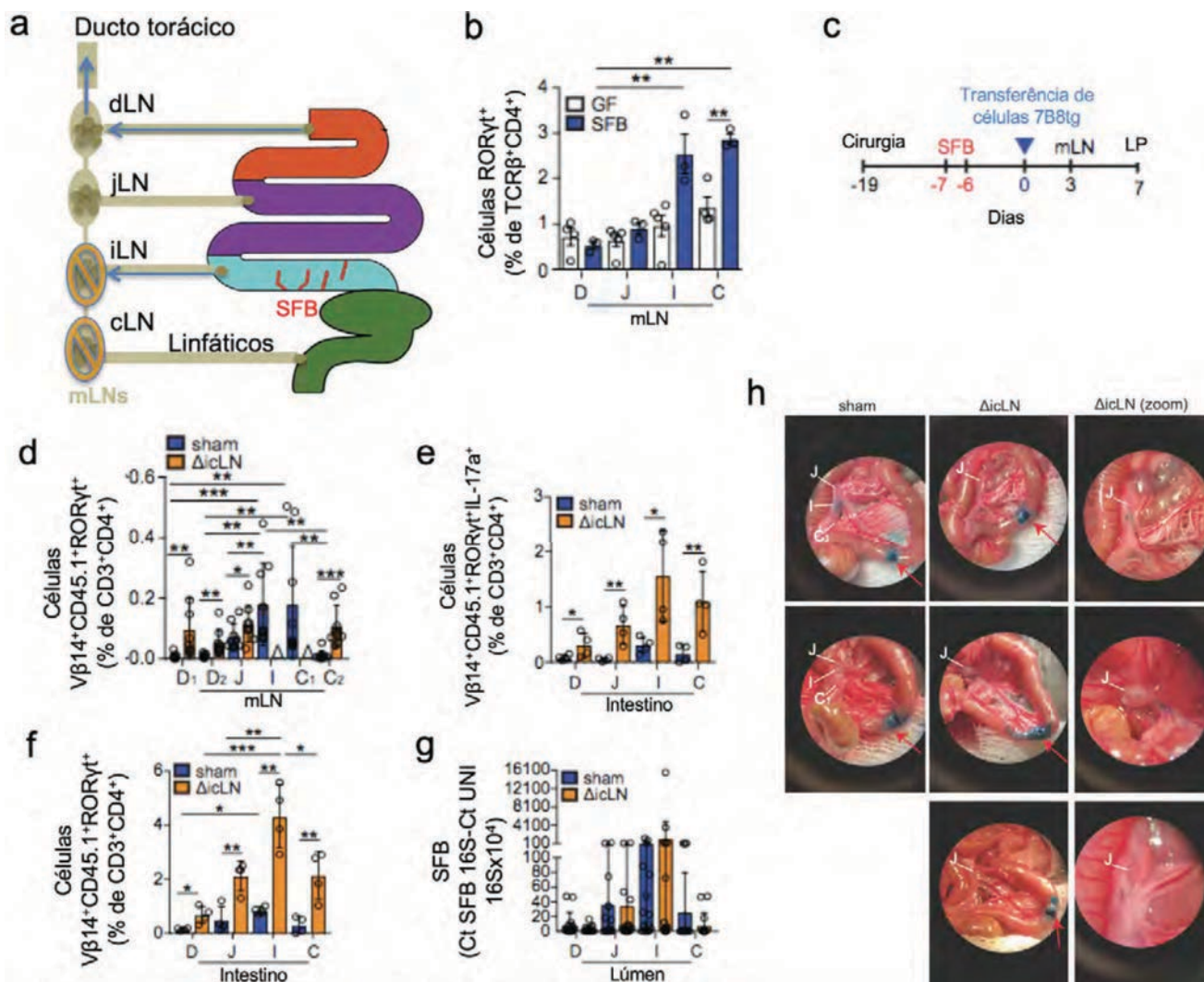


Figura 13: Polarização de células T CD4⁺ por antígenos da microbiota diferiram ao longo da cadeia de mLNs. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino, a localização de SFB no lúmen intestinal e os mLNs (I-mLN e C1-mLN) removidos cirurgicamente. (b) Frequência de células ROR γ t⁺ entre células TCR β ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos GF monocolonizados ou não com SFB 8 dias antes das análises. (c) Esquema do protocolo experimental usado em d. (d) Frequência de células V β 14⁺ CD45⁺ ROR γ t⁺ entre células CD3⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF operados *sham* e camundongos operados que tiveram os I-mLN e C1-mLN removidos (Δ iLN). (e) Frequência de células V β 14⁺ CD45⁺ ROR γ t⁺ IL-17⁺ e (f) células V β 14⁺ CD45⁺ ROR γ t⁺ entre células CD3⁺ CD4⁺ nos segmentos do intestino de camundongos *sham* e Δ iLN 7 dias após a transferência de 5000 células CD45.1⁺ 7B8tg *naïves* em camundongos C57BL/6 SPF colonizados com SFB. (g) Quantificação relativa de 16S de SFB no conteúdo

do luminal de camundongos C57BL/6 SPF *sham* e $\Delta icLN$ colonizados com SFB. (h) Figuras do rastreamento de *Fast Green* da drenagem linfática ileal para os mLNs de camundongos C57BL/6 SPF *sham* e $\Delta icLN$ 3 semanas após a cirurgia. Setas vermelhas indicam local da injeção de *Fast Green*. LP = *lamina própria*. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados são representativos de dois a quatro experimentos independentes com 4-12 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.1.5 Consequências da compartimentalização da resposta imune gerada nos diferentes mLNs

Nosso próximo passo foi investigar as possíveis consequências da segregação anatômica da polarização de células T ao longo do intestino. Primeiramente, sabendo que mesmo em resposta ao mesmo antígeno a injeção de CT + OVA no íleo gerou preferencialmente células Th17 ROR γ t⁺ e pTreg ROR γ t⁺ nos mLNs distais (Figura 12c), nós exploramos a resposta reforçada por CT no íleo para vacinar contra patógenos que compartilham o mesmo antígeno. Para isso, células OT-II CD45.1 foram transferidas para camundongos C57BL/6 SPF e, um dia depois, CT + OVA foi injetado diretamente no lúmen do íleo ou duodeno dos camundongos, sendo seus controles (*sham*) injetados apenas com PBS. Os camundongos foram infectados com *Salmonella enterica* Typhimurium expressando OVA (Stm-OVA) 9 dias após a injeção de CT + OVA ou PBS, e comparados entre si quanto à sua susceptibilidade à infecção entérica. Camundongos previamente injetados com CT + OVA no íleo, mas não aqueles injetados no duodeno, apresentaram uma perda de peso tardia em comparação com camundongos sham controles (Figura 14a - c), o que se correlacionou com uma invasão reduzida de Stm-OVA no baço destes camundongos, maior taxa de sobrevivência e com uma frequência aumentada de ROR γ t⁺ pTreg, bem como células Th17 na lâmina própria (Figura 14d - h).

Nós também testamos se uma infecção anatomicamente segregada por *Citrobacter rodentium*, restrita ao ceco e cólon, poderia perturbar a indução de pTreg específicas para antígenos da dieta. Foi observado que a indução de células pTreg específicas para OVA no D-mLN após a administração oral de OVA não foi afetada pela infecção por *Citrobacter* que expressa OVA, o que resultou na ativação de células T CD4⁺ específicas para OVA no C-mLN (Figura 15a - d).

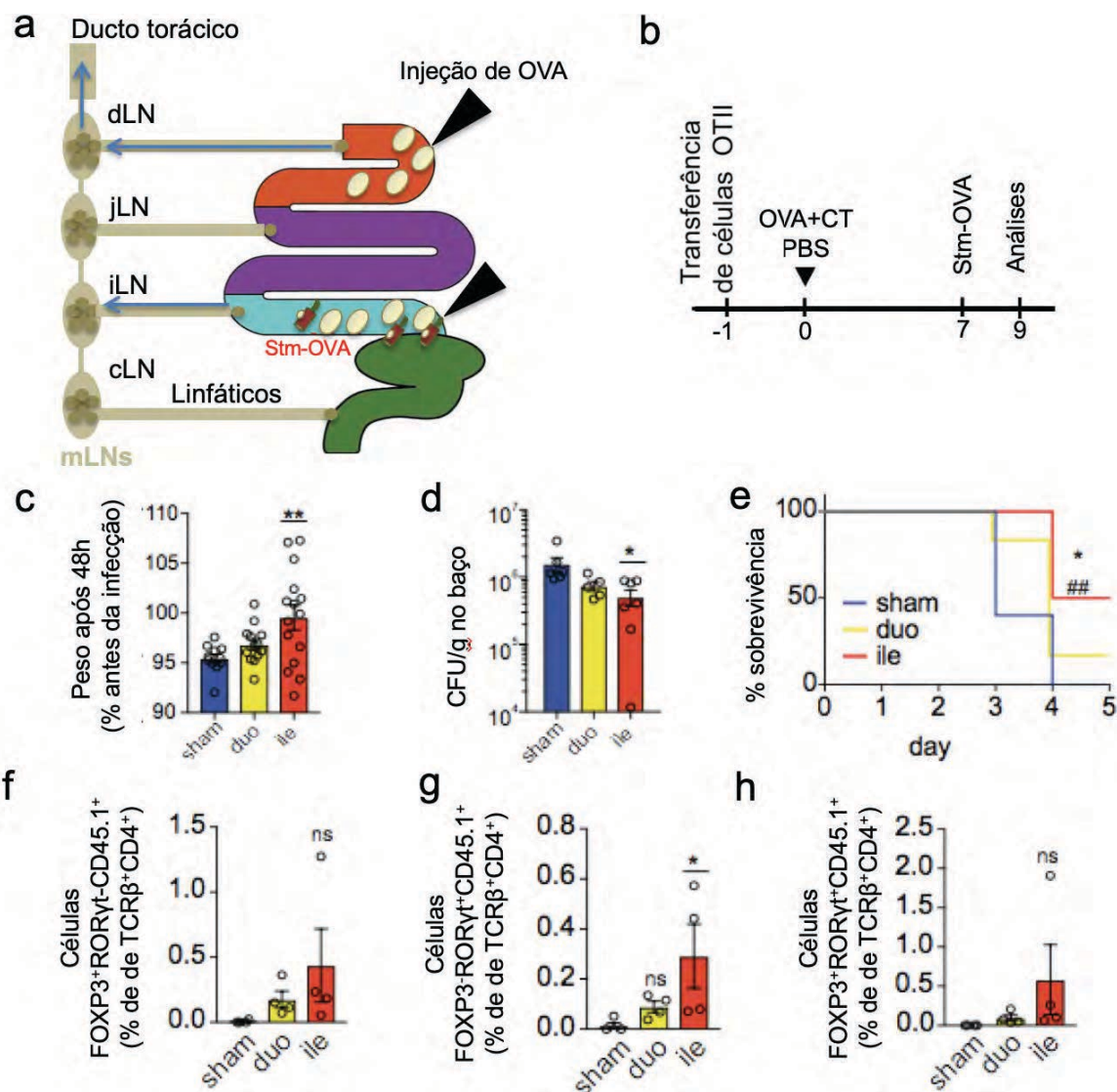


Figura 14: Susceptibilidade à infecção entérica (*Salmonella enterica* Typhimurium) varia de acordo com o local da resposta imune gerada ao antígeno. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino, a localização de *Salmonella enterica* Typhimurium expressando OVA (Stm-OVA) e das injeções de OVA no lúmen intestinal. (b) Esquema do protocolo experimental usado em c-h. (c) Porcentagem de peso de camundongos C57BL/6 SPF relativo ao peso antes da infecção por Stm-OVA e (d) disseminação de Stm-OVA no baço de camundongos C57BL/6 SPF 9 dias após injeção no duodeno ou íleo de OVA + CT versus camundongos sham injetados com PBS e 10 dias após transferência de 1×10^5 células OT-II CD45.1 naive. (e) Curva de sobrevivência e (f) frequência de células Foxp3⁺ Rorγt⁺ CD45⁺, (g) Foxp3⁻ Rorγt⁺ CD45⁺ e (h) Foxp3⁺

Ror γ t⁺ CD45⁺ entre células TCR β ⁺ CD4⁺ da *lamina pr3pia* do 3leo de camundongos C57BL/6 SPF *sham* ou injetados com OVA + CT no duodeno ou 3leo e infectados com Stm-OVA. An3lises foram feitas 48h ap3s infec33o. D = duodeno, J = jejuno, I = 3leo, C = ceco-col3nico mLN. Duo = duodeno, Ile = 3leo. Os resultados s3o representativos de dois experimentos independentes com 4-7 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como m3dia \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ** $P < 0,01$.

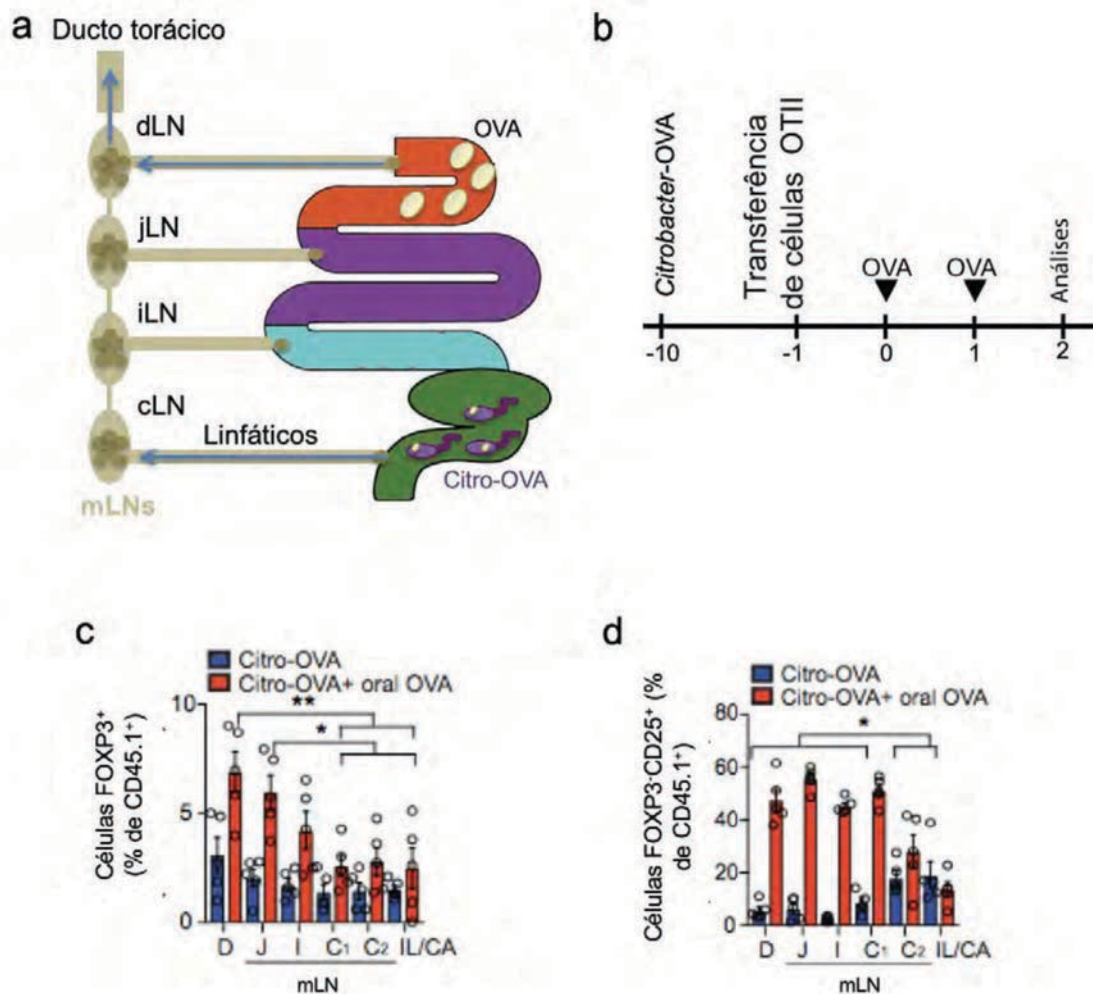


Figura 15: Susceptibilidade à infecção entérica (*Citrobacter rodentium*) varia de acordo com o local da resposta imune gerada ao antígeno. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino e localização de *Citrobacter rodentium* expressando OVA (Citro-OVA) no lúmen intestinal. (b) Esquema do protocolo experimental usado em c-d. (c) Frequência de células Foxp3⁺ e (d) Foxp3⁻ CD25⁺ entre as CD45.1⁺ nos mLNs 64h após transferência de 1×10^6 células OT-II CD45.1⁺ naive em camundongos C57BL/6 SPF CD45.2 hospedeiros infectados ou não com Citrobacter-OVA 9 dias antes, e gavados com OVA 48h e 24h antes da análise. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-7 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.1.6 Infecção duodenal leva a um conflito imunológico compartimentalizado no D-mLN e ao comprometimento da tolerância oral

Os mLNs são cruciais tanto para mecanismos de resistência a patógenos quanto para tolerância oral (Balmer et al., 2014; Cording et al., 2014; Hadis et al., 2011). Infecções gastrointestinais virais e bacterianas são capazes de perturbar a geração de células pTreg específicas para antígenos da dieta e subsequentemente a tolerância oral (Bouziat et al., 2017; Fonseca et al., 2015). Entretanto, como essas infecções são disseminadas ao longo do intestino, não está claro se os efeitos estão ligados a uma região intestinal específica e aos mLNs associados a esta região. Nós avaliamos se os mLNs proximais sozinhos são necessários ou suficientes para suportar a tolerância oral por meio de remoção cirúrgica seletiva dos D-mLNs ou do I-mLN e C-mLN, e em seguida submetemos os camundongos a um modelo de supressão de asma mediada por antígeno oral (esquema Figura 16a e b) (D. Esterhazy et al., 2016). Foi observado que a tolerância oral estava intacta quando removemos especificamente os LNs proximais (D-mLNs) ou quando removemos especificamente LNs os distais (I-mLN e C-mLN) (Figura 16c - h), provavelmente porque a tolerância oral é um mecanismo muito robusto no qual, na ausência de infecção, as células pTreg geradas nos mLNs remanescentes são suficientes (D. Esterhazy et al., 2016).

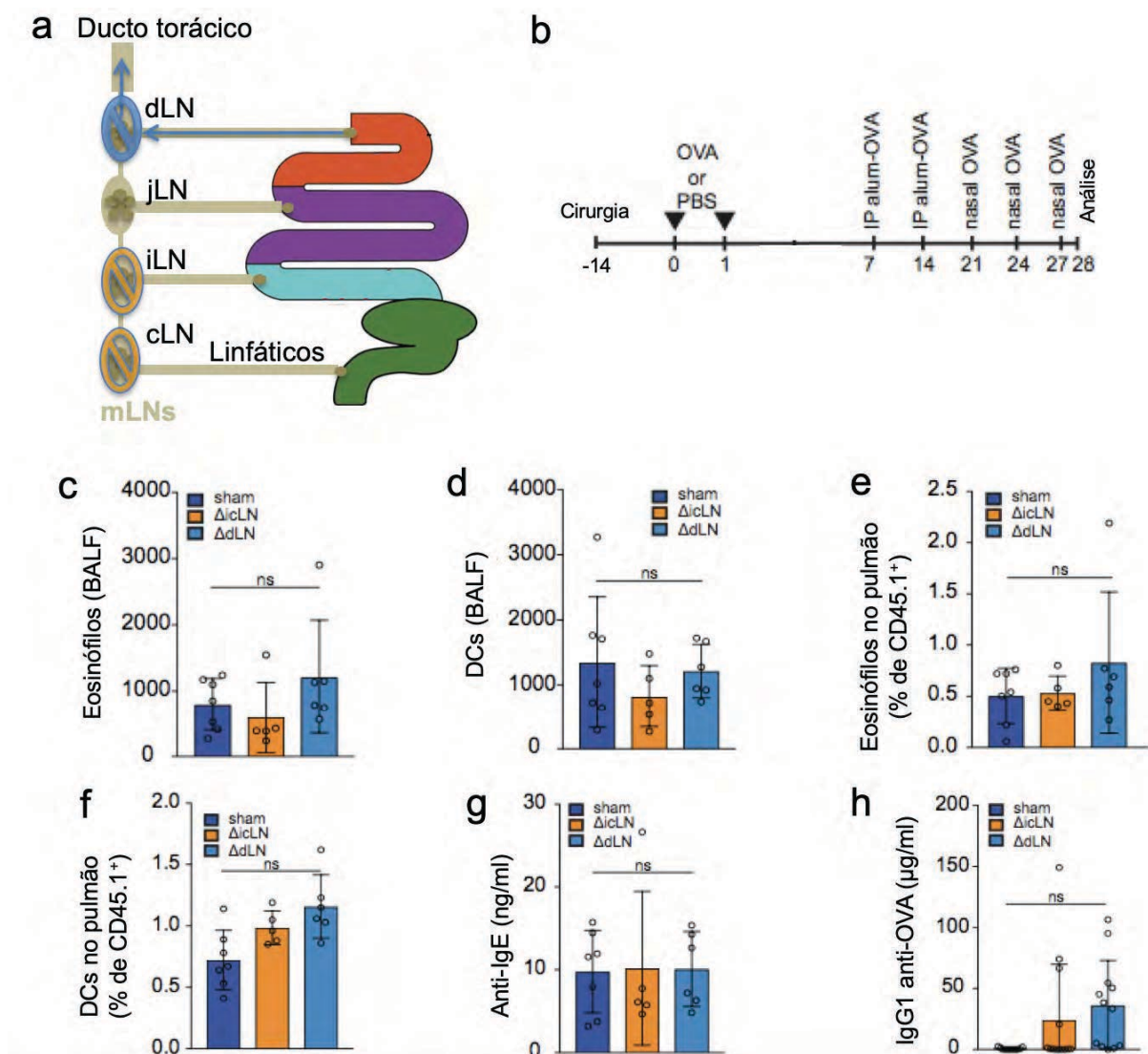


Figura 16: Tolerância oral após remoção seletiva do mLN duodenal ou distal.

(a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino e os mLNs (D-mLNs ou I-mLN e C1-mLN) removidos cirurgicamente. (b) Esquema do protocolo experimental utilizado. Número total de (c) eosinófilos, (d) DCs no BALF (fluido de lavagem broncoalveolar), frequência de (e) eosinófilos, (f) DCs entre células CD45⁺ no pulmão e níveis de (g) IgE total e (h) IgG1 anti-OVA no soro de camundongos C57BL/6 SPF submetidos a tolerância oral 14 dias após a cirurgia *sham*, remoção de I-mLN e C1-mLN (Δ icLN) ou remoção do D-mLN (Δ dLN). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-7 camundongos por grupo. Não significativo (ns).

Para induzir um conflito imunológico somente nos mLNs que drenam a parte proximal do intestino, escolhemos o helminto *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) como um modelo de roedor para infecção em humanos por *Strongyloides*, que exibe tropismo especificamente para o duodeno. As larvas de S.v. infectam através da pele e o pico de carga parasitária intestinal de adultos acontece nos dias 6-8 após a infecção (p.i. - *post infection*), sendo eliminados 10-12 dias p.i. (Mukai, Karasuyama, Kabashima, Kubo, & Galli, 2017). Nós observamos que nos camundongos infectados com S.v. apenas os D-mLNs aumentaram de tamanho, sofreram reestruturação anatômica significativa e apresentaram contagem aumentada do número de células imunes quando comparados com os mLNs de camundongos não infectados (NI) (Figura 17a - d). Resultados que estão de acordo com a carga parasitária compartimentalizada apenas ao duodeno (Figura 17e). Nós também observamos um influxo seletivo de DCs CD11b⁺ nos D-mLNs, previamente ligado à indução de respostas Th2 (Tussiwand et al., 2015), e uma redução dos subtipos de DCs tolerogênicas CD103⁺CD11b⁻ e CD8 α ⁺ (Figura 17f, g e h), bem como uma assinatura de imunidade do tipo 2 compreendendo eosinófilos, células Th2 GATA3⁺ e células Treg GATA3⁺ (Figura 17i, j e k).

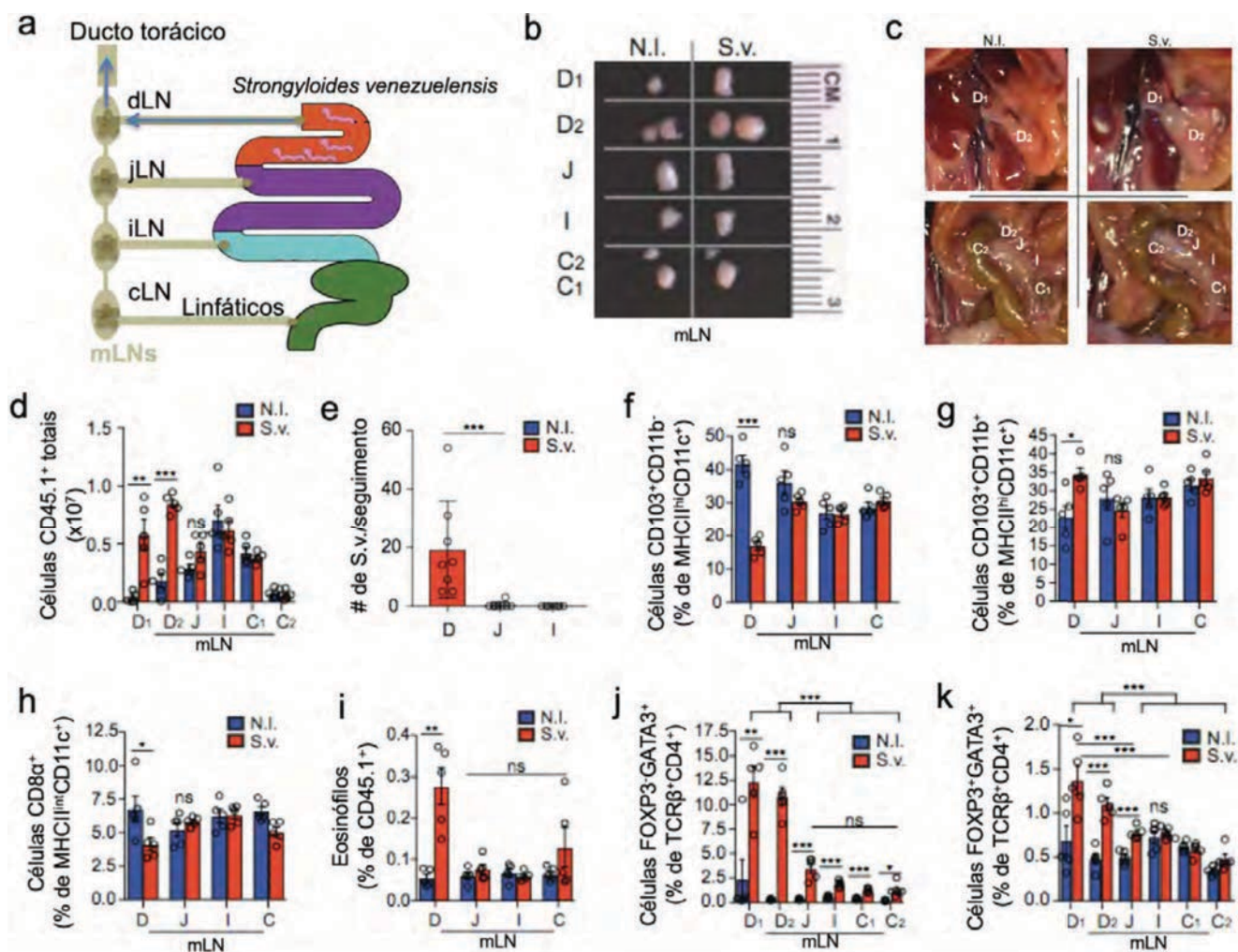


Figura 17: A infecção duodenal leva a um conflito imunológico compartimentalizado no D-mLN. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino e a localização de *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) no lúmen intestinal. (b) mLNs dissecados e (c) posição do mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados ou não (N.I.) com 700 larvas de S.v. 8 dias após infecção. (d) Contagem de células CD45⁺ totais nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados ou não (N.I.) com S.v. (e) Quantificação de vermes de S.v. maduros no epitélio dos segmentos intestinais de C57BL/6 SPF 8 dias após infecção. (f) Frequência de células CD103⁺CD11b⁻ e (g) CD103⁺CD11b⁺ entre células MHCII^{hi}CD11c⁺ e (h) CD8α⁺ entre células MHCII^{int}CD11c⁺ e (i) eosinófilos entre células CD45⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados ou não (N.I.) com S.v. (j) Frequência de células T Foxp3⁺GATA3⁺ e de (k) Foxp3⁺GATA3⁺ entre células TCRβ⁺CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados ou não (N.I.) com S.v. D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN

duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-10 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Essas alterações ainda foram detectadas semanas após a eliminação do verme (Figura 18a - d), assemelhando-se a um fenômeno de “cicatrização imunológica” previamente descrito em outras infecções (Fonseca et al., 2015).

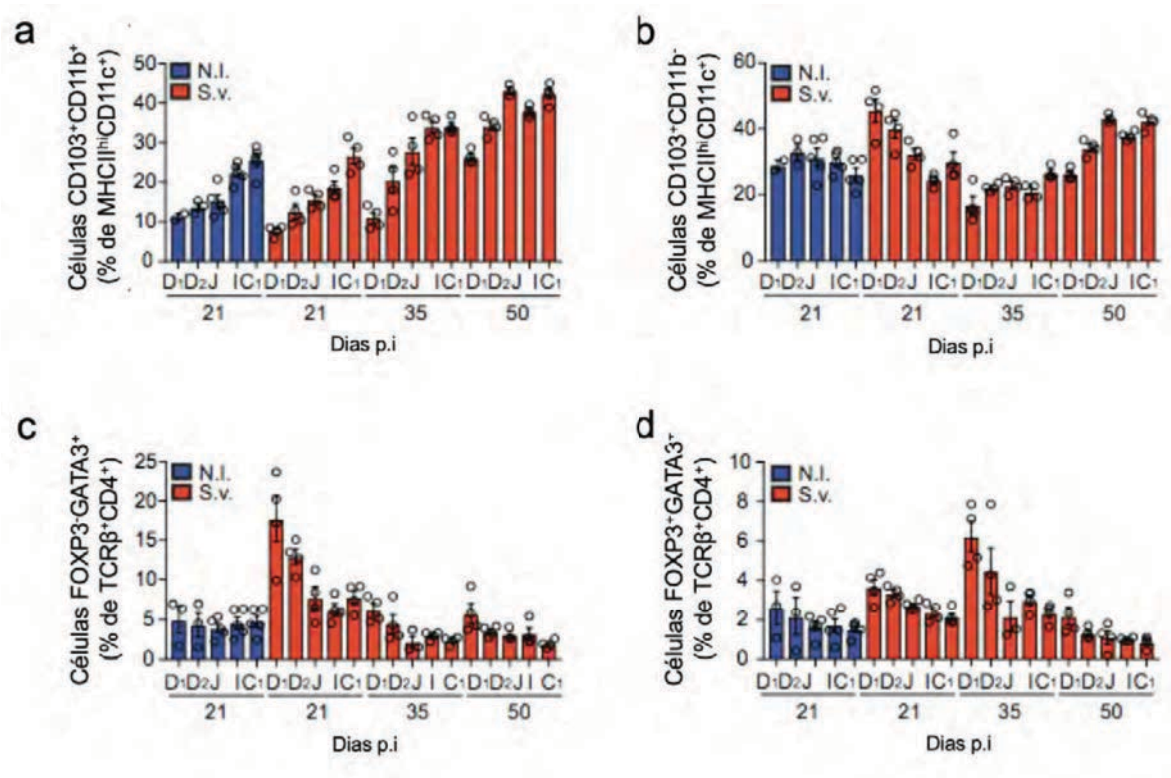


Figura 18: Alterações imunológicas persistentes após eliminação de *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) nos mLNs. (a) Frequência de células CD103⁺CD11b⁺ e (b) CD103⁺CD11b⁻ entre células MHCII^{hi}CD11c⁺ e (c) frequência de células T Foxp3⁻GATA3⁺ e de (d) Foxp3⁺GATA3⁻ entre células TCRβ⁺CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados com com 700 larvas de S.v. 21 a 50 dias antes da análise ou não infectados (N.I.). Dias pós infecção (p.i), D = duodeno, pelo qual D1 é o LN portal e D2 representa o mLN duodeno distal, J = jejuno, I = íleo, C1 = ceco-colônico mLN, C2 = cólon ascendente mLN. *n* = 5-7 camundongos por grupo.

As frequências de células Treg GATA3⁻ e de T CD4⁺CD25⁺ endógenas não foram afetadas pela infecção por S.v. (Figura 19a - d); no entanto, as células OT-II transferidas exibiram uma redução significativa na regulação positiva de Foxp3 e CD25 especificamente nos D-mLNs após a gavagem com OVA em comparação com os camundongos não infectados (N.I). (Figura 19e e f). Apesar disso, a migração das células transferidas para os mLNs foi proporcional (Figura 19g, h e i), sugerindo que o ambiente tolerogênico foi perturbado o suficiente para impactar a indução ou adaptação de células Treg contra antígeno dietético.

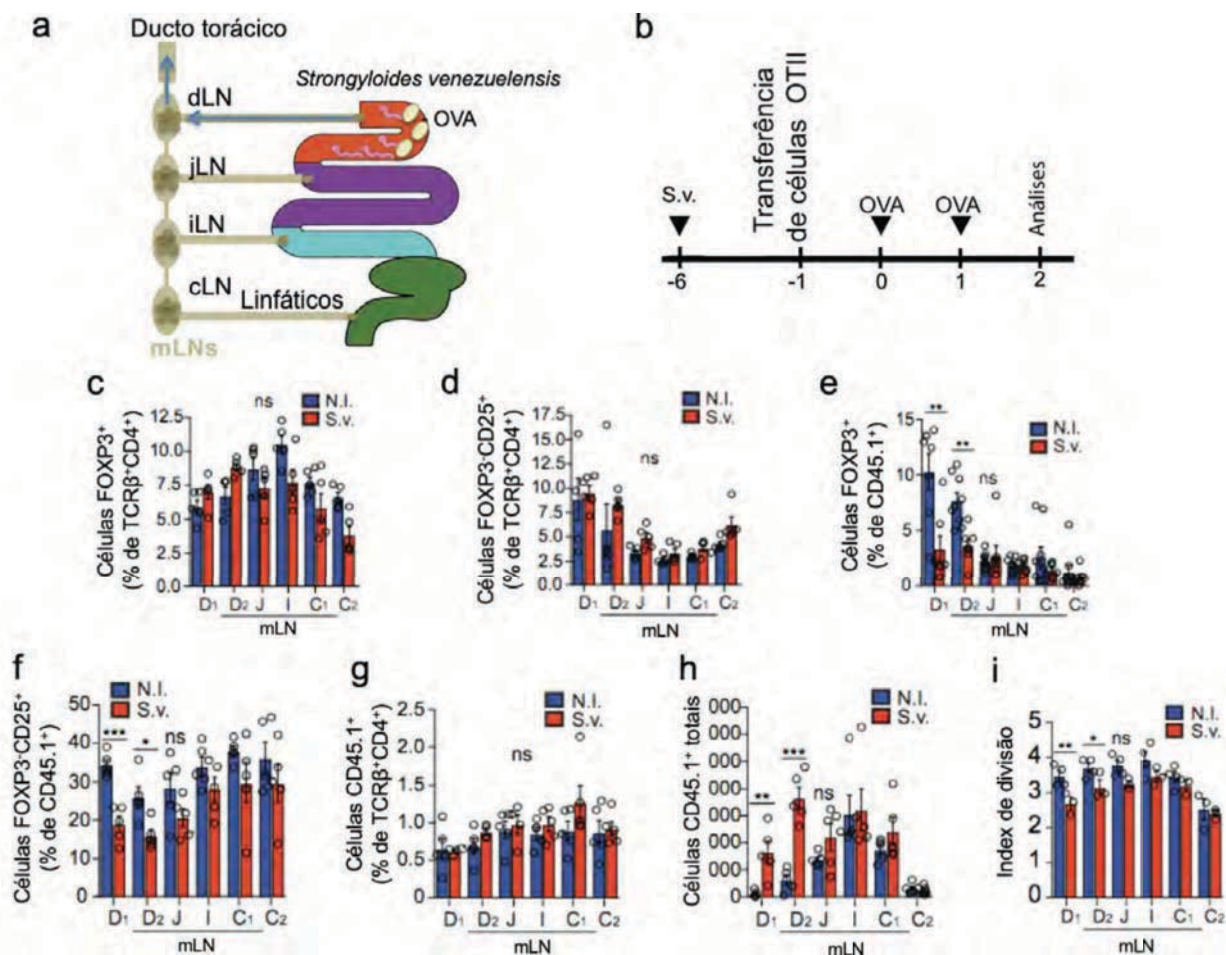


Figura 19: Frequência reduzida de células Treg após *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) nos mLNs proximais. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino e a localização de S.v. no lúmen intestinal. (b) Esquema do protocolo experimental utilizado. (c) Frequência de células T Foxp3⁺ e de (d) CD25⁺ Foxp3⁺ entre células TCRβ⁺ CD4⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 SPF infectados ou não (N.I.) com com 700 larvas de *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) 8 dias antes da análise. (e) Frequência de células T Foxp3⁺ entre CD45.1⁺, (f) Frequência de células T Foxp3⁺ CD25⁺ entre células CD45.1⁺, de (g) células CD45.1⁺ entre células TCRβ⁺ CD4⁺, (h) células CD45.1⁺ totais e (i) index de divisão nos mLNs 64h após transferência de 1 x 10⁶ células OT-II CD45.1⁺ naive em camundongos C57BL/6 SPF CD45.2 hospedeiros infectados ou não (N.I.) com S.v. por 8 dias e gavados com OVA 48h ou 24h antes da análise. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-8 camundongos por grupo. D = duodeno, pelo qual D1 portal LNs e D2 duodeno distal mLNs, J = jejuno, I = íleo, C1 = mLN cecalcolônico, C2 = mLN colônico ascendente, C = cólon. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Embora geralmente se pense que a infecção crônica por helmintos suprime alergias (Maizels & McSorley, 2016; Wilson et al., 2005), nós nos perguntamos se infecções transitórias, como por S.v. durante a exposição inicial ao antígeno, afetaria a tolerância a antígenos da dieta, um processo dependente de células pTreg (Curotto de Lafaille et al., 2008; Mucida et al., 2005). Para responder a esta pergunta, camundongos C57BL/6 receberam duas gavagens de OVA, nos dias 6 e 7 após a infecção por S.v., e foram submetidos ao modelo de asma de tolerância oral após a eliminação do patógeno (esquema Figura 20a e b). Foi observado um comprometimento parcial da supressão de eosinofilia e infiltração de DCs no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) e nos pulmões (Figura 20c - f) e aumento dos níveis de IgG1 específicos para OVA nos camundongos que foram gavados com OVA e infectados com S.v. em comparação com os camundongos N.I. (Figura 20g). Em conjunto, estes dados mostram que a infecção duodenal pode perturbar as respostas locais nos mLNs, bem como afetar a tolerância sistêmica aos antígenos do intestino.

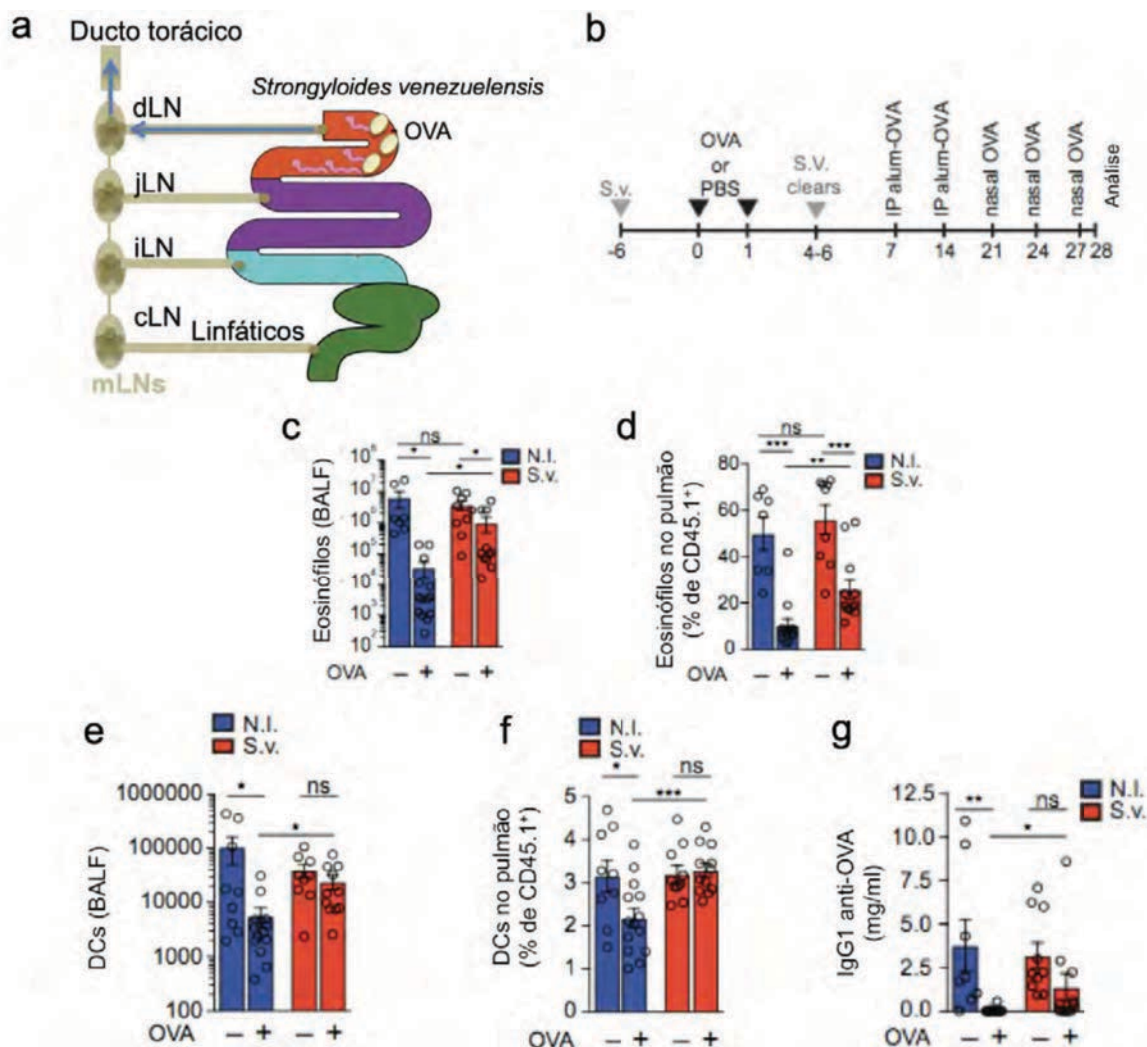


Figura 20: Infecção restrita ao duodeno leva ao comprometimento da tolerância oral. (a) Desenho esquemático dos mLNs drenando regiões específicas do intestino e a localização de *Strongyloides venezuelensis* (S.v.) no lúmen intestinal. (b) Esquema experimental para teste de tolerância oral em camundongos infectados com S.v.. (c) Número de eosinófilos totais no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF), (d) frequência de eosinófilos entre células CD45⁺ no tecido pulmonar, (e) Número de DCs totais no BALF, (f) frequência de DCs entre células CD45⁺ no tecido pulmonar e (g) níveis de IgG1 anti-OVA no soro de camundongos infectados com S.v. ou N.I. que receberam gavagem de antígeno (grupos OVA+) ou não (grupos OVA-), no dia 21 após a primeira imunização com OVA-alumínio. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-8 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal

4.2.1 A microbiota intestinal ativa STING e induziu a produção de IFN do tipo I

Como anteriormente mencionado, o intestino é uma região de constante contato com antígenos e outras moléculas imunologicamente ativas da dieta e da microbiota e a importância do contato com esses antígenos na manutenção da homeostase intestinal e no desenvolvimento do tecido linfoide associado ao intestino já foi bem explorada por estudos em camundongos *germ-free* (GF) e em camundongos alimentados com dieta sem proteínas inteiras (substituídas por aminoácidos não imunogênicos) (K. S. Kim et al., 2016; Menezes et al., 2003; Pereira et al., 1986; Umesaki & Setoyama, 2000; Vitetta et al., 1974). As proteínas da dieta exercem sabidamente papel importante como antígenos estimuladores de um tônus imunológico fundamental para o amadurecimento do sistema imune e os sensores utilizados para detecção dessas proteínas são os receptores antigênicos (Ig e TCR) de linfócitos B e T (Menezes et al., 2003). No entanto, embora a microbiota seja uma fonte de estímulo crítica para a maturação e a manutenção da homeostase intestinal, pouco se sabe sobre quais seriam os componentes microbianos ou os sensores nas células da mucosa intestinal cumprindo o papel nessa sinalização estimulatória. Dentre as várias moléculas produzidas pela microbiota que poderiam cumprir esse papel, o DNA microbiano é certamente uma delas. Vários sensores de DNA, tais como TLR9, AIM2, cGAS e o adaptador STING, são expressos por células epiteliais e células imunes do intestino (S. Hu et al., 2015; Katakura et al., 2005; L. Sun et al., 2013). Neste estudo, nosso objetivo foi explorar o papel do sensor STING na estimulação produzida pela microbiota na mucosa intestinal.

STING é ativado por dinucleotídeos cíclicos que podem ser produzidos por várias espécies de bactérias, incluindo aquelas que compõem a microbiota intestinal. Para avaliar diretamente o envolvimento das bactérias da microbiota na ativação de STING, foram utilizados fibroblastos embrionários murinos (MEFs) de camundongos C57BL/6. STING é uma proteína transmembrana componente do retículo endoplasmático que, quando ativado, forma um agregado na região perinuclear (Ishikawa & Barber, 2008). As MEFs foram estimuladas por 4h com

ligante de STING dsDNA90 (controle positivo), com conteúdo fecal ou DNA da microbiota purificado das fezes, e as células analisadas por microscopia confocal. Na ausência de estímulo, o STING se encontra esparsos no citoplasma das células (Figura 19a). Entretanto, quando as MEFs foram estimuladas com dsDNA90, conteúdo fecal ou DNA purificado das fezes, as moléculas de STING migraram e formaram um agregado pontual na região perinuclear das células (Figura 21a), sugerindo que a microbiota comensal pode ativar STING.

Já foi bem demonstrado que STING é importante para indução de interferon do tipo I (IFN-I) (Ishikawa & Barber, 2008; W. Sun et al., 2009; Zhong et al., 2008). De fato, foram encontrados níveis significativamente reduzidos de mRNA de *IFN-β* (IFN do tipo I) no cólon de camundongos geneticamente deficientes para STING quando comparado com C57BL/6 selvagens (Figura 21b). Consistente com o papel da microbiota na ativação de STING, camundongos C57BL/6 tratados com antibióticos de amplo espectro mostraram níveis similares de expressão de *IFN-β* no cólon comparado com *STING*^{-/-} (Figura 21c). Também foram observados níveis reduzidos de mRNA de *IFN-β* no cólon de camundongos GF quando comparados com os camundongos controle (Figura 21d). Além disso, a mono-colonização de camundongos GF com a bactéria comensal *Bacteroides thetaiomicon* parcialmente resgatou a expressão de *IFN-β* (Figura 21d), indicando, portanto, um papel da microbiota na indução de IFN-I através da sinalização por STING.

Para demonstrar de fato que a microbiota intestinal é capaz de ativar STING, foram cultivadas células da *lamina propria* do cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e *STING*^{-/-}. Essas células foram então estimuladas por 16h com dsDNA90 ou DNA da microbiota purificado das fezes e os níveis da expressão de IFN-β avaliados. Como esperado, células da *lamina propria* do cólon de camundongos C57BL/6 selvagens expressam altos níveis de mRNA de *IFN-β* quando estimuladas com dsDNA90 e nenhuma expressão de IFN-β foi encontrada nas células de *STING*^{-/-} sob o mesmo estímulo (Figura 21e). Além disso, o DNA da microbiota também induziu a produção de IFN-I nas células da *lamina propria* de camundongos C57BL/6 selvagens, porém nenhuma expressão de IFN-β foi encontrada na ausência de STING. Em conjunto, esses resultados indicam que STING pode ser um sensor importante para a presença da microbiota intestinal e

que essa estimulação leva à produção de IFN β .

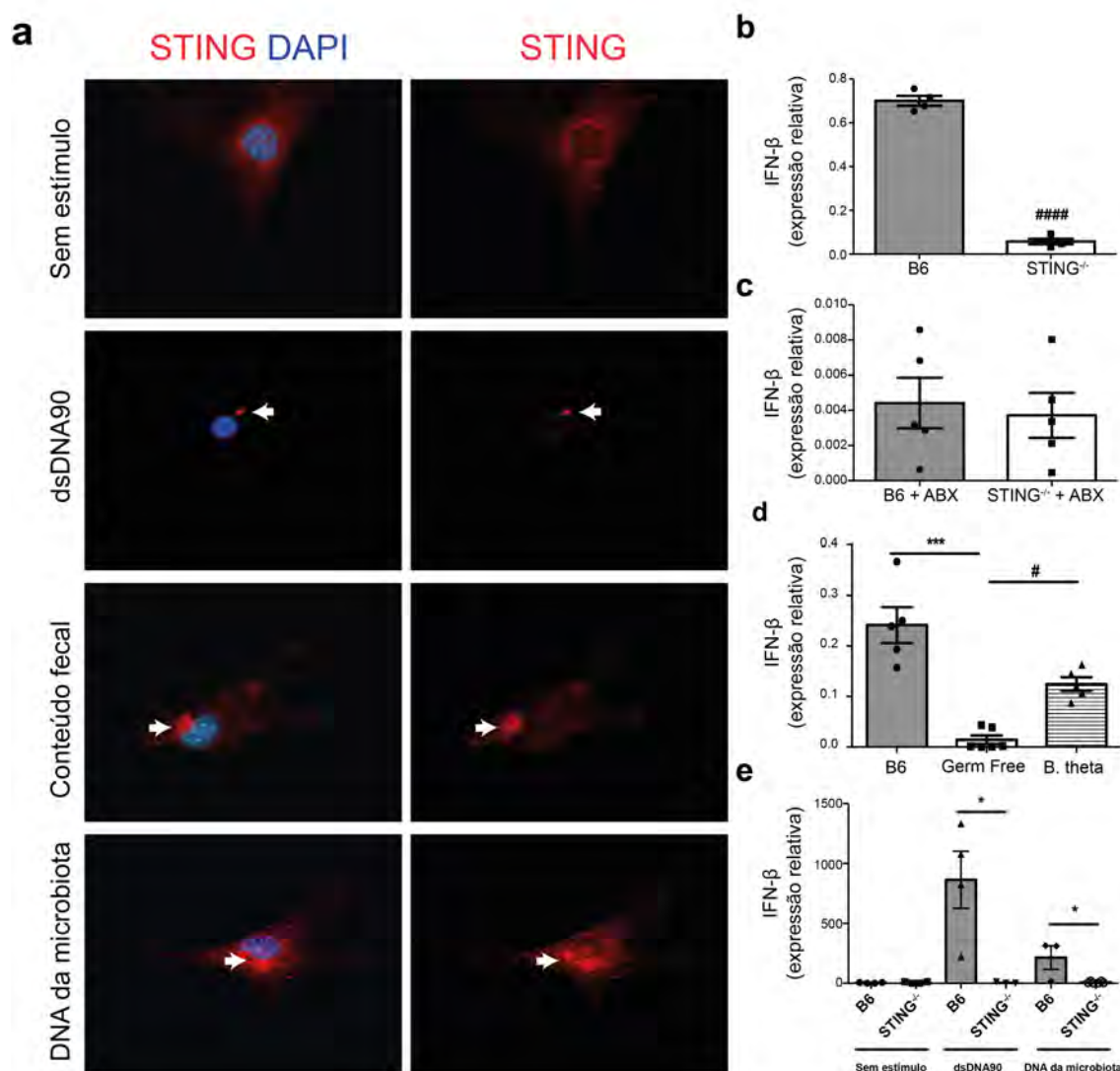


Figura 21: Ativação de STING pela microbiota comensal. (a) Microscopia confocal de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) de camundongos C57BL/6 (B6) corados com anti-STING e DAPI (4,6-diamidino-2phenylindole), não estimulados ou estimulados por 4 h com ativador de STING dsDNA (dsDNA90 pares de base), com conteúdo fecal ou DNA da microbiota purificado das fezes de camundongos C57BL/6. MEFs de camundongos STING^{-/-} não foram positivas para coloração por com anti-STING (dado não mostrado). Setas destacam a agregação pontual de STING. (b) *Quantitative reverse transcriptase-PCR* (qRT-PCR) análise de mRNA de IFN- β no cólon de camundongos C57BL/6 (B6) e STING^{-/-}. (c) qRT-PCR

análise de mRNA de *IFN- β* no cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} tratados com antibióticos de amplo espectro. (d) qRT-PCR análise de mRNA de *IFN- β* de células da *lamina propria* de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} em cultura estimuladas por 16 h com ativador de STING dsDNA ou DNA da microbiota purificado das fezes de camundongos C57BL/6. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $P < 0,05$; #### $P < 0,0001$.

4.2.2 A ausência de STING interferiu na estrutura e nos mecanismos de proteção da mucosa intestinal

Uma das características dos camundongos GF é a morfologia alterada da mucosa intestinal e redução na frequência de células epiteliais do tipo califormes sugerindo que a presença da microbiota interfere na proliferação das células epiteliais e é importante na manutenção estrutural do intestino (Nowacki, 1993). Para avaliar se a ausência da molécula STING teria um efeito semelhante na morfologia e arquitetura do intestino, o intestino delgado e o cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} foram coletados e processados para histologia. Análises das amostras de intestino delgado coradas com hematoxilina-eosina (H&E) mostraram que camundongos STING^{-/-} apresentam os vilos do intestino delgado mais alongados e estes possuem menos pregas quando comparado com os camundongos C57BL/6 controles (Figura 22a e b). Além disso, a altura das criptas do cólon dos camundongos STING^{-/-} é reduzida comparada aos camundongos C57BL/6 controles (Figura 22c e d), semelhante ao fenótipo imaturo já descrito para camundongos GF com padrão alterado de formação de microvilosidades e diminuição das taxas de renovação celular (Abrams, Bauer, & Sprinz, 1963; Nowacki, 1993).

Em seguida foi avaliado a função das células caliciformes, produtoras de muco, através da coloração com *periodic acid-Shiff* (PAS) e foi observado que os camundongos STING^{-/-} possuíam uma quantidade significativamente menor dessas células por cripta do cólon em comparação com os camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 22e e f).

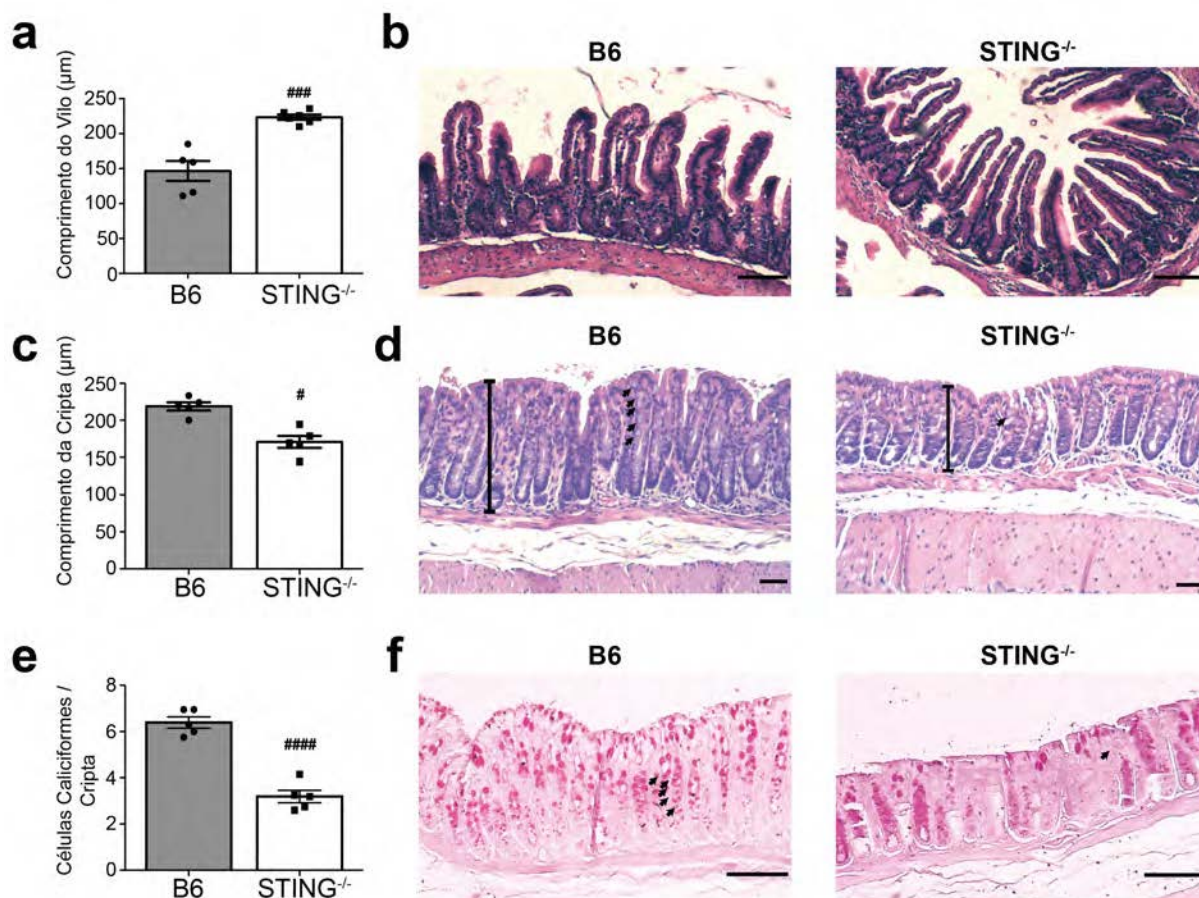


Figura 22: Alterações na estrutura da mucosa intestinal em camundongos STING^{-/-}. Intestino delgado e cólon de camundongos C57BL/6 (B6) controles e STING^{-/-} foram coletados para análises de (a) altura do vilão, (c) altura da cripta e (e) número de células caliciformes por cripta. Fotomicrografias representativas de sessões do (b) íleo e (d) cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} coradas com eosina e hematoxilina evidenciando a altura do vilão e da cripta, respectivamente. Fotomicrografias representativas de sessões do (f) cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} coradas com PAS evidenciando as células caliciformes (setas). Barras representam 100 μm. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. #*P*<0,05; ###*P*<0,001; ####*P*<0,0001.

A produção das camadas de muco pelas células caliciformes é essencial para manter a homeostase intestinal, impedindo que as bactérias do cólon ou outros elementos estressores invadam a mucosa causando lesão tecidual ou inflamação (Petersson et al., 2011). Com o intuito de investigar se o menor número de células caliciformes nos camundongos *STING*^{-/-} afetaria a camada de muco produzida no cólon desses animais, foram feitas imunohistoquímicas para marcação de MUC1 e MUC2, principais componentes da camada mucosa, no cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e *STING*^{-/-}. Como pode ser visto na Figura 23a e b, a quantidade de vesículas positivas para MUC1 também estava reduzida nos camundongos *STING*^{-/-} em comparação com os C57BL/6 selvagens.

Além disso, análises da coloração de MUC2 também mostrou uma frequência reduzida de células expressando MUC2 nos camundongos *STING*^{-/-} (Figura 23c e d), indicando que a produção de camada de muco estava comprometida na ausência de *STING*.

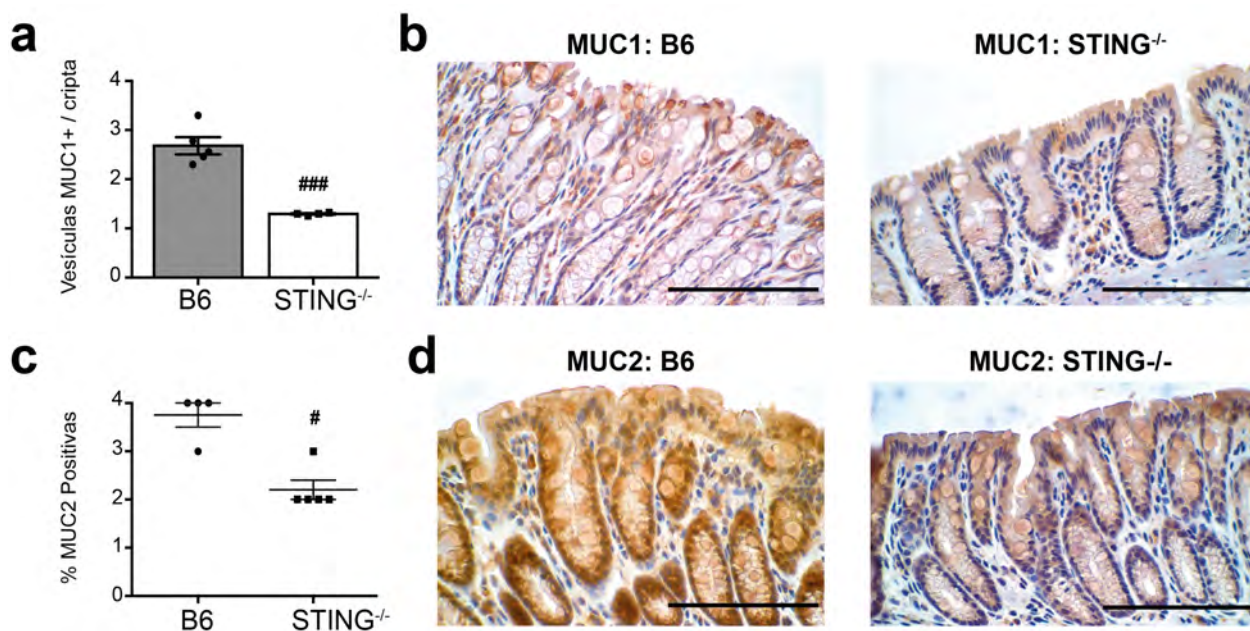


Figura 23: Produção de muco é afetada na mucosa de camundongos STING^{-/-}. Cólon de camundongos C57BL/6 (B6) controles e STING^{-/-} foram coletados para quantificação de (a) MUC1 e (c) MUC2. Fotomicrografias representativas de sessões do cólon imunohistoquímicas de (b) MUC1 e (d) MUC2. Barras representam 100 μ m. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. # P <0,05; ### P <0,001.

Como a exposição à microbiota estimula não somente a proliferação das células epiteliais da mucosa intestinal, mas também o estabelecimento da função de barreira dessa mucosa, foi avaliado também se outros mecanismos imunes envolvidos na proteção da mucosa estavam alterados nos camundongos STING^{-/-}. A IgA produzida pelos plasmócitos na *lamina propria* contribui para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que a IgA secretória (SIgA) reduz a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal (Round & Mazmanian, 2009). Como pode ser visto na Figura 24a e b, foi observado uma redução nos níveis de SIgA nas fezes e um aumento nos níveis de IgM sérica em camundongos STING^{-/-} quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens.

Além disso, foram avaliados os níveis da interleucina (IL)-1 β , uma importante citocina envolvida na manutenção da barreira epitelial. Níveis significativamente menores dessa citocina foram encontrados no cólon de camundongos STING^{-/-} comparados aos C57BL/6 selvagens (Figura 24c). Adicionalmente, níveis de mRNA da molécula de reparo *Amphiregulin* também estavam reduzidos no cólon dos camundongos deficientes para STING (Figura 22d), apesar de nenhuma diferença ter sido observada nos níveis de *IL-22bp* entre os grupos estudados (Figura 24e). Em conjunto, esses resultados sugerem que uma sinalização via STING intacta é necessária para manutenção de vários mecanismos de homeostase e proteção da mucosa.

Como vários mecanismos de função de barreira intestinal estavam alterados em camundongos STING^{-/-}, foi testado se a permeabilidade intestinal também estava comprometida nesses animais utilizando a administração de *fluorescein isothiocyanate dextran* (FITC-labeled dextran), entretanto nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos avaliados (Figura 24f).

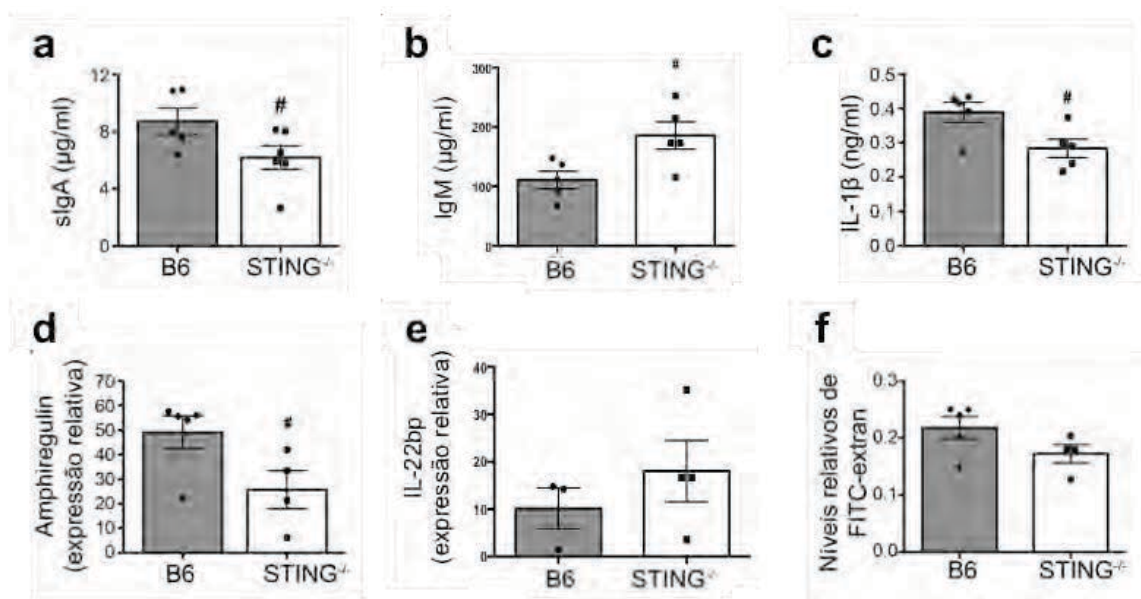


Figura 24: Mecanismos imunes envolvidos na proteção da mucosa são alterados nos camundongos STING^{-/-}. (a) Níveis de IgA secretória (SIgA) nas fezes de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-}. (b) Níveis de IgM no coro de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-}. (c) Níveis de interleucina (IL)-1 β e *Quantitative reverse transcriptase-PCR* (qRT-PCR) análise de mRNA de (d) *Amphiregulin* e (e) *IL-22bp* nos cólons de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-}. (f) Camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} receberam, por gavagem, uma solução contendo FITC dextran. Após 4 h o sangue foi coletado e a detecção de FITC plasmática efetuada (avaliação da permeabilidade intestinal). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. # $P < 0,05$.

Tem sido demonstrado que a microbiota e as células do sistema imune do intestino regulam umas às outras. Há relatos, por exemplo, sobre o papel da microbiota na produção de SIgA (Benveniste, Lespinats, & Salomon, 1971) e, de maneira recíproca, sobre o impacto da SIgA na composição da microbiota (Fransen et al., 2015; Suzuki et al., 2004). Dessa maneira, o próximo passo foi avaliar se a ausência da sinalização de STING pela microbiota intestinal altera a sua composição. Para isso, amostras de DNA purificado das fezes dos camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} foram amplificadas na região hiper-variável V3-V4 do RNA ribossomal 16S e sequenciadas utilizando a plataforma Illumina-Miseq. A diversidade beta foi avaliada pela análise de coordenadas principais (PCA) com peso (Figura 25a) e sem peso (Figura 25b e c) (*weighted and unweighted*) de distâncias UniFrac. Em ambas as medidas, camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} se agruparam separadamente e se mostraram significativamente diferentes por meio do teste estatístico de Adonis (com peso: $P=0,01$; sem peso: $P=0,015$).

Houve uma maior produção fecal no filo *Proteobacteria* e uma redução no filo *Actinobacteria* nas fezes de camundongos STING^{-/-}, entretanto as maiores diferenças entre a microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} foram observadas dentro dos filamentos específicos (Figura 25c, d e e). Um super-crescimento de bactérias do gênero *Desulfovibrio* (filo *Proteobacteria*), o qual é relacionado com o desenvolvimento de inflamação intestinal, e uma redução em organismos comensais simbióticos como *Bifidobacterium* (filo *Actinobacteria*) e *Allobaculum* (filo *Firmicutes*), conhecidos por exibir efeitos anti-inflamatórios, foram detectados em camundongos STING^{-/-} (Figura 25c, d e e). Diferenças significativas na abundância relativa dessas populações de bactérias dentro dos filamentos específicos entre camundongos STING^{-/-} e C57BL/6 foram confirmadas por análises DESeq2.

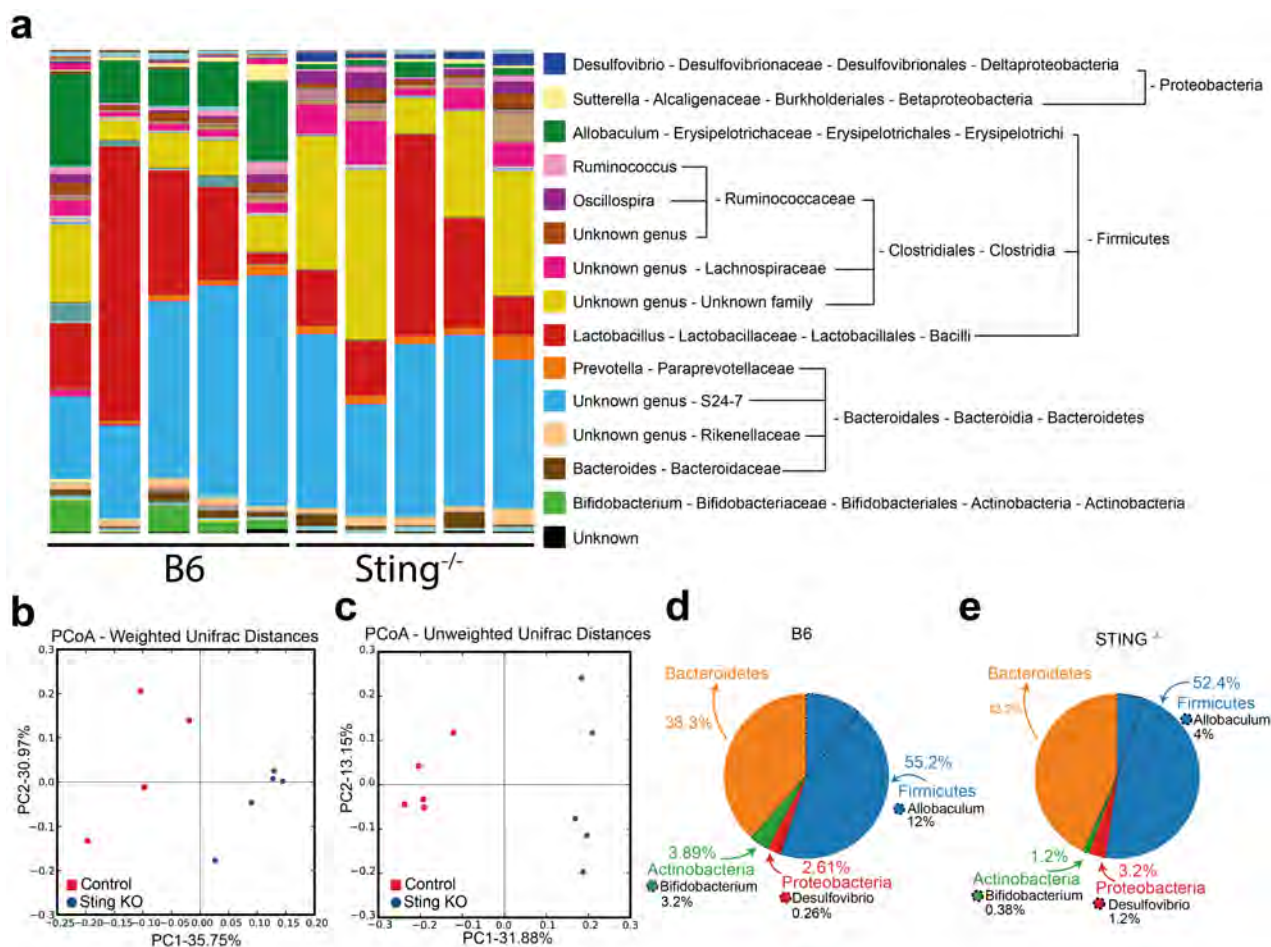


Figura 25: Composição da microbiota na ausência de STING. (a) Distribuição de Unidades Taxonomias Operacionais nas fezes de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e $STING^{-/-}$. Avaliação de estrutura de comunidades microbianas pela análise de coordenadas principais (PCoA) (b) com peso e (c) sem peso UniFrac, pots são de bactérias intestinais sequenciadas. Distribuição dos filos de bactérias nas fezes de camundongos (d) C57BL/6 selvagens e (e) $STING^{-/-}$ evidenciando as principais diferenças dentro de cada filo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4 camundongos por grupo.

4.2.3 Frequências de IEL e subtipos de ILC estavam alterados no intestino de camundongos STING^{-/-}

Para garantir a homeostase intestinal, as células imunes locais devem ser capazes de responder rapidamente aos antígenos de patógenos, mantendo o estado de tolerância aos comensais. Várias populações linfoides e da imunidade inata participam da preservação dessa dualidade crítica na resposta imune intestinal. Entre elas, os linfócitos intraepiteliais (IEL) que se encontram dispersos na própria camada epitelial assim como os linfócitos T CD4⁺ (Th) e as células linfoides inatas (ILC) localizados na *lamina propria* abaixo do epitélio. Já está descrito que a frequência dessas células da *lamina propria* do intestino também é afetada pela ausência da microbiota intestinal (Umesaki et al, 2000; Gury-BenAri et al, 2016).

Dessa forma, o próximo passo foi avaliar se a ausência de STING influenciaria nas populações de IEL do intestino (Figura 26a - estratégia de *gates*). Interessantemente, a frequência dos IEL naturais (CD45⁺ TCR $\gamma\delta$) foram maiores nos camundongos STING^{-/-} em comparação aos camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 26b). Ao mesmo tempo, as frequências dos dois subtipos de IEL induzidos (CD45⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8 $\alpha\beta$ ⁺ e CD45⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺) estavam significativamente reduzidas na ausência de STING (Figura 26c-f). Novamente, esse fenótipo de IEL observado nos camundongos STING^{-/-} assemelha-se ao que é descrito em camundongos GF e em neonatos, caracterizando um desenvolvimento imaturo da imunidade intestinal (Cheroutre et al., 2011; Umesaki, Setoyama, Matsumoto, & Okada, 1993).

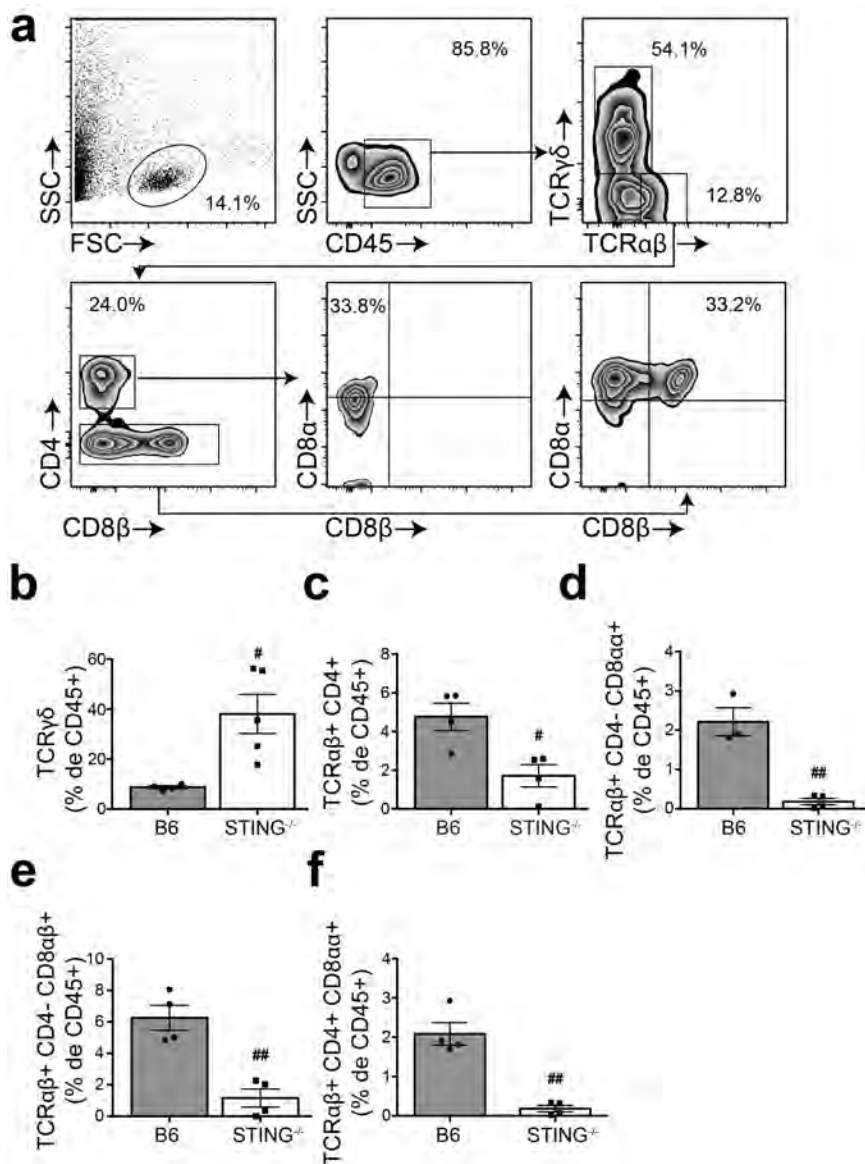


Figura 26: Frequência alterada de linfócitos intra-epiteliais (IELs) em camundongos $STING^{-/-}$. (a) Plots representativos de IEL no intestino delgado de camundongos C57BL/6 (B6) e $STING^{-/-}$. Frequências de IELs (b) $CD45^{+}$ TCR $\gamma\delta$, (c) $CD45^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ $CD4^{+}$, (d) $CD45^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ $CD4^{-}$ $CD8\alpha\alpha^{+}$, (e) $CD45^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ $CD4^{-}$ $CD8\alpha\beta^{+}$, (f) $CD45^{+}$ TCR $\alpha\beta^{+}$ $CD4^{+}$ $CD8\alpha\alpha^{+}$ no intestino delgado de camundongos C57BL/6 selvagens e $STING^{-/-}$. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-5 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. [#] $P < 0,05$; ^{##} $P < 0,01$.

Avaliamos também se o STING também afetaria as células linfoides da *lamina propria* do cólon. Não foi observada nenhuma diferença nas frequências das células T *helper* tipo 1 (Th1), Th2 e Th17 na *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-} comparado aos camundongos C57BL/6 selvagens, (Figura 27a-d) sugerindo que as células Th não são afetadas pela ausência de STING. Tampouco houve diferença entre os níveis de IL-6 e IFN- γ produzidos pelos camundongos dos dois grupos (Figura 27e).

Em seguida, foram analisadas as células linfóides inatas (ILC) uma vez que estas células são abundantes nas superfícies mucosas e parecem ter um papel particularmente importante na manutenção da barreira intestinal (Diefenbach, Colonna, & Koyasu, 2014; Klose & Artis, 2016). Interessantemente a frequência de ILC1 e ILC3 estavam aumentadas na *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-} comparado com os camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 28 - estratégia de *gates* e Figura 29a, c e d). Além disso, a frequência de ILC2 estava reduzida na *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-} (Figura 29a e c), um resultado que está em consenso com os níveis reduzidos de IL-4 e IL-5 (Figura 29e) e níveis aumentados de IL-17 (Figura 29f) no cólon desses camundongos. Além disso, a análise de frequências de ILCs na mucosa intestinal de camundongos neonatos STING^{-/-} e C57BL/6 controles não mostraram diferença entre os dois grupos (Figura 29g, h e i). Esses resultados sugerem que a falta de STING em camundongos adultos resulta em um desequilíbrio nas frequências das subpopulações de ILCs comprometendo suas funções na homeostase intestinal.

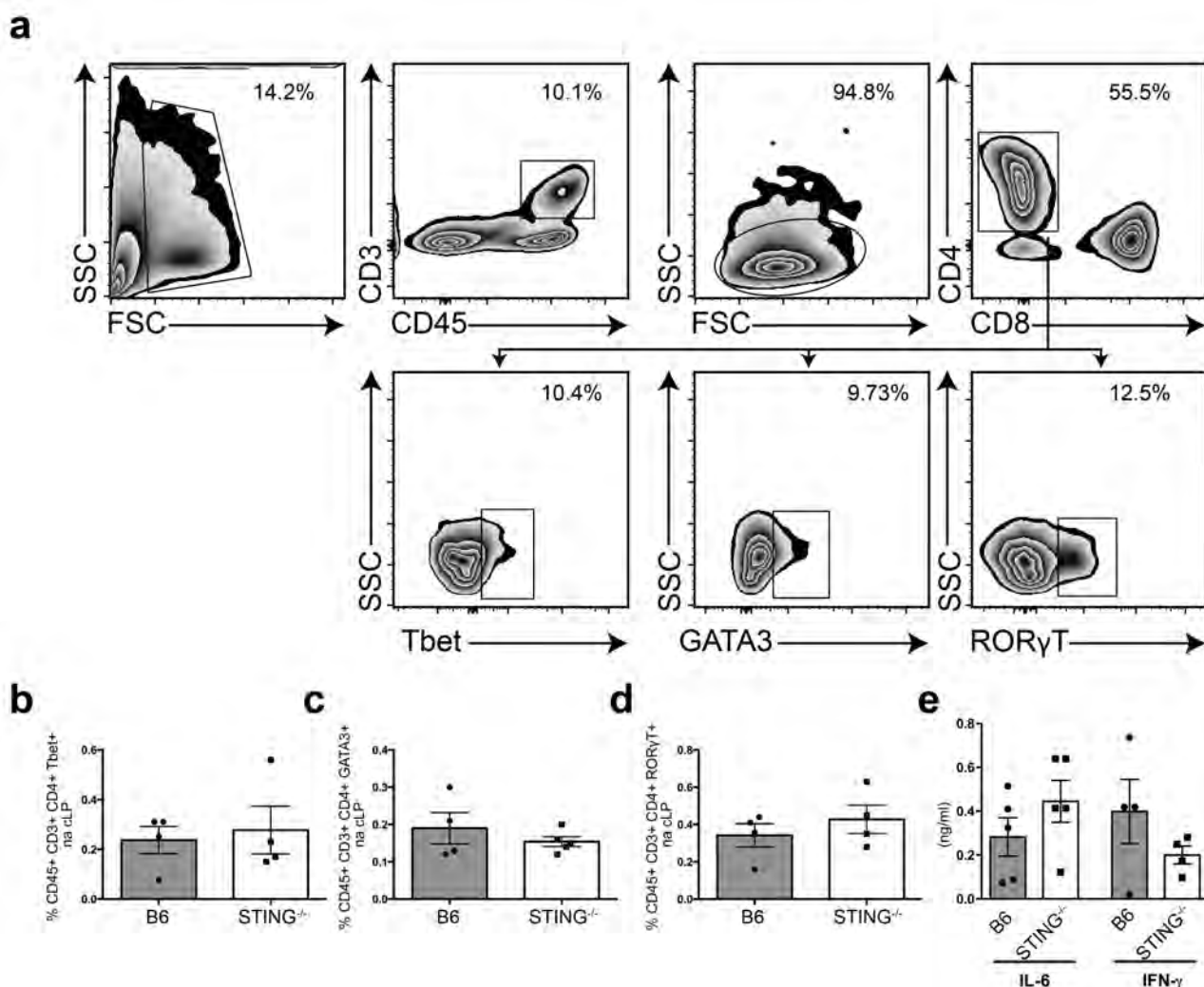


Figura 27: Frequência de células T na lamina propria de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-}. (a) Plots representativos de células T helper na lamina propria do cólon (cLP) de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}. Frequências de células Th1 (b) CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Tbet⁺, (c) CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ GATA3⁺ e (d) CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Rorγt⁺ na lamina propria do cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-}. Níveis de (e) interleucina (IL)-6 e da citocina IFN-γ no cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-5 camundongos por grupo.

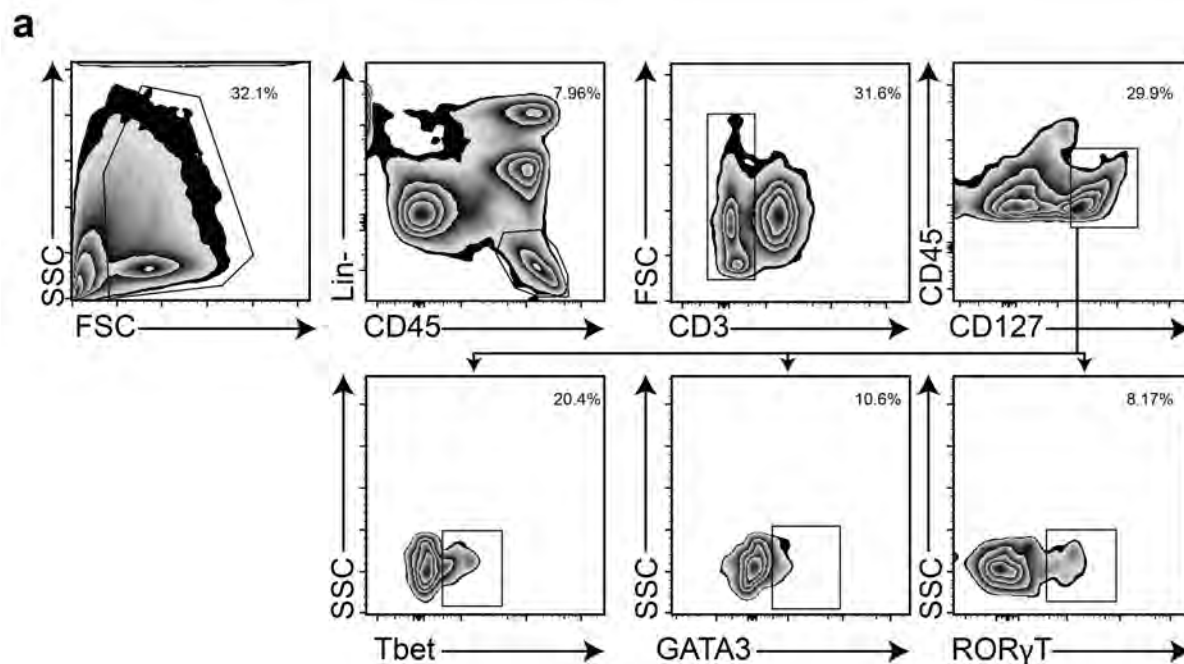


Figura 28: Estratégia de *gates* utilizada para análise de linfócitos inatos (ILCs).

(a) Plots representativos da estratégia de *gates* de ILCs na *lamina propria* do cólon de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-}. Células ILC1 foram classificadas como Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ Tbet⁺, células ILC2 como Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ GATA3⁺ e células ILC3 Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ Ror γ t⁺. Lin⁻ linhagem negativa; FSC, *forward scatter*; SSC, *side scatter*.

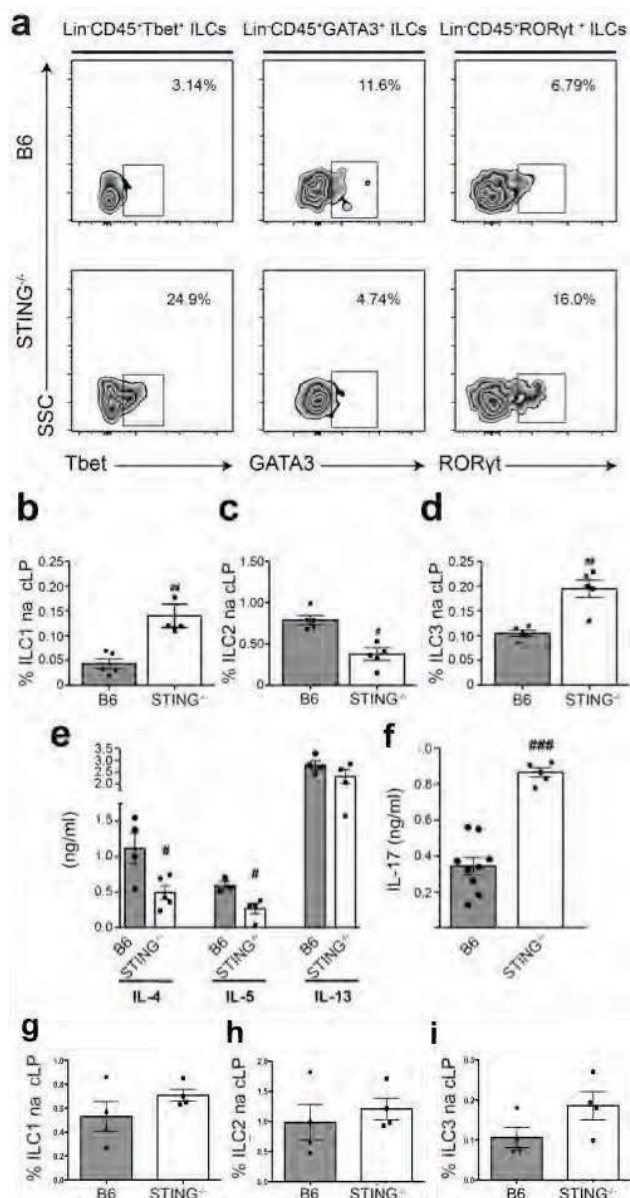


Figura 29: Frequência alterada de linfócitos inatos (ILCs) em camundongos STING^{-/-}. (a) Plots representativos de ILCs na *lamina propria* do cólon (cLP) de camundongos C57BL/6 (B6) e STING^{-/-}. Frequências de células ILC1 (b) Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ Tbet⁺, ILC2 (c) Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ GATA3⁺ e ILC3 (d) Lin⁻ CD45⁺ CD127⁺ Rorγt⁺ na *lamina propria* do cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-}. Níveis de (e) interleucina (IL)-4, IL-5, IL-13 e (f) IL-17 no cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}. Frequências de células ILC1 (g), ILC2 (h) e ILC3 (i) na *lamina propria* do cólon de camundongos neonatos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-}. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 4-5 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001. Lin⁻ linhagem negativa; SSC, *side scatter*.

4.2.4 A Ausência de sinalização por STING reduziu a frequência e função de células T reguladoras

Células T reguladoras que expressam Foxp3 ou LAP são responsáveis pela supressão de várias células imunes e previnem ativamente doenças como alergia alimentar e IBD (Bilate & Lafaille, 2012; Chen et al., 2008). A presença da microbiota intestinal tem sido descrita como fundamental para o desenvolvimento e manutenção de células T CD4⁺ Foxp3⁺ com atividade reguladora na mucosa colônica (Tanoue, Honda, 2012; Geuking et al., 2011). Por outro lado, tem sido demonstrado que IFN-I regula o acúmulo de células Treg no intestino além de manter a sua estabilidade. A ausência de sinalização por IFNAR (receptor *alfa* de IFN) nas células imunes inatas resulta em deficiência na expansão e manutenção de Tregs Foxp3⁺ no intestino (Kole et al., 2013; Lee et al., 2012; Metidji et al., 2015). Sabendo que a via de sinalização de STING induz a produção de IFN-I, nós analisamos se a ausência de STING interfere com o desenvolvimento e função de células Treg na mucosa intestinal. Camundongos STING^{-/-} possuíam frequência reduzida de células Treg CD4⁺ LAP⁺ na *lamina propria* do cólon além de menor frequência de células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e CD4⁺ LAP⁺ nos mLNs quando comparado aos camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 30a-e). Consistente com a frequência dessas células, os níveis de IL-10 e TGF- β , críticos para expansão e manutenção de células Foxp3⁺ e LAP⁺ respectivamente, estavam também reduzidos no cólon e mLNs de camundongos STING^{-/-} comparados com os C57BL/6 selvagens (Figura 30f-i). Esses resultados sugerem que a sinalização por STING é necessária para a manutenção de uma frequência normal de células Treg Foxp3⁺ e LAP⁺ e para uma produção ótima de IL-10 e TGF- β nos mLNs, além de células Treg LAP⁺ e TGF- β também no cólon.

O próximo passo foi examinar se a sinalização por STING estava também envolvida na função de células Treg avaliando sua capacidade de suprimir a expansão de células T CD4⁺ *naive*. Células T *naive* CD4⁺ CD62L⁺ CD44^{low} e células Treg CD4⁺ CD25⁺ foram isoladas, co-cultivadas com células apresentadoras de antígeno e estimuladas com anti-CD3 para induzir a proliferação de células T. Nas proporções de 1:1 e 1:2 de Treg : T *naive*, as células Treg de camundongos C57BL/6 selvagens foram capazes de suprimir parcialmente a proliferação de células T *naive*. Entretanto, Tregs de camundongos STING^{-/-} foram incapazes de

suprimir a proliferação de células T *naive* nas mesmas proporções (Figura 30j). Em conjunto, esses resultados indicam que STING é essencial para manutenção e função de células Treg CD4⁺ Foxp3⁺.

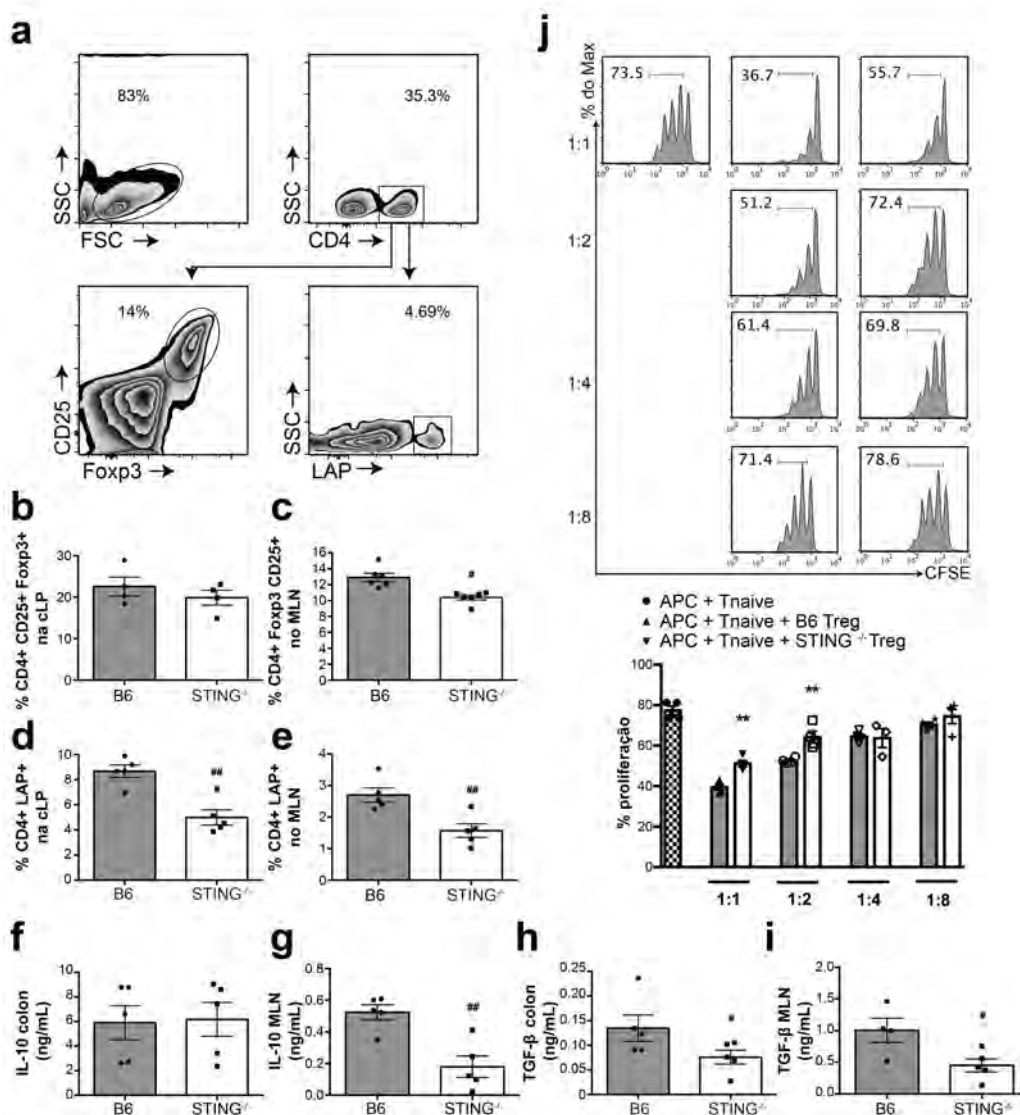


Figura 30: Frequência de células T reguladoras na lamina propria do cólon (cLP) e linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-}. (a) Plots representativos da estratégia de *gates* para células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e CD4⁺ LAP⁺. (b) Frequência de Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ na cLP e (c) mLNs de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}. (d) Frequência de Tregs CD4⁺ LAP⁺ na cLP e (e) mLNs de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-}. Níveis de (f) interleucina (IL)-10 e da citocina (h) TGF-β no cólon de camundongos

C57BL/6 e STING^{-/-}. Níveis de (g) IL-10 e (i) TGF- β no sobrenadante da cultura de células dos mLNs estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 por 48 h ou 72 h, respectivamente. (j) Células CD4⁺ CD62L⁺ CD44^{low} ou CD4⁺ CD25⁺ foram purificadas (utilizando o *Sorting-FACS AriaII*) do baço de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} com 8 semanas de idade e co-cultivadas com células apresentadoras de antígeno (APC) e estimuladas com anti-CD3 por 3 dias a diferentes proporções. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 3-6 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$. CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*; FSC, *forward scatter*; LAP, *latency-associated peptide*; SSC, *side scatter*.

4.2.5 A expressão de STING protegeu os camundongos de diferentes insultos inflamatórios no intestino

Sabendo que camundongos STING^{-/-} possuem alterações no intestino que comprometem os mecanismos de proteção e regulação imune da mucosa intestinal, avaliamos, em seguida, se os camundongos STING^{-/-} apresentavam maior susceptibilidade a inflamações intestinais. Para responder a essa pergunta foram empregados três diferentes tipos de insultos inflamatórios: (a) um modelo de indução de colite por sulfato de sódio dextrano (DSS), no qual na inflamação intestinal é associada com destruição epitelial, liberação de DNA próprio e translocação bacteriana (Kiesler, Fuss, & Strober, 2015); (b) um modelo de colite induzida pela transferência de células T *naive* CD4⁺ CD45RB^{high} para camundongos RAG^{-/-} no qual a co-transferência de células T reguladoras CD4⁺ CD45RB^{low} funcionais previne o desenvolvimento da colite (Leach et al., 1996); e (c) um modelo de infecção entérica por *Salmonella enterica* Typhimurium.

Camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} foram tratados com 3% de DSS na água de beber por 8 dias e monitorados diariamente durante todo esse período. Para os experimentos de mortalidade, os camundongos receberam água normal após os 8 dias de DSS e foram monitorados todos os dias até o dia 21 após início do tratamento. Camundongos STING^{-/-} apresentaram maior perda de peso (Figura 31a), sangramento e diarreia, a partir do quinto dia após tratamento quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens (Figura 31b). Além disso, todos os camundongos STING^{-/-} morreram até o dia 13 após início do tratamento com DSS enquanto 30% dos camundongos C57BL/6 selvagens sobreviveram até o final do período experimental (Figura 31c). Análises da morfologia do cólon mostraram que o seu comprimento foi similar entre os camundongos não tratados, entretanto o tratamento com DSS levou a uma redução significativa no comprimento do cólon, mais evidente em camundongos STING^{-/-} (Figura 31d e e). Análises histológicas de sessões do cólon coradas com hematoxilina e eosina (H&E) mostraram que, após o tratamento com DSS, os camundongos STING^{-/-} apresentaram o epitélio menos intacto e a camada submucosa mais espessa do que os camundongos C57BL/6 selvagens, indicando mais edema na submucosa (Figura 31f e g). A coloração de secções histológicas com PAS também mostrou células caliciformes e arquitetura intestinal remanescentes nos camundongos C56BL/6 selvagens comparados com

STING^{-/-} após tratamento com DSS (Figura 31h). Além disso, observamos que houve redução da frequência de células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e CD4⁺ LAP⁺ na *lamina propria* do cólon e nos mLNs dos camundongos STING^{-/-} (Figura 32a-f) e redução dos níveis de TGF- β (Figura 32c-h) quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens após tratamento com DSS.

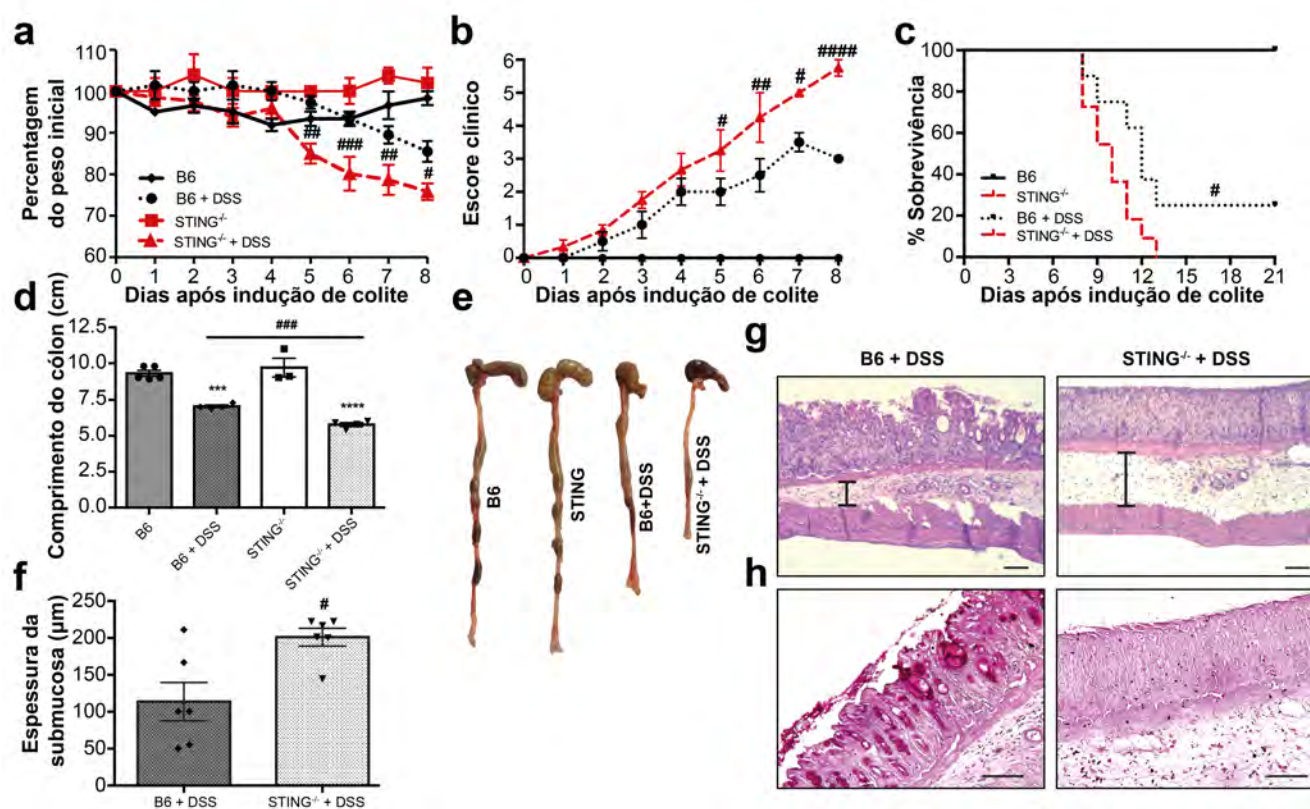


Figura 31: Camundongos STING^{-/-} foram mais susceptíveis a colite induzida por DSS. Camundongos C57BL/6 selvagens (B6) e STING^{-/-} foram tratados com 3% DSS na água de beber por 8 dias. (a) Alterações no peso após a administração de DSS, monitorado diariamente. (b) Escore clínico de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} durante o tratamento com DSS, onde um escore mais alto corresponde a maior patologia. (c) Sobrevivência de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-}. Os camundongos receberam 3% DSS por 8 dias, seguido de água potável normal por mais 13 dias, e monitorados todos os dias. (d) Quantificação do comprimento do cólon mostrado em E. (e) Cólons de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} no dia 8 após tratamento com DSS. (f) Quantificação do comprimento da camada submucosa mostrado em g. Fotomicrografias representativas de sessões do cólon de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} tratados com DSS coradas com (g) hematoxilina e eosina (H&E) e (h) periodic-acid Schiff evidenciando a espessura da camada submucosa e as células caliciformes. Barras representam 100µm. Os resultados são representativos de quatro experimentos independentes com 5-10 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. #*P*<0,05; ##*P*<0,01; ###,****P*<0,001; ####,*****P*<0,0001.

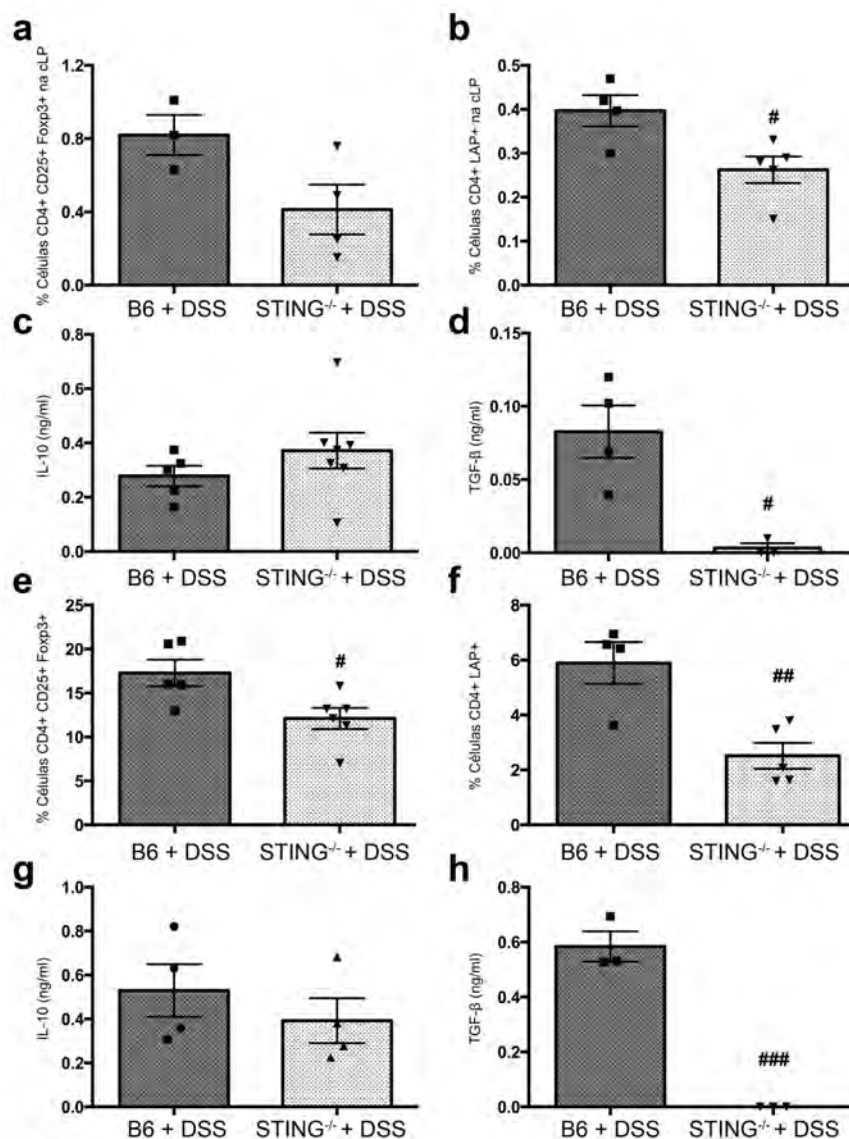


Figura 32: Frequência de células T reguladoras na *lamina propria* do cólon (cLP) e linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos C57BL/6 (B6) selvagens e STING^{-/-} tratados com DSS. Frequência de Tregs (s) CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e (b) CD4⁺ LAP⁺ na cLP de camundongos C57BL/6 e STING^{-/-} tratados com DSS. Níveis de (c) interleucina (IL)-10 e da citocina (d) TGF-β no cólon de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} tratados com DSS. Frequência de Tregs (e) CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e (f) CD4⁺ LAP⁺ nos mLNs de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} tratados com DSS. Níveis de (g) IL-10 e (h) TGF-β no sobrenadante da cultura de células dos mLNs estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 por 48 h ou 72 h, respectivamente. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. #P<0,05; ###P<0,001.

A expressão de STING pelas células Treg se mostrou necessária para sua função supressora *in vitro* (Figura 30j). Portanto, utilizamos, em seguida, um modelo de inflamação intestinal no qual células Treg funcionais são necessárias para prevenir o desenvolvimento de colite induzida por células T (Leach et al., 1996) para testar a função de células Treg também *in vivo* (Figura 33a). Camundongos C57BL/6 RAG^{-/-} que receberam apenas células T naive CD4⁺ CD45RB^{hi} apresentaram alterações histológicas compatíveis com inflamação da mucosa intestinal, como pode ser constatado pela análise histológica da mucosa colônica desses animais (Figura 33b e c). A co-transferência de células Treg CD4⁺ CD45RB^{low} de camundongos C57BL/6 selvagens com as células T naive preveniu o desenvolvimento da doença. Entretanto, a co-transferência de células Treg CD4⁺ CD45RB^{low} de camundongos STING^{-/-} não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da doença, confirmando o resultado *in vitro* de que a expressão de STING pelas células Treg é necessária para a sua função supressora.

Com o intuito de investigar a susceptibilidade de camundongos a infecções patogênicas entéricas na ausência de STING, nós examinamos a taxa de mortalidade de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} após administração de 1x10⁸ unidades formadoras de colônias de *Salmonella enterica* Typhimurium. Camundongos STING^{-/-} infectados apresentaram taxa de mortalidade precoce quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens também infectados (Figura 33d). No dia 6 pós infecção, 60% dos camundongos STING^{-/-} já haviam morrido enquanto os camundongos C57BL/6 selvagens começaram a morrer apenas a partir do dia 9 após serem infectados. Foi também avaliada a translocação bacteriana no dia 6 pós infecção e foram observadas cargas bacterianas similares no fígado de camundongos C57BL/6 selvagens e STING^{-/-} infectados (Figura 33e), indicando que, mesmo que a translocação bacteriana não seja diferente entre os dois grupos, camundongos STING^{-/-} são mais susceptíveis à infecção por *Salmonella enterica* Typhimurium.

Em conjunto, esses resultados mostram que STING é um regulador crítico da homeostase intestinal e que a deficiência de STING leva a uma maior susceptibilidade a inflamações intestinais e infecções entéricas em camundongos.

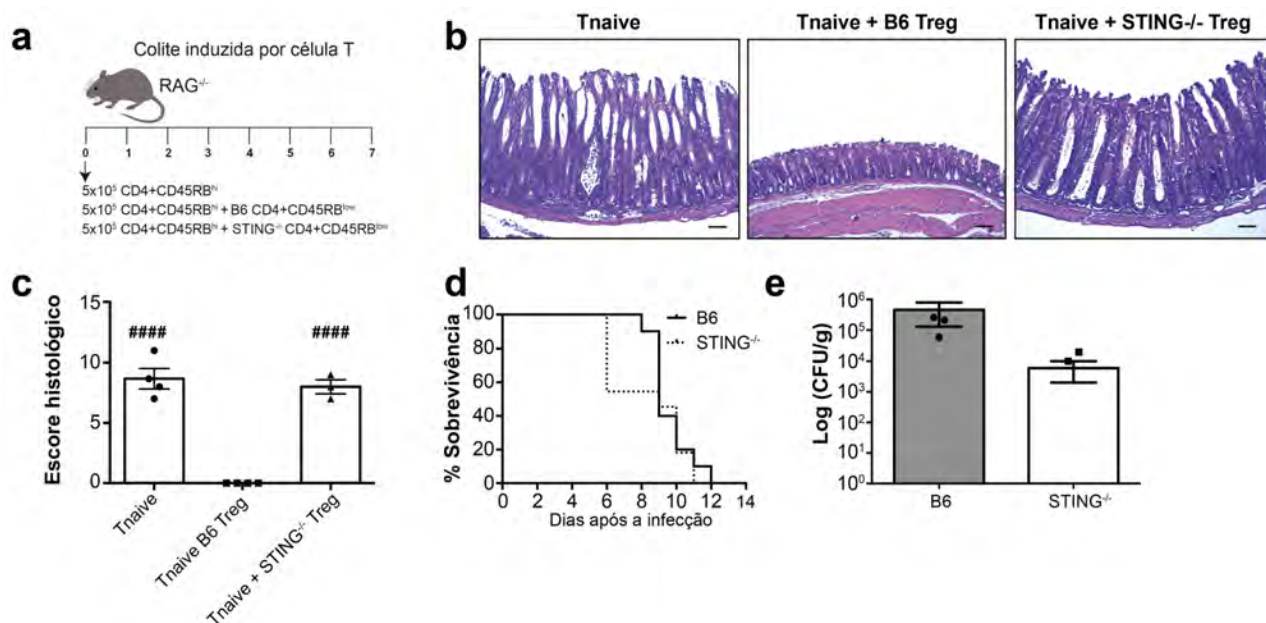


Figura 33: Camundongos $STING^{-/-}$ foram mais susceptíveis a colite induzida por células T e infecção entérica. (a) Esquema do protocolo de colite induzida pela transferência de células T $CD4^+ CD45RB^{high}$ para camundongos C57BL/6 $RAG^{-/-}$ e co-transferência de células T $CD4^+ CD45RB^{low}$. (b) Fotomicrografias representativas de sessões do cólon de camundongos C57BL/6 $RAG^{-/-}$ que receberam células T *naive* ($CD4^+ CD45RB^{high}$) de camundongos C57BL/6 (B6) e co-transferência de células Treg ($CD4^+ CD45RB^{low}$) de camundongos C57BL/6 selvagens ou $STING^{-/-}$. (c) Escore histológico do experimento de colite induzida por células T representado em B. (d) Camundongos C57BL/6 selvagens ou $STING^{-/-}$ foram infectados com 1×10^8 unidades formadoras de colônias de *Salmonella enterica* Typhimurium por gavagem e tiveram sua sobrevivência monitorada. (e) Translocação bacteriana avaliada no fígado de camundongos C57BL/6 selvagens e $STING^{-/-}$ 6 dias após infecção por *Salmonella enterica* Typhimurium. Barras representam $100\mu m$. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-10 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. $#### P < 0,0001$.

4.2.6 Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} também foram mais susceptíveis a colite induzida por DSS

Sabendo que a ativação de STING induz a produção de IFN-I, avaliamos a seguir se a ausência de sinalização por IFN-I também é capaz de promover maior susceptibilidade a inflamações intestinais. Para isso, camundongos 129Sv/Ev controles e camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} foram tratados com 3% de DSS na água de beber por 8 dias e monitorados diariamente durante todo esse período. Para os experimentos de mortalidade, os camundongos receberam água normal após os 8 dias de DSS e foram monitorados todos os dias até o dia 21 após início do tratamento. Camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} apresentaram maior perda de peso (Figura 34a), sangramento e diarreia a partir do quinto dia pós tratamento quando comparados aos camundongos controle (Figura 34b). Além disso, 60% dos camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} morreram enquanto que apenas 20% dos camundongos 129Sv/Ev morreram até o final do período experimental (Figura 34c). Análises da morfologia do cólon mostraram que o seu comprimento foi similar entre os camundongos não tratados, entretanto o tratamento com DSS levou a uma redução significativa do comprimento do cólon, mais evidente em camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} (Figura 34d e e). Análises histológicas de secções histológicas do cólon coradas com H&E mostraram que, após o tratamento com DSS, os camundongos IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} apresentaram um epitélio menos intacto, com maior perda da morfologia e arquitetura normal quando comparados aos camundongos controle (Figura 34f).

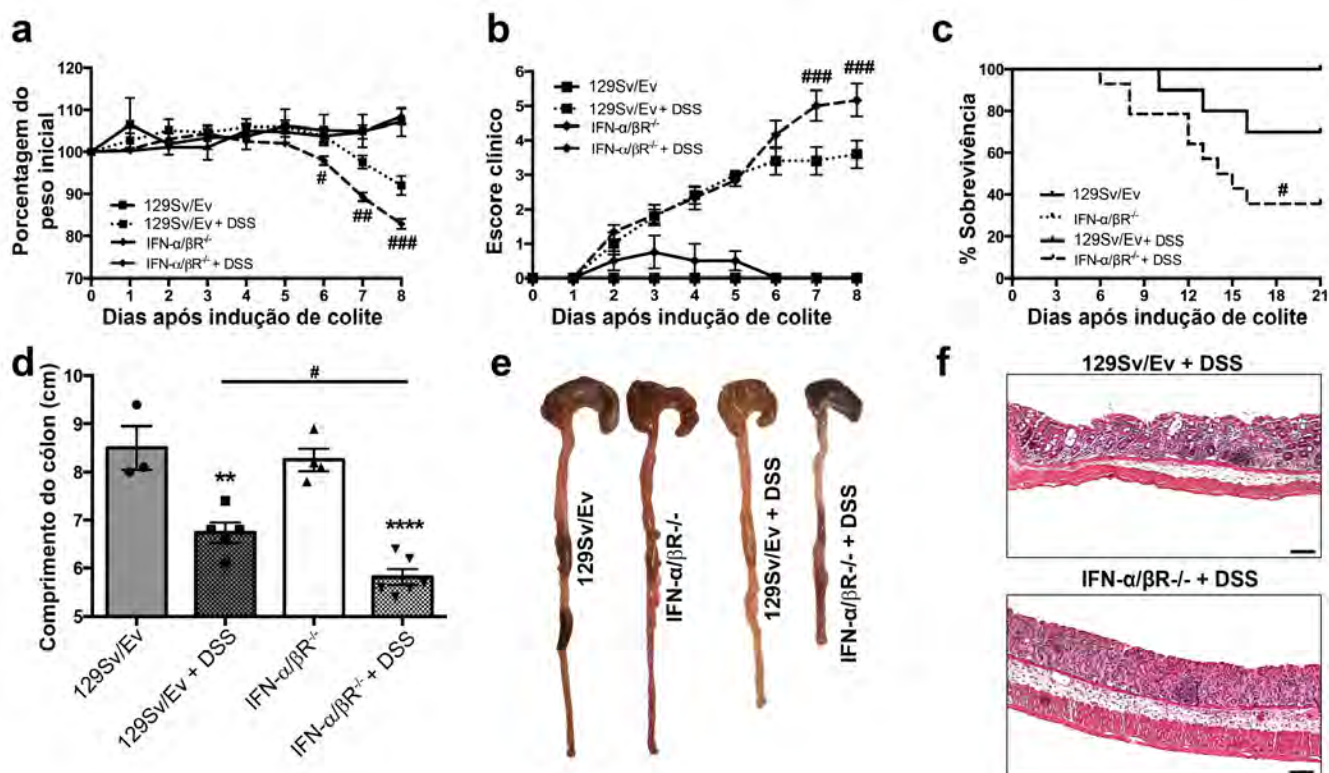


Figura 34: Camundongos IFN-αβR^{-/-} são mais susceptíveis a colite induzida por DSS. Camundongos 129Sv/Ev e IFN-αβR^{-/-} foram tratados com 3% DSS na água de beber por 8 dias. (a) Alterações no peso após a administração de DSS, monitorado diariamente. (b) Escore clínico de camundongos 129Sv/Ev selvagens e IFN-αβR^{-/-} durante o tratamento com DSS, onde um escore mais alto corresponde a maior patologia. (c) Sobrevivência de camundongos 129Sv/Ev e IFN-αβR^{-/-}. Os camundongos receberam 3% DSS por 8 dias, seguido de água potável normal por mais 13 dias, e monitorados todos os dias. (d) Quantificação do comprimento do cólon mostrado em e. (e) Cólon de camundongos 129Sv/Ev selvagens e IFN-αβR^{-/-} no dia 8 após tratamento com DSS. (f) Fotomicrografias representativas de sessões do cólon de camundongos 129Sv/Ev selvagens e IFN-αβR^{-/-} tratados com DSS coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Barras representam 100μm. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com 5-10 camundongos por grupo. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. #P<0,05; **P<0,01; ###P<0,001; ****P<0,0001.

5. DISCUSSÃO

5.1 Capítulo 1 - Respostas imunológicas nos diferentes microambientes intestinais

A principal função do intestino é digerir e absorver os nutrientes da dieta com a ajuda do epitélio absorptivo e do sistema vascular e linfático subjacentes, bem como do microbioma (Randolph, Ivanov, Zinselmeyer, & Scallan, 2017). A seleção de nutrientes e a capacidade absorptiva variam ao longo do intestino: a maioria dos nutrientes da dieta é absorvida nas vilosidades do intestino delgado superior (duodeno e jejuno) e, em menor extensão, pelo intestino delgado inferior (íleo). A microbiota mais densa no íleo e cólon medeia a liberação adicional de nutrientes ou modificação de metabólitos. O intestino também abriga a maior população de células imunológicas do corpo com a tarefa de fornecer resistência a toxinas e patógenos invasores, mantendo a tolerância a antígenos alimentares e microbianos, seja por ação local ou tráfego linfático até os mLNs para montar respostas imunes adaptativas (Belkaid & Hand, 2014; A. M. C. Faria, Reis, & Mucida, 2017; Fonseca et al., 2015).

O papel crítico dos mLNs na imunidade adaptativa do intestino é bem estabelecido, tanto para indução de tolerância aos antígenos alimentares em virtude da geração de pTregs (D. Esterhazy et al., 2016), quanto da necessidade de tráfego linfático adequado de células imunes para os mLNs (Fonseca et al., 2015; Worbs et al., 2006). Estudos prévios revelaram o mapa de drenagem para vários mLNs ao longo do intestino murino (Carter & Collins, 1974; Gautreaux et al., 1994; Houston et al., 2016; Van den Broeck et al., 2006) e descreveram diferenças imunológicas entre os mLNs (Houston et al., 2016; Siewert et al., 2008; Veenbergen et al., 2016). No entanto, os componentes celulares subjacentes e as consequências funcionais da drenagem específica dos microambientes intestinais não foram ainda abordados sistematicamente. Procuramos, na primeira parte deste trabalho, entender como a drenagem linfática compartimentalizada dos distintos microambientes do intestino contribui para respostas imunes a antígenos luminiais diferentes.

O trato gastrointestinal varia em arquitetura, função, composição celular e componentes luminais ao longo da sua extensão. A capacidade absorptiva do intestino é maior na sua porção proximal devido ao maior comprimento dos vilos. Seguindo esse padrão, observamos um maior comprimento dos vasos e capilares linfáticos nessa porção do intestino, apresentada neste trabalho pelas imagens 3D do tecido

intestinal, da rede de drenagem linfática e dos mLNs. O encurtamento dos vasos linfáticos nas vilosidades ao longo do intestino implica que os mLNs são expostos a diferentes taxas de fluxo linfático e de *turnover* (Bernier-Latmani & Petrova, 2017). No intestino delgado, essa estrutura parece ser modulada pela microbiota, uma vez que os vasos linfáticos duodenais eram mais longos e os ileais encurtados em camundongos GF, nos quais a maior absorção duodenal pode estar compensando a falta de liberação distal de nutrientes mediada pela microbiota (Hooper & Gordon, 2001). Isto sugere que o conteúdo luminal pode influenciar a drenagem aferente dos mLNs. Ainda seguindo o gradiente de capacidade de absorção nos diferentes microambientes intestinais, os mLNs que drenam cada seguimento específico do intestino eram também diferentes em sua forma e tamanho. Esse fenômeno ocorre provavelmente devido às diferentes propriedades teciduais e de composição luminal ao longo do intestino, embora tenhamos excluído a microbiota como um dos principais impulsionadores dessa anatomia macroscópica dos mLNs, uma vez que esse fenômeno estava preservado em camundongos GF.

Além da separação da composição luminal, funcional e propriedades teciduais dos microambientes intestinais e das diferenças anatômicas observadas entre os mLNs, o fato de corantes injetados em um mLN específico não se espalharem para os outros mLNs mostra que a drenagem linfática é compartimentalizada para cada mLN (Carter & Collins, 1974; Gautreaux et al., 1994; Houston et al., 2016; Siewert et al., 2008; Van den Broeck et al., 2006; Veenbergen et al., 2016). Corroborando esses dados, a injeção de corantes na camada muscular de regiões diferentes do intestino também não levou à detecção do corante em outros mLNs que não aqueles que drenam as regiões injetadas inicialmente. Outro fator importante que distingue os mLNs de um único órgão com função singular é o perfil e composição diferente de células do estroma e DCs entre os diferentes mLNs. Tem sido demonstrado que as células estromais da cadeia principal dos mLNs são mais eficientes na indução de tolerância imunológica quando comparados a LNs não intestinais (Hammerschmidt et al., 2008; Pezoldt et al., 2018; Rodda et al., 2018). Nossos dados confirmam esses relatos e mostram ainda diferenças nos perfis de células endoteliais linfáticas (LECs) e de células reticulares fibroblásticas (FRCs) entre os linfonodos duodenais (D-mLNs), ileais (I-mLN) e cecais (C-mLN). Ambos os tipos celulares apresentaram vias de ativação e de moléculas de adesão

de células imunes reguladas positivamente nos mLNs distais em contraste com maior ativação de vias de metabolismo xenobiótico no D-mLN. Esses resultados indicam que, além da drenagem linfática compartimentalizada, cada um dos mLNs possui características únicas que os tornam distintos entre si.

A administração de antígenos pela via oral geralmente induz a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em células pTreg, um processo dependente do ácido retinóico (RA) e da citocina TGF- β (D. Esterhazy et al., 2016; Worbs et al., 2006), que também controla as respostas inflamatórias sistêmicas. Foi demonstrado que as DCs desempenham um papel crítico no desencadeamento da diferenciação das células em pTreg, principalmente as DCs migratórias CD11b⁻ após sua migração para os mLNs. Além disso, tanto DCs derivadas de *lamina propria* quanto DCs derivadas de mLN, particularmente DCs positivas para integrina α_E (CD103), produzem grandes quantidades de RA e TGF- β e induzem eficientemente a diferenciação de células pTreg (Carter & Collins, 1974; Houston et al., 2016; Randolph et al., 2017). A análise das duas populações principais de DCs migratórias (MHCIIhi) CD103⁺ CD11b⁺ e CD103⁺ CD11b⁻ mostrou que as DCs presentes no D-mLN apresentavam um perfil menos pró-inflamatório do que as DCs do C-mLN, expressando níveis mais baixos de receptores e vias de citocinas inflamatórias, além de estarem especialmente enriquecidas para vias associadas com a migração de células Tregs (Gobert et al., 2009). Esses dados sugerem que, mesmo entre os subtipos de DCs migratórias chamadas de tolerogênicas (CD103⁺ CD11b⁻) ou inflamatórias (CD103⁺ CD11b⁺), apresentavam diferenças de perfil dependendo de do mLN no qual elas se localizavam. Estudos posteriores serão necessários para avaliar exatamente quais DCs interagem e induzem a polarização das células T CD4⁺ para Treg ou Th17 nos diferentes mLNs. Em conjunto com os dados discutidos acima, esses resultados sugerem que uma rota linfática compartimentalizada cria microambientes distintos ao longo do intestino para específicos órgãos linfoides secundários (mLNs), potencialmente contribuindo para uma resposta imune regionalmente organizada. Os resultados também sugerem que os D-mLNs constituem ambientes tolerogênicos devido à assinatura favorável de células estromais, DCs e à drenagem de nutrientes, um fenômeno impulsionado pela microbiota.

Em concordância com o ambiente mais tolerogênico nos mLNs proximais, a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em pTregs seguiu um gradiente descendente (proximal-distal) enquanto que a indução de células Th17 ROR γ t⁺ seguiu o padrão contrário. De maneira interessante, esse padrão foi ainda mantido quando o mesmo antígeno, no caso a OVA, era entregue diretamente no lúmen do duodeno ou do íleo, mostrando que a disponibilidade de antígeno, isoladamente, não era responsável pelo tipo de resposta imune induzida em cada mLN. Além disso, as frequências de células ativadas (CD25⁺) não diferiram entre os mLNs indicando a compartimentalização na absorção linfática de retinol e a diferença nos perfis de expressão de DCs e células estromais como causas subjacentes mais prováveis. Apesar disso, observamos que a indução de células Treg nos D-mLNs foi menor quando injetamos OVA no lúmen do duodeno do que quando administramos a OVA por gavagem, sugerindo que a pré-digestão ou liberação do antígeno mais lentamente no estômago, emulsificação ou mecanismos adicionais contribuem para a eficiência da indução de células pTreg reativas a antígenos da dieta. O papel potencial do reservatório de antígenos no estômago se apoia no fato de que, quando realizamos a injeção ileal de OVA, o mLN que drena o ceco também apresentou a indução de células pTreg, possivelmente porque o antígeno foi capturado no ceco. Esses dados sugerem que, em condições homeostáticas, os mLNs duodenais são os locais primários para a indução de células pTreg pelos antígenos da dieta. Esse sítio anatômico pode ser, assim, instrumental na indução de tolerância oral e na prevenção da alergia alimentar. Em contraste, mesmo em resposta ao mesmo antígeno, os mLNs distais promoveram preferencialmente a diferenciação de células Th17 e pTreg ROR γ t⁺, ressaltando a distinção imunológica entre os microambientes do intestino delgado proximal versus ílaco e colônico.

A remoção cirúrgica de mLNs em humanos acontece em pacientes com IBD que precisam ter parte do seu intestino removido como forma de tratamento da doença. Em muitos casos, os sintomas da doença voltam a aparecer algum tempo depois da cirurgia (Hwang & Varma, 2008). A remoção dos mLNs distais (I- e C-mLNs) em camundongos mostrou que uma resposta imune específica para SFB, isto é a indução de células Th17 ROR γ t⁺, pode ocorrer em outros mLNs. Esse fenômeno foi observado a partir da análise das células encontradas nos locais do tecido intestinal drenados por esses mLNs implicando que outro papel de um mLN é

ajustar a imunidade adaptativa nos microambientes/seguimentos específicos do intestino que ele originalmente drenou, o que, em casos de patobiontes mais patogênicos, pode ajudar a conter o dano tecidual. Ainda permanece para ser resolvido como acontece a indução atópica de células Th17 ROR γ t⁺ nos seguimentos proximais do intestino após remoção dos mLNs distais. No entanto, eliminamos as possibilidades de que isto tenha ocorrido devido ao aumento da concentração de antígeno no local, uma vez que o SFB não se espalhou para colonizar outras regiões do intestino. Também observamos, pelos experimentos utilizando *Fast Green*, que a indução ectópica não foi devida ao redirecionamento da linfa do íleo/ceco para os mLNs vizinhos.

A remoção cirúrgica seletiva dos mLNs proximais mostrou que mesmo quando todos os D-mLNs e o J-mLN superior foram removidos, a indução de tolerância oral continuou intacta, pelo menos na resposta do tipo Th2 do modelo de inflamação eosinofílica pulmonar (semelhante à asma). Nossa hipótese é que os mLNs a jusante foram capazes de gerar células pTregs compensando a falta dos mLNs proximais ou que as pTregs restantes induzidas nos outros mLNs foram suficientes para suprimir uma resposta inflamatória Th2. Entretanto, quando infectamos camundongos com o parasito *S. venezuelensis* (S.v.) que coloniza a região proximal do intestino exclusivamente, ocorreu uma mudança no perfil imunológico dos mLNs que drenam essa região gerando uma frequência significativamente menor de pTregs e a quebra parcial da tolerância oral à OVA. A diferença entre a remoção cirúrgica seletiva dos mLNs proximais e a infecção por S.v. é que não houve conflito imunológico na situação da cirurgia, isto é, células T específicas para OVA não se diferenciaram em outras células que não sejam as Tregs, como no caso da infecção. Esses dados mostram que a infecção duodenal pode perturbar as respostas locais, bem como afetar a tolerância sistêmica induzida aos antígenos contatos através do intestino.

Nossos dados de infecção pelo nematodo S.v. mostram que a indução de um meio imunológico conflitante, mesmo se voltado para outro antígeno, pode impactar os processos tolerogênicos nos D-mLNs. Os experimentos de infecção pela bactéria gram-negativa *Citrobacter rodentium* expressando OVA, em contraste, mostram que uma infecção distal com *Citrobacter* não teve efeito sobre a capacidade dos D-mLNs em induzir pTregs específicas para antígenos da dieta, devido à

compartimentalização das respostas imunes nos mLNs drenando diferentes microambientes intestinais. Também observamos que essa infecção induziu uma reestruturação seletiva dos D-mLNs mesmo depois que a bactéria havia sido eliminada (dia 14 pós infecção), produzindo uma espécie de “cicatriz” de longo prazo da composição das células imunes. Isto é provavelmente apenas uma pequena parte das alterações induzidas por infecções locais e análises mais detalhadas poderiam revelar outras repercussões imunológicas das alterações nas células estromais provocadas por infecções locais. No entanto, esses dados sugerem que os linfonodos drenantes do intestino não são órgãos passivos e que as células residentes dos D-mLNs foram as mais afetadas participando ativamente dessa infecção local.

A injeção de OVA acompanhada de toxina colérica (CT) no lúmen do íleo induziu células OT-II *naive* a se diferenciarem em células Th17, diferentemente do que é visto quando injetamos OVA + CT no lúmen do duodeno, induzindo células pTregs. Mesmo na ausência de CT injetado no íleo (apenas OVA), as células OT-II *naive* ainda se diferenciaram em células Th17. Além disso, algumas células pTregs foram também induzidas no I-mLN após a injeção de OVA + CT no íleo; essas células, entretanto, elas eram também ROR γ t⁺ sugerindo que o local de entrega do antígeno pode moldar a natureza das células pTregs. Interessantemente, a "vacinação" com OVA + CT no íleo induziu proteção contra a infecção pela bactéria *Salmonella enterica* Typhimurium expressando OVA, enquanto que a administração de OVA + CT no duodeno não foi capaz de mostrar o mesmo efeito. Em conjunto, os dados ilustram os efeitos benéficos da drenagem distinta de mLNs, que pode evitar conflito imunológico entre respostas imunes induzidas em diferentes locais do intestino. Além disto, eles apontam os mLNs distais como alvos para vacinação oral e os mLNs proximais como locais para indução de tolerância a antígenos administrados pela via oral.

De uma maneira geral, os nossos dados revelam um mecanismo pelo qual o tecido linfóide associado ao intestino lida simultaneamente com respostas reguladoras versus respostas pró-inflamatórias: pela segregação anatômica dessas reações em mLNs funcionalmente distintos. Essa segregação torna possível que decisões antagônicas da imunidade adaptativa possam ocorrer ao mesmo tempo sem comprometer umas às outras. Eles também revelam que uma cooperação de

mecanismos efetores eficientes (Th) e mecanismos reguladores correspondentes (Tregs) existem em cada local para diminuir a inflamação excessiva, específica de cada microambiente intestinal. Ainda é necessário determinar quais as contribuições relativas do desenvolvimento, da disponibilidade compartimentalizada de nutrientes, do microbioma, do histórico de infecções, da composição e pressão linfática, do tráfico de células, da drenagem de fatores teciduais específicos do segmento intestinal e da co-drenagem de órgãos para a impressão e composição de células imunes e não imunes e para a criação e manutenção desses nichos nos mLNs.

A drenagem eficiente de antígenos da dieta em linfonodos promotores da tolerância associados à região proximal do intestino contribui para a geração de mecanismos de prevenção da alergia alimentar. Nesse sentido, a infecção duodenal e disbiose local surgem como perturbações ambientais que podem alterar o resultado alérgico. É plausível que a vacinação oral geralmente resulte em respostas imunológicas diminuídas (Levine, 2010) por esse mesmo mecanismo. No entanto, a via duodenal tolerogênica pode ser explorada terapêuticamente para induzir tolerância a fontes de antígenos pró-inflamatórios inacessíveis, tais como bactérias disbióticas que habitam o íleo ou o cólon em doenças do intestino irritável (IBD).

5.2 Capítulo 2 - Sensores imunológicos do microambiente intestinal

Sabemos que a manutenção da homeostase da mucosa intestinal depende da capacidade das células imunes localizadas nessa mucosa em responder a antígenos inócuos ou patogênicos de forma diferenciada. Uma das maneiras de garantir essa diferenciação das respostas imunes nesse local parece ser, como vimos, através da compartimentalização dos microambientes imunes e da drenagem linfática desses microambientes ao longo do intestino. Um outro aspecto interessante da atividade imunológica da mucosa intestinal é que esses mesmos antígenos com os quais as células e microambientes imunes são preparados para lidar, atuam como importantes fontes de estimulação para o desenvolvimento e maturação dos vários microambientes da mucosa intestinal, dos seus mecanismos de proteção e do tecido linfóide associado a ela. Essas interações entre a mucosa intestinal e os componentes das duas principais fontes de estimulação do intestino (dieta e microbiota) é mediada por uma coleção de sensores que integram vias de sinalização complexas nas células que compõem esse órgão. Muitos componentes da dieta, como proteínas, vitaminas, lipídeos e mesmo sais minerais, atuam diretamente em sensores específicos de células imunes e não imunes da mucosa intestinal induzindo a ativação e diferenciação de células epiteliais, células da imunidade inata e linfócitos locais (K. S. Kim et al., 2016; Menezes et al., 2003; Pereira et al., 1986; Umesaki & Setoyama, 2000; Vitetta et al., 1974). Vários receptores de reconhecimento de padrão expressos em células epiteliais e células do sistema imune também mantêm a vigilância de padrões moleculares associados a microorganismos e desencadeiam respostas imunes homeostáticas permitindo a coexistência bem sucedida da microbiota comensal com um tecido mucoso intacto. Dentre os muitos componentes mediando essa estimulação das células da mucosa intestinal pela microbiota estão as moléculas de DNA. Sabe-se que o DNA microbiano é detectado por TLR9, AIM2 e cGAS, levando à ativação de NF- κ B, inflamação e vias de sinalização por IFN, respectivamente (S. Hu et al., 2015; Katakura et al., 2005; L. Sun et al., 2013). O reconhecimento de DNA no intestino por TLR9 e AIM2 exerce um efeito protetor na colite experimental, por exemplo (S. Hu et al., 2015; Katakura et al., 2005; Rachmilewitz et al., 2002). Apesar da relevância fisiológica da detecção de DNA por cGAS durante a inflamação intestinal não ser muito clara, a sinalização por IFN-I tem sido demonstrada como crítica para

regulação da função de células epiteliais e linfócitos T (Kole et al., 2013; Lee et al., 2012; Metidji et al., 2015; Tschurtschenthaler et al., 2014). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel do STING como um sensor de CDNs e como um adaptador para detecção de DNA na homeostase intestinal.

A mucosa intestinal abriga também células epiteliais de rápida renovação que estão em constante contato com estímulos externos, como a microbiota (Crosnier et al., 2006). Ambos os componentes, células morrendo e bactérias da microbiota, representam fontes contínuas de DNA livre que pode fornecer estimulação fisiológica às células do sistema imune locais. Estudos em camundongos GF mostraram que esses animais apresentam vários sinais de imaturidade intestinal e imunológica quando comparados com camundongos convencionais, incluindo vilos alongados e lisos e criptas do cólon menores, bem como produção reduzida de muco e SIgA e níveis normais de IgM no soro (Bos, Meeuwse, Wostmann, Pleasants, & Benner, 1988; Nowacki, 1993; Round & Mazmanian, 2009). O papel da camada de muco e da SIgA na homeostase intestinal é bem conhecido. A camada mucosa do intestino promove uma barreira física limitando o contato das bactérias com o epitélio subjacente e a SIgA reduz a penetração das bactérias comensais impedindo a sua adesão ao epitélio (Round & Mazmanian, 2009). Assim, a presença de uma microbiota intestinal normal influencia positivamente respostas imunes e protege contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias induzindo o desenvolvimento de vários mecanismos intestinais e imunoprotetores desde o início da vida. De fato tem sido demonstrado que camundongos GF são altamente susceptíveis a colite induzida por DSS (Maslowski et al., 2009; Round & Mazmanian, 2009). Por outro lado, tem sido demonstrado também que produtos das células imunes como a SIgA podem influenciar a composição de bactérias da microbiota local (Fransen et al., 2015; Suzuki et al., 2004). Esses relatos sugerem que existe um circuito de regulação mútua entre as células imunes e os microrganismos que colonizam a mucosa intestinal. Análises da composição da microbiota em camundongos STING^{-/-} mostraram que a ausência dessa via de sinalização não altera a razão dos filos *Firmicutes* para *Bacteroidetes*. Entretanto, alterações em gêneros específicos de bactérias resultaram em uma mudança significativa na composição do microbioma e em um perfil relacionado à suscetibilidade à inflamação intestinal (Berry & Reinisch, 2013). Um deslocamento

divergente foi observado dentro do filo *Firmicutes*, com uma diminuição, nas fezes de camundongos STING^{-/-}, de *Allobaculum*, um grupo de bactérias que é induzido pelo IFN-I e está relacionado com a redução da produção de IL-17 (Ren et al., 2016). Camundongos STING^{-/-} também apresentaram um aumento do número de bactérias do gênero *Desulfovibrio* (filo *Proteobacteria*), uma bactéria Gram-negativa cuja prevalência tem sido associada à colite ulcerativa (Rowan et al., 2010). Em contrapartida, também foi observada uma redução no número de bactérias *Bifidobacterium* (filo *Actinobacteria*), uma espécie com efeitos anti-inflamatórios mediados por TGF- β e células Treg no intestino (Dong, Yang, & Wang, 2010).

Embora camundongos STING^{-/-} tenham uma microbiota, eles não possuem uma via de sinalização crítica para o DNA e CDNs da microbiota. Muitas espécies da microbiota intestinal produzem dinucleotídeos cíclicos (Rudlaff, 2014) e, portanto, podem ativar o STING. De fato, nossos resultados mostram que camundongos STING^{-/-} apresentam um fenótipo que se assemelha ao observado em camundongos GF. Eles possuem os vilos do intestino delgado mais alongados e com menos pregas, criptas do cólon menores, além de menor produção de MUC1 e MUC2, níveis mais baixos de SIgA e mais elevados de IgM no soro quando comparado aos camundongos C57BL/6 controle. A imaturidade da mucosa intestinal é também compatível com o perfil de IELs em camundongos STING^{-/-}. Como já descrito para camundongos neonatos e GF (Cheroutre et al., 2011; Umesaki et al., 1993), camundongos STING^{-/-} também apresentaram frequência reduzida de todos os subtipos de IEL induzidos (expressando TCR $\alpha\beta$). Os IELs são linfócitos T intercalados no epitélio intestinal como uma primeira linha de manutenção da homeostase intestinal e de proteção imunológica contra patógenos. Eles estão presentes como subpopulações distintas, dependendo do rearranjo do receptor de células T (TCR) que apresentam ($\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$) e da expressão tanto da forma homodimérica ($\alpha\alpha$) ou heterodimérica ($\alpha\beta$) de CD8, bem como da expressão de CD4 (Hoytema van Konijnenburg & Mucida, 2017). Independentemente da expressão de CD4 e CD8, observamos que todos os subconjuntos de IELs expressando o TCR $\alpha\beta$ estavam modulados negativamente e que os IELs expressando TCR $\gamma\delta$ naturais estavam aumentados em frequência na ausência de sinalização de STING. Esse resultado está de acordo com o papel da microbiota na indução de IELs TCR $\alpha\beta$ e também com o seu papel na proteção contra infecções

(Cheroutre et al., 2011). De fato, camundongos STING^{-/-} se mostraram mais susceptíveis a infecção por *Salmonella* do que camundongos C57BL/6 controles, apesar da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana não estarem alteradas em camundongos STING^{-/-}. É provável que a imunidade protetora da mucosa comprometida seja resultado de uma rede de defeitos em vários componentes da função de barreira nesses animais.

O padrão de ILCs em neonatos e camundongos GF é menos explorado. Recentemente essas linhagens de linfócitos inatos, que se pensava serem representadas apenas por células *natural killer* (NK), foram descritas e são agora referidas como ILCs. As ILCs estão preferencialmente localizadas em superfícies de barreira e são importantes para proteção contra patógenos e para a manutenção da homeostase de órgãos. A ativação inapropriada de ILCs tem sido associada à patogênese de distúrbios inflamatórios e autoimunes (Klose & Artis, 2016). Como células indutoras linfoides fetais fazem parte da população ILC3, é esperada uma super-representação desse subconjunto de ILCs nos estágios iniciais de desenvolvimento. Essas ILCs são as primeiras células imunes a povoar a mucosa intestinal no animal neonato (Melo-Gonzalez & Hepworth, 2017). Em consenso com nossa hipótese de que camundongos STING^{-/-} apresentam um perfil imunológico imaturo semelhante a camundongos GF, a frequência de ILC3 estava aumentada nesses camundongos quando comparados com os C57BL/6 controles. Além disso, a análise de frequências de ILCs na mucosa intestinal de camundongos STING^{-/-} e neonatos C57BL/6 controles não mostraram diferença entre os dois grupos sugerindo que o padrão dos STING^{-/-} é, de fato, comparável ao de neonatos. É plausível que a colonização pela microbiota tenha um papel crítico no fornecimento de sinais estimulatórios, como os dinucleotídeos cíclicos, para o desenvolvimento do perfil adulto de ILCs observado em camundongos C57BL/6 selvagens. Por outro lado, camundongos STING^{-/-} apresentaram uma menor frequência de ILC2 quando comparados com camundongos C57BL/6 selvagens, pareados por idade. Foi demonstrado que as ILC2 estão envolvidas na proteção tecidual durante lesão intestinal, como a colite induzida por DSS, limitando a inflamação e promovendo o reparo epitelial através da produção de *Amphiregulin* (Monticelli et al., 2015). A diferenciação dessas células requer IL-25, IL-33 e linfopoietina estromal tímica (TSLP). A indução de *il-33* e *Tslp* está marcadamente diminuída em células *Sting*

knockdown. Além disso, foi demonstrado que o IRF3, o qual é ativado por STING, está envolvido na produção de IL-33 e TSLP e camundongos IRF3^{-/-} também são mais suscetíveis à colite induzida por DSS (Negishi et al., 2012). Nós observamos que a *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-} apresentava menor frequência de ILC2, reduzidos níveis de mRNA para *Amphiregulin* e aumento na frequência de ILC1 e ILC3. Embora ILC3 possa ser protetora em alguns tipos de distúrbios intestinais, foram relatadas respostas prejudiciais de ILC1 e ILC3 em modelos de colite induzida por *Helicobacter hepaticus* ou tratamento com anti-CD40 sendo essas respostas inflamatórias relacionadas a IL-22, IL-17, fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos e / ou atividade de IFN- γ (Buonocore et al., 2010; Song et al., 2015). Além disso, o aumento da frequência de ILC1 é observado em pacientes com doença de Crohn (Bernink et al., 2013). Nossos achados sugerem que o aumento da frequência de ILC1 e ILC3 parece cooperar com a diminuição da ILC2 na *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-} para aumentar sua suscetibilidade à colite. Assim, um equilíbrio na frequência dos subtipos de ILCs no cólon é essencial para manter a homeostase intestinal.

Juntamente com esses mecanismos imunes inatos e adquiridos de manutenção da barreira, a mucosa intestinal aloja subconjuntos distintos de células Tregs que são essenciais para a indução de tolerância imunológica específica a antígenos da dieta e às bactérias intestinais. Sua ausência ou falha em patrulhar a mucosa intestinal leva, por exemplo, à reatividade contra a microbiota comensal e ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal em camundongos e humanos (Izcue, Coombes, & Powrie, 2006; M. Sun, He, Cong, & Liu, 2015). Um importante regulador das células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ são os IFNs-I. A ausência de sinalização de IFNAR em células imunes inatas resulta em expansão e manutenção reduzidas de Tregs Foxp3⁺ no intestino, levando à proliferação de células efetoras Th1 e Th17 no cólon inflamado (Kole et al., 2013). Sabe-se que a via de sinalização do STING induz a produção de IFN-I, e confirmamos, neste estudo, que camundongos STING^{-/-} produzem níveis significativamente mais baixos de mRNA de *IFN- β* no cólon quando comparados aos camundongos C57BL/6 selvagens. Consistente com os efeitos dos IFNs-I na expansão e manutenção de células Tregs, observamos que a frequência de células Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ estava reduzida nos mLNs e a frequência de Tregs CD4⁺ LAP⁺ produtores de TGF- β estava reduzida na *lamina*

propria do cólon e nos mLNs de camundongos STING^{-/-} quando comparados com os seus controles. Além disso, a ausência de sinalização de STING também interferiu com a função das células Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, uma vez que elas foram menos eficientes na supressão da proliferação de células T *in vitro* e na prevenção da indução de colite quando co-transferidas com células T CD4⁺ *naive* para camundongos RAG^{-/-}. Especulamos que as alterações observadas nas células Treg de camundongos STING^{-/-} foram devidas aos níveis mais baixos de IFN-I nesses animais; no entanto, não podemos descartar a possibilidade de que o STING esteja interferindo no desenvolvimento e na função de Tregs de maneira independente de IFN-I. Por outro lado, o papel crítico do IFN-β na manutenção da homeostase intestinal e na proteção contra a inflamação foi ressaltado no presente estudo pela suscetibilidade aumentada de ambos camundongos STING^{-/-} e IFNα/βR^{-/-} à indução de colite por DSS.

Curiosamente, células reguladoras e citocinas se encontravam alteradas diferencialmente nos mLNs e na *lamina propria* do cólon de camundongos STING^{-/-}. Células Tregs CD4⁺ LAP⁺ e os níveis de TGF-β estavam reduzidos no cólon e nos mLNs, enquanto que as células Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e a produção de IL-10 estavam reduzidas apenas nos mLNs. Os mLNs analisados nessa parte do trabalho correspondem aos mLNs da cadeia principal, isto é D-mLN, J-mLN e I-mLN, que drenam apenas o intestino delgado e não o cólon. Como visto na primeira parte deste trabalho, vários fatores imuno-reguladores são ativados nos diferentes mLNs de acordo com os microambientes intestinais que eles drenam. Também é plausível que outras moléculas de sinalização para estímulos relevantes da microbiota, incluindo o DNA (como TLR9, AIM2 e outros), também estejam diferencialmente expressas ao longo da mucosa intestinal, exercendo papéis complementares na transmissão de sinais do microbioma para a diferenciação adequada de células reguladoras, tais como células produtoras de IL-10.

A sinalização de STING também pode ativar o fator de transcrição NF-κB, que induz a transcrição de muitos genes, incluindo de mucinas. O NF-κB induz a produção de MUC2 por células epiteliais do cólon em humanos (D. H. Ahn et al., 2005; Ishinaga et al., 2005) e por linhas celulares epiteliais humanas em cooperação com a via de sinalização TGF-β-Smad (Jono et al., 2002). Embora não tenha sido avaliado neste trabalho a ativação de NF-κB, está bem descrito que a via de

sinalização da STING induz a translocação do NF- κ B para o núcleo da célula (Burdette & Vance, 2013; Ishikawa & Barber, 2008; W. Sun et al., 2009). Além disso, observamos níveis mais baixos de TGF- β no cólon de camundongos STING^{-/-}, o que sugere que a produção reduzida de MUC2 observada nesses animais pode ser devida a um efeito aditivo de fraca ativação de NF- κ B e baixos níveis de TGF- β na mucosa intestinal. MUC2 também é capaz de induzir a produção de IL-10 e TGF- β pelas DCs tolerogênicas envolvidas na indução de células Treg (Shan et al., 2013). Assim, uma camada de muco denso no intestino grosso previne a inflamação não apenas protegendo o epitélio subjacente das bactérias e antígenos alimentares, mas também pela liberação de sinais tolerogênicos. Estudos mostrando que camundongos MUC2^{-/-} desenvolvem inflamação espontânea do cólon ressaltam o papel crítico da MUC2 na homeostase intestinal (Velcich et al., 2002).

STING e CDNs são altamente conservadas durante a evolução, sendo observados >500 milhões de anos atrás, no antepassado comum do ser humano e Cnidaria (Kranzusch et al., 2015). CDNs são moléculas de sinalização de mensageiros secundários produzidos por diversas espécies bacterianas, incluindo as da microbiota intestinal comensal (Romling, 2008; Rudlaff, 2014), e também são sintetizados por cGAS no citosol após ligação de dsDNA. As características modernas da imunidade inata apareceram mais tarde na evolução do que a ligação STING-CDNs, sugerindo que a via STING-CDNs pode ter uma outra função além de seu papel na defesa do hospedeiro contra patógenos. Nossa hipótese é que os CDNs da microbiota detectados por STING podem atuar induzindo um tônus fisiológico de ativação para mecanismos protetores envolvidos na homeostase intestinal. É possível que os 3'3'CDNs tenham evoluído se tornando um agonista de STING menos potente em mamíferos, mantendo a homeostase intestinal sem iniciar uma resposta imune contra a microbiota. Durante a infecção por patógenos, no entanto, o STING seria fortemente ativado pelo cGAMP 2',3' produzido pelo cGAS, um agonista do STING mais potente (X. Zhang et al., 2013), e uma resposta imune inflamatória adequada contra o patógeno seria desencadeada. Esta hipótese entretanto merece uma investigação mais aprofundada.

O adaptador citosólico STING possui importante função na defesa do hospedeiro contra patógenos e em doenças autoimunes; no entanto, seu papel na homeostase intestinal tem sido amplamente desconhecido. Este estudo revela que

STING pode ser ativado por DNA presente no conteúdo fecal, e que essa molécula adaptadora tem uma função crítica no desenvolvimento de mecanismos protetores do intestino, como produção de muco e SIgA, no equilíbrio de subtipos de ILCs e na atividade de células Treg na mucosa intestinal. Como consequência, os camundongos STING^{-/-} apresentaram maior suscetibilidade à colite induzida por DSS e à colite induzida por células T, bem como à infecção entérica. Dessa forma, os nossos dados mostram que o STING é uma importante molécula de sinalização envolvida na homeostase intestinal e também pode servir como um alvo terapêutico para a regulação da inflamação intestinal.

6. CONCLUSÕES

Este estudo abordou as respostas imunes nos diferentes microambientes do intestino bem como o papel de um dos sensores presentes na mucosa intestinal para sinais da microbiota intestinal. Fomos capazes de observar que a manutenção da homeostase intestinal pode ser alcançada de duas maneiras distintas: através da compartimentalização das respostas imunes específicas a cada microambiente intestinal distinto, e pelos sensores imunológicos dos componentes presentes no ambiente intestinal. A microbiota aumenta em quantidade ao longo do intestino, fazendo da sua parte distal, principalmente do cólon, um microambiente diferente da parte proximal do intestino, afetando assim as respostas imunes direcionadas a este local. O STING, demonstrado por este estudo como um sensor de produtos liberados pela microbiota, papel aqui demonstrado amplamente no cólon, se mostrou crucial para a homeostase intestinal. Distúrbios dos microambientes intestinais bem como a ausência de sensores destes ambientes, neste caso do STING, influenciam as respostas imunes nestes locais e podem levar a condições inflamatórias e susceptibilidades a doenças.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams, G. D., Bauer, H., & Sprinz, H. (1963). Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest*, *12*, 355-364.
- 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. *Clin Exp Immunol*, *136*(1), 40-48. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02400.x
- Aguiar, S. L. F., Miranda, M. C. G., Guimaraes, M. A. F., Santiago, H. C., Queiroz, C. P., Cunha, P. D. S., . . . Faria, A. M. C. (2017). High-Salt Diet Induces IL-17-Dependent Gut Inflammation and Exacerbates Colitis in Mice. *Front Immunol*, *8*, 1969. doi: 10.3389/fimmu.2017.01969
- Ahn, D. H., Crawley, S. C., Hokari, R., Kato, S., Yang, S. C., Li, J. D., & Kim, Y. S. (2005). TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation. *Cell Physiol Biochem*, *15*(1-4), 29-40. doi: 10.1159/000083636
- Ahn, J., Konno, H., & Barber, G. N. (2015). Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer. *Oncogene*, *34*(41), 5302-5308. doi: 10.1038/onc.2014.457
- Anderson, J. A. (1997). Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. *Am Fam Physician*, *56*(5), 1365-1374.
- Artis, D., & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, *517*(7534), 293-301. doi: 10.1038/nature14189
- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., . . . Honda, K. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*, *163*(2), 367-380. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., . . . Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, *331*(6015), 337-341. doi: 10.1126/science.1198469
- Ayres, J. S., Trinidad, N. J., & Vance, R. E. (2012). Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nat Med*, *18*(5), 799-806. doi: 10.1038/nm.2729

nm.2729 [pii]

- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, *307*(5717), 1915-1920. doi: 10.1126/science.1104816
- Balmer, M. L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M. A., Hapfelmeier, S., Miele, L., . . . Macpherson, A. J. (2014). The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*, *6*(237), 237ra266. doi: 10.1126/scitranslmed.3008618
- Barber, G. N. (2011a). Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol Rev*, *243*(1), 99-108. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x
- Barber, G. N. (2011b). STING-dependent signaling. *Nat Immunol*, *12*(10), 929-930. doi: 10.1038/ni.2118
- Barber, G. N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, *15*(12), 760-770. doi: 10.1038/nri3921
- Baumgart, D. C., & Carding, S. R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, *369*(9573), 1627-1640. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60750-8
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, *157*(1), 121-141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
- Benveniste, J., Lespinats, G., & Salomon, J. (1971). Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *J Immunol*, *107*(6), 1656-1662.
- Bernier-Latmani, J., & Petrova, T. V. (2017). Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *14*(9), 510-526. doi: 10.1038/nrgastro.2017.79
- Bernink, J. H., Peters, C. P., Munneke, M., te Velde, A. A., Meijer, S. L., Weijer, K., . . . Spits, H. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*, *14*(3), 221-229. doi: 10.1038/ni.2534
- Berry, D., & Reinisch, W. (2013). Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *27*(1), 47-58. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.005

- Bhat, N., & Fitzgerald, K. A. (2014). Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors. *Eur J Immunol*, 44(3), 634-640. doi: 10.1002/eji.201344127
- Bienenstock, J., & Befus, A. D. (1980). Mucosal immunology. *Immunology*, 41(2), 249-270.
- Bik, E. M. (2009). Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr Rev*, 67 Suppl 2, S164-171. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00237.x
- Bilate, A. M., & Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*, 30, 733-758. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075043
- Bos, N. A., Meeuwse, C. G., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R., & Benner, R. (1988). The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell Immunol*, 112(2), 371-380.
- Bouma, G., & Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 3(7), 521-533. doi: 10.1038/nri1132
- Bousquet, J., & Michel, F. B. (1992). International consensus report on diagnosis and management of asthma. *Allergy*, 47(2 Pt 2), 129-132.
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Mayassi, T., . . . Jabri, B. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, 356(6333), 44-50. doi: 10.1126/science.aah5298
- Brandtzaeg, P. (1998). Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev*, 56(1 Pt 2), S5-18.
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*, 70(6), 505-515. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*, 34(5), 525-527. doi: 10.1038/nbt.3519

- Bufe, A. (1998). The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int Arch Allergy Immunol*, 117(4), 215-219. doi: 10.1159/000024013
- Bunker, J. J., Erickson, S. A., Flynn, T. M., Henry, C., Koval, J. C., Meisel, M., . . . Bendelac, A. (2017). Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science*, 358(6361). doi: 10.1126/science.aan6619
- Bunker, J. J., Flynn, T. M., Koval, J. C., Shaw, D. G., Meisel, M., McDonald, B. D., . . . Bendelac, A. (2015). Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity*, 43(3), 541-553. doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.007
- Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I., Littman, D. R., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, 464(7293), 1371-1375. doi: 10.1038/nature08949
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., . . . Vance, R. E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 478(7370), 515-518. doi: 10.1038/nature10429
- Burdette, D. L., & Vance, R. E. (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol*, 14(1), 19-26. doi: 10.1038/ni.2491
- Canesso, M. C., Vieira, A. T., Castro, T. B., Schirmer, B. G., Cisalpino, D., Martins, F. S., . . . Barcelos, L. S. (2014). Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. *J Immunol*, 193(10), 5171-5180. doi: 10.4049/jimmunol.1400625
- Carter, P. B., & Collins, F. M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med*, 139(5), 1189-1203.
- Cazac, B. B., & Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*, 13(4), 443-451.
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*, 69(5), 1046S-1051S.
- Chehade, M., & Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, 115(1), 3-12; quiz 13. doi: 10.1016/j.jaci.2004.11.008

- Chen, M. L., Yan, B. S., Bando, Y., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, *180*(11), 7327-7337.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., & Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, *11*(7), 445-456. doi: 10.1038/nri3007
- Chirido, F. G., Millington, O. R., Beacock-Sharp, H., & Mowat, A. M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol*, *35*(6), 1831-1840. doi: 10.1002/eji.200425882
- Cho, H., & Kelsall, B. L. (2014). The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation. *Immunol Rev*, *260*(1), 145-167. doi: 10.1111/imr.12195
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, *204*(8), 1757-1764. doi: 10.1084/jem.20070590
- Cording, S., Wahl, B., Kulkarni, D., Chopra, H., Pezoldt, J., Buettner, M., . . . Pabst, O. (2014). The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes. *Mucosal Immunol*, *7*(2), 359-368. doi: 10.1038/mi.2013.54
- Crabbe, P. A., Bazin, H., Eyssen, H., & Heremans, J. F. (1968). The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, *34*(4), 362-375.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, *7*(5), 349-359. doi: 10.1038/nrg1840
- Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., & Lafaille, J. J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*, *29*(1), 114-126. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.010

- Danilchanka, O., & Mekalanos, J. J. (2013). Cyclic dinucleotides and the innate immune response. *Cell*, *154*(5), 962-970. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.014
- Davies, M. D., & Parrott, D. M. (1981). Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut*, *22*(6), 481-488.
- Diefenbach, A., Colonna, M., & Koyasu, S. (2014). Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*, *41*(3), 354-365. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.005
- Diehl, G. E., Longman, R. S., Zhang, J. X., Breart, B., Galan, C., Cuesta, A., . . . Littman, D. R. (2013). Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature*, *494*(7435), 116-120. doi: 10.1038/nature11809
- Dobbs, N., Burnaevskiy, N., Chen, D., Gonugunta, V. K., Alto, N. M., & Yan, N. (2015). STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell Host Microbe*, *18*(2), 157-168. doi: 10.1016/j.chom.2015.07.001
- Dong, P., Yang, Y., & Wang, W. P. (2010). The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Hum Dev*, *86*(1), 51-58. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.002
- Durai, V., & Murphy, K. M. (2016). Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*, *45*(4), 719-736. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.010
- Eberl, G. (2010). A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol*, *3*(5), 450-460. doi: 10.1038/mi.2010.20
- Eisenhoffer, G. T., Loftus, P. D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C. B., Morcos, P. A., & Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, *484*(7395), 546-549. doi: 10.1038/nature10999
- Esterhazy, D., Canesso, M. C. C., Muller, P. A., Lockhart, A., Mesin, L., Faria, A. M., & Mucida, D. (2018). Compartmentalized lymph node drainage dictates intestinal adaptive immune responses. *BioRxiv 299628 (Preprint)*(Available from: doi: <https://doi.org/10.1101/299628>). doi: Available from: doi: <https://doi.org/10.1101/299628>

- Esterhazy, D., Loschko, J., London, M., Jove, V., Oliveira, T. Y., & Mucida, D. (2016). Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance. *Nat Immunol*, *17*(5), 545-555. doi: 10.1038/ni.3408
- Faria, A. M., 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-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*, *20*(2), 135-145.
- Faria, A. M., & Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev*, *206*, 232-259. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x
- Faria, A. M., & Weiner, H. L. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*, *13*(2-4), 143-157. doi: U608745454W48W74 [pii] 10.1080/17402520600876804
- Faria, A. M. C., Reis, B. S., & Mucida, D. (2017). Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *J Exp Med*, *214*(5), 1211-1226. doi: 10.1084/jem.20162014
- Ferguson, L. R., Peterman, I., Hubner, C., Philpott, M., & Shellin, A. N. (2007). Uncoupling gene-diet interactions in inflammatory bowel disease (IBD). *Genes Nutr*, *2*(1), 71-73. doi: 10.1007/s12263-007-0012-y
- Ferguson, L. R., Shelling, A. N., Browning, B. L., Huebner, C., & Petermann, I. (2007). Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res*, *622*(1-2), 70-83. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.05.011
- Fonseca, D. M., Hand, T. W., Han, S. J., Gerner, M. Y., Glatman Zaretsky, A., Byrd, A. L., . . . Belkaid, Y. (2015). Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. *Cell*, *163*(2), 354-366. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.030
- Fransen, F., Zagato, E., Mazzini, E., Fosso, B., Manzari, C., El Aidy, S., . . . Rescigno, M. (2015). BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity*, *43*(3), 527-540. doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.011

- Friswell, M., Campbell, B., & Rhodes, J. (2010). The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver*, 4(3), 295-306. doi: 10.5009/gnl.2010.4.3.295
- Fukata, M., & Arditi, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*, 6(3), 451-463. doi: 10.1038/mi.2013.13
- Fuleihan, R. L. (1998). Allergy, immunology, and related disorders. *Curr Opin Pediatr*, 10(6), 581-583.
- Gall, A., Treuting, P., Elkon, K. B., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Barber, G. N., & Stetson, D. B. (2012). Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity*, 36(1), 120-131. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.018
- Gallo, R. L., & Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*, 12(7), 503-516. doi: 10.1038/nri3228
- Gautreaux, M. D., Deitch, E. A., & Berg, R. D. (1994). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infect Immun*, 62(5), 2132-2134.
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., . . . Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355-1359. doi: 10.1126/science.1124234
- Gleich, G. J., & Kita, H. (1997). Bronchial asthma: lessons from murine models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6), 2101-2102.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., . . . Menetrier-Caux, C. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, 69(5), 2000-2009. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2360
- Gomes-Santos, A. C., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., Cruz, D. N., . . . Faria, A. M. (2012). New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol*, 2012, 560817. doi: 10.1155/2012/560817
- 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. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.016

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., . . . Ishikawa, H. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol*, 168(1), 57-64.

Hammerschmidt, S. I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., & Pabst, O. (2008). Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med*, 205(11), 2483-2490. doi: 10.1084/jem.20080039

Hapfelmeier, S., Lawson, M. A., Slack, E., Kirundi, J. K., Stoel, M., Heikenwalder, M., . . . Macpherson, A. J. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science*, 328(5986), 1705-1709. doi: 10.1126/science.1188454

Hartlova, A., Erttmann, S. F., Raffi, F. A., Schmalz, A. M., Resch, U., Anugula, S., . . . Gekara, N. O. (2015). DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity*, 42(2), 332-343. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.012

He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., . . . Cerutti, A. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*, 26(6), 812-826. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.014

Hofmann, S. R., Rosen-Wolff, A., Tsokos, G. C., & Hedrich, C. M. (2012). Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin Immunol*, 143(2), 116-127. doi: 10.1016/j.clim.2012.02.005

Holgate, S. T. (1999). The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402(6760 Suppl), B2-4.

Honda, K., & Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75-84. doi: 10.1038/nature18848

Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.

- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273. doi: 10.1126/science.1223490
- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*, 10(3), 159-169. doi: 10.1038/nri2710
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061. doi: 10.1126/science.1079490
- Houston, S. A., Cerovic, V., Thomson, C., Brewer, J., Mowat, A. M., & Milling, S. (2016). The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol*, 9(2), 468-478. doi: 10.1038/mi.2015.77
- Hoyler, T., Klose, C. S., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E. L., . . . Diefenbach, A. (2012). The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity*, 37(4), 634-648. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.020
- Hoytema van Konijnenburg, D. P., & Mucida, D. (2017). Intraepithelial lymphocytes. *Curr Biol*, 27(15), R737-R739. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.073
- Hu, G. Q., Song, P. X., Li, N., Chen, W., Lei, Q. Q., Yu, S. X., . . . Yang, Y. J. (2016). AIM2 contributes to the maintenance of intestinal integrity via Akt and protects against *Salmonella* mucosal infection. *Mucosal Immunol*, 9(5), 1330-1339. doi: 10.1038/mi.2015.142
- Hu, S., Peng, L., Kwak, Y. T., Tekippe, E. M., Pasare, C., Malter, J. S., . . . Zaki, M. H. (2015). The DNA Sensor AIM2 Maintains Intestinal Homeostasis via Regulation of Epithelial Antimicrobial Host Defense. *Cell Rep*, 13(9), 1922-1936. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.040
- Huber, S., Gagliani, N., & Flavell, R. A. (2012). Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *Eur J Immunol*, 42(9), 2238-2245. doi: 10.1002/eji.201242619
- Hwang, J. M., & Varma, M. G. (2008). Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 14(17), 2678-2690.
- Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytniuk, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., . . . Steinman, R. M. (2013). Specialized role of migratory dendritic cells in

- peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*, 123(2), 844-854. doi: 10.1172/JCI65260
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 455(7213), 674-678. doi: 10.1038/nature07317
- Ishikawa, H., Ma, Z., & Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265), 788-792. doi: 10.1038/nature08476
- Ishinaga, H., Takeuchi, K., Kishioka, C., Suzuki, S., Basbaum, C., & Majima, Y. (2005). Pranlukast inhibits NF-kappaB activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells. *Pharmacology*, 73(2), 89-96. doi: 10.1159/000081294
- Ivanov, I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., . . . Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3), 485-498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., . . . Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 36-49. doi: 10.1038/nri3581
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. (2006). Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*, 212, 256-271. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00423.x
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol*, 27, 313-338. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132657
- Jain, N., & Walker, W. A. (2015). Diet and host-microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(1), 14-25. doi: 10.1038/nrgastro.2014.153
- Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M. C., . . . Rieux-Laucat, F. (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a

- familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest*, 124(12), 5516-5520. doi: 10.1172/JCI79100
- Jin, L., Waterman, P. M., Jonscher, K. R., Short, C. M., Reisdorph, N. A., & Cambier, J. C. (2008). MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol*, 28(16), 5014-5026. doi: 10.1128/MCB.00640-08
- Johansson, M. E., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15064-15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105
- Jono, H., Shuto, T., Xu, H., Kai, H., Lim, D. J., Gum, J. R., Jr., . . . Li, J. D. (2002). Transforming growth factor-beta -Smad signaling pathway cooperates with NF-kappa B to mediate nontypeable Haemophilus influenzae-induced MUC2 mucin transcription. *J Biol Chem*, 277(47), 45547-45557. doi: 10.1074/jbc.M206883200
- Kasprovicz, D. J., Smallwood, P. S., Tyznik, A. J., & Ziegler, S. F. (2003). Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol*, 171(3), 1216-1223.
- Katakura, K., Lee, J., Rachmilewitz, D., Li, G., Eckmann, L., & Raz, E. (2005). Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*, 115(3), 695-702. doi: 10.1172/JCI22996
- Kawada, M., Arihiro, A., & Mizoguchi, E. (2007). Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 13(42), 5581-5593.
- Kay, A. B. (2000). Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *Br Med Bull*, 56(4), 843-864.
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317. doi: 10.1038/nature10209
- Kiesler, P., Fuss, I. J., & Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(2), 154-170. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006

- Kim, K. S., Hong, S. W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B. G., . . . Surh, C. D. (2016). Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science*, *351*(6275), 858-863. doi: 10.1126/science.aac5560
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*, *12*(5), 319-330. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2
- Kitajima, S., Takuma, S., & Morimoto, M. (1999). Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci*, *61*(1), 67-70.
- Klose, C. S., & Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol*, *17*(7), 765-774. doi: 10.1038/ni.3489
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., . . . Hibi, T. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, *57*(12), 1682-1689. doi: 10.1136/gut.2007.135053
- Kole, A., He, J., Rivollier, A., Silveira, D. D., Kitamura, K., Maloy, K. J., & Kelsall, B. L. (2013). Type I IFNs regulate effector and regulatory T cell accumulation and anti-inflammatory cytokine production during T cell-mediated colitis. *J Immunol*, *191*(5), 2771-2779. doi: 10.4049/jimmunol.1301093
- Koloski, N. A., Bret, L., & Radford-Smith, G. (2008). Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol*, *14*(2), 165-173.
- Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., Matsumoto, S., Hashimoto, Y., Obana, S., . . . et al. (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(13), 6147-6151.
- Koppe, U., Hogner, K., Doehn, J. M., Muller, H. C., Witzentrath, M., Gutbier, B., . . . Opitz, B. (2012). *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol*, *188*(2), 811-817. doi: 10.4049/jimmunol.1004143
- Kranzusch, P. J., Wilson, S. C., Lee, A. S., Berger, J. M., Doudna, J. A., & Vance, R. E. (2015). Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal

2',3' cGAMP Signaling. *Mol Cell*, 59(6), 891-903. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.022

- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., & Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol*, 12(8), 1145-1155.
- Leach, M. W., Bean, A. G., Mauze, S., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1996). Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *Am J Pathol*, 148(5), 1503-1515.
- Lee, S. E., Li, X., Kim, J. C., Lee, J., Gonzalez-Navajas, J. M., Hong, S. H., . . . Raz, E. (2012). Type I interferons maintain Foxp3 expression and T-regulatory cell functions under inflammatory conditions in mice. *Gastroenterology*, 143(1), 145-154. doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.042
- Levine, M. M. (2010). Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biol*, 8, 129. doi: 10.1186/1741-7007-8-129
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 24, 99-146. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737
- MacDonald, T. T. (1995). Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 102(3), 445-447.
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., . . . Mackay, C. R. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*, 6, 6734. doi: 10.1038/ncomms7734
- Macpherson, A. J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 288(5474), 2222-2226.

- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4(6), 478-485. doi: 10.1038/nri1373
- Maizels, R. M., & McSorley, H. J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*, 138(3), 666-675. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.007
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306. doi: 10.1038/nature10208
- Manzanillo, P. S., Shiloh, M. U., Portnoy, D. A., & Cox, J. S. (2012). Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*, 11(5), 469-480. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.007
- Marino, E., Richards, J. L., McLeod, K. H., Stanley, D., Yap, Y. A., Knight, J., . . . Mackay, C. R. (2017). Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol*, 18(5), 552-562. doi: 10.1038/ni.3713
- Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*, 12(1), 5-9. doi: ni0111-5 [pii] 10.1038/ni0111-5
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., . . . Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461(7268), 1282-1286. doi: 10.1038/nature08530
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107-118. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453(7195), 620-625. doi: nature07008 [pii] 10.1038/nature07008
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaelsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice:

- correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(6), G1328-1338. doi: 00467.2004 [pii]
10.1152/ajpgi.00467.2004
- Melo-Gonzalez, F., & Hepworth, M. R. (2017). Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology*, 150(3), 265-275. doi: 10.1111/imm.12697
- Menezes, J. S., Mucida, D. S., Cara, D. C., Alvarez-Leite, J. I., Russo, M., Vaz, N. M., & de Faria, A. M. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*, 15(3), 447-455.
- Mengel, J., Cardillo, F., Aroeira, L. S., Williams, O., Russo, M., & Vaz, N. M. (1995). Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol Lett*, 48(2), 97-102.
- Metidji, A., Rieder, S. A., Glass, D. D., Cremer, I., Puskosdy, G. A., & Shevach, E. M. (2015). IFN-alpha/beta receptor signaling promotes regulatory T cell development and function under stress conditions. *J Immunol*, 194(9), 4265-4276. doi: 10.4049/jimmunol.1500036
- Molenaar, R., Greuter, M., van der Marel, A. P., Roozendaal, R., Martin, S. F., Edele, F., . . . Mebius, R. E. (2009). Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. *J Immunol*, 183(10), 6395-6402. doi: 10.4049/jimmunol.0900311
- Monticelli, L. A., Osborne, L. C., Noti, M., Tran, S. V., Zaiss, D. M., & Artis, D. (2015). IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(34), 10762-10767. doi: 10.1073/pnas.1509070112
- Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Sci Am*, 245(5), 154-158, 160, 162 et passiom.
- Moreira, T. G., Horta, L. S., Gomes-Santos, A. C., Oliveira, R. P., Queiroz, N., Mangani, D., . . . Faria, A. M. C. (2018). CLA-supplemented diet accelerates experimental colorectal cancer by inducing TGF-beta-producing macrophages and T cells. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/s41385-018-0090-8
- Morrissey, P. J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D., & Watson, J. D. (1993). CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease

- development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med*, 178(1), 237-244.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 331-341.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 667-685. doi: 10.1038/nri3738
- Mowat, A. M., Faria, A. M., & Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance: basic mechanisms and clinical implications. *Mucosal Immunol*, 487-538.
- 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), 105-113.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., & Curotto de Lafaille, M. A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*, 115(7), 1923-1933. doi: 10.1172/JCI24487
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317(5835), 256-260. doi: 10.1126/science.1145697
- Mukai, K., Karasuyama, H., Kabashima, K., Kubo, M., & Galli, S. J. (2017). Differences in the Importance of Mast Cells, Basophils, IgE, and IgG versus That of CD4(+) T Cells and ILC2 Cells in Primary and Secondary Immunity to *Strongyloides venezuelensis*. *Infect Immun*, 85(5). doi: 10.1128/IAI.00053-17
- Murthy, A. K., Dubose, C. N., Banas, J. A., Coalson, J. J., & Arulanandam, B. P. (2006). Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21(9), 1372-1380. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04312.x
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., & Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*, 172(2), 834-842.
- Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., . . . Taniguchi, T. (2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal

- homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51), 21016-21021. doi: 10.1073/pnas.1219482110
- Ngan, J., & Kind, L. S. (1978). Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol*, 120(3), 861-865.
- Ni, J., Chen, S. F., & Hollander, D. (1996). Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*, 39(2), 234-241.
- Nowacki, M. R. (1993). Cell proliferation in colonic crypts of germ-free and conventional mice--preliminary report. *Folia Histochem Cytobiol*, 31(2), 77-81.
- O'Neill, L. A. (2013). Immunology. Sensing the dark side of DNA. *Science*, 339(6121), 763-764. doi: 10.1126/science.1234724
- Oida, T., & Weiner, H. L. (2010). TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One*, 5(11), e15523. doi: 10.1371/journal.pone.0015523
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702. doi: S0016508590000725 [pii]
- Paul, G., Khare, V., & Gasche, C. (2012). Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest*, 42(1), 95-109. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02552.x
- Pereira, P., Forni, L., Larsson, E. L., Cooper, M., Heusser, C., & Coutinho, A. (1986). Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol*, 16(6), 685-688. doi: 10.1002/eji.1830160616
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 141-153. doi: 10.1038/nri3608
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., . . . Phillipson, M. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(2), G327-333. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2010

- Pezoldt, J., Pasztoi, M., Zou, M., Wiechers, C., Beckstette, M., Thierry, G. R., . . . Huehn, J. (2018). Neonatally imprinted stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells in mesenteric lymph nodes. *Nat Commun*, 9(1), 3903. doi: 10.1038/s41467-018-06423-7
- Pimentel, H., Bray, N. L., Puente, S., Melsted, P., & Pachter, L. (2017). Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat Methods*, 14(7), 687-690. doi: 10.1038/nmeth.4324
- Pleasants, J. E. (1974). Letter: Legislation--the solution to a dilemma. *J Oral Surg*, 32(3), 166.
- Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., & Koltun, W. A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*, 140(1), 12-19. doi: S0022-4804(06)00425-2 [pii] 10.1016/j.jss.2006.07.050
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., & Coffman, R. L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, 1(7), 553-562.
- Pyzik, M., & Piccirillo, C. A. (2007). TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol*, 82(2), 335-346. doi: 10.1189/jlb.1006644
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Takabayashi, K., Hayashi, T., Leider-Trejo, L., Lee, J., . . . Raz, E. (2002). Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, 122(5), 1428-1441.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002
- Randolph, G. J., Ivanov, S., Zinselmeyer, B. H., & Scallan, J. P. (2017). The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu Rev Immunol*, 35, 31-52. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055354
- Ren, W., Chen, S., Zhang, L., Liu, G., Hussain, T., Hao, X., . . . Yin, Y. (2016). Interferon Tau Affects Mouse Intestinal Microbiota and Expression of IL-17. *Mediators Inflamm*, 2016, 2839232. doi: 10.1155/2016/2839232

- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., . . . Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2(4), 361-367. doi: 10.1038/86373
- Rodda, L. B., Lu, E., Bennett, M. L., Sokol, C. L., Wang, X., Luther, S. A., . . . Cyster, J. G. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity*, 48(5), 1014-1028 e1016. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.006
- Romling, U. (2008). Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci Signal*, 1(33), pe39. doi: 10.1126/scisignal.133pe39
- Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., & Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, 182, 68-79.
- Roosendaal, R., & Mebius, R. E. (2011). Stromal cell-immune cell interactions. *Annu Rev Immunol*, 29, 23-43. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101357
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(5), 313-323. doi: 10.1038/nri2515
- Rowan, F., Docherty, N. G., Murphy, M., Murphy, B., Calvin Coffey, J., & O'Connell, P. R. (2010). *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*, 53(11), 1530-1536. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181f1e620
- Rudlaff, M. R. W., M.C. (2014). What is the role of cyclic di-GMP signaling within the human gut microbiome? *Microbiome Science and Medicine*, 1(1), 39-44. doi: 10.2478/micsm-2014-0001
- Russo, M., Nahori, M. A., Lefort, J., Gomes, E., de Castro Keller, A., Rodriguez, D., . . . Vargaftig, B. B. (2001). Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(5), 518-526. doi: 10.1165/ajrcmb.24.5.4320
- Sampson, H. A. (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 103(5 Pt 1), 717-728.
- Sano, T., Huang, W., Hall, J. A., Yang, Y., Chen, A., Gavzy, S. J., . . . Littman, D. R. (2015). An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to

Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell*, 163(2), 381-393. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.061

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J., . . . Farber, D. L. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*, 38(1), 187-197. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.020

Sauer, J. D., Sotelo-Troha, K., von Moltke, J., Monroe, K. M., Rae, C. S., Brubaker, S. W., . . . Vance, R. E. (2011). The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun*, 79(2), 688-694. doi: 10.1128/IAI.00999-10

Saxon, A., & Diaz-Sanchez, D. (2005). Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat Immunol*, 6(3), 223-226. doi: 10.1038/ni0305-223

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*, 342(6157), 447-453. doi: 10.1126/science.1237910

Shapiro, G. G., & Stout, J. W. (2002). Childhood asthma in the United States: urban issues. *Pediatr Pulmonol*, 33(1), 47-55.

Shiga, H., Kajjura, T., Shinozaki, J., Takagi, S., Kinouchi, Y., Takahashi, S., . . . Shimosegawa, T. (2012). Changes of faecal microbiota in patients with Crohn's disease treated with an elemental diet and total parenteral nutrition. *Dig Liver Dis*. doi: 10.1016/j.dld.2012.04.014

Shires, J., Theodoridis, E., & Hayday, A. C. (2001). Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalpha+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity*, 15(3), 419-434.

Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2006). 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S470-475. doi: 10.1016/j.jaci.2005.05.048

Siewert, C., Lauer, U., Cording, S., Bopp, T., Schmitt, E., Hamann, A., & Huehn, J. (2008). Experience-driven development: effector/memory-like alphaE+Foxp3+ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J Immunol*, 180(1), 146-155.

- Skeen, M. J., Miller, M. A., Shinnick, T. M., & Ziegler, H. K. (1996). Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J Immunol*, *156*(3), 1196-1206.
- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., . . . Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*, *357*(6353), 802-806. doi: 10.1126/science.aan4834
- Song, C., Lee, J. S., Gilfillan, S., Robinette, M. L., Newberry, R. D., Stappenbeck, T. S., . . . Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J Exp Med*, *212*(11), 1869-1882. doi: 10.1084/jem.20151403
- Sonnenberg, G. F., Monticelli, L. A., Elloso, M. M., Fouser, L. A., & Artis, D. (2011). CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity*, *34*(1), 122-134. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.009
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., . . . Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*, *13*(2), 145-149. doi: 10.1038/nri3365
- Spits, H., & Di Santo, J. P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol*, *12*(1), 21-27. doi: 10.1038/ni.1962
- Strober, W., Fuss, I., & Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, *117*(3), 514-521. doi: 10.1172/JCI30587
- Strugnell, R. A., & Wijnburg, O. L. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol*, *8*(9), 656-667. doi: 10.1038/nrmicro2384
- Sun, L., Miyoshi, H., Origanti, S., Nice, T. J., Barger, A. C., Manieri, N. A., . . . Stappenbeck, T. S. (2015). Type I interferons link viral infection to enhanced epithelial turnover and repair. *Cell Host Microbe*, *17*(1), 85-97. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.004
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, *339*(6121), 786-791. doi: 10.1126/science.1232458

- Sun, M., He, C., Cong, Y., & Liu, Z. (2015). Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol*, 8(5), 969-978. doi: 10.1038/mi.2015.49
- Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., . . . Jiang, Z. (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8653-8658. doi: 10.1073/pnas.0900850106
- Sutherland, D. B., & Fagarasan, S. (2012). IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. *Curr Opin Immunol*, 24(3), 261-268. doi: 10.1016/j.coi.2012.03.005
- Suzuki, K., & Fagarasan, S. (2009). Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. *Mucosal Immunol*, 2(6), 468-471. doi: mi2009107 [pii] 10.1038/mi.2009.107
- Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., & Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 1981-1986. doi: 10.1073/pnas.0307317101
- Tanoue, T., Atarashi, K., & Honda, K. (2016). Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 16(5), 295-309. doi: 10.1038/nri.2016.36
- Taylor, A. W. (2009). Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol*, 85(1), 29-33. doi: 10.1189/jlb.0708415
- Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P. O., Podoplelova, Y., Trejo, A., . . . Garcia, K. C. (2011). Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell*, 146(4), 621-632. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.048
- Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., . . . Kokesova, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*, 93(2-3), 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005
- Tschurtschenthaler, M., Wang, J., Fricke, C., Fritz, T. M., Niederreiter, L., Adolph, T. E., . . . Kaser, A. (2014). Type I interferon signalling in the intestinal epithelium

- affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut*, 63(12), 1921-1931. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305863
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804-810. doi: 10.1038/nature06244
- Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G. E., Kretzer, N. M., Iwata, A., Bagaitkar, J., . . . Murphy, K. M. (2015). Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity*, 42(5), 916-928. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.017
- Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2003). Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest*, 112(5), 648-651. doi: 10.1172/JCI19545
112/5/648 [pii]
- Umesaki, Y., & Setoyama, H. (2000). Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect*, 2(11), 1343-1351.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., & Okada, Y. (1993). Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology*, 79(1), 32-37.
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., . . . Bowie, A. G. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*, 11(11), 997-1004. doi: 10.1038/ni.1932
- Van den Broeck, W., Derore, A., & Simoens, P. (2006). Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods*, 312(1-2), 12-19. doi: 10.1016/j.jim.2006.01.022
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., . . . Einerhand, A. W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117-129. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020

- Vaz, N. M., Maia, L. C., Hanson, D. G., & Lynch, J. M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*, 60(2), 110-115.
- Veenbergen, S., van Berkel, L. A., du Pre, M. F., He, J., Karrich, J. J., Costes, L. M., . . . Samsom, J. N. (2016). Colonic tolerance develops in the iliac lymph nodes and can be established independent of CD103(+) dendritic cells. *Mucosal Immunol*, 9(4), 894-906. doi: 10.1038/mi.2015.118
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., . . . Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science*, 295(5560), 1726-1729. doi: 10.1126/science.1069094
- Vitetta, E. S., Grundke-Iqbal, I., Holmes, K. V., & Uhr, J. W. (1974). Cell surface immunoglobulin. VII. Synthesis, shedding, and secretion of immunoglobulin by lymphoid cells of germ-free mice. *J Exp Med*, 139(4), 862-876.
- Wallach, D., & Kovalenko, A. (2013). How do cells sense foreign DNA? A new outlook on the function of STING. *Mol Cell*, 50(1), 1-2. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.024
- Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182, 207-214.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunol Rev*, 241(1), 241-259. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x
- Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., al-Sabbagh, A., Santos, L., . . . Hafler, D. A. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*, 12, 809-837. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.004113
- Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A., Lamb, J. R., & Maizels, R. M. (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med*, 202(9), 1199-1212. doi: 10.1084/jem.20042572
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., . . . Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*, 203(3), 519-527. doi: 10.1084/jem.20052016

- Xu, M., Pokrovskii, M., Ding, Y., Yi, R., Au, C., Harrison, O. J., . . . Littman, D. R. (2018). c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont. *Nature*, *554*(7692), 373-377. doi: 10.1038/nature25500
- Yang, Y., Torchinsky, M. B., Gobert, M., Xiong, H., Xu, M., Linehan, J. L., . . . Littman, D. R. (2014). Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature*, *510*(7503), 152-156. doi: 10.1038/nature13279
- Yao, J., Lu, Y., Zhi, M., Hu, P., Wu, W., & Gao, X. (2017). Dietary n3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPARgamma/NFAT. *Mol Med Rep*, *16*(6), 8315-8322. doi: 10.3892/mmr.2017.7673
- Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell*, *51*(2), 226-235. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.022
- Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., & Liu, Y. J. (2011). The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*, *12*(10), 959-965. doi: 10.1038/ni.2091
- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y. Y., Li, Y., Diao, F., . . . Shu, H. B. (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*, *29*(4), 538-550. doi: 10.1016/j.immuni.2008.09.003
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*, *238*(1), 247-262. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x
- Zhu, Q., Man, S. M., Gurung, P., Liu, Z., Vogel, P., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2014). Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation. *J Immunol*, *193*(10), 4779-4782. doi: 10.4049/jimmunol.1402051
- Zook, E. C., & Kee, B. L. (2016). Development of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, *17*(7), 775-782. doi: 10.4038/ni.3481

8. ANEXOS

8. ANEXOS

1. Esterhazy D*, **Canesso MCC***, Mesin L, Muller PA, Castro TBR, Lockhart A, ElJalbay M, Faria AMC, Mucida D. Compartmentalized gut lymph nod drainage dictates adaptive immune responses. *Nature*. 2019 Apr15; PubMed PMID:30988509. * These authors contributed equally.
2. **Canesso MCC**, Lemos L, Neves TC, Marim FM, Castro TBR, Veloso ÉS, Queiroz CP, Ahn J, Santiago HC, Cara DC, Silva JA, Martins FS, Ferreira E, Vieira AT, Barber GN, Oliveira SC, Faria AMC. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunol*. 2017 Dec20; PubMed PMID:29346345.

Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses

Daria Esterhazy^{1,4,5*}, Maria C. C. Canesso^{1,2,5}, Luka Mesin³, Paul A. Muller¹, Tiago B. R. de Castro^{1,2}, Ainsley Lockhart¹, Mahmoud ElJalby¹, Ana M. C. Faria² & Daniel Mucida^{1*}

The intestinal immune system has the challenging task of tolerating foreign nutrients and the commensal microbiome, while excluding or eliminating ingested pathogens. Failure of this balance leads to conditions such as inflammatory bowel diseases, food allergies and invasive gastrointestinal infections¹. Multiple immune mechanisms are therefore in place to maintain tissue integrity, including balanced generation of effector T (T_H) cells and FOXP3⁺ regulatory T (pT_{reg}) cells, which mediate resistance to pathogens and regulate excessive immune activation, respectively^{1,4}. The gut-draining lymph nodes (gLNs) are key sites for orchestrating adaptive immunity to luminal perturbations^{5,7}. However, it is unclear how they simultaneously support tolerogenic and inflammatory reactions. Here we show that gLNs are immunologically specific to the functional gut segment that they drain. Stromal and dendritic cell gene signatures and polarization of T cells against the same luminal antigen differ between gLNs, with the proximal small intestine-draining gLNs preferentially giving rise to tolerogenic responses and the distal gLNs to pro-inflammatory T cell responses. This segregation permitted the targeting of distal gLNs for vaccination and the maintenance of duodenal pT_{reg} cell induction during colonic infection. Conversely, the compartmentalized dichotomy was perturbed by surgical removal of select distal gLNs and duodenal infection, with effects on both lymphoid organ and tissue immune responses. Our findings reveal that the conflict between tolerogenic and inflammatory intestinal responses is in part resolved by discrete gLN drainage, and encourage antigen targeting to specific gut segments for therapeutic immune modulation.

Appropriate lymphatic trafficking of immune cells to gLNs is essential for intestinal adaptive immunity^{6,8} (Fig. 1a). Previous studies have mapped drainage to various gLNs along the mouse gut^{9,12}, and described immunological differences between gLNs^{11,13}, but, to our knowledge, the underlying cellular components and functional consequences of gut segment-specific drainage have not been systematically addressed. We sought to understand how compartmentalized lymphatic drainage of the intestinal milieu contributes to distinct immune responses towards luminal antigens. We first imaged the gut lymphatic system using 3D imaging of solvent-cleared tissue stained with an antibody against the lymphatic endothelial cell (LEC) surface marker LYVE-1. En bloc imaging exposed the lymphatic route of the intestine to gLNs via afferent lymphatic vessels in the mesentery (Fig. 1a±c, Extended Data Fig. 1a±c, Supplementary Videos 1±4). The size and shape of individual gLNs differs considerably regardless of the presence or absence of microbiota (Extended Data Fig. 1d, e). Dye injected into individual gLNs did not spread to other gLNs, suggesting that the lymph remains compartmentalized until it reaches the thoracic duct (Extended Data Fig. 1f±i). Injection of dye into the intestinal muscularis confirmed that the gLNs drain different gut segments^{9,12} despite the network-like lymphatic structure in the gut wall (Extended Data Fig. 1j±q, Supplementary Videos 5±7). The progressive shortening of the lymphatic lacteals in the villi along the small intestine

is modulated by the microbiome, as germ-free mice showed lengthened duodenal and shortened ileal lacteals (Extended Data Fig. 2a). To investigate whether the combination of compartmentalized absorption and drainage results in differential nutrient exposure in the gLNs, we tracked the uptake of radiolabelled retinol after feeding; retinol is a lipid-soluble proxy and an immunomodulatory nutrient, and its uptake depends largely on packing into chylomicrons and lymphatic absorption by the upper small intestine (Extended Data Fig. 2b). Most retinol was absorbed in the duodenum with a gradient along the intestine, and this was mirrored in the gLNs (Fig. 1d, e, Extended Data Fig. 2b±g), illustrating that the gLNs are exposed to region-specific lymph composition.

We investigated how compartmentalized drainage affects gLNs on a cellular level. Stromal cells of pooled gLNs were shown to be tolerance-promoting compared to non-intestinal lymph nodes^{14,15}, so we analysed the transcriptomes of two major stromal cell populations, lymphatic endothelial cells (LECs) and fibroblastic reticular cells (FRCs), isolated from duodenal, ileal and caecal-colonic gLNs (D-, I- and C-gLNs, respectively; Extended Data Fig. 3a). Principal component analysis (PCA) indicated that LECs and FRCs showed differential gene expression according to the gut segment the gLNs drained (Fig. 1f). LECs from D-gLNs showed a distinct metabolic signature indicative of elevated cholesterol and lipoprotein handling as well as fatty acid utilization, probably driven by the lipid-rich lymph of the proximal small intestine (Fig. 1g, Extended Data Fig. 3b±d, Supplementary Tables 1±4). FRC gene expression profiles were affected in a more pronounced manner by location, most evidently in immune cell migration and activation pathways, which were upregulated in the C-gLN (Fig. 1h, Extended Data Fig. 3e, Supplementary Tables 5±8). Differences within the small intestine were less extreme, although FRCs from I-gLNs also showed a gene signature associated with leucocyte stimulation (Extended Data Fig. 3f, g).

Because stromal cells may influence the function of antigen-presenting cells (APCs) in gLNs¹⁴, we tested whether gut-segment-specific lymphatic drainage influenced the gene expression profiles of migratory dendritic cells. The two populations of MHCII^{hi} migratory dendritic cells (CD103⁺CD11b⁺ and CD103⁺CD11b⁻ dendritic cells; Extended Data Fig. 3h) are highly represented in gLNs and have been implicated in tolerogenic and pro-inflammatory responses, respectively^{16,17}. PCA revealed that dendritic cells segregated between the small and large intestine, and less so between D-gLNs and I-gLNs (Fig. 2a). Both subsets of dendritic cells showed immunological and metabolic differences according to gLN location (Fig. 2b, c, Extended Data Fig. 3i±n, Supplementary Tables 9±16). Duodenal-gLN dendritic cells showed a less pro-inflammatory signature than their colonic counterparts: D-gLN CD103⁺CD11b⁺ dendritic cells expressed lower levels of inflammatory cytokine receptors and pathways such as interferon or interleukin-1 β (IL-1 β ; Fig. 2b, Extended Data Fig. 3m); and D-gLN CD103⁺CD11b⁺ dendritic cells were specifically enriched for *Ccl22*, which encodes a chemokine associated with migration of T_{reg} cells,

¹Laboratory of Mucosal Immunology, The Rockefeller University, New York, NY, USA. ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³Laboratory of Lymphocyte Dynamics, The Rockefeller University, New York, NY, USA. ⁴Present address: Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, IL, USA. ⁵These authors contributed equally: Daria Esterhazy, Maria C. C. Canesso. *e-mail: desterhazy@bsd.uchicago.edu; mucida@rockefeller.edu

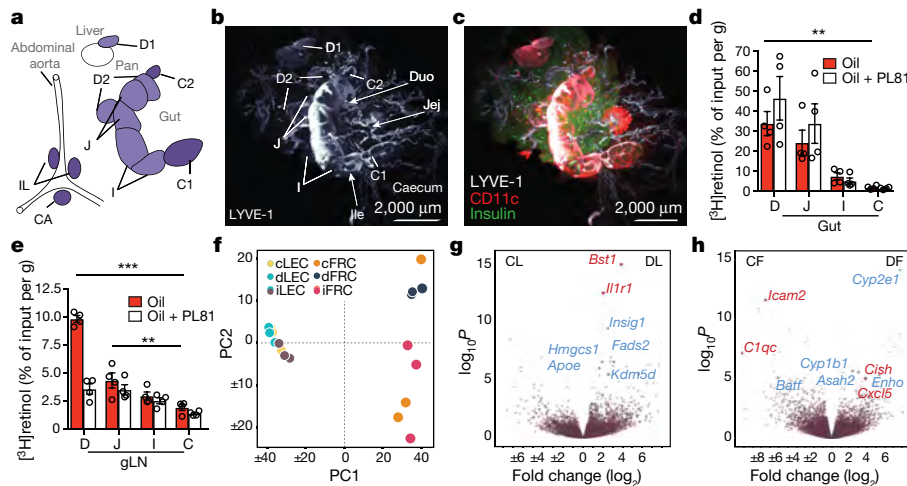


Fig. 1 | The gLNs are metabolically and immunologically unique according to the gut segment drained. **a**, Schematic of gLNs. **b**, **c**, 3D reconstruction of mouse lymphatics (anti-LYVE-1) and position after iDISCO⁺ procedure (see Methods) (**b**), co-stained with anti-GFP (in *Itgax^{Venus}* mice, where GFP is expressed under the *Cd11c* promoter) and anti-insulin (**c**). **d**, **e**, Percentage of [³H]retinol absorption into indicated gut segment (**d**) or gLN (**e**) of mice 3 h after gavage with 1 Ci [³H]retinol in 100 μ l olive oil with or without pre-treatment with 5 μ l chylomicron formation inhibitor Pluronic L-81 (PL81) 3 h before gavage ($n = 4$ per group). **f**, RNA sequencing (RNA-seq) PCA of FRCs and LECs sorted from D-, I- and C-gLNs (for example, cLEC denotes LECs from C-gLNs from

and the T_{reg} -promoting factor *Aldh1a2*, which encodes a rate-limiting enzyme for retinoic acid¹¹ production from retinol (Fig. 2c, Extended Data Fig. 3j, $0 \pm q$). Differences in retinoic acid production capacity between small- and large-intestine gLNs were preserved in germ-free mice (Extended Data Fig. 3o \pm q), but the ratio of CD103⁺CD11b⁺ to CD103⁺CD11b⁻ dendritic cells was inverted in all gLNs analysed when compared to SPF mice (Extended Data Fig. 3r). These data suggest that D-gLNs are more tolerogenic environments than I-gLNs and C-gLNs, at least in part owing to favourable dendritic cell and stromal cell signatures, and that this tolerogenicity is boosted by the microbiota. Overall, each gLN appears to be poised to mount an appropriate immune response corresponding to the environment of the intestinal region that it drains.

We next investigated whether CD4⁺ T cell fates correlated with migratory dendritic cell profiles or the presence of microbiota. Although germ-free mice harboured fewer T_{reg} (FOXP3⁺) cells than control mice in the small and large intestines¹⁸, we observed no difference between germ-free and specific pathogen-free (SPF) mice in the numbers of T_{reg} cells in gLNs (Extended Data Fig. 4a \pm c). T_H17 (ROR γ T⁺) effector cells and their corresponding suppressive ROR γ T⁺ p T_{reg} cells can be induced by the microbiota^{1,3}, and germ-free mice displayed a severe reduction in ROR γ T⁺ p T_{reg} cells in all tested gLNs, although there was no significant decrease in T_H17 cells (Fig. 2d, Extended Data Fig. 4d, e). We then tracked T cell responses to segmented filamentous bacteria (SFB)- pathobionts that elicit a strong T_H17 response and preferentially colonize the ileum and colon^{19,20} and found that monocolonization of germ-free mice with SFB led to enrichment of ROR γ T⁺CD4⁺ T cells only in the I- and C-gLNs (Fig. 2e). To test whether initial CD4⁺ T cell polarization occurs in a compartmentalized manner, we adoptively transferred naive ovalbumin (OVA)-specific CD4⁺ cells (CD45.1 OT-II cells) into SPF mice and analysed the activation of the transferred cells upon OVA gavage¹⁷. OT-II cells proliferated and were activated in all gLNs, with the exception of the iliac and caudal gLNs (Extended Data Fig. 4f \pm i).

We then assessed CD4⁺ T cell fate and its dependence on the microbiota. Amongst the retained OT-II cells (Extended Data Fig. 5a), we observed a gradient of p T_{reg} cell induction that declined in a proximal-to-distal manner (Fig. 2f). In germ-free mice, p T_{reg} cell induction

was decreased in all gLNs when compared to SPF mice (Fig. 2f, Extended Data Fig. 5b), despite having similar antigen access, induced proliferation and increased CD25 expression by transferred OT-II cells in upper small intestine gLNs (Extended Data Fig. 5c \pm g), suggesting that the less favourable dendritic cell composition in germ-free gLNs contributed to this effect. Limited antigen availability was also unlikely to explain the gradient of OT-II p T_{reg} cells in the small intestine and C-gLNs of SPF mice, as proliferation and CD25⁺ cell frequencies did not differ between these gLNs (Extended Data Fig. 5f, g). Furthermore, intravenous administration of OVA also resulted in a decreasing proximal-to-distal gradient of FOXP3 induction, but similar OT-II cell recovery and proliferation among gLNs (Fig. 2g, Extended Data Fig. 5h \pm m). By contrast, OT-II ROR γ T⁺ T_H and OT-II ROR γ T⁺ p T_{reg} cells showed an ascending proximal-to-distal gradient that was independent of the microbiota (Fig. 2h, i) and correlated with an increase in IL12/23p40⁺ frequency among CD103⁺CD11b⁺ dendritic cells (Extended Data Fig. 5n). These data indicate that under homeostatic conditions, the D-gLNs are the primary sites for induction of p T_{reg} cells by dietary antigens. By contrast, distal gLNs favour differentiation of T_H17 and ROR γ T⁺ p T_{reg} cells, underscoring the immunological distinctness of the proximal and distal intestinal milieus.

We investigated the possible consequences of anatomical segregation of T cell fates along the intestine. First, we analysed T cell responses to an antigen delivered to distinct intestinal sites by surgical injection of OVA-containing solution into the duodenum or ileum. This approach did not elicit significant induction of ROR γ T⁺ p T_{reg} cells, possibly because of the pro-inflammatory surgical setting and lack of post-prandial mechanisms. Ileal injection of OVA elicited more pronounced differentiation of ROR γ T⁺ T_H and ROR γ T⁺ p T_{reg} cells than duodenal injection of OVA in the respective draining gLNs; this response pattern was boosted by co-injection of cholera toxin (CT; Fig. 3a, Extended Data Fig. 6a \pm h). This result confirms that I- and C-gLNs have a greater pro-inflammatory potential than D-gLNs. We next injected CT \pm OVA into the ileum or duodenum and compared these mice to sham-operated mice for susceptibility to OVA-expressing *Salmonella enterica* Typhimurium (*Stm*-OVA), which infects the ileum and caecum before systemic dissemination. Only mice previously injected with CT \pm OVA in the ileum displayed delayed weight loss compared to sham-operated

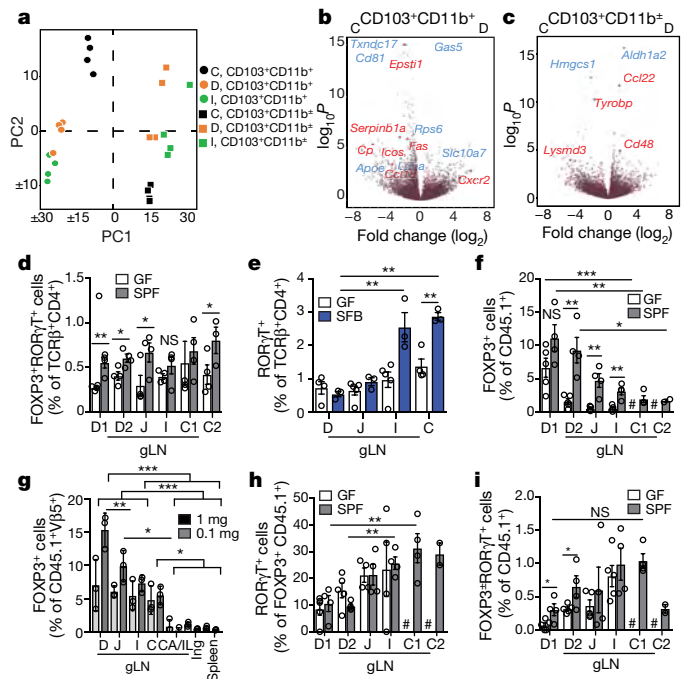


Fig. 2 | Migratory dendritic cell profiles and CD4⁺ T cell polarization differ between gLNs and follow proximal-to-distal gradients. **a**, RNA-seq PCA of CD103⁺CD11b⁺ and CD103⁺CD11b⁻ dendritic cells sorted from D-, I- or C-gLNs from SPF C57BL/6 mice ($n = 4$, pooled from two mice each). PC1 accounts for 52.7% and PC2 for 10% of the variance. **b**, **c**, Volcano plots depicting genes that are differentially expressed among dendritic cells from D- or C-gLNs. Blue, metabolism-related genes; red, immunity-related genes. **d**, Frequency of FOXP3⁺ROR γ T⁺ cells among TCR β ⁺CD4⁺ cells in gLNs from germ-free or SPF mice ($n = 3$, representing two independent experiments). **e**, Frequency of ROR γ T⁺ cells among TCR β ⁺CD4⁺ cells in gLNs from germ-free mice or germ-free mice 8 days after SFB monocolonization ($n = 3$, representing two independent experiments). **f**, Frequency of FOXP3⁺ cells among CD45.1⁺ cells 64 h after adoptive transfer of 1×10^6 naive CD45.1⁺ OT-II cells into germ-free and SPF CD45.2 mice ($n = 4$) gaged with OVA 48 h and 24 h before analysis. **g**, Frequency of total FOXP3⁺ cells among CD45.1⁺ cells in lymph nodes or spleen 64 h after transfer of 1×10^6 naive CD45.1⁺ OT-II cells into SPF CD45.2 mice ($n = 3$) with intravenous injection of OVA 48 h before analysis, representative of two experiments. **h**, **i**, ROR γ T⁺ cells among FOXP3⁺CD45.1⁺ cells (**h**) and among CD45.1⁺ cells (**i**) in the same experiment as in **f**, representative of two independent experiments. Hash denotes fewer than 200 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; NS, not significant (one-tailed t -test or ANOVA).

mice (Fig. 3b, c, Extended Data Fig. 6i), which correlated with reduced *Salmonella* invasion and an increased frequency of ROR γ T⁺ pT_{Reg} and T_H17 cells in the lamina propria (Extended Data Fig. 6j±). We then tested whether infection with *Citrobacter rodentium*, which is anatomically restricted to the caecum and colon, perturbed proximal induction of pTreg cells. Induction of OVA-specific pTreg cells in D-gLNs by oral administration of OVA was unaffected by infection with OVA-expressing *Citrobacter*, which resulted in OVA-specific CD4⁺ T cell activation in the C-gLNs (Fig. 3d, e, Extended Data Fig. 6m±p), or by infection with wild-type *Citrobacter* (Extended Data Fig. 6q±u).

The gLNs are crucial for physiological responses to microbiota, pathogen-resistance mechanisms and oral tolerance^{7,21,22}. We investigated whether the I- and C-gLNs are required for the generation of SFB-specific T_H17 cells. After transfer of naive SFB-specific CD4⁺ T cells (7B8tg cells)² into SPF mice colonized with SFB, we recovered substantial numbers of transferred cells only from the I- and C-gLNs, which upregulated ROR γ T expression (Fig. 3f, g, Extended Data Fig. 7a±e). Surgical removal of I- and C-gLNs shifted the SFB-specific T_H17 cell response to the gLNs that drain gut segments with lower colonization (Fig. 3f, g, Extended Data Fig. 7a±g), and this change correlated with

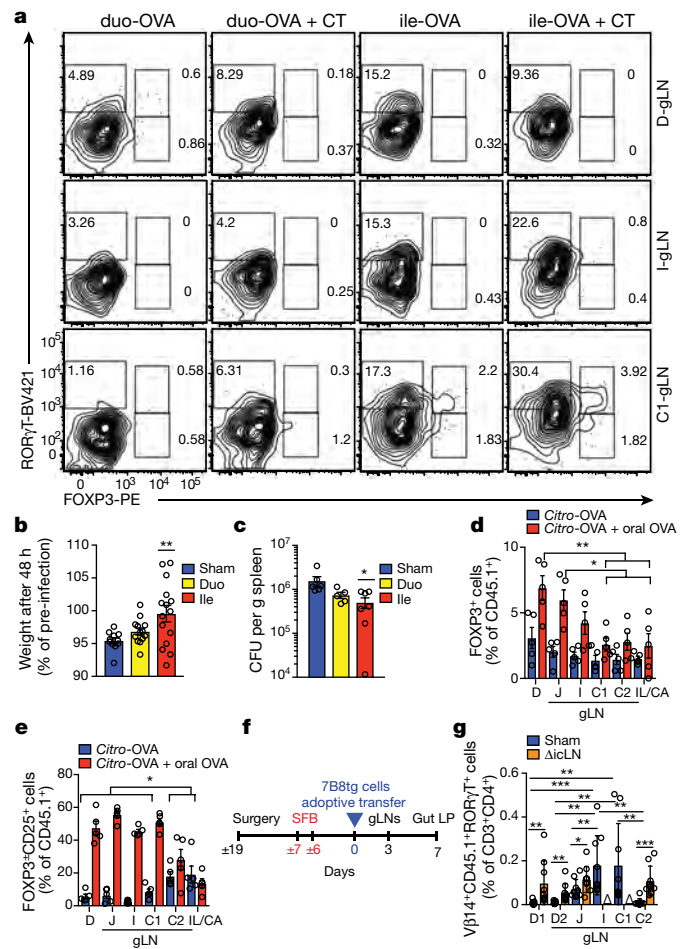


Fig. 3 | Compartmentalization of CD4⁺ T cell fates permits vaccination via ileocaecal gLNs. **a**, Representative flow cytometry plots for FOXP3 and ROR γ T expression among CD45.1⁺ OT-II cells in gLNs 48 h after duodenal or ileal injection with OVA or OVA and CT, performed 16 h after adoptive transfer of 1×10^6 naive cells into SPF CD45.2 C57BL/6 mice ($n = 4$). **b**, **c**, Percentage of pre-infection weight (**b**) and splenic *Stm*-OVA dissemination (**c**) of mice infected with *Stm*-OVA 9 days after duodenal or ileal injection with OVA±CT versus sham operation and 10 days after adoptive transfer of 1×10^5 naive OT-II cells into SPF CD45.2 mice. **b**, Pool of two independent experiments, sham ($n = 11$), CT±OVA duodenal injection (duo; $n = 13$), CT±OVA ileal injection (ile; $n = 15$). **c**, Single experiment, sham ($n = 6$), CT-OVA duo ($n = 6$), CT-OVA ile ($n = 7$). **d**, **e**, Frequency of total FOXP3⁺ (**d**) and FOXP3⁺CD25⁺ cells (**e**) among CD45.1⁺ cells in gLNs 64 h after adoptive transfer of 1×10^6 naive CD45.1⁺ OT-II cells into SPF CD45.2 mice infected or not with OVA-expressing *Citrobacter* (*Citro*-OVA) 9 days earlier, and after gavage of OVA 48 h and 24 h before analysis ($n = 5$, representative of two independent experiments). **f**, Experimental design for **g**. **g**, Frequency of V β 14⁺CD45.1⁺ROR γ T⁺ cells among CD3⁺CD4⁺ cells in indicated gLNs from mice after sham operation ($n = 12$) or surgical removal of the I- and C1-gLNs (Δ ICLN, $n = 14$), 64 h (day 3, **f**) after adoptive transfer of 4×10^5 naive SFB-specific CD45.1⁺ 7B8tg cells into SPF CD45.2 mice; pooled data from three independent experiments with $n = 4 \pm 5$ per group each. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ (one-tailed t -test or ANOVA).

ectopic expansion of 7B8tg cells in the intestine, but only if some SFB was present in the lumen owing to recent colonization (Extended Data Fig. 7a±c, h±s). It is unlikely that surgery caused lymph rerouting to surrounding gLNs, because dye did not spread to adjacent lymph nodes, or expansion of SFB into surrounding gut segments, as evidenced by SFB-specific 16S qPCR (Extended Data Fig. 8a±c). Hence, these data suggest that individual gLNs also modulate T cell responses in the intestinal tissue in a region-specific manner. In the presence of pathogens or pathobionts, this regionalization may help to contain tissue damage. Together, these results illustrate the beneficial effects of discrete gLN

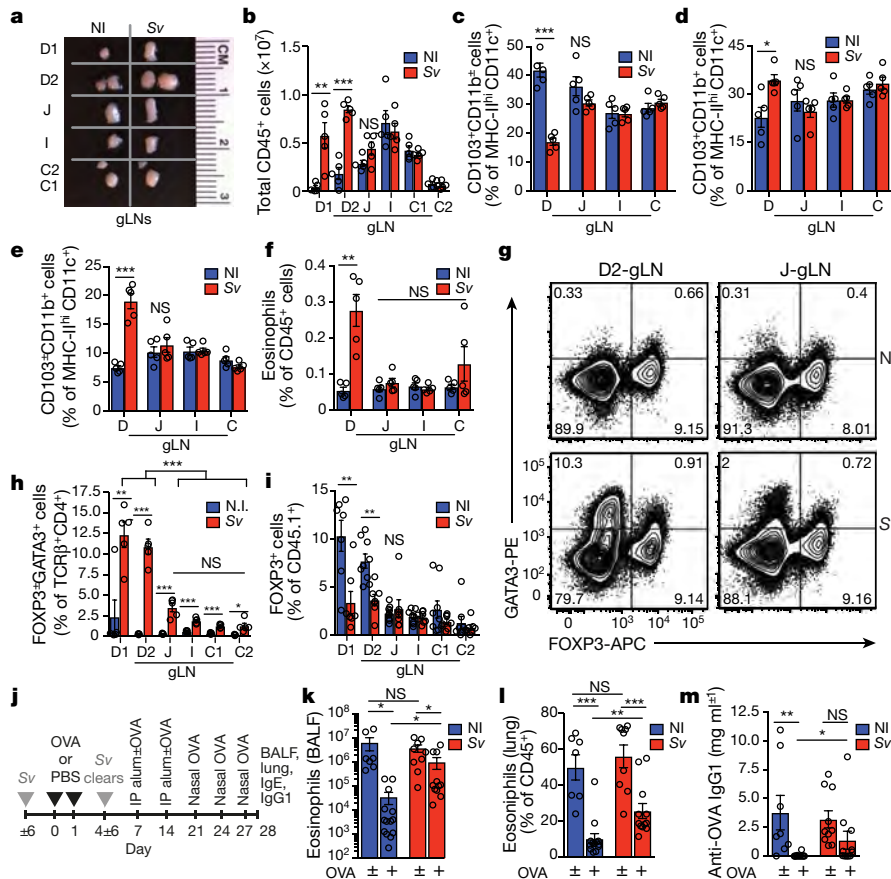


Fig. 4 | Duodenal infection leads to a compartmentalized immune conflict in the duodenal gLNs and to compromised oral tolerance.

a, Dissected gLNs from non-infected (NI) C57BL/6 mice or mice infected with 700 *S. venezuelensis* (Sv) larvae 8 days before dissection. **b**, Total CD45⁺ cell counts ($n = 5$, representative of three independent experiments). **c–f**, Frequency of CD103⁺CD11b⁺ (**c**), CD103⁺CD11b⁺ (**d**) and CD103⁺CD11b⁺ (**e**) cells among MHCII^{hi}CD11c⁺ cells and eosinophils among CD45⁺ cells (**f**) ($n = 5$, representative of two independent experiments). **g**, Representative flow cytometry plot of GATA3⁺ and FOXP3⁺ CD4⁺ T cells. **h**, Frequency of GATA3⁺ CD4⁺ T cells ($n = 5$, representative of three independent experiments). **i**, Frequency of total FOXP3⁺ cells among CD45.1⁺ cells in gLNs 64 h after adoptive transfer of 1×10^6 naive CD45.1⁺ OT-II cells into CD45.2 mice

drainage, which may avoid immunological conflict between responses induced at different gut sites and help to preserve these responses in the tissue.

Viral and bacterial gastrointestinal infections can perturb the generation of pT_{reg} cells that recognize dietary antigens and subsequently impair oral tolerance^{6,23}. We investigated whether the proximal gLNs alone are necessary or sufficient for oral tolerance, a pT_{reg} cell-dependent process⁴, by surgical removal of the D-gLNs or the I- and C-gLNs followed by the induction of asthma suppression mediated by an oral antigen¹⁷. Oral tolerance was intact following the removal of proximal or distal lymph nodes (Extended Data Fig. 8d±i), probably because pT_{reg} cells generated in remnant gLNs are sufficient to maintain tolerance¹⁷. To induce immunological conflict only in the proximal intestine-draining gLNs, we chose the helminth *Strongyloides venezuelensis*, which displays distinct duodenal tropism²⁴. Upon infection with *S. venezuelensis*, only the D-gLNs were swollen, underwent significant restructuring and displayed increased immune cell counts compared to gLNs of non-infected mice, and this was consistent with compartmentalized duodenal worm load (Fig. 4a, b, Extended Data Fig. 9a±c, Supplementary Videos 8±17). We also observed a selective influx of CD11b⁺ dendritic cells into D-gLNs (this has been previously linked to the induction of Th2 responses²⁵) at the expense of the

($n = 8$, pool of two independent experiments) infected with *S. venezuelensis* larvae or not infected 8 days before analysis, and gavaged with OVA 48 h and 24 h before analysis. **j**, Scheme of oral tolerance experimental set-up in *S. venezuelensis*-infected mice. **k±m**, Total eosinophils in BALF (**k**), frequency of eosinophils among CD45⁺ cells in lung tissue (**l**) and OVA-specific IgG1 levels in serum (**m**) from mice infected with *S. venezuelensis* or not infected during antigen feeding (+OVA groups) or no feeding (±OVA groups), 21 days after first immunization with OVA±alum (**j**) ($n = 13$ for +OVA groups, $n = 10$ for ±OVA groups, pool of two independent experiments). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; NS, not significant (one-tailed *t*-test or ANOVA).

more tolerogenic CD103⁺CD11b⁺ and CD8α⁺ dendritic cell subsets; D-gLNs also showed a type 2 immunity signature comprising eosinophils, GATA3⁺ T_{H2} cells and GATA3⁺ T_{reg} cells even after the infection was cleared (Fig. 4c±h, Extended Data Fig. 9d±l). Upon infection with *S. venezuelensis*, transferred OT-II cells showed a significant reduction in OVA gavage-induced upregulation of FOXP3 ($P < 0.01$ for D1 and D2) and CD25 ($P < 0.001$ (D1), $P < 0.05$ (D2)) specifically in the D-gLNs ($P < 0.01$ for D1 and D2) compared to non-infected mice, despite a similar frequency of CD45.1 cells being recovered (Fig. 4i, Extended Data Fig. 10a±e). Finally, we investigated whether transient infection during initial antigen exposure affected tolerance to dietary antigens¹⁷ (Fig. 4j). Mice infected with *S. venezuelensis* showed partial impairment of suppression of eosinophilia and dendritic cell infiltration into bronchial-alveolar lavage fluid (BALF) and lungs, and increased OVA-specific IgG1, compared to non-infected mice (Fig. 4k±m, Extended Data Fig. 10f, g). Together, these data show that duodenal infection can perturb local responses and alter systemic tolerance to gut antigens.

Our data uncover a mechanism by which the intestinal immune system simultaneously handles regulatory versus pro-inflammatory responses: by anatomical segregation of these reactions into functionally distinct gLNs. They also show that effector (T_H cells) and corresponding regulatory mechanisms (lineage-defined T_{reg} cells)

may co-operate at every site to dampen excessive, gut segment-specific inflammation. It remains to be determined whether the presence of specific dendritic cell subpopulations with varying tolerogenic or inflammatory roles in specific gLNs mediate distinct responses to dietary, microbiota or pathogen-derived antigens^{3,16}. The efficient drainage of dietary antigens into tolerance-promoting lymph nodes associated with the proximal intestine suggest that these lymph nodes help to prevent food allergies, and that duodenal infection and dysbiosis can alter the allergic outcome. However, the dietary duodenal route could be exploited therapeutically for inducing tolerance to otherwise inaccessible pro-inflammatory antigen sources, such as dysbiotic bacteria in patients with inflammatory bowel diseases, while selective targeting of distal gLNs might lead to successful intestinal vaccination.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, statements of data availability and associated accession codes are available at <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125-3>.

Received: 12 April 2018; Accepted: 6 March 2019;
Published online: 15 April 2019

- Honda, K. & Littman, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75–84 (2016).
- Yang, Y. et al. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* **510**, 152–156 (2014).
- Xu, M. et al. c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont. *Nature* **554**, 373–377 (2018).
- Mucida, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**, 1923–1933 (2005).
- Randolph, G. J., Ivanov, S., Zinselmeyer, B. H. & Scallan, J. P. The lymphatic system: integral roles in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 31–52 (2017).
- Fonseca, D. M. et al. Microbiota-dependent sequelae of acute infection compromise tissue-specific immunity. *Cell* **163**, 354–366 (2015).
- Cording, S. et al. The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes. *Mucosal Immunol.* **7**, 359–368 (2014).
- Worbs, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 519–527 (2006).
- Van den Broeck, W., Derore, A. & Simoons, P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: descriptive study and nomenclature standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J. Immunol. Methods* **312**, 12–19 (2006).
- Carter, P. B. & Collins, F. M. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* **139**, 1189–1203 (1974).
- Houston, S. A. et al. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol.* **9**, 468–478 (2016).
- Gautreaux, M. D., Deitch, E. A. & Berg, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infect. Immun.* **62**, 2132–2134 (1994).
- Veenbergen, S. et al. Colonic tolerance develops in the iliac lymph nodes and can be established independent of CD103⁺ dendritic cells. *Mucosal Immunol.* **9**, 894–906 (2016).
- Pezoldt, J. et al. Neonatally imprinted stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells in mesenteric lymph nodes. *Nat. Commun.* **9**, 3903 (2018).
- Hammerschmidt, S. I. et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **205**, 2483–2490 (2008).
- Durai, V. & Murphy, K. M. Functions of murine dendritic cells. *Immunity* **45**, 719–736 (2016).
- Esterhazy, D. et al. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T_{reg} cells and tolerance. *Nat. Immunol.* **17**, 545–555 (2016).
- Atarashi, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
- Sano, T. et al. An IL-23R/IL-22 circuit regulates epithelial serum amyloid A to promote local effector Th17 responses. *Cell* **163**, 381–393 (2015).
- Atarashi, K. et al. Th17 Cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell* **163**, 367–380 (2015).
- Hadis, U. et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* **34**, 237–246 (2011).
- Balmer, M. L. et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237ra666 (2014).
- Bouziat, R. et al. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* **356**, 44–50 (2017).
- Mukai, K., Karasuyama, H., Kabashima, K., Kubo, M. & Galli, S. J. Differences in the importance of mast cells, basophils, IgE, and IgG versus that of CD4⁺ T cells and ILC2 cells in primary and secondary immunity to *Strongyloides venezuelensis*. *Infect. Immun.* **85**, e00053-17 (2017).
- Tussiwand, R. et al. Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* **42**, 916–928 (2015).

Acknowledgements We thank all members of the Mucida laboratory, past and present, for assistance, discussions and reading of the manuscript; B. Reis for figure preparation; F. Matheis for propagating *S. venezuelensis*; A. Rogoz and S. Gonzalez for the maintenance of mice; T. Rendon and B. Lopez for genotyping; K. Gordon and K. Chosphele for assistance with cell sorting; the Rockefeller University Bio-imaging Research Center for assistance with microscopy and image analysis; the Rockefeller University Genomics Center for RNA sequencing; Rockefeller University employees for assistance; M. Nussenzweig, G. Victoria and J. Lafaille and their respective laboratory members for discussions and suggestions; D. Littman and M. Xu (NYU) for 7B8tg mice and faeces from SFB monocolonized mice; and S. Galli and K. Matsushita (Stanford University) for providing *S. venezuelensis* and guidance on how to maintain it. This work was supported by a Swiss National Science Foundation postdoctoral fellowship and University of Chicago start-up funds (D.E.); a CAPES fellowship (M.C.C.C.); an NIH F31 Kirchstein Fellowship, Philip M. Levine Fellowship, and Kavli Neural Systems Institute Graduate Fellowship (P.A.M.); the Leona M. and Harry B. Helmsley Charitable Trust, the Crohn's & Colitis Foundation of America Senior Research Award, the Burroughs Wellcome Fund PATH Award, and National Institute of Health grants R21AI31188, R01DK113375 and R01DK093674 (D.M.).

Reviewer information Nature thanks Rodney Newberry and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Author contributions D.E. initiated, designed, performed and analysed the research, and wrote the paper. M.C.C.C. designed and performed the research. L.M. performed the dendritic cell sorting and guided the RNA-seq library preparation. P.A.M. performed RNA-seq data alignment and analyses and fast green injection. T.B.R.d.C. performed RNA-seq data alignment and analyses and designed the lymph node schematic. A.L. performed radioactive studies. M.E. prepared, imaged and analysed lymph nodes upon *S. venezuelensis* infection. A.M.C.F. initiated the *S. venezuelensis* model and contributed to the experimental design using the model. All authors edited the paper. D.M. initiated, designed and supervised the research, and wrote the paper.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Additional information

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125-3>.

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125-3>.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.E. or D.M.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2019

METHODS

Mice. C57BL/6J CD45.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ) mice were from Jackson Laboratories, CD45.2 (C57BL/6) mice were purchased from Jackson Laboratories or Taconic Farms, and CD45.1 OT-II TCR-transgenic mice were originally purchased from Taconic Farms and maintained in our facilities. B6.Cg-Tg(Igax-Venus)1Mnz/J mice were provided by M. Nussenzweig (The Rockefeller University). C57BL/6-Tg (Tcr α ,Tcr β)2Litt/J (7B8tg) mice were either purchased from Jackson Laboratories or provided by D. Littman (NYU). Mice were used at 7±12 weeks of age, and male mice were used throughout the study. A minimum of biological triplicates was used throughout the study. For *in vivo* studies, the maximum number of mice available per treatment group was used to counteract biological variation: for all adoptive transfer experiments up to five mice per group, for oral tolerance experiments up to eight mice per group, for infection and surgery experiments up to eight mice per group. For surgeries (lymph node removal, intestinal antigen injection and OVA+ cholera toxin surgery), surgical group sizes were larger than sham group sizes (two additional mice) to allow for the possibility that a mouse might have to be euthanized during post-operative care owing to the higher invasiveness of the procedure. All surviving animals were included in the study. For all studies B6 mice were purchased in batches of 10±20 mice and randomly distributed to cages. Infection/colonization studies: cages of five mice were randomly infected or colonized with SFB or not. Because of the high chance of contamination it was not possible to house infected/colonized and non-infected mice together. CT±OVA injection: mice were housed in cages of 4±5 mice and within a cage randomly subjected to sham, duodenal or ileal OVA or OVA-CT injection, ensuring that mixed groups were present in each cage (2 vs 2, 2 vs 3, or 2 vs 2 vs 1). Surgery: mice were housed as five mice per cage, and each cage housed 2 vs 3 or 3 vs 2 sham operation versus lymph node removal surgery mice, to avoid any potential microbial drift or behavioural changes due to the different treatments affecting the study outcome. Blinding was not possible in this study as the experimenters treating the mice were the same as those that analysed the data. The treatment groups had to be clearly identified throughout the study to prevent cross contamination (gnotobiotic/infection experiments), to be able to draw conclusions (CT±OVA injection in duodenum versus ileum) or were obvious by their anatomy (lymph nodes were removed). Statistics were applied in an unbiased manner. Mice were maintained at the Rockefeller University animal facilities under specific pathogen-free conditions or germ-free conditions. Germ-free C57BL/6 mice were generously provided by S. Mazmanian (Caltech) and imported into germ-free flexible film isolators (Class Biologically Clean Ltd). Mice monocolonized with SFB were kept in flexible film isolators and originally colonized by gavage with faecal extracts from SFB monocolonized mice kept at NYU (Littman laboratory). SFB colonization was verified by real-time PCR using SFB-specific 16S primers; germ-free faeces served as a negative control and Taconic Farms B6 faeces as a positive control. The mice were bred in our germ-free facility for maintenance of the strain and kept on sterilized Autoclavable Mouse Breeder Diet (5021, LabDiet, USA), which was also used for control (ex-germ-free) SPF mouse breeding and maintenance.

Rats. Female Wistar rats (6±10 weeks old) were purchased from Charles River. Animal care and experimentation were consistent with the NIH guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Rockefeller University.

Reagents. The following reagents were purchased from Sigma: benzyl ether (108014), dichloromethane (270997), Fast Green FCF (F7252), heparin (H3393), omeprazole (O104), Pluronic L-81 (435430), pyrantel pamoate (P6210), ovalbumin (grade VI, A2512; grade III, A5378) and vancomycin (V2002). LPS-free ovalbumin was from Hyglos, Germany (cat. no. 77161). [^3H]retinol and Na ^{125}I were from Perkin-Elmer. Cholera toxin was from List Biological Laboratories (cat. no. 100B).

Antibodies, staining and flow cytometry. Fluorescent-dye-conjugated antibodies were purchased from BD (USA) (anti-CD25, 563061; anti-CD45.1, 563982; anti-CD45.2, 560693; anti-CD31, 557355; anti-CD103, 557495; anti-LY6C, 560595; anti-NK1.1, 562921; anti-SiglecF, 552126; anti-ROR γT , 562894; anti-IL17A, 56022 and 559502; anti-V β 5.1, 553190; anti-V β 14, 553258), eBioscience (USA) (anti-B220, 48-0452-82; anti-CD3 ϵ , 48-0031-82; anti-CD4, 83-0042-42; anti-CD8 α , 56-0081-82; anti-CD25, 17-0251-82; anti-CD11b, 47-0112-82; anti-CD11c, 25-0114-82, 17-0114-82 and 56-0114-82; anti-CD24, 48-0242; anti-CD45, 25-0451-82; anti-CD45.1, 25-0453-82 and 45-0454-82; anti-CD69, 45-0691-82; anti-FOXP3, 12-5773-82; anti-GATA3, 12-9966-42; anti-I-A/I-E (MHCII), 46-5321-82 and 56-5321-82; anti-LY6G, 48-5931-82; anti-podoplanin, 25-5381-82; anti-V α 2, 48-5812-82, and streptavidin, 46-4317-82), or Biologend (USA) (anti-CD3 ϵ , 100320; anti-CD8 α , 100744; anti-CD11b, 101236; anti-CD64, 139306; anti-TCR β , 109220; anti-TER119, 116206). Additional antibodies were purchased from BioXCell and labelled in-house (anti-CD4, BE0003-1; anti-CD8 α , BE0004-1; anti-CD11b, BE007; anti-CD19, BE0150; anti-TCR β , BE00102). Biotinylated antibodies were purchased from BD Pharmingen (anti-B220, 553086; anti-CD8 α , 553029; anti-CD11b, 553309; anti-CD11c, 553800; anti-CD25, 553070; anti-NK1.1,

553163; and anti-TER-119, 553672) or as follows: anti-IgG1, Bethyl, A90-105B; anti-IgG2c, Bethyl, A90-136B; anti-IgE, eBioscience, 13-5992-82; and anti-neuropilin, R&D Systems, BAF566. Unconjugated antibodies used were anti-LYVE1, R and D Systems AF2125; anti-GFP, Aves Labs, GFP-1020; anti-OVA IgG1, Biologend, 520501; anti-IgE, Invitrogen, RMGE00; and IgE isotype control, eBioscience 554118. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Aqua LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, L-34965, Cell Trace CFSE and Violet Cell Proliferation kits (C34554 and C34557) were purchased from Life Technologies. For cytokine analysis in T cells, cells were incubated for 3.5 h in RPMI medium with 10% fetal bovine serum (FBS), brefeldin A (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma B7651), ionomycin (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma I0634), and phorbol 12-myristate 13-acetate (100 ng ml^{-1} , Sigma P8139); for cytokine analysis in dendritic cells, cells were incubated for 6 h in RPMI with 10% FBS and GolgiPlug (1 to 1,000, BD Biosciences 555029). Cell populations were stained with Aqua in phosphate-buffered saline (PBS), followed by incubation with Fc block and antibodies against the indicated cell surface markers in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS, 1% BSA, 10 mM EDTA, 0.02% sodium azide). The cells were analysed live, or fixed in 1% PFA/PBS. For intracellular staining, cells were first stained for surface epitopes and then fixed, permeabilized and stained according to the manufacturer's protocol (eBioscience 00-5123-43). Flow cytometry was performed on an LSRII (BD Biosciences) and analysed using FlowJo software (Tree Star). Cell division index was calculated using the FlowJo formula (<http://www.flowjo.com/v765/en/proliferation.html>), in which the index represents the fraction of total cell divisions over the calculated total starting cells.

Tissue clearing, light sheet microscopy and image reconstruction. For tissue clearing and staining, the iDISCO protocol was followed as detailed on the continuously updated website <http://idisco.info>, with the following specifics: tissues were stained in primary and secondary antibodies for 4 days each, and were embedded in 1% agarose-TAE before final dehydration. Blocks were imaged using a LaVision Ultramicroscope II and software. Images were reconstructed using Imaris 8 software.

Fast green tracing. Mice were anaesthetized with isoflurane and their peritoneal cavity exposed. For mapping intestine to lymph node drainage, 3±5 μl of 10% Fast Green in PBS was injected into the muscularis of the intestine using a nanoinjection device (Nanoject III, Drummond). Spreading of green colour through the lymphatics was followed until it accumulated in the draining lymph node and until it faded again (sham-operated mice) and reached the duodenal lumen via the bile duct (no longer than 15 min). The same timing was applied in mice in which ileal and caecal mesenteric lymph nodes (mLNs) had been removed, even though the dye never accumulated in a lymph node. To trace lymphatic mLN efflux, 1±3 μl of 10% Fast Green was injected into the centre of the mLN, and efflux monitored for 15 min or until the dye was detected in the thoracic duct.

[^3H]retinol biodistribution. Mice were fasted for 3 h before gavage with 150 μl PBS with or without 5 μl chylomicron formation-inhibiting Pluronic L-81, followed by 1 μCi [^3H]retinol in 100 μl olive oil 30 min later, and sampled at indicated time points. Serum was sampled from the submandibular vein (systemic) or from the portal vein. Lymph was collected from the thoracic duct under isoflurane anaesthesia using a custom-made glass needle (micropipette puller, Sutter Instruments). Dissected organs were weighed before lysis by mechanical disruption in 0.5 ml hypertonic lysis buffer with 1% Triton-X 100; the lysate was mixed with 7 ml Ultima Gold scintillation cocktail (Perkin Elmer) and accumulation of radioactivity was measured on a scintillation counter. Input radioactivity was estimated by counting 10% of the gavaged material.

Segmentation of gut-draining lymph nodes. The mouse gLNs consist of one hepatic±coeliac lymph node co-draining the duodenum, pancreatic±duodenal lymph nodes draining the duodenum and separately the ascending and transverse colon, the main mLN chain draining the distal duodenum, jejunum, ileum, caecum and proximal ascending colon, and the caudal and iliac lymph nodes draining the descending-distal colon. Mesenteric lymph nodes draining intestinal segments were identified anatomically by following the lymphatic vessels connecting the colon, ileum and jejunum to their lymph nodes. Duodenal lymph nodes were revealed by gaging with 100 μl of olive oil (Sigma) and determining the most stomach-proximal lymph nodes surrounded by chyle, indicative of duodenal drainage, 1 h after gavage.

Isolation of lymphocytes and APCs from lymph nodes. Lymph nodes were dissected into cold Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with Mg^{2+} and Ca^{2+} , finely chopped and incubated in 400 U/ml collagenase D (Roche) in HBSS for 25 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . Collagenase was quenched on ice by addition of a final 10% FCS. Single cell suspensions were extracted from connective tissue by taking up and resuspending the digests five times. Erythrocytes were lysed by incubation in erythrocyte lysis buffer (Sigma) for 7 min at room temperature.

Isolation of stromal cells from gLNs. Gut lymph nodes were dissected into 500 μl cold RPMI, supplemented with 2% FCS and HEPES (dissection medium). Tissues

were disrupted using 25 G needles, and Liberase TL (Roche) was added to a final concentration of 0.25 mg/ml with collagenase D (Roche) to a final concentration of 400 U/ml. Tissues were incubated at 37 °C on an orbital shaker at 80 r.p.m. for 10 min, and disrupted at room temperature by gently pipetting the digest up and down 50 times, followed by an additional 20 times. The reaction was stopped by placing the digest on ice and adding 14 ml of ice-cold dissection medium. Cells were spun down at 700g for 5 min at 4 °C, resuspended in erythrocyte lysis buffer (Sigma), topped up with medium again, spun and then subjected to staining.

Isolation of lymphocytes and APCs from small and large intestines. Intestines were separated from mesentery, and Peyer's patches (small intestine) and faeces were removed. For segmentation of the small intestine, the upper 25% of the small intestine was taken as duodenum, the next 50% as jejunum and the last 25% as ileum. This division allowed quick processing of multiple specimens, though it can lead to some contamination of the ileum and duodenum with jejunum. The caecum was included in the preparation of the large intestine. Intestines were cut longitudinally and washed twice in PBS. Tissue was cut into 1-cm pieces, mucus was removed by incubating the tissue for 10 min in PBS and 1 M DTT, and the epithelium was removed by two incubations in 25 ml of HBSS, 2% FCS and 30 mM EDTA for 10 min at 37 °C at 230 r.p.m. with vigorous shaking after each incubation. Tissues were washed in PBS over a sieve, then finely chopped and digested in 6 ml of RPMI per gut segment (Gibco), 2% FCS, 200 g/ml DNaseI (Roche) and 2 mg/ml collagenase 8 (Gibco) for 45 min at 37 °C, 5% CO₂. Digests were taken up and resuspended 10 times and passed through a sieve, and the collagenase was quenched by addition of 15 ml cold RPMI, 2% FCS. Cell pellets were resuspended in 40% Percoll (BD Pharmingen) complemented with RPMI, 2% FCS, passed through a 100-µm mesh and separated by centrifugation in a discontinuous Percoll gradient (80%/40%) at 1000g for 25 min at room temperature. APCs and lymphocytes were isolated from the interphase, washed, and stained for FACS analysis or subjected to re-stimulation.

Cell isolation for RNA-seq. C57BL/6 male mice (10±14 weeks old) served as gLN donors, and biological triplicates or quadruplicates were collected. Cells were sorted using a FACS Aria cell sorter flow cytometer (Becton Dickinson). Dendritic cells from mLNs were pre-enriched using a Pan Dendritic Cell Isolation Kit (130-100-875, Miltenyi Biotec) and LS MACS Separation Columns (Miltenyi Biotec). Dendritic cells were sorted as Aqua⁺CD45⁺Lin⁺(CD3⁺B220⁺NK1.1⁺CD19⁺)CD11c^{hi}, and the subpopulations further sorted as MHCII^{hi}CD103⁺CD11b⁺ and MHCII^{hi}CD103⁺CD11b⁺. Stromal cells were not pre-enriched and sorted as Aqua⁺CD45⁺TER119⁺CD24⁺TCRβ⁺B220⁺CD11c⁺ cells, and the subpopulations were sorted further as podoplanin⁺CD31⁺ (FRCs) and podoplanin⁺CD31⁺ (LECs). Three hundred cells were sorted directly into 25 µl TCL buffer (Qiagen, 1031576) supplemented with 1% β-mercaptoethanol at single cell precision. Samples were kept at room temperature for 5 min, spun down and kept at ±80 °C until further processing.

RNA-seq library preparation and sequencing. RNA was isolated using RNeasy XP beads (Agentcourt, A63987) on a magnetic stand (DynaMag, Invitrogen 12331D). Reverse transcription primers were: P1-RNA-TSO: Biot-rArArUrGrArUrArCrGrGrCrGrArCrCrArCrCrGrArUrNrNrNrNrNrNrGrGrG; P1-T31: Biot-AATGATACGCGACCACCGATCG3IT; P1-PCR: Biot-GAATGATACGCGACCACCGAT. RNA was eluted for 1 min at room temperature in cDNA synthesis mix 1 (0.5 l P1-T31 (20 M), 0.3 l RNasin plus (Promega, N2615), 1.5 l 10 mM dNTP, 3.5 l 10 mM Tris pH 7.5, 0.5% IGEPAL CA-630 (Sigma) and 1.7 l RNase free ddH₂O) and the beads pipetted up and down ten times. The eluted sample was then incubated for 3 min at 72 °C, followed by 1 min on ice, then 7.5 l of mix 2 was added (3 l 5× FS Buffer SS, 0.375 l 100 mM DTT, 0.375 l RNasin plus, 0.5 l P1-RNA-TSO (40 M), 0.75 l Maxima RT Minus H (Thermo Scientific, EP0751), 1.8 l 15M Betaine (Sigma, B0300), 0.9 l 50 mM MgCl₂ and 0.175 l RNase free ddH₂O). Reverse transcription occurred during a thermal cycle of one cycle (90 min at 42 °C), 10 cycles (2 min at 50 °C, 2 min at 42 °C) and one cycle (15 min at 70 °C), and the product was kept at 4 °C. The cDNA was then amplified using 15 l of the reverse transcription product, 20 l 2× KAPA HiFi HS Ready Mix (Kapabiosystems, KK2601), 1.5 l P1-PCR (10 M), and 3.5 l RNase-free ddH₂O. Amplification occurred during the following cycles: one cycle of 3 min at 98 °C, 20 cycles of (15 s at 98 °C, 20 s at 67 °C, 6 min at 72 °C), and one cycle of 5 min at 72 °C, and the product was kept at 4 °C. PCR product (20 l) was cleaned up using 16 l RNeasy XP beads. The cDNA was eluted in 20 l RNase-free ddH₂O and kept at ±20 °C. Isolated amplicons were confirmed to be 1,500±2,000 bp long by a High Sensitivity DNA Assay (Bioanalyzer). Concentration of all sample was measured on a Qubit fluorometer (Thermo Fisher), all samples were adjusted to 0.1 ng/ l with ddH₂O, and 2.5 l cDNA was subjected to Nextera XT DNA Library preparation (Illumina) using a Nextera XT Index Kit (Illumina, FC-131-1002) according to the manufacturer's protocol, except that all volumes were used at 0.5× the indicated volumes. Sample quality was again verified by Bioanalyzer, and sample concentrations were measured on the Qubit fluorometer and adjusted to a concentration of 4.54 ng/ l. All samples were pooled at equal

contributions and run in multiple lanes. Sequencing was performed using 76-base single-end reading on a NextSeq instrument (Illumina).

RNA-seq data analysis. Gene expression was quantified using the raw fastq files and the mouse reference transcriptome M18 (Gencode, GRCm38.p6) as input for Kallisto (v.0.43.0). The resultant normalized transcript frequencies were provided to the R package Sleuth for differential analysis (v.0.30.0). Analyses were conducted at the gene level, and the likelihood ratio test was applied to capture gene expression differences among all groups. When testing between group pairs, the Wald test was used to determine differentially expressed genes. Genes with log₂ fold changes greater than 1 or less than ±1 and a false discovery rate (FDR) of 0.05 were considered significant for downstream studies. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed by ranking genes based on log₂ fold changes of paired comparisons and subsequently run as a GSEA preranked analysis (GSEA v3.0) with the c5.all.v6.1.symbols.gmt (Gene Ontology) gene set database. All pathways with an FDR of 0.25 or less were considered significantly different.

RALDH activity assay. RALDH activity was determined using the Aldefluor kit (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer's protocol. Cells were analysed by flow cytometry 30 min after the addition of substrate.

¹²⁵I-OVA labelling and biodistribution. Iodination of OVA was performed as described previously¹⁸. Mice were fasted for 3 h before gavage with 4 × 10⁶ CPM ¹²⁵I-OVA and 50 mg cold OVA (grade III) in 200 l PBS, and samples were taken at 1 h and 5 h post gavage. The wet weight of tissues was measured before measuring radioactivity on a gamma counter (Packard Cobra). Input radioactivity was estimated by counting 10% of the gavaged material.

Adoptive T cell transfer. Naive CD4 T cells from spleen and lymph nodes were isolated by negative selection using biotinylated antibodies against CD8α, CD25, CD11c, CD11b, TER-119, NK1.1, and B220 and anti-biotin MACS beads (Miltenyi Biotec). The purity of transgenic CD4⁺ T cells was verified by flow cytometry (CD45.1⁺Vα2⁺Vβ35⁺CD25⁺ for OT-II cells, CD45.1⁺Vβ14⁺CD25⁺ for 7B8tg cells, typically >90%). T cells were labelled using the Cell Trace Violet or CFSE Cell Proliferation Kit (Life Technologies). For OT-II cells, 1 × 10⁶ cells were transferred by retro-orbital injection under isoflurane gas anaesthesia. For 7B8tg cells, 4 × 10⁵ cells were transferred for analysis of gLNs 60 h post-transfer and 5,000 cells for analysis 7 days or more after transfer in the gut and gLNs.

Oral antigen administration. OVA (grade III, Sigma, A5378) was administered at 50 mg in 200 l PBS by gavage using metal gavage needles. Two doses were given with a 24-h interval, the first dose given 16±24 h after adoptive OT-II cell transfer.

Intravenous antigen administration. Endotoxin-low OVA (Worthington) was administered by retro-orbital injection at either 1 mg or 0.1 mg in 100 l PBS 16 h after adoptive OT-II cell transfer. The high dose corresponds to the maximum of ¹²⁵I-OVA recovered in blood upon OVA gavage (4% of 50 mg gavage per ml plasma, see Extended Data Fig. 5e, equivalent to 2% in blood, estimating the blood volume of a 20 g mouse is around 1 ml equating to 1 mg); the ten times lower dose is equivalent to doses used previously¹¹.

Intestinal CT±OVA injection. Naive OT-II cells were adoptively transferred into 7-week-old C57B6 mice 16±24 h before surgery (1 × 10⁶ cells for T cell fate analysis in gLNs, 1 × 10⁵ for subsequent *Stm*-OVA infection). Mice were anaesthetized subcutaneously with 100 mg/kg ketamine (controlled substance provided by the Rockefeller University animal facility), 10 mg/kg xylazine (Akorn), and in the presence of 5 mg/kg analgesic meloxicam (Putney) in 0.5 ml saline. The abdominal area was then shaved, and sterilized by three cycles of wiping with iodine solution and 70% ethanol after 20 l of 0.25% bupivacaine (Hospira, Inc.) was injected intradermally at the prospective site of incision. The mouse was placed on a heat mat and covered by sterile surgical plastic with an opening above the abdomen. All work from here was performed aseptically. Skin was incised in the middle of the abdomen and the peritoneum was cut open. Filter-sterilized PBS solution (100 l) containing 50 mg OVA and 5 µg cholera toxin or not was injected into the duodenum (5 mm after the pylorus) or the ileum (5 mm before the most distal Peyer's patch) using a 28.5 G needle pointing towards the distal intestine. The peritoneal muscles were aligned and sutured using absorbable suture (PDS®II, Ethicon), the skin closed with autoclips (Ken Scientific Corp.), and the wound covered with Triple Antibiotic Ointment (Honeywell Safety Products, USA). Mice were allowed to fully awaken in a cage placed on a heat mat. For sham surgery, mice were opened and sutured again. Mice that had undergone different surgeries were pooled in cages. On the day after surgery, mice were monitored for agility and passing stool. Mice were treated with 0.3 mg/kg of buprinex (controlled substance) and 5 mg/kg meloxicam 24 h after the first meloxicam treatment and every 24 h for another 3 days.

***Stm*-OVA infection.** Seven days after CT±OVA injection, mice were gavaged with 20 mg streptomycin in 200 l PBS. On the same day, *Stm*-OVA was grown overnight to stationary growth phase in LB broth at 300 r.p.m. at 37 °C. On the next day, a 100 l aliquot of *Stm*-OVA was sub-cultured in 3 ml LB broth. After 3.5 h, 50 l subculture was diluted in 50 ml PBS, giving rise to a density of 10⁵ CFU per 100 l, and mice were immediately gavaged with 100 l of this solution. The infection was

timed such that 24 h had elapsed since streptomycin administration and the mice had been fasted for 4 h before infection. Initial body weight was taken just before gavage. Mice were weighed every 24 h after infection. In the survival study, mice were killed when their weight reached 80% or less of their starting weight. For analysis of *Stm*-OVA dissemination, mice were killed 48 h after infection, and CFU in organs was determined by serial dilutions on Salmonella Shigella agar plates.

C. rodentium and Citro-OVA infection. Mice were infected with $1 \pm 2 \times 10^9$ CFU of *C. rodentium* or *Citro*-OVA. For *Citro*-OVA infection, mice were kept on 100 mg/l kanamycin in drinking water to ensure the OVA-expressing plasmid was not lost. Non-infected control mice were also kept on kanamycin. Infection was monitored by plating faeces onto MacConkey agar plates. Nine days after infection, 1×10^6 naive OT-II cells were adoptively transferred and mice subjected to OVA gavage as described above.

SFB colonization. SFB was obtained from frozen stocks of caecal contents (kept at ± 80 °C for less than 6 months) of mice monocolonized with SFB, which were diluted in PBS (2 ml/caecum) and passed through a 70- μ m mesh. Mice were colonized by two gavages of 0.4 ml of caecal content preparation, 24 h apart. Colonization was verified by real-time PCR of faecal DNA (Quick-DNA Fecal/Soil microbe miniprep kit, Zymo research, Cat. No. D6010). PCR was performed in the presence of Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, 4367659) on a Quant Studio 3 PCR machine (Applied Biosystems), using SFB-specific 16S primers (fwd: GACGCTGAGGCATGAGAGCAT; rev: GACGGCACGGATTGTTATTCA). The SFB Ct value was normalized by the Ct obtained in the PCR using universal bacterial 16S primers (fwd: ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT; rev: ATTACCGCGGCTGCTGGC).

Lymph node surgery. Mice were prepared and sutured and monitored postoperatively as for CT \pm OVA injection. To expose the ileal and caecal lymph nodes, the caecum was gently pulled out using cotton tipped applicators soaked in saline. To expose the upper duodenal lymph nodes, the duodenum was shifted to the left just under the pylorus; the same loop was shifted to the right to expose the distal duodenal gLNs. Lymph nodes were removed by holding onto the lymph node with tweezers and gently pulling it while slowly and closely cutting around the node with microsurgical scissors, such that no bleeding occurred. For sham operation, the caecum was pulled out and the lymph nodes exposed for 2 min. The caecum was then placed back into its original position and the peritoneal cavity filled with 0.5 ml pre-warmed saline. Mice were allowed to recover from surgery for twelve days before colonization with SFB (Jax mice), nineteen days before adoptive transfer of 7B8tg cells, and two weeks before OVA gavage (oral tolerance).

S. venezuelensis passage and infection. *S. venezuelensis* was maintained in Wistar rats by subcutaneous infection with 30,000 larvae. On day 6 \pm 8 after

infection, the caecum (containing eggs) was removed and spread on Whatman paper, which was placed into a beaker with water at 28 °C. The hatching larvae were collected over 4 days and the cycle re-initiated. Mice were infected subcutaneously with 700 larvae per mouse. Adult worm load was assessed in total epithelial scrapes from the gut.

Alum immunization and airway challenge. Seven days after oral administration of OVA, 4 μ g of endotoxin-free OVA antigen adsorbed to 40 μ l Imject Alum Adjuvant (Fisher Scientific) was injected intraperitoneally in a final volume of 400 μ l made up with PBS. Immunization was repeated after 7 days. To induce airway inflammation, mice were anaesthetized and intranasally administered 10 μ g of sterile OVA grade VI in 50 μ l PBS (25 μ l per nostril) on days 14, 17 and 21 after the first intraperitoneal immunization. Total IgE was measured to confirm previous infection with *S. venezuelensis* (250 \pm 350 ng/ml in plasma compared to 5 \pm 10 ng/ml in plasma of uninfected mice)¹⁸.

Bronchoalveolar lavage (BAL), lung histology and infiltrate analysis by flow cytometry. Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of 0.35 ml 2.5% avertin (Sigma), the trachea was cannulated and lungs were lavaged once with 0.5 ml and then with 1.0 ml PBS. Total BAL cells were counted after erythrocyte lysis and stained for FACS analysis. Lungs were perfused via the right ventricle with 10 ml saline to wash out residual blood. One lobe was digested in 400 U/ml collagenase D/HBSS and processed for FACS analysis. Eosinophils were determined as CD45⁺SSA^{hi}MHCII⁺CD11b⁺Ly6G^{int}SiglecF⁺ and dendritic cells as CD45⁺MHCII⁺CD11c⁺CD64⁺SiglecF⁺.

Anti-OVA IgG1 and total IgE ELISAs. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed as described previously¹⁸.

Statistical analysis. No statistical methods were used to predetermine sample size. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 7.0 software. Error bars indicate s.e.m. Multivariate data were analysed by applying one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post hoc test; comparisons between two treatment conditions were analysed using one-tailed unpaired Student's *t*-test. Survival curve was analysed using Mantel-Cox, Gehan-Breslow-Wilcoxon and logrank tests. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this paper.

Data availability

Source data for all figures are provided with the paper. For RNA-seq experiments the raw and processed data generated here can be obtained at the Gene Expression Omnibus database under the accession code: GSE121811.

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistical parameters

When statistical analyses are reported, confirm that the following items are present in the relevant location (e.g. figure legend, table legend, main text, or Methods section).

n/a | Confirmed

- The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- An indication of whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.
- A description of all covariates tested
- A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- A full description of the statistics including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
Give P values as exact values whenever suitable.
- For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated
- Clearly defined error bars
State explicitly what error bars represent (e.g. SD, SE, CI)

Our web collection on [statistics for biologists](#) may be useful.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

N/A

Data analysis

Flow Jo 8.7 and Flow Jo 10 (Flow Cytometry analysis); Gaph Pad Prism 7 and 8 (Graphs, statistics); R, DESeq2, GSEA v3.0 with the c5.all.v6.1.symbols.gmt (Gene Ontology) for RNA-seq analysis.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors/reviewers upon request. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

A link to the RNAseq data will be made available prior to publication.

Field-specific reporting

Please select the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/authors/policies/ReportingSummary-flat.pdf](https://www.nature.com/authors/policies/ReportingSummary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	A minimum of biological triplicates was used, the minimum needed to be able to perform statistics. For in vivo studies, the maximum number of animals available per treatment group were used to counteract biological variation: for all adoptive transfer experiments up to 5 animals per group, for oral tolerance experiments up to 8 animals per group, for infection and surgery experiments up to 8 per group. For surgeries (lymph node removal and intestinal antigen injection) removal surgery and OVA+ cholera toxin surgery group sizes were larger than sham (+2 mice) in the event an animal had to be euthanized during post-operative care due to the higher invasiveness of the procedure. All surviving animals were included in the study. This could lead to unequal group sizes and is indicated in the respective figure legends.
Data exclusions	No data were excluded except if technical reason applied: for lamina propria lymphocyte populations if the preparation was more than 60% dead; no sample was recovered; for transferred cells, if fewer than 200 cells were recovered during flow cytometry (indicated throughout figure legends by #), as gates for very low frequency cells inaccurate at such low number.
Replication	All attempts at replicating data were successful. In experiments where variation is inherent to the assay, data from independent experiments were pooled are shown as indicated in the legends (Fig. 3b, g; Fig. 4j, l-n; Extended Data Fig. 7b, c; Extended data Fig. 8b,c; Extended data Fig. 10 e, f).
Randomization	For all studied B6 mice were purchased in batches of 10-20 mice and randomly distributed to cages. Infection/colonization studies: Cages of 5 mice were randomly infected/colonized with SFB or note. Because of the high chance of contamination it was not possible to house infected/colonized and non-infected mice in a single cage. CT-OVA injection: Mice were housed in cages of 4-5 mice and within a cage randomly subjected to sham, duodenal or ilial OVA or OVA-CT injection but ensuring mixed groups were present in each cage (2 vs 2 or 2 vs 3 or 2 vs 2 vs 1). Surgery: Mice were housed as 5 mice/ cage, and each cage housed 2 vs 3 or 3 vs 2 sham operation versus lymph node removal surgery mice, to avoid any potential microbial drift or behavioral changes due to the different treatments affecting the study outcome.
Blinding	Blinding was not possible in this study as the experimenters treating the mice were the same as those analyzing the data. The treatment groups had to be clearly identified throughout the study to prevent cross contamination (gnotobiotic/infection experiments), to be able to draw conclusions (CT-OVA injection in duodenum versus ileum) or were obvious by their anatomy (lymph nodes were removed). However, statistics were performed in an unbiased manner.

Reporting for specific materials, systems and methods

Materials & experimental systems

n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Unique biological materials
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Human research participants

Methods

n/a	Involved in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

Unique biological materials

Policy information about [availability of materials](#)

Obtaining unique materials	C57BL/6J CD45.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ) were from Jackson laboratories, CD45.2 (C57BL/6) mice were purchased from the Jackson Laboratories or Taconic Farms, and CD45.1 OT-II TCR-transgenic were originally purchased from Taconic Farms and maintained in our facilities. B6.Cg-Tg(Itgax-Venus)1Mnz/J mice were provided by M. Nussenzweig (The Rockefeller University). C57BL/6-Tg (Tcra,Tcrb)2Litt/J (7B8tg) mice were either purchased from Jackson Laboratories or provided by D. Littman (NYU). All mice are commercially available from the indicated suppliers.
----------------------------	---

Antibodies

Antibodies used

Fluorescent-dye-conjugated antibodies were purchased from BD (USA) (anti-CD45.2, 560693; anti-CD31, 557355; anti-CD103, 557495; anti-Ly6C, 560595; anti-NK1.1, 562921; anti-SiglecF, 552126; anti-RORyt, 562894; anti-IL17A, 56022 and 559502; anti-Vβ14, 553258), eBioscience (USA) (anti-B220, 48-0452-82; anti-CD3e, 48-0031-82; anti-CD4, 83-0042-42; anti-CD8α, 56-0081-82; anti-CD25, 17-0251-82; anti-CD11b, 47-0112-82; anti-CD11c, 25-0114-82, 17-0114-82 and 56-0114-82; anti-CD24, 48-0242; anti-CD45, 25-0451-82; anti-CD45.1, 25-0453-82; anti-CD69; anti-FOXP3, 12-5773-82; anti-GATA3, 12-9966-42; anti-I-A/I-E (MHCII), 46-5321-82 and 56-5321-82; anti-Ly6G, 48-5931-82; anti-Podoplanin, 25-5381-82; anti-Vα2, 48-5812-82, and Streptavidin, 46-4317-82), or Biolegend (USA) (anti-CD8α, 100744; anti-CD11b, 101236; anti-CD64, 139306; anti-TCRβ, 109220; anti-TER119, 116206). Additional antibodies were purchased from BioXCell and labelled in-house (anti CD4, BE0003-1; anti-CD8α, BE0004-1; anti-CD11b, BE007; anti-CD19, BE0150; anti-TCRβ, BE00102). Biotinylated antibodies were purchased from BD Pharmigen (anti-B220, 553086; anti-CD8α, 553029; anti-CD11b, 553309; anti-CD11c, 553800; anti-CD25, 553070; and anti-NK1.1, 553163; anti-TER-119, 553672;) or as follows: anti-IgG1, Bethyl, A90-105B; anti-IgG2c, Bethyl, A90-136B; anti-IgE, eBioscience, 13-5992-82; and anti-Neuropilin, R&D Systems, BAF566. Unconjugated antibodies used were anti-LYVE 1, R and D Systems AF2125; anti-GFP (Aves Labs, GFP-1020); anti-OVA IgG1, Biolegend, 520501; anti-IgE, Invitrogen, RMGE00; IgE isotype control, eBioscience 554118. Horseradish peroxidase conjugated Streptavidin was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Aqua LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, L-34965, Cell Trace CFSE and Violet Cell Proliferation kits (C34554 and C34557) were purchased from Life Technologies.

Validation

All antibodies are commercially available and have been validated by suppliers and previous publications.

Animals and other organisms

Policy information about [studies involving animals](#); [ARRIVE guidelines](#) recommended for reporting animal research

Laboratory animals

C57BL/6 males, age 7-15 week were used. Age is specified in legends where necessary.

Wild animals

N/A

Field-collected samples

N/A

Flow Cytometry

Plots

Confirm that:

- The axis labels state the marker and fluorochrome used (e.g. CD4-FITC).
- The axis scales are clearly visible. Include numbers along axes only for bottom left plot of group (a 'group' is an analysis of identical markers).
- All plots are contour plots with outliers or pseudocolor plots.
- A numerical value for number of cells or percentage (with statistics) is provided.

Methodology

Sample preparation

Lymphocyte and APC isolation from lymph nodes. Tissues were dissected into cold HBSS, supplemented with Mg²⁺ and Ca²⁺, finely chopped and incubated in 400 U/ml Collagenase D (Roche) in HBSS for 25 min at 37°C, 5% CO₂. Collagenase was quenched on ice by addition of final 10% FCS. Single cell suspensions were extracted from connective tissue by taking up and resuspending the digests five times. Erythrocytes were lysed by incubation in erythrocyte lysis buffer (Sigma) for 7 min at RT.

Stromal cell isolation from gLNs. gLNs were dissected into 500 µl cold RPMI, supplemented with 2% FCS and HEPES (dissection medium). Tissues were disrupted using 25 G needles, and Liberase TL (Roche) was added to a final concentration of 0.25 mg/ml, collagenase D (Roche) to a final concentration of 400 U/ml. Tissues were incubated at 37°C on an orbital shaker at 80 rpm for 10 minutes, disrupted at RT by gently pipetting digest up and down 50 times, followed by an additional 20 times. Reaction was stopped by placing digest on ice and adding 14 ml of ice cold dissection medium. Cells were spun down at 700 g for 5 minutes at 4°C, resuspended in erythrocyte lysis buffer (Sigma) topped up with medium again, spun and then subjected to staining.

Lymphocyte and APC isolation from small and large intestine. Intestines were separated from mesentery, and Peyer's Patches (small intestine) and feces were removed. For segmentation of the small intestine, the upper 25% of the small intestine were taken as duodenum, the next 50% as jejunum and the last 25% as ileum. The cecum was included in the preparation of the large intestine. Intestines were cut longitudinally and washed twice in PBS. Tissue was cut into 1 cm pieces, mucus was removed by incubating the tissue for 10 min in PBS and 1 µM DTT, and the epithelium removed by two incubations in 25 ml of HBSS + 2% FCS + 30 mM EDTA for 10 min at 37°C at 230 rpm with vigorous shaking after each incubation. Tissues were washed in PBS over a sieve, then finely chopped and digested in 6 ml of RPMI per gut segment (Gibco), 2% FCS, 200 µg/ml DNaseI (Roche) and 2 mg/ml Collagenase 8 (Gibco) for 45 min at 37°C, 5% CO₂. Digests were taken up and resuspended 10 times, passed through a sieve and the collagenase quenched by addition of 15 ml of cold RPMI, 2% FCS. Cell pellets were resuspended in 40% Percoll (BD Pharmigen) complemented with RPMI, 2% FCS, passed through a 100 µm mesh and separated by centrifugation in a discontinuous Percoll gradient (80%/40%) at 1000 g for 25 min at room temperature (RT). APCs and lymphocytes were isolated from the interphase, washed, and stained for FACS analysis or subjected to re-stimulation.

Instrument	LSR II
Software	Flow Jo 8.7
Cell population abundance	For flow cytometry analysis of mLNs a minimum of 500 cells per final gate, or in the case of adoptive transfer, of adoptively transferred cells, was acquired. For lamina propria, a minimum of 200 adoptively transferred cells was acquired. Wherever this was not possible (low recovery of adoptively transferred cells) this is reported in the legend as "#, fewer than 200 cells were recovered".
Gating strategy	All samples were pre-gated as singlet, live (Aqua negative) events. Further gates for lymphocytes are indicated in the axes or legends of each figure, but typically were events out of CD45+, CD45.1+ or TCRb+CD4+. Final gating strategy for DC subsets is in ED Fig. 3f. Stromal cells were gated as CD45-, TCRb-B220-(lineage, LIN)TER119-CD24, final gating strategy for subsets in ED Fig. 3a.

Tick this box to confirm that a figure exemplifying the gating strategy is provided in the Supplementary Information.

The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation

MCC Canesso¹, L Lemos¹, TC Neves¹, FM Marim¹, TBR Castro¹, ÉS Veloso², CP Queiroz¹, J Ahn³, HC Santiago¹, FS Martins⁴, J Alves-Silva¹, E Ferreira², DC Cara⁵, AT Vieira¹, GN Barber³, SC Oliveira¹ and AMC Faria¹

STING (stimulator of interferon genes) is a cytosolic sensor for cyclic dinucleotides and also an adaptor molecule for intracellular DNA receptors. Although STING has important functions in the host defense against pathogens and in autoimmune diseases, its physiological relevance in intestinal homeostasis is largely unknown. In this study, we show that STING^{-/-} mice presented defective protective mechanisms of intestinal mucosa, including decreased number of goblet cells, diminished mucus production, and lower levels of secretory IgA, when compared with wild-type (WT) mice. Fecal content and microbiota DNA could activate STING, indicating a role of this molecule in gut. Microbiota composition was altered in STING^{-/-} mice toward a more inflammatory profile, evidencing a reduction in the Allobaculum and Bifidobacterium groups along with increase in Disulfovibrio bacteria. Absence of STING lead to decrease in induced intraepithelial lymphocytes (IEL) and to increase in group 1 innate lymphoid cell (ILC1) as well as ILC3 frequencies and decrease in ILC2 in the colon. Development and function of Foxp3⁺ and LAP⁺ regulatory T cells were also compromised in STING^{-/-} mice. Moreover, these mice were highly susceptible to dextran sodium sulfate-induced colitis, T-cell-induced colitis, and enteric *Salmonella typhimurium* infection when compared with WT animals. Therefore, our results identify an important role of STING in maintaining gut homeostasis and also a protective effect in controlling gut inflammation.

INTRODUCTION

The large intestine is colonized by trillions of microorganisms that can greatly affect the mucosal immune response.¹ To maintain intestinal health, the immune system must faithfully respond to antigens from pathogenic microbes while maintaining a state of tolerance to commensals and food antigens that contact it every day.^{2,3} Commensal bacteria have the potential to activate large intestinal epithelial and immune cells and this constitutive activation is critical to maintain intestinal homeostasis. However, defective interactions between the luminal microbiota and intestinal immune system can lead to sustained inflammation and development of chronic diseases, such as inflammatory bowel disease.^{4,5}

The intestinal epithelium is renewed at an extraordinary rate, outpacing all other tissues in the body. Cell death, by apoptosis

or other mechanisms, are responsible for the renewing of cells; proliferation as well as migration of new cells from precursors induces extrusion of live cells to control epithelial cell numbers.⁶ These events, along with the presence of the microbiota, contribute to release of nucleic acids in the intestine. Extracellular DNA can activate cells of the immune system and a fine balance between pro- and anti-inflammatory mechanisms is required to maintain intestinal homeostasis.^{7,8}

Innate immunity has a central role in the homeostasis of intestine and in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. A complex network of signaling pathways triggered by molecules derived from commensal microbiota via innate receptors such as Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors, NOD-like receptors (NLRs), and absent in melanoma 2 (AIM2) are employed for the detection of pathogens

¹Department of Biochemistry and Immunology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ²Department of Pathology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³Department of Cell Biology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA. ⁴Department of Microbiology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and ⁵Department of Morphology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. Correspondence: AMC Faria (anacaetanofaria@gmail.com)

Received 28 December 2016; accepted 17 September 2017; published online 20 December 2017; doi:10.1038/mi.2017.88

and for the maintenance of gut integrity in a highly activated environment.^{7,9} Consistently, defects in TLRs (TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9), RIG-I-like receptor, NLRs (NOD1, NOD2, NLRP3, and NLRP12) and AIM2 signaling pathways were shown to be involved in the development of colitis and colorectal cancer.^{8,10} However, the precise mechanisms and functions of DNA sensors in intestinal physiology and inflammation have yet to be defined.

STING (stimulator of interferon genes) is a cytoplasmic innate immune sensor for cyclic dinucleotides (CDNs) that also has a role as an adaptor molecule for a number of intracellular DNA receptors.^{11,12} The upstream DNA sensors that signal through STING include cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), IFI16, and DDX41,^{13,14} highlighting an important function for STING in controlling multiple DNA recognition pathways. Upon activation, STING recruits TBK1 that phosphorylates IRF3 and nuclear factor (NF)- κ B, inducing transcription of type I interferon (IFN) and other co-regulated genes.^{11–13,15–17} Type I IFNs are a widely expressed family of pleiotropic cytokines that exert different functions, including antiviral and antimicrobial activity. Paradoxically, type I IFNs can also suppress immune responses by driving production of anti-inflammatory cytokines, and their deregulation contribute to progression of intestinal inflammatory diseases.^{18–20} Since its discovery, STING was shown to contribute to the host defense against viral, bacterial, and eukaryotic pathogens and also to the development of autoimmune disease through its aberrant activation by self DNA.^{21,22} Recent studies have also underscored the role of STING in regulating intestinal inflammation and tumorigenesis in mice.^{23,24} On the other hand, high levels of microbiota-derived DNA and CDNs have been detected in the gut,^{25,26} and these stimuli could contribute to local activation of STING at steady state. Although the role of commensal microbiota in intestinal homeostasis is well documented,²⁷ the physiological relevance for STING signaling in this process has not been reported.

In this study, we investigated the physiological function of STING in the gut as well as the impact of its absence in T-cell-induced colitis, in Salmonella infection and in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, a model of intestinal inflammatory disease that is associated with epithelial destruction and bacterial translocation. Our results demonstrate that STING^{-/-} mice presented several defects in mechanisms that maintain gut homeostasis both at steady state and under inflammatory conditions.

RESULTS

Absence of STING resulted in disruption of gut homeostasis

Intestinal epithelial cells produce antimicrobial effectors that have a central role in shaping the gut microbial community and protecting mucosal tissues from colonization and invasion by commensal microorganisms.⁸ To investigate the potential role of STING in intestine homeostasis, we analyzed histology sections of small intestine and colons from WT and STING^{-/-} mice. First, we observed in hematoxylin and eosin-stained sections

that the villi of small intestine in STING^{-/-} mice were elongated and presented less crimps when compared with WT mice (Figure 1a,b). In addition, colon crypts in STING^{-/-} mice were shorter than that in WT mice (Figure 1c,d) resembling the immature phenotype that was already reported for germ-free mice, with altered pattern of microvilli formation and decreased rates of cell turnover.^{28,29} We then examined goblet cell function by using periodic acid-Schiff staining, and STING^{-/-} mice displayed decreased numbers of periodic acid-Schiff-positive (goblet) cells per crypt when compared with WT mice (Figure 1d–f). Goblet cells are responsible for mucin production, which is essential to protect the gut mucosa from invasion by colonic bacteria and from other stressors that may cause tissue damage and inflammation.³⁰ To further examine whether the lower number of goblet cells in STING^{-/-} mice was associated with mucus production, we stained sections of colon by immunohistochemistry to detect MUC1 and MUC2, which are the major components of the colonic mucus. The number of vesicles positive for MUC1 was smaller in STING^{-/-} mice when compared with WT counterparts (Figure 1g,h). Consistent with that, analysis of the MUC2 staining also showed a decreased frequency of MUC2-expressing cells in STING^{-/-} mice compared with WT mice (Figure 1i,j), indicating that mucus layer production is compromised in the absence of STING.

We next analyzed whether other immune mechanisms involved in mucosa protection were altered in STING^{-/-} mice. Lower levels of secretory IgA (SIgA) were found in the feces of STING^{-/-} mice compared with WT animals (Figure 1k). IgA is essential to gut homeostasis as they reduce the penetration of commensal bacteria in the intestinal epithelium.³¹ Moreover, we assessed the levels of interleukin (IL)-1 β , which is an important cytokine involved in the maintenance of epithelial barrier, and we observed lower levels of IL-1 β in the colon of STING^{-/-} mice (Figure 1l). Additionally, mRNA levels of the repair molecule *Amphiregulin* were also reduced in the colon of STING^{-/-} mice compared with WT mice (Figure 1m) and no difference was found in the levels of *IL-22bp* between the studied groups (data not shown). Together, these data indicate that an intact STING signaling is required to maintain several mechanisms of mucosa homeostasis and protection.

As several mechanisms of gut barrier function were defective in STING^{-/-} mice, we tested whether intestinal permeability was also compromised in these animals using administration of fluorescein isothiocyanate dextran, but no difference was found between the two groups of mice (data not shown).

Gut microbiota activates STING and induces type I IFN

STING is known to be activated by cyclic dinucleotides that can be produced by many bacteria species, including gut microbiota. To directly assess the involvement of bacteria from gut microbiota in STING activation, we used murine embryonic fibroblasts (MEFs) from WT mice. STING is a transmembrane protein component of endoplasmic reticulum that, when activated, forms an aggregate in the perinuclear region.¹¹ MEFs

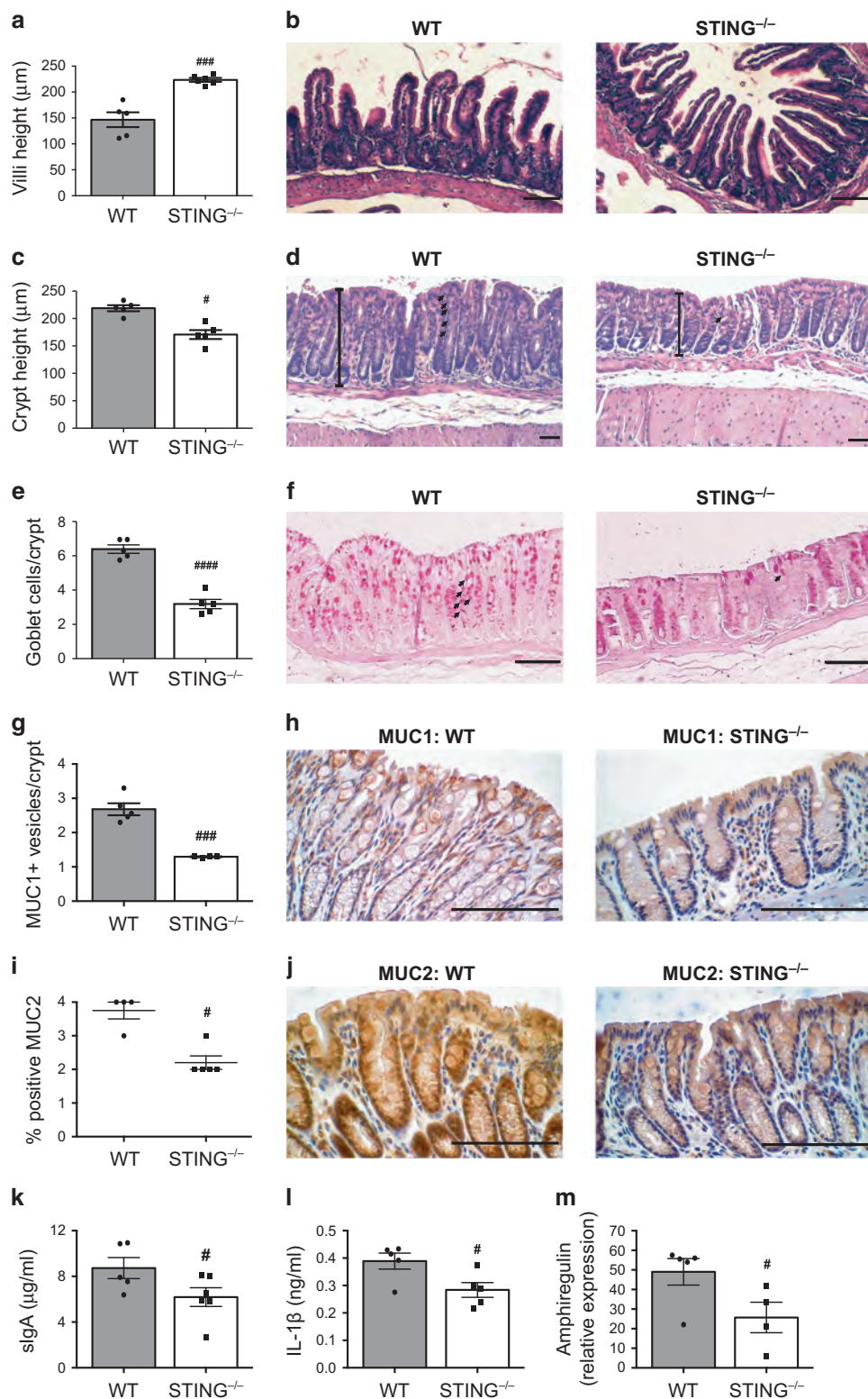


Figure 1 Alterations in mucosa structure in STING^{-/-} mice. Small intestine and colon of wild-type (WT) and STING^{-/-} mice were collected for analyses of (a) villi height, (c) crypt height, and (e) the number of goblet cells per crypt. Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin-stained (b) ileum sections and (d) colon sections from WT and STING^{-/-} mice evidencing villi and crypt height, respectively. Representative photomicrographs of periodic acid-Schiff-stained (f) colon sections from WT and STING^{-/-} mice evidencing goblet cells (arrows). Quantification of (g) MUC1 and (i) MUC2 in the colons of WT and STING^{-/-} mice. Representative photomicrographs of (h) MUC1 and (j) MUC2 immunohistochemical colon sections. (k) Secretory IgA (sIgA) levels in feces and (l) interleukin (IL)-1 β levels in the colons of WT and STING^{-/-} mice. (m) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis of *Amphiregulin* mRNA in the colons from WT or STING^{-/-} mice. Bars represent 100 μm . Data represent two independent experiments with five to six mice per group. Data represent the mean \pm s.e.m. # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$; #### $P < 0.0001$.

were stimulated for 4 h with STING-activating dsDNA90 (positive control), fecal content, or microbiota DNA purified from feces and the cells were analyzed by confocal microscopy. In the absence of stimuli, STING was sparse in the cytoplasm. However, when MEFs were stimulated with dsDNA90, fecal content, or DNA purified from the feces, STING migrated and formed a punctual aggregate in the perinuclear region of the cell (**Figure 2a**). This result suggests that gut commensal microbiota can activate STING.

STING is known to be important for type I IFN induction.^{11,15,16} Indeed, we found significantly reduced levels of *IFN- β* mRNA in the colon of STING^{-/-} when compared with WT mice (**Figure 2b**). Consistent with a role for microbiota in STING activation, WT mice that were treated with a broad spectrum antibiotics showed similar levels of *IFN- β* expression compared with STING^{-/-} mice (**Figure 2c**). We also found reduced *IFN- β* mRNA levels in the colon of germ-free mice when compared with their WT counterparts (see **Supplementary Figure S1** online). Moreover, mono-association of germ-free mice with the commensal bacterium *Bacteroides thetaioimicon* partially rescued *IFN- β* expression (see **Supplementary Figure S1**), indicating a role for gut microbiota in type I IFN via STING signaling.

To further demonstrate that gut microbiota activates STING, we cultured lamina propria cells from WT and STING^{-/-} mice and stimulated them for 16 h with either dsDNA90 or microbiota DNA purified from feces and measured *IFN- β* expression. As expected, colon lamina propria cells from WT mice expressed high levels of *IFN- β* mRNA when stimulated with dsDNA90 and no *IFN- β* expression was observed in STING^{-/-} mice upon the same stimuli (**Figure 2d**). Moreover, microbiota DNA also induced type I IFN in WT mice lamina propria cells, whereas no expression was found in the absence of STING. Together these data suggest that the microbiota is indeed involved in the production of type I IFN in a STING-dependent pathway.

It has been described that microbiota and immune cells in the gut regulate each other. There are reports, for instance, on the role of microbiota in SIgA production^{32,33} and, reciprocally, on the impact of SIgA in the microbiota composition.^{34,35} Therefore, we next assessed whether the absence of STING signaling by gut microbiota would interfere with its composition. The beta diversity was assessed by the principal coordinate analysis of weighted (**Figure 2f**) and unweighted (**Figure 2g**) Unifrac distances. In both metrics, WT and STING^{-/-} mice groups clustered separately and showed to be significantly different by means of the Adonis statistical test (unweighted: $P = 0.015$, weighted: $P = 0.01$). There was a greater fecal output in the Proteobacteria and a reduction in the Actinobacteria phylum in the feces from STING^{-/-} mice, but the most prominent gut microbiota differences between WT and STING^{-/-} mice were observed within specific phyla (**Figure 2e,h,i**). An overgrowth of *Desulfovibrio* genus (Proteobacteria phylum), which is related with development of gut inflammation, and a decrease in symbiotic commensal organisms such as *Bifidobacterium* (Actinobacteria phylum)

and *Allobaculum* (Firmicutes phylum), shown to display anti-inflammatory effects, were detected in STING^{-/-} mice (**Figure 2h,i**).³⁶⁻³⁸ Significant differences in relative abundance of these bacteria populations within specific phyla between STING^{-/-} and WT mice were confirmed by DESeq2 analysis.

Frequencies of IEL and ILC subsets were altered in the colon of STING^{-/-} mice

To ensure intestinal homeostasis, local immune cells must be able to respond to pathogen antigens quickly while maintaining the state of tolerance to commensals. We assessed next whether the absence of STING influenced in intraepithelial lymphocyte (IEL) populations (**Figure 3a** shows gate strategy). Strikingly, the frequency of natural IEL (CD45 + TCR $\gamma\delta$ +) was much higher in STING^{-/-} mice in comparison with that in WT mice (**Figure 3b**). At the same time, the frequency of both subsets of induced IELs (CD45 + TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8 $\alpha\beta$ +, CD45 + TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8 $\alpha\alpha$ +) was significantly reduced in STING^{-/-} mice compared with WT (**Figure 3c-f**). This IEL phenotype observed in STING^{-/-} mice resembles what is observed in germ-free mice featuring an immature development of gut immunity.^{39,40}

We then examine whether STING would also interfere in the colon lamina propria cells. There was no difference in the frequency of T helper type 1 (Th1), Th2, and Th17 cells in the colon lamina propria of STING^{-/-} mice when compared with WT animals (see **Supplementary Figure S2b,c,d**), suggesting that Th cells were not affected by the absence of STING. Next, we analyzed innate lymphoid cells (ILCs) since these cells are substantially enriched in mucosal surfaces and seem to be particularly important regulators of epithelial barriers in the intestine.^{41,42} Interestingly, the frequency of ILC1 (**Figure 3g,h**) and ILC3 (**Figure 3g,j**) was increased in the colonic lamina propria of STING^{-/-} mice compared with WT (**Supplementary Figure S3** shows gating strategy). Moreover, the frequency of ILC2 (**Figure 3g,i**) was reduced in the colonic lamina propria of STING^{-/-} mice, a result that parallels with the reduced levels of IL-4 and IL-5 (**Figure 3k**) and increased levels of IL-17 (**Figure 3l**) in the colon of these mice. This data suggests that lack of STING results in an imbalance in the frequency of ILCs, which might be harmful to gut homeostasis.

Lack of STING signaling reduced the frequency and function of regulatory T cells

Regulatory T (Treg) cells expressing Foxp3 or latency-associated peptide (LAP) mediate suppression of a variety of immune cells and actively prevent inflammatory bowel diseases and food allergies.^{43,44} It has been previously shown that type I IFNs regulates Treg accumulation in the intestine and maintains their stability. The absence of IFNAR (IFN- α receptor) signaling on innate immune cells results in poor expansion and maintenance of Foxp3 + Tregs in the intestine.^{20,45,46} Given that STING signaling induces the production of type I IFNs, we analyzed whether the absence of STING would interfere with the development and function of Treg cells in gut mucosa. STING^{-/-} mice had lower frequency of CD4 + LAP + Treg cells in colonic lamina propria and lower

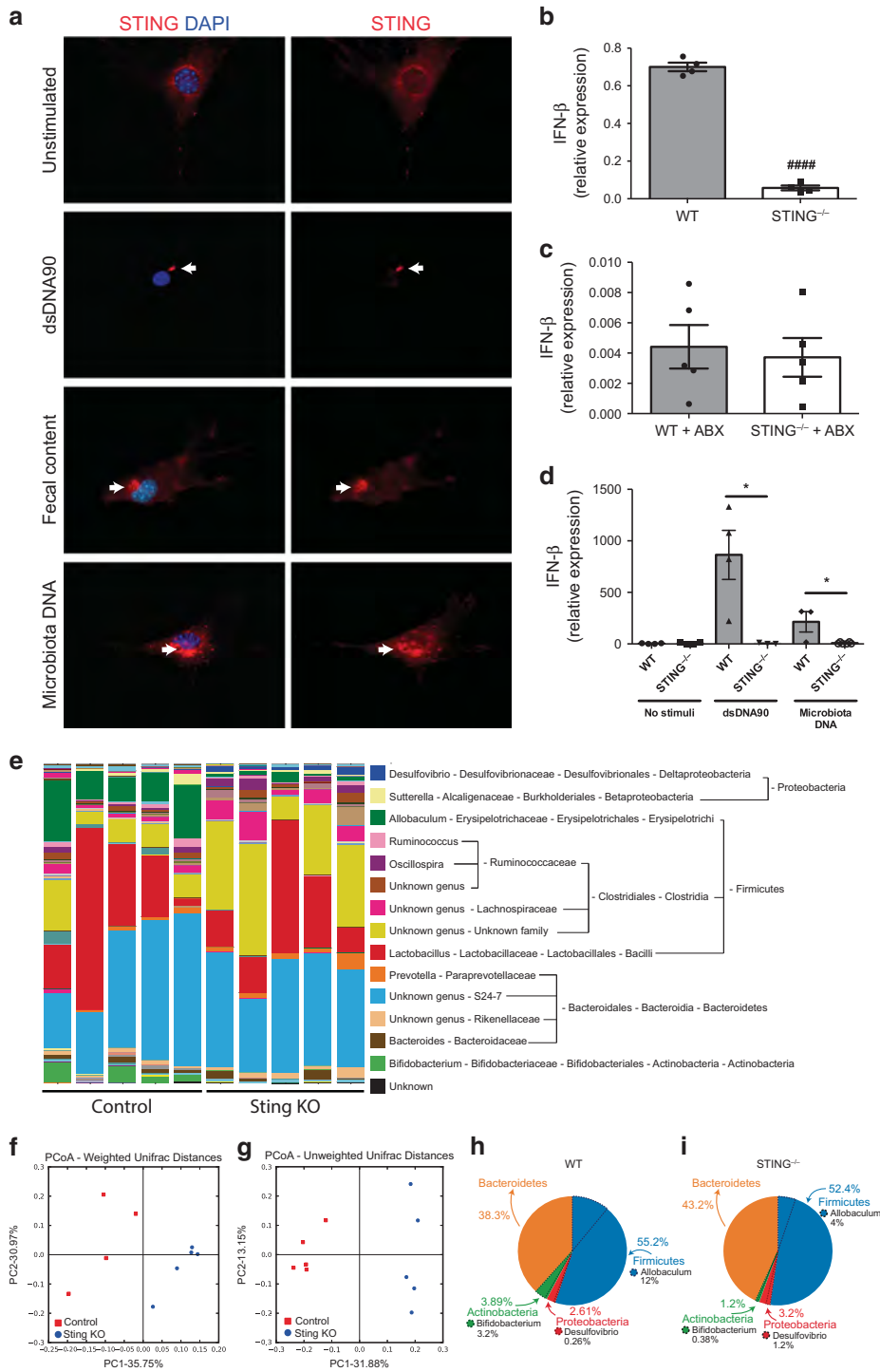


Figure 2 Activation of STING (stimulator of interferon genes) by commensals. **(a)** Confocal microscopy of wild-type (WT) murine embryonic fibroblasts (MEFs) stained with anti-STING and DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), unstimulated or stimulated for 4 h with STING-activating dsDNA (dsDNA90 base pairs), fecal content, or microbiota DNA purified from feces from WT mice. MEFs from STING^{-/-} mice did not stain with anti-STING (data not shown). Arrows highlight STING punctual aggregation. **(b)** Quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) analysis of interferon (IFN)- β mRNA in the colons from WT or STING^{-/-} mice. Data represent two independent experiments with four mice per group. **(c)** qRT-PCR analysis of IFN- β mRNA in the colons from WT or STING^{-/-} mice treated with a broad spectrum of antibiotics. **(d)** qRT-PCR analysis of IFN- β mRNA of WT and STING^{-/-} mice lamina propria cell culture stimulated with STING-activating dsDNA or microbiota DNA purified from feces for 16 h. **(e)** Distribution of operational taxonomic units in feces from WT and STING^{-/-} mice. Assessment of structure of microbial communities by **(f)** weighted and **(g)** unweighted UniFrac principal coordinate analyses (PCoA) plots are presented for gut bacteria sequenced. Distribution of bacteria phyla in feces from **(h)** WT and **(i)** STING^{-/-} mice evidencing main differences within each phylum. Data represent two independent experiments with three to five mice per group. Data represent the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$; #### $P < 0.0001$.

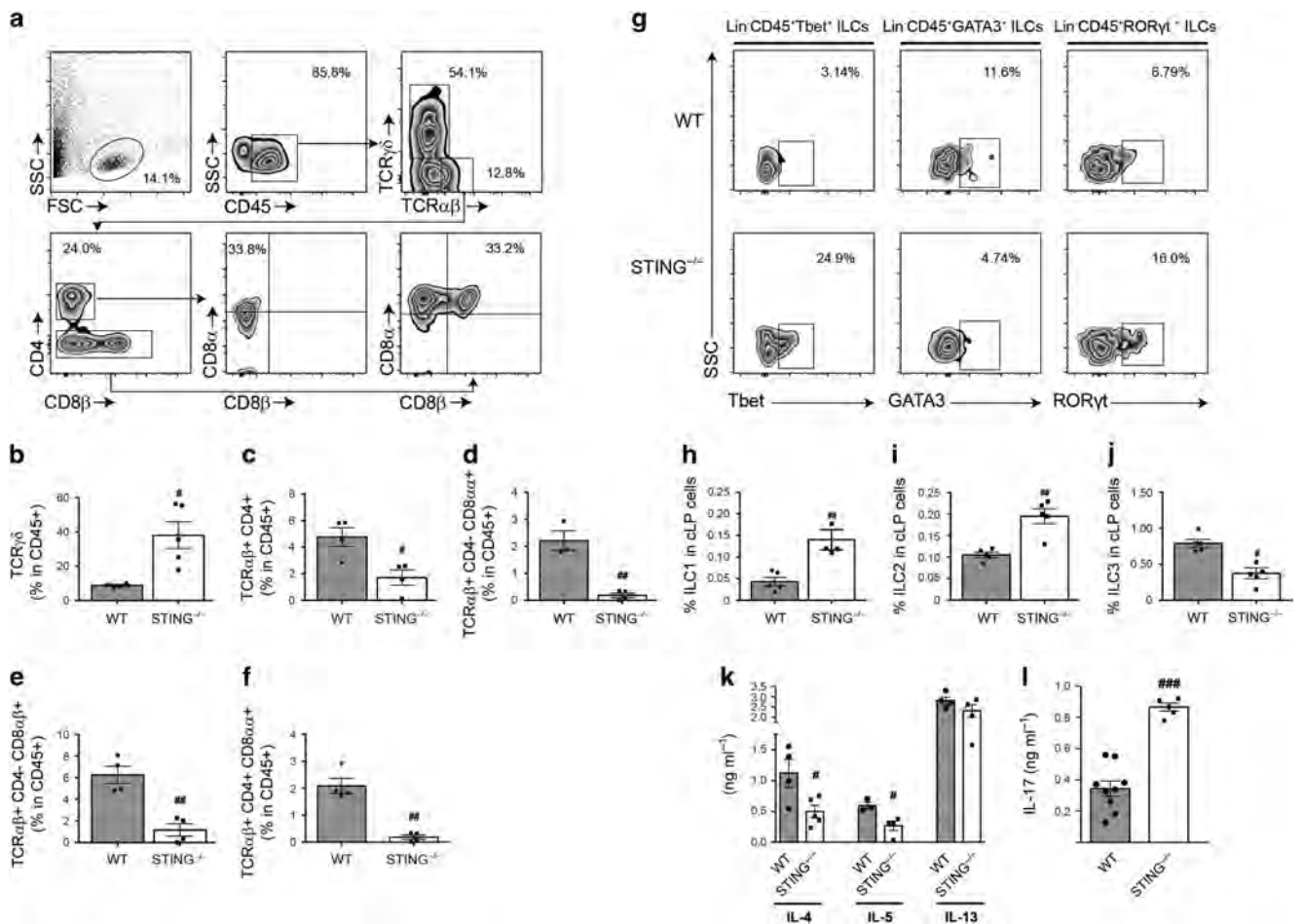


Figure 3 Altered frequency of intraepithelial lymphocytes (IELs) and innate lymphoid cells (ILCs) in *STING*^{-/-} mice. **(a)** Representative plots of IELs in the small intestine of wild-type (WT) and *STING*^{-/-} mice. Frequencies of **(b)** CD45 + TCRγδ⁺, **(c)** CD45 + TCRαβ + CD4⁺, **(d)** CD45 + TCRαβ + CD4⁻ CD8αα⁺, **(e)** CD45 + TCRαβ + CD4⁻ CD8αβ⁺, and **(f)** CD45 + TCRαβ + CD4⁻ CD8αα⁺ cells in the small intestine of WT and *STING*^{-/-} mice. **(g)** Representative plots displaying frequencies of ILC1 (Lin-CD45 + CD127 + Tbet⁺), ILC2 (Lin-CD45 + CD127 + GATA3⁺), and ILC3 (Lin-CD45 + CD127 + RORγt⁺) in colon lamina propria of WT and *STING*^{-/-} mice. Frequencies of **(h)** ILC1, **(i)** ILC2, and **(j)** ILC3 cells in colon lamina propria of WT and *STING*^{-/-} mice. Levels of **(k)** interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13 and **(l)** IL-17 cytokines in colon extract of WT and *STING*^{-/-} mice. Data represent two independent experiments with four to five mice per group. Data represent the mean ± s.e.m. #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001. FSC, forward scatter; SSC, side scatter.

frequency of CD4 + CD25 + Foxp3⁺ and CD4 + LAP⁺ Treg cells in mesenteric lymph nodes (MLN) when compared with WT animals (**Figure 4b–e**). Consistent with that, levels of IL-10 and transforming growth factor (TGF)-β, critical for the expansion and maintenance of Foxp3⁺ and LAP⁺ cells, respectively, were also reduced in the colon and MLN of *STING*^{-/-} mice compared with WT (**Figure 4f–i**). These results suggest that STING signaling is required for the maintenance of a normal pool of Foxp3⁺ and LAP⁺ Treg cells and optimal production of IL-10 and TGF-β in MLN and LAP⁺ Treg cells and TGF-β in the colon.

Next, we examined whether STING signaling was also involved in Treg function by assessing their suppressive ability on T naive cells. Naive CD4 + CD62L + CD44^{low} and CD4 + CD25 + Treg cells were sorted, co-cultured with antigen-presenting cells, and stimulated with anti-CD3 to induce T-cell proliferation. At the ratios of 1:1 and 1:2 of Treg:T naive cells, Tregs from WT mice were able to partially suppress T-cell

proliferation. However, Tregs from *STING*^{-/-} mice were unable to suppress proliferation of T cells at the same ratios (**Figure 4j**). Taken together, these data indicate that STING is essential for the maintenance and function of CD4 + Foxp3⁺ Treg cells.

STING protected mice from different gut inflammatory insults

Knowing that *STING*^{-/-} mice showed alterations in the gut that compromise the mechanisms of intestinal mucosa protection and immune-regulation, we assessed whether *STING*^{-/-} mice presented increased susceptibility to intestinal inflammation. To address this question, we employed three different inflammatory insults: (a) a model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in which intestinal inflammation is associated with epithelial destruction, self DNA release, and bacterial translocation;⁴⁷ (b) a model of colitis induced by naive CD4 + CD45RB^{high} T-cell transfer into *RAG*^{-/-} mice in

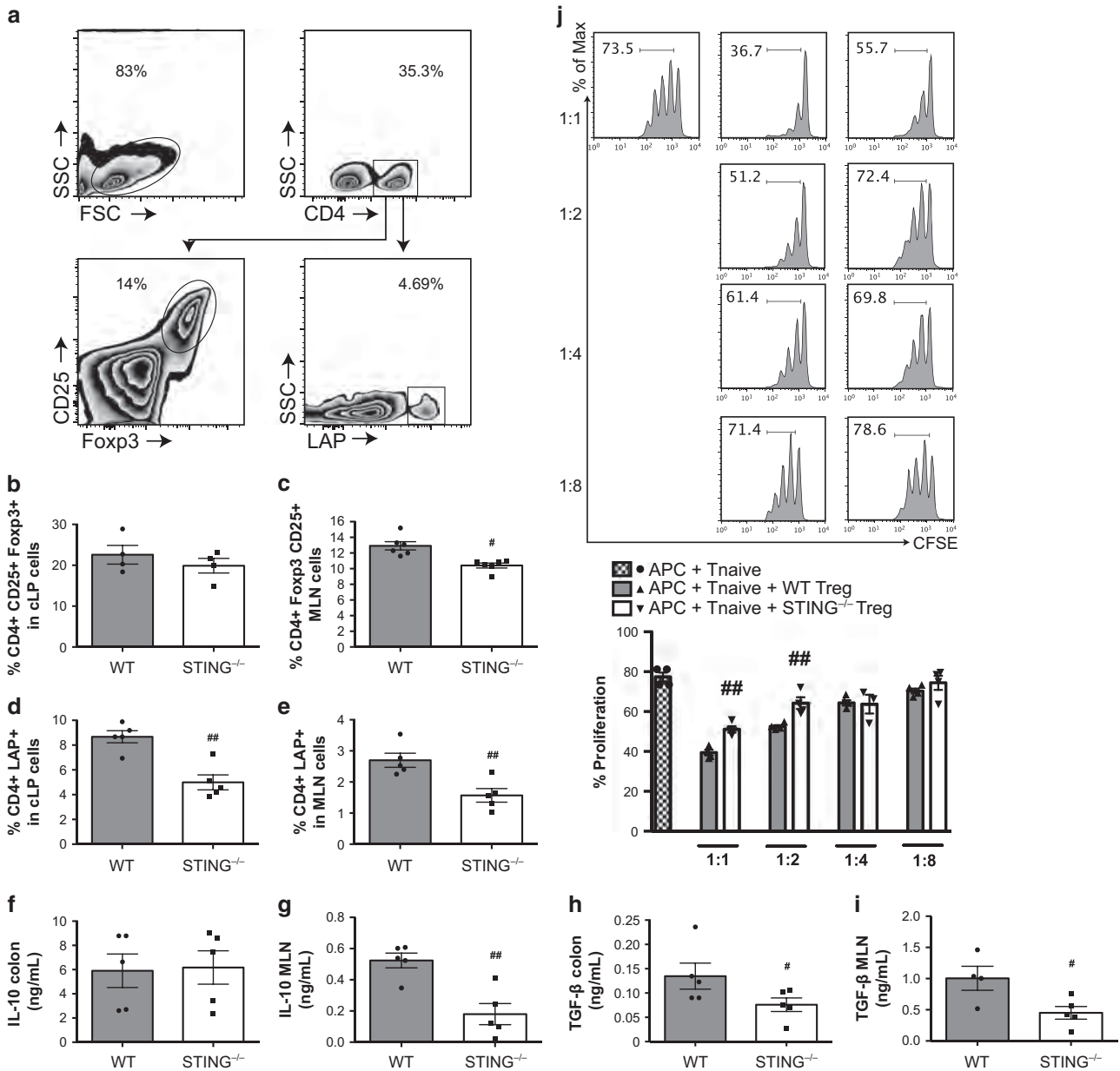


Figure 4 Frequency of regulatory T (Treg) cells in colon lamina propria (cLP) and mesenteric lymph nodes (MLN) of wild-type (WT) and *STING*^{-/-} mice. **(a)** Representative plots of gating strategy for Treg CD4 + CD25 + Foxp3 + and Treg CD4 + LAP + cells. **(b)** Frequency of Treg CD4 + CD25 + Foxp3 + in cLP and **(c)** MLN of WT and *STING*^{-/-} mice. **(d)** Frequency of Treg CD4 + LAP + in cLP and **(e)** MLN of WT and *STING*^{-/-} mice. **(f)** Levels of interleukin (IL)-10 and **(h)** transforming growth factor (TGF)-β cytokines in colon extract of WT and *STING*^{-/-} mice. **(g)** Levels of IL-10 and **(i)** TGF-β in MLN culture of cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 and 72 h, respectively. **(j)** CD4 + CD62L + CD44^{low} or CD4 + CD25 + cells were purified by fluorescence-activated cell sorting from the spleen of 8-week WT and *STING*^{-/-} mice and co-cultured with antigen-presenting cells (APCs) and anti-CD3 stimuli for 3 days at different proportions. Data represent two independent experiments with three to six mice per group. Data represent the mean ± s.e.m. #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01. CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; FSC, forward scatter; LAP, latency-associated peptide; SSC, side scatter.

which co-transfer of functional regulatory CD4 + CD45RB^{low} T cells prevents colitis development;⁴⁸ and (c) a model of enteric infection by *Salmonella thyphimurium*.

WT and *STING*^{-/-} mice were treated with 3% DSS in drinking water for 8 days (followed by normal drinking water only in mortality experiments). Mice were monitored every day up to eighth or twenty-first day. *STING*^{-/-} mice showed increased weight loss (**Figure 5a**) bleeding, and diarrhea

(**Figure 5b**) starting on the fifth day when compared with WT mice. Moreover, all *STING*^{-/-} mice died within 13 days, whereas 30% of WT mice were still alive at day 13 and 8 days thereafter when the experiment was terminated (**Figure 5c**). Analysis of colon morphology and histology of the colons showed that their lengths were similar among control untreated animals, but DSS treatment led to a significant reduction in colon length, which was more evident in *STING*^{-/-} mice

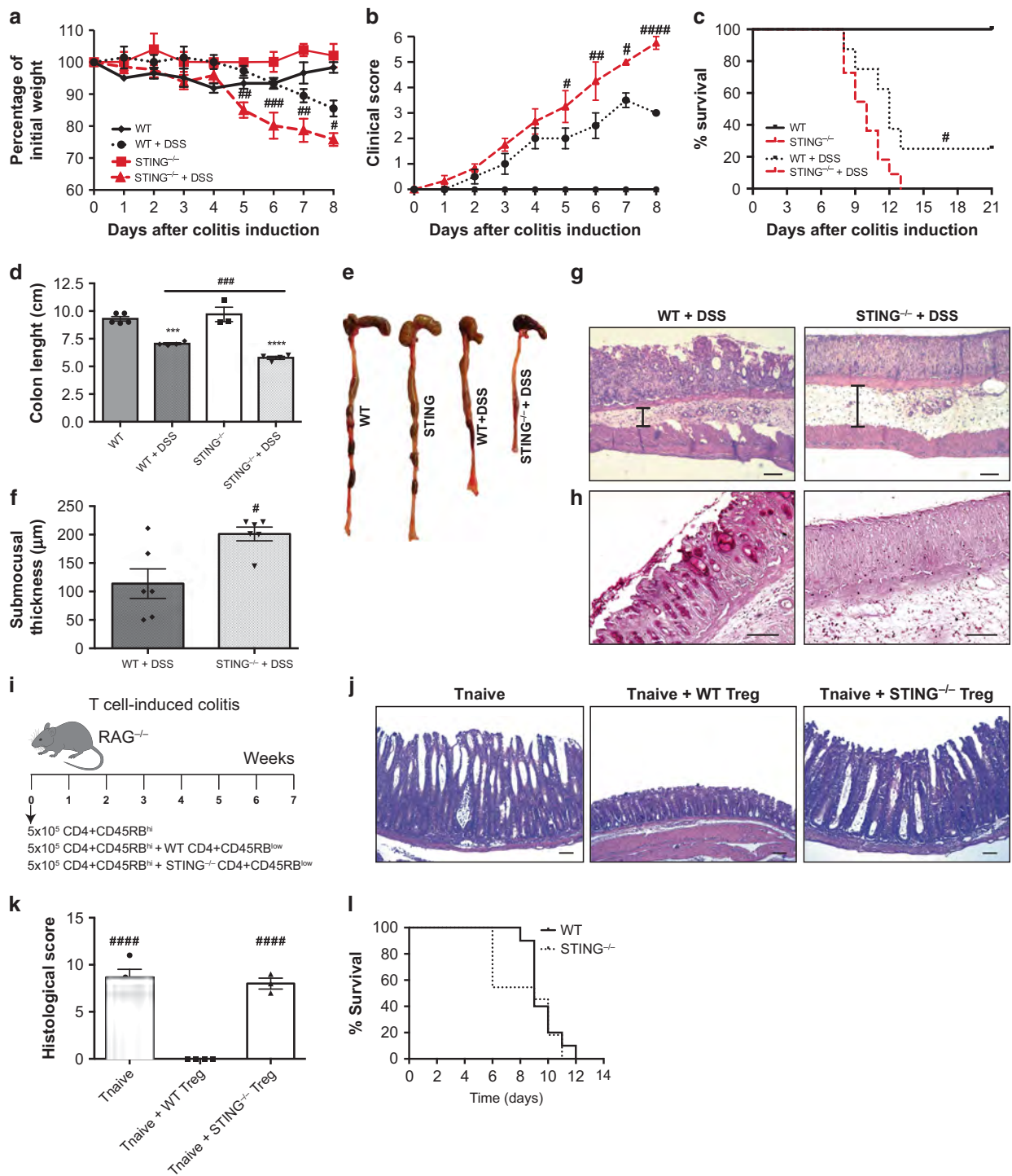


Figure 5 STING^{-/-} mice are highly susceptible to gut inflammation and enteric infection. Wild-type (WT) and STING^{-/-} mice were given 3% dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water for 8 days. (a) Weight change following DSS administration, monitored every day. (b) Clinical score of WT and STING^{-/-} mice during DSS treatment, where a higher score corresponds to increased pathology. (c) Survival of WT and STING^{-/-} mice. Mice were given 3% DSS for 8 days, followed by normal drinking water for another 13 days, and monitored every day. (d) Quantification of the colon length described in e. (e) Colons from WT and STING^{-/-} mice on day 8. Representative photomicrographies of (g) hematoxylin and eosin (H&E)-stained and (h) periodic acid-Schiff-stained colon sections from WT and STING^{-/-} mice treated with DSS evidencing submucosal thickness and goblet cells. (i) Schematic protocol of colitis induced by transfer of naive CD4 + CD45RB^{high} T cells into RAG^{-/-} mice and adoptive co-transfer of CD4 + CD45RB^{low} Treg cells. (j) Representative photomicrographies of H&E-stained colon sections from RAG^{-/-} mice that received WT T-naive cells (CD4 + CD45RB^{high}) and co-transfer of either WT or STING^{-/-} Treg cells (CD4 + CD45RB^{low}). (k) Histological score of T-cell transfer colitis experiment represented in j. (l) WT and STING^{-/-} mice were treated with 1×10^8 colony-forming units of *Salmonella typhimurium* by gavage and their survival was assessed. Bars represent 100 μ m. Data represent four independent experiments with 5–10 mice per group. Data represent the mean \pm s.e.m. #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001; ####*P* < 0.0001.

(Figure 5d,e). Similar colitis clinical signs and colon length reduction was also observed in IFNAR-deficient mice (Figure 6a–f), suggesting that type I IFNs might participate in STING-dependent control of gut homeostasis.^{20,45,46} Histological hematoxylin and eosin staining of the colons showed that, after DSS treatment, STING^{-/-} mice had less intact epithelium and thicker submucosal layer than the WT mice (Figure 5f,g) indicating more edema. Periodic acid-Schiff staining also showed remaining goblet cells and intestinal architecture in WT mice compared with STING^{-/-} after DSS treatment (Figure 5h). Moreover, we observed lower frequencies of CD4 + CD25 + Foxp3 + and CD4 + LAP + Treg cells in colonic lamina propria and MLN of STING^{-/-} mice (see Supplementary Figure S4a,b,e,f) and reduced levels of TGF- β (see Supplementary Figure S4c,d,g,h) when compared with WT animals after DSS treatment.

STING expression by Treg cells was necessary for their suppressive function *in vitro* (Figure 4j). Therefore, we used a model of gut inflammation in which functional Treg cells are necessary to prevent the development of T-cell-induced colitis⁴⁸ to test Treg function *in vivo*. RAG^{-/-} mice transferred with naive CD4 + CD45RB^{hi} T cells showed histological alterations that were compatible with inflammation in gut mucosa as shown by histological analysis (Figure 5i–k), whereas co-transfer of WT CD4 + CD45RB^{low} Treg cells with naive CD4 + CD45RB^{high} T cells prevented development of disease. However, co-transfer of STING^{-/-} CD4 + CD45RB^{low} Treg cells failed to prevent disease development, confirming the *in vitro* results that STING expression on Treg cells is required to its suppression function.

To investigate mouse susceptibility to enteric pathogen infection in the absence of STING, we examined the mortality rate of WT and STING^{-/-} mice following the oral administration of 1×10^8 colony-forming units of *Salmonella typhimurium*. STING^{-/-} mice displayed early mortality rate compared with WT mice (Figure 5l). On day 6 after infection, 60% of STING^{-/-} mice had died while WT mice start to die only from day 9 after infection. We also analyzed bacteria translocation at day 6 after infection and observed similar bacterial loads in the liver of WT and STING^{-/-} -infected mice (data not shown), indicating that even though bacterial translocation is not different between both groups, STING^{-/-} mice are more susceptible to *Salmonella* infection.

Taken together, these results showed that STING is a critical regulator of intestinal homeostasis and that STING-deficiency leads to higher susceptibility to gut inflammation and to enteric infection in mice.

DISCUSSION

A variety of pattern-recognition receptors expressed in intestinal epithelial cells and immune cells maintain the surveillance of pathogen-associated molecular patterns and trigger homeostatic immune responses allowing the successful coexistence of the gut commensal microbiota with an intact intestinal mucosal tissue. Microbial DNA is known to be sensed by TLR9, AIM2, and cGAS, leading to the activation of NF- κ B,

inflammasome, and IFN signaling pathways, respectively.^{7,13,49} TLR9- and AIM2-mediated recognition of DNA in the intestine exerts a protective effect against experimental colitis.^{7,49,50} Although the physiological relevance of DNA sensing by cGAS during intestinal inflammation is still unclear, type I IFN signaling has been shown to be critical in regulating epithelial and T-cell functions.^{20,45,46,51} However, little is known about the role of STING as a sensing of CDNs and as an adaptor for DNA sensing in intestinal homeostasis.

Intestinal mucosa harbors fast renewing epithelial cells that are in contact with external stimuli, such as microbiota.^{6,7} Both components, dying cells and bacteria from microbiota, are continuous sources of free DNA that can deliver physiological stimulation to immune cells. Studies on germ-free mice showed that these animals present several signs of immunological and intestinal immaturity when compared with conventional mice, including elongated and smooth villi and smaller colon crypts, as well as reduced production of mucus and SIgA with normal levels of serum IgM.^{28,31,52} The role of mucus layer and SIgA in gut homeostasis is clear. The intestinal mucus layer provides a barrier limiting bacterial contact with the underlying epithelium and SIgA reduces the penetration of commensal bacteria by preventing their adhesion to the epithelium.⁵³ Thus the presence of a normal intestinal microbiota positively influences immune responses and protects against the development of inflammatory diseases by inducing the development of several intestinal and immune-protective mechanisms since early life. Indeed, it has been shown that germ-free mice are highly susceptible to DSS-induced colitis.³¹ On the other hand, it has also been described that products of immune cells such as SIgA in the gut can influence bacterial composition of the local microbiota.^{34,35} These reports suggest that there is a circuit of mutual regulation between immune cells and the microorganisms that colonize the gut mucosa. Analysis of microbiota composition in STING^{-/-} mice show that the absence of this signaling pathway does not change the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes phyla. However, alterations in specific genera of bacteria resulted in a significant change in microbiome composition and in a profile related to susceptibility to gut inflammation.⁵⁴ A divergent shift was observed within the phylum Firmicutes, with a decrease in *Allobaculum* in feces from STING^{-/-}, a group of bacteria that is induced by type I IFN and is related with reduction of IL-17 production.³⁸ STING^{-/-} mice had also an increase in *Desulfovibrio* genus (Proteobacteria phylum), a Gram-negative bacterium whose prevalence have been shown to be associated with ulcerative colitis.³⁶ On the other hand, a reduction in *Bifidobacterium* (Actinobacteria phylum), a species with anti-inflammatory effects mediated by TGF- β and Treg cells in the gut,⁵⁵ was also observed.

Although STING^{-/-} mice bear a microbiota, they miss a critical signaling pathway for microbiota DNA and CDNs. Many species of gut bacteria produce cyclic dinucleotides²⁶ and therefore may stimulate STING. Indeed, our results show that STING^{-/-} mice present a phenotype that resembles the one observed in germ-free mice. They had longer and less crimped

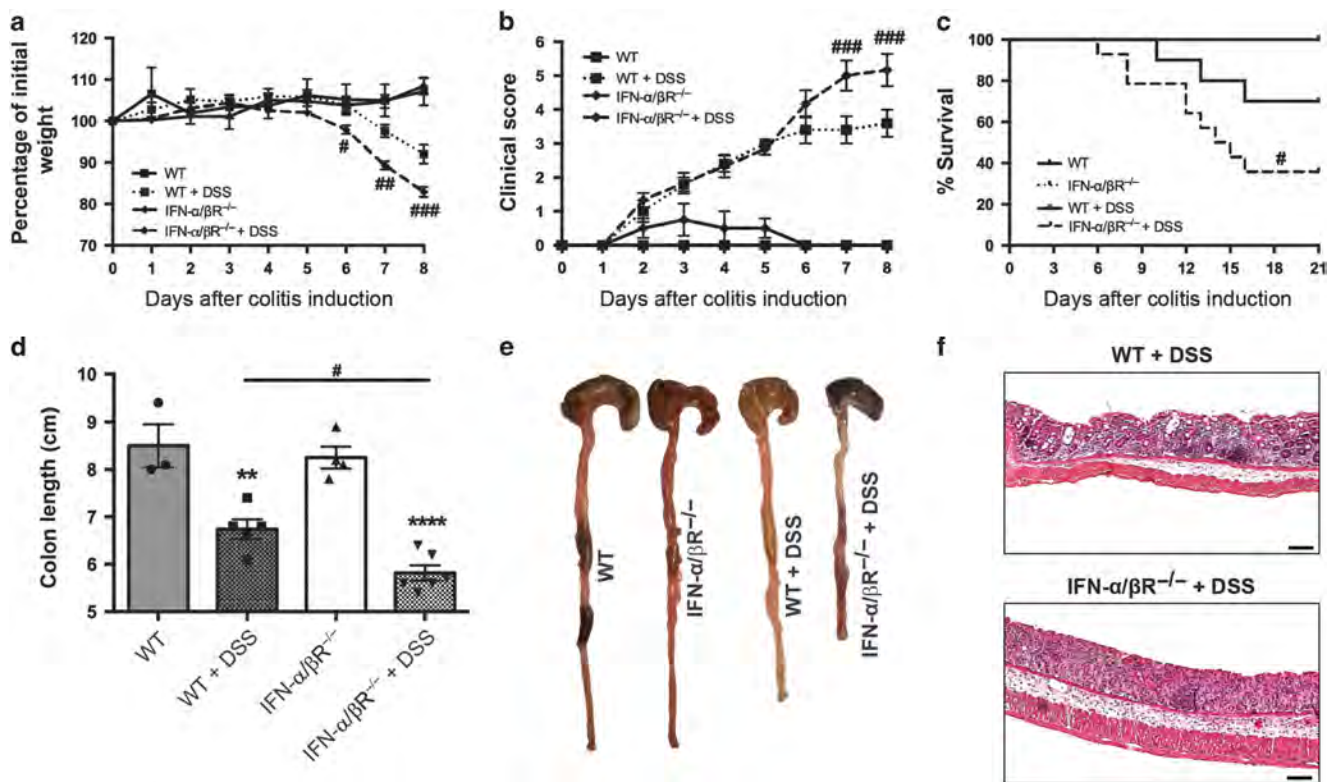


Figure 6 Interferon (IFN)- α/β R $^{-/-}$ mice are also susceptible to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. **(a)** Weight change following DSS administration, monitored everyday. **(b)** Clinical score of wild-type (WT) and IFN- α/β R $^{-/-}$ mice during DSS treatment, where a higher score corresponds to increased pathology. **(c)** Survival of WT and IFN- α/β R $^{-/-}$ mice. Mice were given 3% DSS for 8 days, followed by normal drinking water for another 13 days, and monitored everyday. **(d)** Quantification of the colon length described in **e**. **(e)** Colons from WT and IFN- α/β R $^{-/-}$ mice on day 8. Data are representative of 3–10 mice per group. Data represent the mean \pm s.e.m. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$; #### $P < 0.0001$. **Shows difference between WT \times WT+DSS and **** shows difference between IFN- α/β R $^{-/-}$ \times IFN- α/β R $^{-/-}$ +DSS. # Shows differences between WT+DSS \times IFN- α/β R $^{-/-}$ +DSS.

small intestine villi, smaller colon crypts, lower production of MUC1/MUC2, lower levels of SIgA, and increased serum IgM levels (data not shown) when compared with WT mice. The immaturity of gut mucosa is also consistent with the profile of IELs in STING $^{-/-}$ mice. As already described in neonates and germ-free mice,⁴⁰ STING $^{-/-}$ mice presented a decreased frequency of all subsets of induced IELs (expressing TCR $\alpha\beta$). IELs are T lymphocytes interspersed in the gut epithelium as a first line of immune protection against pathogens. They are present as distinct subpopulations depending on the T-cell receptor (TCR) rearrangement they show ($\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$) and on the expression of either homodimeric ($\alpha\alpha$) or heterodimeric ($\alpha\beta$) form of CD8 as well as co-expression of CD4.⁵⁶ Regardless of CD8 and CD4 expression, we found that all subsets of induced TCR $\alpha\beta$ -expressing IELs are downmodulated and natural TCR $\gamma\delta$ -expressing IELs are increased in frequency in the absence of STING signaling. This result is in concert with the role of microbiota in inducing TCR $\alpha\beta$ + IELs and also with their role in protection against infection.⁴⁰ Indeed, STING $^{-/-}$ mice were more susceptible to *Salmonella* infection than WT mice although intestinal permeability and bacteria translocation (data not shown) were not changed in STING $^{-/-}$ mice. It is likely that the compromised mucosal protective immunity is a net result of defects in several components of barrier function in these animals.

The pattern of ILCs in neonates and germ-free animals is less explored. Recently, these innate lymphocyte lineages, previously thought to be represented only by natural killer cells, were described and are now referred to as ILCs. ILCs are preferentially located at barrier surfaces and are important for protection against pathogens and for the maintenance of organ homeostasis. Inappropriate activation of ILCs has been linked to the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders.⁴¹ As fetal lymphoid inducer cells and lymphoid inducer-like cells are part of the ILC3 population, we would expect to have an overrepresentation of this subset at early stages of development. These cells have been shown to be the first immune cells to seed the intestinal mucosa.⁵⁷ In concert with our hypothesis that STING $^{-/-}$ present an immature immunological profile, the frequency of ILC3 is increased in STING $^{-/-}$ mice when compared with WT mice. Moreover, analysis of frequencies of ILCs in the intestinal mucosa of STING $^{-/-}$ and WT neonates showed no difference between the two groups. It is plausible that microbiota colonization has a critical role in delivering stimulatory cues such as cyclic DNA for the development of the adult profile of ILCs seen in WT mice. On the other hand, STING $^{-/-}$ mice presented a lower frequency of ILC2 when compared with age-matched WT mice. ILC2 was shown to mediate tissue protection during intestinal injury, such as DSS-induced colitis, by limiting inflammation and promoting

epithelial repair through amphiregulin production.⁵⁸ Differentiation of these cells requires IL-25, IL-33, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *IL-33* and *Tslp* induction is markedly decreased in *Sting* knockdown cells.⁵⁹ Moreover, it was shown that IRF3, which is activated by STING, is involved in IL-33 and TSLP production and IRF3^{-/-} mice are also more susceptible to DSS-induced colitis.⁵⁹ We observed that the colonic lamina propria of STING^{-/-} mice had a decreased frequency of ILC2, reduced levels of *Amphiregulin* mRNA, and increased frequency of ILC1 and ILC3. Although ILC3 can be protective in some types of intestinal disorders, detrimental ILC1 and ILC3 responses have been reported in models of colitis induced by *Helicobacter hepaticus* or anti-CD40 treatment and have been related to IL-22, IL-17, granulocyte macrophages colony-stimulating factor, and/or IFN- γ activity.^{60,61} Moreover, increased frequency of ILC1 is observed in patients with Crohn's disease.⁶² Our findings suggest that increased frequency of ILC1 and ILC3 seems to cooperate with the decreased ILC2 in colonic lamina propria of STING^{-/-} mice to enhance their susceptibility to colitis. Thus a balance in ILC subtype frequency in the colon is essential to maintain gut homeostasis.

Along with these innate and acquired immune mechanisms of barrier maintenance, the intestinal mucosa lodges distinct subsets of Treg cells that are essential for the induction of specific immunological tolerance to gut bacteria. Their absence or failure to patrol the intestinal mucosa leads to reactivity against the commensal microbiota and development of inflammatory bowel disease in mice and humans.^{63,64} An important regulator of CD4 + Foxp3 + Treg cells is the type I IFNs. The absence of IFNAR signaling on innate immune cells result in poor expansion and maintenance of Foxp3 + Tregs in the intestine, leading to the outgrowth of Th1 and Th17 effector cells in the inflamed colon.²⁰ STING pathway is known to induce the production of type I IFNs, and we confirmed that showing that STING^{-/-} mice produce significantly lower levels of *IFN- β* mRNA transcripts in the colon than WT mice. Consistent with the effects of type I IFNs in Treg expansion and maintenance, we observed that the frequency of CD4 + CD25 + Foxp3 + was reduced in MLN and the frequency of TGF- β -producing CD4 + LAP + Tregs was reduced in the colonic lamina propria and MLN of STING^{-/-} mice when compared with their WT counterparts. Moreover, absence of STING signaling also interfered with the function of CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg cells, as they were less efficient in suppressing T-cell proliferation *in vitro* and in preventing colitis induction when co-transferred with naive CD4 + T cells into RAG^{-/-} mice.⁴⁸ We speculate that the alterations observed in STING^{-/-} Treg cells were due to the lower levels of type I IFN in those animals; however, we cannot discard the possibility that STING is interfering in Treg development and function in a type I IFN-independent manner. On the other hand, the critical role of IFN- β in the maintenance of gut homeostasis and protection against inflammation was underscored in the present study by the increased susceptibility of both STING^{-/-} mice and IFN α/β R^{-/-} to colitis induction by DSS.

Interestingly, regulatory cells and cytokines were differentially altered in MLN and colonic lamina propria of STING^{-/-} mice. TGF- β and CD4 + LAP + cells were both reduced in the colon, whereas CD4 + CD25 + Foxp3 + Tregs, CD4 + LAP + cells, and IL-10 production were all reduced in MLN. MLN drain the lamina propria of the small intestine but not the colonic lamina propria. Several immune-regulatory factors are probably activated at distinct sites of the intestine and they may vary according to the specific features and requirements of the region⁶⁵ as well as additional factors.⁶⁶ It is also plausible that other signaling molecules for relevant microbiota stimuli, including DNA (such as TLR9, AIM2, and so on) are also differentially expressed along the gut mucosa having complementary roles in conveying cues from the microbiome for the proper differentiation of regulatory cells, such as IL-10-producing cells.

STING signaling can also activate NF- κ B, which induces the transcription of many genes, including mucins. NF- κ B induces the production of MUC2 by human colonic epithelial cells^{67,68} and by human epithelial cell lines in cooperation with TGF- β -Smad signaling pathway.⁶⁹ Although we did not assess NF- κ B activation here, it is well described that STING signaling pathway induces NF- κ B translocation to the cell nucleus.^{11,14,16} Moreover, we observed lower levels of TGF- β in the colon of STING^{-/-} mice, which suggests that the reduced MUC2 production observed in these animals could be due to an additive effect of poor activation of NF- κ B and low levels of TGF- β . MUC2 is also able to induce the production of IL-10 and TGF- β by tolerogenic DCs involved in the induction of Treg cells.⁷⁰ Thus a dense mucus layer in the large intestine prevents inflammation not only by shielding the underlying epithelium from luminal bacteria and food antigens but also by delivering tolerogenic signals. Studies showing that MUC2^{-/-} mice develop spontaneous colon inflammation underscore the critical role of MUC2 in gut homeostasis.⁷¹

STING and CDNs are highly conserved throughout evolution, being observed > 500 million years ago in the common ancestor of human and Cnidaria.⁷² CDNs are second-messenger signaling molecules produced by diverse bacterial species, including gut commensal microbiota,^{25,73} and are also synthesized by cytosolic cGAS upon dsDNA binding. The modern features of innate immunity appeared later in evolution than the STING-CDN binding, suggesting that STING-CDN pathway may have a function other than its role in host defense against pathogens. We hypothesized that the microbiota CDNs sensed by STING might act by inducing a physiological tonus of activation for protective mechanisms involved in intestinal homeostasis. It is possible that the 3'3'CDNs evolved to be a less potent STING agonist in mammals in order to keep gut homeostasis without initiating an immune response against the microbiota. During pathogen infection, however, STING is strongly activated by 2',3' cGAMP produced by cGAS, a more potent STING agonist,⁷⁴ and a proper inflammatory immune response against pathogen is triggered. This observation merits further investigation.

The cytosolic adaptor STING has important function in the host defense against pathogens and in autoimmune diseases; however, its role in gut homeostasis has been largely unknown. This study reveals that STING can be activated by DNA present in fecal contents, and this adaptor molecule has a critical function in the development of gut-protective mechanisms, such as mucus and SIgA production, in the balance of ILC subsets and in the Treg cell activity in the intestinal mucosa. As a consequence, STING^{-/-} mice had a higher susceptibility to DSS-induced and T-cell-induced colitis as well as to enteric infection. Therefore, our data show that STING is an important signaling molecule involved in gut homeostasis and may also serve as a therapeutic target for the regulation of intestinal inflammation.

METHODS

Mice. STING^{-/-} mice were obtained from Dr Glen Barber (University of Miami, Miami, FL) and maintained in the animal care facility of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). C57BL/6 WT, 129 Sv/Ev WT, STING^{-/-}, IFN- α / β R^{-/-}, and RAG^{-/-} mice were bred and maintained in the animal care facility of the Laboratório de Imunobiologia at UFMG as previously described.⁴¹ Male and female mice used in experiments were aged 7–12 weeks. All conventional mice within an experiment were cohoused (gender matched) for 4 weeks to minimize differences among their microbiotas. Germ-free mice were obtained from the Gnotobiotic facility of UFMG, and they were maintained there in isolators for the entire period of the experiment. All mice were housed and used according to the experimental protocols approved by the Ethics Committee on Animal Care and Use (CEUA) of UFMG.

Induction of colitis with DSS. Male or female C57BL/6 WT and STING^{-/-} mice or 129 Sv/Ev WT and IFN- α / β R^{-/-} mice were cohoused for 4 weeks before colitis induction. Animals received 3% DSS (molecular weight 36,000–50,000; MP Biomedicals, Santa Ana, CA) in drinking water for 8 days. There was no difference in the amount of DSS consumption between experimental groups. For survival studies, mice were monitored every day up to 21 days postinitiation of DSS treatment. For weight-change studies, the percentage of initial weight was determined through the following equation: percentage of initial weight: (weight at the *x*th day \times 100)/(weight on day 0). Animals were also monitored for feces consistency, rectal bleeding, diarrhea, and general signs of morbidity, including hunched posture and failure to groom, and scored between 0 and 6, with 0 being normal up to 6 being diarrhea, signs of morbidity, and failure to groom.

Flow cytometric analysis. Cells were isolated from colon lamina propria by removing the entire length of colon, dissected, opened longitudinally, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and cut into small pieces. Tissue fragments were placed in Petri dishes and washed in calcium and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution containing 2% fetal bovine serum. Then fragments of colon lamina propria were transferred to culture flasks and incubated at 37°C in Hank's Balanced Salt Solution containing 1 mM DL-dithiothreitol (Sigma, St Louis, MO) for 60 min. After that, tissue fragments were then incubated with 100 U ml⁻¹ of collagenase II (Sigma) for 60 min at 37°C in a shaker. Supernatants were passed through a 70- μ m cell strainer and resuspended in medium. Lamina propria cells were then preincubated with anti-CD16/CD32 monoclonal antibody to block Fc γ RII/III receptors and stained on ice for 30 min with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibody: fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD4, PE-labeled anti-LAP, PerCPy5.5-labeled anti-CD25, and APC-labeled anti-Foxp3 for Treg cells analysis.

Pacific Blue-labeled anti-CD11b, anti-CD11c and anti-Fc ϵ R1 α ; BV421-labeled anti-CD16/32 and anti-CD19; PerCPy5.5-labeled anti-CD8; PeCy7-labeled anti-CD4; BV570-labeled anti-CD45; BV510-labeled anti-CD127; Aexa700-labeled anti-CD3; PE-CF594-labeled anti-ROR γ t; PE-labeled anti-T-bet, and AlexaFluor 488-labeled anti-GATA3 were used for T-cell and ILC analysis. Antibodies were purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA; BD Pharmingen (San Jose, CA); or R&D Systems, Minneapolis, MN. Surface staining was performed according to standard procedures at a density of 1×10^6 cells per 25 μ l, and volumes were scaled up accordingly. Flow cytometric analysis was performed on a FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA) or on a FACSFortessa (BD Biosciences).

Cell sorting. A pool of cells from spleen of WT and STING^{-/-} mice was first enriched using CD4 + Microbeads T-Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Naive CD4 + CD62L + CD44^{low} T cells and CD4 + CD25 + Treg cells were sorted (FACSARIAII, BD Biosciences) with PeCy-7-labeled anti-CD4, APC-labeled anti-CD62L, PE-labeled anti-CD44, and PerCPy5.5-labeled anti-CD25.

Treg suppression assay in vitro. Sorted Treg CD4 + CD25 + cells were cultured at 1:1, 1:2, 1:4, and 1:8 ratio with T naive CD4 + CD62L + CD44^{low} cells previously stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester dye (Invitrogen). Cells were stimulated with anti-CD3e (1 μ g ml⁻¹; 145-2C11, BioLegend, San Diego, CA) in the presence of antigen-presenting cells in 200 μ l of RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum in 96-well round-bottom plates. Proliferation and Foxp3 induction were assessed 72 h later by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences), based on the dilution of the carboxyfluorescein succinimidyl ester dye.

Cell culture preparation. MLN were removed and cells suspensions were prepared using a tissue homogenizer, being gently centrifuged. Cells isolated from MLN were cultured, at 1×10^6 cells per well for cytokine secretion analyses, in 98-well plates in complete RPMI and stimulated or not with 1 μ g ml⁻¹ of anti-CD3 and anti-CD28. Supernatants were collected after 48 h to measure IL-10 and after 72 h to measure TGF- β .

T-cell transfer model of colitis. Naive CD4 + CD45RB^{hi} T cells were isolated from WT or STING^{-/-} mice and injected intraperitoneally into 7–8-week-old RAG^{-/-} immune-deficient recipients (5×10^5 cells per mouse). WT and STING^{-/-} CD4 + CD45RB^{low} Treg cells (2.5×10^5 mouse) were co-injected intraperitoneally as previously described.⁷⁵ Mice were monitored weekly for wasting disease, and any mice losing >20% of its starting body weight or showing severe signs of disease were killed.

Quantitative reverse transcriptase-PCR. Colon tissue or cultured lamina propria cells were homogenized in TRIzol (Invitrogen), and RNA was isolated by phenol chloroform extraction and isopropanol precipitation. Reverse transcription of 2 μ g of total RNA was performed using Illustra Ready-To-Go reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) Beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was conducted with a final volume of 10 μ l containing SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), oligo(dT) cDNA as the PCR template and 10 μ M primers. Real-time RT-PCR was performed with the ABI7900 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the following cycling parameters: 60°C for 10 min, 95°C for 10 min, 45 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min, and a dissociation stage of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s, and 60°C for 15 s. The primers used for the β -actin, IFN- β , and amphiregulin genes were as follows: β -actin F:5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' and R:5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'; IFN- β F:5'-GCCTTGC CATCCAAGAGATGC-3' and R:5'-ACACTGTCTGCTGGTGGAG TTC-3'. Amphiregulin F:5'-GCCATTATGCAGCTGCTTTGGAGC-3' and R:5'-TGTTTTCTTGGGCTTAATCACCT-3'. All data are presented as relative expression units after normalization to β -actin.

Histology and immunohistochemistry. Animals were killed and their colons were collected and opened longitudinally. For colitis analysis, on day 8 after 3% DSS treatment or 7 weeks after T-cell transfer to RAG^{-/-} mice, the colon of mice were also extracted. Later the colons were fixed with 10% formalin in neutral buffer and embedded in paraffin. Histological sections were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin or Periodic acid-Schiff and analyzed by light microscopy. For immunohistochemical analysis, consecutive 4- μ m-thick sections were mounted on silanized slides, and peroxidase-based detection system Advance HRP was applied (Dako North America, Carpinteria, CA). Antigen retrieval was performed in water bath at 98 °C, with a citrate buffer solution (pH 6.0) (Target Retrieval Solution) for 20 min. Endogenous peroxidase activity was blocked with a 3% hydrogen peroxide solution in methyl alcohol. Sections were stained with anti-MUC1 (1:50; Abcam, Cambridge, UK) and anti-MUC2 (1:300; Abcam), and immunoreactivity was visualized by incubating the slides with diaminobenzidine (DAB substrate system, Lab Vision, Fremont CA) for 10 min. The histological changes were analyzed in a double-blinded manner. Immunohistochemical analysis of MUC2 were based on scores divided into frequency of the positive cells in 10 fields (60 \times), classified as: 1+ when 0–25% of cells staining; 2+ when 25–50% of cells staining; 3+ when 50–75% of cell staining; and 4+ when >75% of cells staining, and cases were then classified negative (1+ or 2+) or positive (3+ or 4+). Statistical analysis was performed using correlation of Fisher's Exact test.

Isolation of fecal content and microbiota DNA from feces. Feces were extracted from the colon of WT mice, resuspended, and homogenized in PBS 1 \times . The content was centrifuged and the supernatant used for cell stimulation. Fecal DNA was extracted from fresh mouse fecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

DNA sequencing of microbiota and bioinformatics workflow. The DNA purified from feces was amplified at the V3–V4 hypervariable region of RNA ribosomal 16S and sequenced using the Illumina-MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA), which provided single-end reads with 300 nt in length. Downstream analysis were performed by running the QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) pipeline. Briefly, sequence reads that presented Phred quality score <20 were removed. We normalize each library relative to the smaller sample, choosing randomly until it matches its total number of readings. Afterwards, representative sequences were grouped by Uclust into Operational Taxonomic Units by 97% similarity and taxonomy assigned with Pynast against Greengenes database. Chimeric sequences were identified by Usearch61 and removed before performing diversity analysis and visualization. The microbiome profile of mice samples was assessed through weighted and unweighted UniFrac principal coordinate analysis. Statistical significance between both groups were inferred by means of the Adonis method implemented in the vegan package for the R statistical software environment, as described before.⁷⁶ The differential abundance of Operational Taxonomic Units in each group was evaluated with the DESeq2 package. We evaluated the alpha diversity in each group by means of the Shannon index. The raw sequence data used in this experiment are available in the EMBL-EBI (Accession id: PRJEB22143).

Lamina propria cell transfection. Lamina propria cells were isolated from WT and STING^{-/-} mice and cultured at 5 \times 10⁵ cells per well. Transient transfections of lamina propria cells were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ratio (in ml) of 1:0.25, following the manufacturer's directions. Cells were cultured in RPMI and transfected with microbiota DNA extracted from mice feces (3 μ g per well) or dsDNA90 (3 μ g ml⁻¹). After 17 h, cells were harvested and assayed for the expression of IFN- β by RT-PCR.

Cell culture and nucleic acid transfection. WT and STING^{-/-} MEFs were provided by Dr Glen Barber (University of Miami). Cells

were maintained in high-glucose complete Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, Waltham, MA) at 37 °C in 5% CO₂/95% air in a humidified incubator. MEFs were seeded on 24-well plates containing sterile coverslips a day before the experiment and kept on normal growth media. Cell challenge was performed by DNA transfection using Lipofectamine Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) following the manufacturer's instructions. A total of 1 μ g of DNA extract was used per well. Transfection was performed for 4 h after which the medium was removed and cells were fixed in 4% paraformaldehyde, pH 7.4, at room temperature for 30 min.

Immunofluorescence and microscopy. After fixation, coverslips were washed with PBS and kept in the same buffer at 4 °C until immunofluorescence was performed. Permeabilization was carried out for 15 min with 0.3% Triton X-100 in PBS, and cells were subsequently blocked for 1 h with 1% BSA in PBS at room temperature prior to incubation with anti-Sting at 4 °C overnight. Rabbit polyclonal antibody against STING was provided by Glen Barber.⁷⁷ Detection of anti-Sting was performed with anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-546 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Coverslips were mounted in slides using Prolong Gold with 4,6-diamidino-2-phenylindole mounting medium (Invitrogen). Microscopy analysis was performed in an Apotome 2.0 (Zeiss, Oberkochen, Germany) system, mounted in a Axio Imager microscope adapted with a Plan-APOCHROMAT 40 \times 0.8 objective. HXP 120C (metal halide) was used for illumination, and images were acquired as czi files by a AxioCam HRm camera using the Zen software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Cytokine measurements. The colons were homogenized in extraction solution (100 mg tissue per 1 ml), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethoniumchloride, 10 mM EDTA, and 20 KI aprotinin, using Ultra-Turrax. The suspension was then spun at 10,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Concentrations of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, and IFN- γ were measured in the colon extract by capture ELISA. Concentrations of IL-10 and TGF- β were measured in cell culture supernatants and IgA as well as IgM levels were assessed in mice feces by ELISA. ELISAs for cytokine and immunoglobulin (IgA and IgM) measurements were performed using kits from R&D Systems according to the manufacturer's instructions. For TGF- β measurement, samples were acidified and neutralized to activate latent TGF- β as previously described.⁷⁸

Statistics. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism6 software (GraphPad, La Jolla, CA). Groups of animals were compared using Student's *t*-tests or two-way analysis of variance where applicable. *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/mi>

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Daniela Silva dos Reis for help with flow cytometric experiments and Ilda Marçal de Souza and Hermes for the excellent care of the animals. We also thank Tiago Bruno Rezende de Castro for his precious help with figure formatting. We thank Professor André Báfica for his precious contribution to microbiota analysis and for relevant ideas and discussion. This work was supported by scholarships (to M.C.C.C. and T.C.N.) and research fellowships (to A.M.C.F. and S.C.O.) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CAPES/PVE 030448/2013-0, by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) APQ 00704-14, and National Institute of Health R01 AI116453.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.C.C.C., S.C.O., G.N.B., and A.M.C.F. planned experiments and wrote the manuscript. M.C.C.C., L.L., and T.C.N. performed the experiments. J.A.

performed the assays using MEFs. T.B.R.C. and A.T.V. performed the microbiota analysis. E.S.V., E.F., J.A.-S., and D.C.C. performed histological and imaging analysis. F.M.M. helped with PCR analysis. C.P.Q. and H.C.S. helped with ILC reagents and analysis. F.S.M. provided the germ-free mice and G.N.B. provided STING^{-/-} mice and critical reagents. A.M.C.F., S.C.O., and G.N.B. conceived and supervised the project. All authors provided critical comments.

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2018 Society for Mucosal Immunology

REFERENCES

- Mayer, L. Mucosal immunity. *Immunol. Rev.* **206**, 5 (2005).
- Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F. & Wu, H. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* **241**, 241–259 (2011).
- Pabst, O. & Mowat, A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* **5**, 232–239 (2012).
- Honda, K. & Littman, D.R. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 759–795 (2012).
- Hill, D.A. & Artis, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 623–667 (2010).
- Crosnier, C., Stamataki, D. & Lewis, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 349–359 (2006).
- Hu, S. *et al.* The DNA sensor AIM2 maintains intestinal homeostasis via regulation of epithelial antimicrobial host defense. *Cell Rep.* **13**, 1922–1936 (2015).
- Fukata, M. & Arditi, M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **6**, 451–463 (2013).
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
- Hu, G.Q. *et al.* AIM2 contributes to the maintenance of intestinal integrity via Akt and protects against Salmonella mucosal infection. *Mucosal Immunol.* **9**, 1330–1339 (2016).
- Ishikawa, H. & Barber, G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
- Burdette, D.L. *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515–518 (2011).
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z.J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786–791 (2013).
- Burdette, D.L. & Vance, R.E. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* **14**, 19–26 (2013).
- Zhong, B. *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538–550 (2008).
- Sun, W. *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8653–8658 (2009).
- Jin, L., Waterman, P.M., Jonscher, K.R., Short, C.M., Reisdorph, N.A. & Cambier, J.C. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5014–5026 (2008).
- Cho, H. & Kelsall, B.L. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation. *Immunol. Rev.* **260**, 145–167 (2014).
- Chirido, F.G., Millington, O.R., Beacock-Sharp, H. & Mowat, A.M. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1831–1840 (2005).
- Kole, A. *et al.* Type I IFNs regulate effector and regulatory T cell accumulation and anti-inflammatory cytokine production during T cell-mediated colitis. *J. Immunol.* **191**, 2771–2779 (2013).
- Sauer, J.D. *et al.* The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect. Immun.* **79**, 688–694 (2011).
- Dobbs, N., Burnaevskiy, N., Chen, D., Gonugunta, V.K., Alto, N.M. & Yan, N. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. *Cell Host Microbe* **18**, 157–168 (2015).
- Zhu, Q. *et al.* Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation. *J. Immunol.* **193**, 4779–4782 (2014).
- Ahn, J., Konno, H. & Barber, G.N. Diverse roles of STING-dependent signalling on the development of cancer. *Oncogene* **34**, 5302–5308 (2015).
- Rudlaff, R.M. & Waters, C.M. What is the role of cyclic di-GMP signaling within the human gut microbiome?. *Microbiome Sci. Med.* **1**, 39–44 (2014).
- Daniilchanka, O. & Mekalanos, J.J. Cyclic dinucleotides and the innate immune response. *Cell* **154**, 962–970 (2013).
- Hooper, L.V., Littman, D.R. & Macpherson, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268–1273 (2012).
- Nowacki, M.R. Cell proliferation in colonic crypts of germ-free and conventional mice—preliminary report. *Folia Histochem. Cytobiol.* **31**, 77–81 (1993).
- Abrams, G.D., Bauer, H. & Sprinz, H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab. Invest.* **12**, 355–364 (1963).
- Petersson, J. *et al.* Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G327–G333 (2011).
- Round, J.L. & Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
- Hapfelmeier, S. *et al.* Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705–1709 (2010).
- Benveniste, J., Lespinats, G. & Salomon, J. Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *J. Immunol.* **107**, 1656–1662 (1971).
- Suzuki, K. *et al.* Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1981–1986 (2004).
- Fransen, F. *et al.* BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity. *Immunity* **43**, 527–540 (2015).
- Rowan, F., Docherty, N.G., Murphy, M., Murphy, B., Calvin Coffey, J. & O’Connell, P.R. *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. *Dis. Colon Rectum* **53**, 1530–1536 (2010).
- Smith, P.M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569–573 (2013).
- Ren, W. *et al.* Interferon Tau affects mouse intestinal microbiota and expression of IL-17. *Mediat. Inflamm.* **2016**, 2839232 (2016).
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S. & Okada, Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* **79**, 32–37 (1993).
- Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 445–456 (2011).
- Klose, C.S. & Artis, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 765–774 (2016).
- Diefenbach, A., Colonna, M. & Koyasu, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* **41**, 354–365 (2014).
- Chen, M.L., Yan, B.S., Bando, Y., Kuchroo, V.K. & Weiner, H.L. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **180**, 7327–7337 (2008).
- Bilate, A.M. & Lafaille, J.J. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 733–758 (2012).
- Metidji, A., Rieder, S.A., Glass, D.D., Cremer, I., Punkosdy, G.A. & Shevach, E.M. IFN-alpha/beta receptor signaling promotes regulatory T cell development and function under stress conditions. *J. Immunol.* **194**, 4265–4276 (2015).
- Lee, S.E. *et al.* Type I interferons maintain Foxp3 expression and T-regulatory cell functions under inflammatory conditions in mice. *Gastroenterology* **143**, 145–154 (2012).
- Kiesler, P., Fuss, I.J. & Strober, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 154–170 (2015).

48. Leach, M.W., Bean, A.G., Mauze, S., Coffman, R.L. & Powrie, F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RBhigh subset of CD4+ T cells. *Am. J. Pathol.* **148**, 1503–1515 (1996).
49. Katakura, K., Lee, J., Rachmilewitz, D., Li, G., Eckmann, L. & Raz, E. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* **115**, 695–702 (2005).
50. Rachmilewitz, D. *et al.* Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* **122**, 1428–1441 (2002).
51. Tschurtschenthaler, M. *et al.* Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut* **63**, 1921–1931 (2014).
52. Bos, N.A., Meeuwse, C.G., Wostmann, B.S., Pleasants, J.R. & Benner, R. The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell. Immunol.* **112**, 371–380.
53. Pabst, O., Cerovic, V. & Hornef, M. Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Trends Immunol.* **37**, 287–296 (2016).
54. Berry, D. & Reinisch, W. Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases?. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 47–58 (2013).
55. Dong, P., Yang, Y. & Wang, W.P. The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Hum. Dev.* **86**, 51–58 (2010).
56. Hoytema van Konijnenburg, D.P. & Mucida, D. Intraepithelial lymphocytes. *Curr. Biol.* **27**, R737–R739 (2017).
57. Melo-Gonzalez, F. & Hepworth, M.R. Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology* **150**, 265–275 (2017).
58. Monticelli, L.A., Osborne, L.C., Noti, M., Tran, S.V., Zaiss, D.M. & Artis, D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 10762–10767 (2015).
59. Negishi, H. *et al.* Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 21016–21021 (2012).
60. Song, C. *et al.* Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **212**, 1869–1882 (2015).
61. Buonocore, S. *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* **464**, 1371–1375 (2010).
62. Bernink, J.H. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **14**, 221–229 (2013).
63. Izcue, A., Coombes, J.L. & Powrie, F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* **212**, 256–271 (2006).
64. Sun, M., He, C., Cong, Y. & Liu, Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol.* **8**, 969–978 (2015).
65. Faria, A.M.C., Reis, B.S. & Mucida, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *J. Exp. Med.* **214**, 1211–1226 (2017).
66. Mowat, A.M. & Agace, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 667–685 (2014).
67. Ishinaga, H., Takeuchi, K., Kishioka, C., Suzuki, S., Basbaum, C. & Majima, Y. Pranlukast inhibits NF-kappaB activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells. *Pharmacology* **73**, 89–96 (2005).
68. Ahn, D.H. *et al.* TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation. *Cell. Physiol. Biochem.* **15**, 29–40 (2005).
69. Jono, H. *et al.* Transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway cooperates with NF-kappa B to mediate nontypeable Haemophilus influenzae-induced MUC2 mucin transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 45547–45557 (2002).
70. Shan, M. *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* **342**, 447–453 (2013).
71. Velcich, A. *et al.* Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* **295**, 1726–1729 (2002).
72. Kranzusch, P.J., Wilson, S.C., Lee, A.S., Berger, J.M., Doudna, J.A. & Vance, R.E. Ancient origin of cGAS-STING reveals mechanism of universal 2',3' cGAMP signaling. *Mol. Cell* **59**, 891–903 (2015).
73. Romling, U. Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci. Signal.* **1**, pe39 (2008).
74. Zhang, X. *et al.* Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell* **51**, 226–235 (2013).
75. de Almeida, L.A. *et al.* MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to Brucella abortus infection. *PLoS ONE* **6**, e23135 (2011).
76. Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B. & Coffman, R.L. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* **1**, 553–562 (1994).
77. Marino, E. *et al.* Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **18**, 552–562 (2017).
78. Faria, A.M., Maron, R., Ficker, S.M., Slavin, A.J., Spahn, T. & Weiner, H.L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* **20**, 135–145 (2003).