

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação do potencial imunomodulatório de linhagens de *Lactococcus lactis* portadoras de vetores de expressão eucariótica codificando as interleucinas 4 e 10 de *Mus musculus* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por estreptozotocina

ORIENTADA: Tatiane Melo Preisser

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

COORIENTADORA: Dra. Bianca Mendes Souza

BELO HORIZONTE, MG

Setembro – 2017

Tatiane Melo Preisser

Avaliação do potencial imunomodulatório de linhagens de *Lactococcus lactis* portadoras de vetores de expressão eucariótica codificando as interleucinas 4 e 10 de *Mus musculus* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por estreptozotocina

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**
Coorientadora: **Dra. Bianca Mendes Souza**

BELO HORIZONTE, MG

Setembro – 2017

043

Preisser, Tatiane Melo.

Avaliação do potencial imunomodulatório de linhagens de *Lactococcus lactis* portadoras de vetores de expressão eucariótica codificando as interleucinas 4 e 10 de *Mus musculus* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por estreptozotocina [manuscrito] / Tatiane Melo Preisser. – 2017.

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi. Coorientadora: Dra. Bianca Mendes Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Diabetes - Teses. 3. *Lactococcus lactis* - Teses. 4. Interleucina- 4 - Teses. 5. Interleucina 10 - Teses. 6. Estreptozocina. I. Miyoshi, Anderson. II. Souza, Bianca Mendes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Tatiane Melo Preisser

259/2017
entrada
1º/2016
CPF:
108.162.966-50

Às oito horas do dia **26 de setembro de 2017**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do potencial imunomodulatório de linhagens de *Lactococcus lactis* portadoras de vetores de expressão eucariótica codificando as interleucinas 4 e 10 de *Mus musculus* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por estreptozotocina**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Anderson Miyoshi**, 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 de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Anderson Miyoshi	UFMG	034.357.031-01	Aprovada
Adriana Abalen Martins Dias	UFMG	544.099.346-00	Aprovada
Marcelo Rizzatti Luizon	UFMG	277.308.188-92	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: _____
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 26 de setembro de 2017.

Anderson Miyoshi _____
Adriana Abalen Martins Dias _____
Marcelo Rizzatti Luizon _____



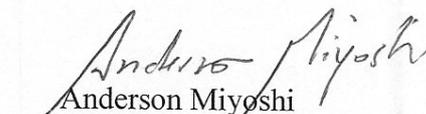
Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

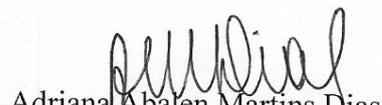


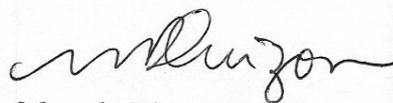
"Avaliação do potencial imunomodulatório de linhagens de *Lactococcus lactis* portadoras de vetores de expressão eucariótica codificando as interleucinas 4 e 10 de *Mus musculus* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por estreptozotocina"

Tatiane Melo Preisser

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Anderson Miyoshi
UFMG


Adriana Abalen Martins Dias
UFMG


Marcelo Rizzatti Luizon
UFMG

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2017.

*“Viver é enfrentar desafios. Quem nunca enfrentou desafios,
apenas passou pela vida, não viveu.”*

Augusto Branco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem dadas a mim;

À Universidade Federal de Minas Gerais por me fornecer uma formação acadêmica de excelência;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiarem este projeto;

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho;

Aos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Genética por serem sempre solícitos quando precisei, disponibilizando seus equipamentos;

Ao meu orientador prof. Dr. Anderson Miyoshi pela oportunidade, confiança e apoio incondicional;

À minha coorientadora Bianca Mendes Souza pela ajuda prestada e incentivo;

Às amigas Vanessa Bastos e Mari pela ajuda nos experimentos, companheirismo e por fazerem os dias de trabalho serem sempre um prazer;

Às amigas Fúlvia e Milena pela paciência, torcida e por terem sempre uma palavra de apoio e incentivo;

À amiga Vanessa Pecini que esteve comigo em todos os momentos: nos finais de semana no biotério, nos sufocos e, também, nos momentos de alegria (acompanhados de muito açaí);

Ao Bruno pelo carinho, apoio em todos os momentos e por sempre acreditar em mim e no meu trabalho;

Aos meus pais Edilene e Luciano e meu irmão Matheus pela paciência, compreensão e incentivo imensuráveis. Por não medirem esforços para me ajudar a alcançar todos os meus sonhos!

O meu “muito obrigada” a todos que, direta ou indiretamente, fazem parte desta conquista!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.	1
LISTA DE TABELAS.	3
LISTA DE ABREVIATURAS.	4
RESUMO.	7
ABSTRACT.	8
1 INTRODUÇÃO.	9
1.1 Diabetes Mellitus.....	10
1.1.1 Diabetes tipo 1.....	10
1.1.1.1 Modelos Experimentais: camundongos NOD e indução química por estreptozotocina.....	15
1.1.1.2 A IL-4 e IL-10 no contexto da T1D.....	18
1.2 Bactérias como veículos de entrega de DNA.....	20
1.2.1 Bactérias lácticas.....	23
1.2.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> : a bactéria láctica modelo.....	24
1.2.1.1.1 <i>L. lactis</i> como carreadora de vacinas de DNA.....	24
1.3 Justificativa de realização de trabalho.....	26
2 OBJETIVOS.	29
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.	31
3.1 Linhagens celulares, plasmídeos e condições de cultivo.....	32
3.2 Avaliação do potencial imunomodulatório da linhagem <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ portadora dos vetores pValac::dts:: <i>IL-4</i> ou pValac:: <i>IL-10</i> em modelo experimental de T1D.....	32
3.2.1 Animais.....	32
3.2.2 Indução da T1D experimental.....	32
3.2.3 Tratamento da T1D experimental.....	33
3.2.3.1 Preparo de doses de <i>L. lactis</i>	33
3.2.3.2 Administração de doses de <i>L. lactis</i>	34
3.2.4 Avaliação da incidência da T1D experimental.....	35
3.2.5 Avaliação do potencial imunomodulatório das linhagens <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::dts:: <i>IL-4</i>) e <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac:: <i>IL-10</i>). ..	36
3.2.5.1 ELISA para detecção de citocinas no pâncreas.....	36
3.2.5.2 ELISA para detecção de citocinas no soro sanguíneo.....	37
3.2.5.3 Análise histológica.....	38

3.2.6	Avaliação do efeito das linhagens <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::dts::IL-4) e <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::IL-10) no trato gastrointestinal de camundongos induzidos à T1D experimental.	38
3.2.6.1	ELISA para detecção de sIgA.	38
3.2.6.2	ELISA para detecção de citocinas no cólon.	39
3.3	Análises estatísticas.	40
3.4	Aspectos bioéticos e de biossegurança.	40
3.4.1	Bioéticos.	40
3.4.2	Biossegurança.	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	41
4.1	Avaliação da incidência da T1D experimental.	42
4.2	Avaliação do efeito das linhagens bacterianas no trato gastrointestinal dos camundongos submetidos ao modelo experimental de T1D.	44
4.3	Avaliação das respostas imunológicas no soro sanguíneo de camundongos que receberam linhagens bacterianas recombinantes codificadoras de IL-4 ou IL-10 no modelo experimental de T1D.	50
4.4	Avaliação das respostas imunológicas no pâncreas de camundongos que receberam linhagens <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ portadoras dos vetores pValac::dts::IL-4 ou pValac::IL-10 no modelo de múltiplas doses de STZ.	52
4.5	Discussão geral.	61
5	CONCLUSÕES.	67
6	PERSPECTIVAS.	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estágios de desenvolvimento da T1D.	12
Figura 1.2: Representação esquemática dos possíveis eventos envolvidos no surgimento e desenvolvimento da T1D.	15
Figura 1.3: Estrutura química da estreptozotocina.	16
Figura 1.4: Representação esquemática da transferência do DNA plasmidiano carregado por uma bactéria para células mamíferas.	20
Figura 1.5: Representação esquemática da dinâmica do sistema de amostragem dos antígenos da mucosa.	22
Figura 1.6: Representação esquemática dos plasmídeos (A) pValac::dts::IL-4 e (B) pValac::IL-10.	28
Figura 3.1: Representação esquemática do protocolo de indução química e tratamento da T1D experimental.	33
Figura 3.2: Representação esquemática das etapas para realização do ELISA do tipo “sanduíche”.	37
Figura 4.1: Porcentagem do peso corporal inicial (%) de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia).	42
Figura 4.2: Glicemia (mg/dL) de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia).	43
Figura 4.3: Glicosúria (g/dL) de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia).	44
Figura 4.4: Concentração de IgA secretória do lavado intestinal de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à injeção de STZ.	45
Figura 4.5: Concentração de IFN- γ (A), IL-12 (B), TNF- α (C) e IL-6 (D) de amostras de cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	47
Figura 4.6: Concentração de IL-17 (A), TGF- β (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) de amostras de cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	48
Figura 4.7: Concentração de IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) de amostras de soro sanguíneo de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	51

Figura 4.8: Grau de insulite visualizado nas ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da T1D experimental e suplementados com diferentes linhagens bacterianas recombinantes.	53
Figura 4.9: Cortes histológicos mostrando as ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da T1D experimental e suplementados com diferentes linhagens bacterianas recombinantes.	54
Figura 4.10: Concentração de IFN- γ de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	56
Figura 4.11: Concentração de TNF- α de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	57
Figura 4.12: Concentração de IL-4 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	58
Figura 4.13: Concentração de TGF- β de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	59
Figura 4.14: Concentração de IL-10 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	60
Figura 4.15: Concentração de IL-2 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental.	61
Figura 4.16: Modelo hipotético da contribuição de diversos componentes do ambiente intestinal na patogênese da T1D.	63
Figura 4.17: Representação esquemática da homeostase imune intestinal.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Linhagens bacterianas usadas neste trabalho.	32
Tabela 3.2: Divisão dos grupos experimentais quanto à indução e ao tratamento da T1D experimental.	35
Tabela 3.3: Índice para avaliação do grau de infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

% – por cento

°C – graus Celsius

ADA – *American Diabetes Association*

ADP – adenosina difosfato

ANOVA – *analysis of variance*

APC – célula apresentadora de antígeno

ATP – adenosina 5'-trifosfato

BGH poli-A – sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento

BL – bactérias lácticas

BLG – β -lactoglobulina

BSA – *bovine serum albumin*

C – citosina

CDA – *Canadian Diabetes Association*

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIBio – Comissão Interna de Biossegurança

Cm – cloranfenicol

dL – decilitro

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros

DTS – sequência de endereçamento nuclear

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

Ery – eritromicina

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FnBPA – proteína A de ligação à fibronectina

g – grama

G – guanina

GAD – *glutamic acid decarboxylase*

GALT – tecidos linfoides associados a mucosas

GLUT2 – proteína transportadora de glicose 2

GRAS – *generally recognized as safe*
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
HbA1c – hemoglobina glicada
HLA – *human leukocyte antigen system*
HRP – *horseradish peroxidase*
i.g. – intragástrica
i.p. – intraperitoneal
IA-2 – *insulinoma antigen 2*
IA-2β – *insulin antibody-2β*
idd – *loci insulin-dependent diabetes*
IFN-γ – interferon gama
IFN-α - interferon alfa
Ig – imunoglobulina
IgA – imunoglobulina A
IL – interleucina
iTregs – células T regulatórias induzidas
Kg – quilograma
L – litro
LPS – lipopolissacarídeo
M – molar
M0 – macrófago *naive*
M17-Gli – meio M17 suplementado com glicose (0,5%)
M2 – macrófago do tipo 2
MDA – malonaldeído
mg – miligramas
MHC – *major histocompatibility complex*
mL – mililitro
mmol – milimol
μg – micrograma
μL – microlitro
N – normal
Na₂CO₃ – carbonato de sódio
Na₂EDTA – ácido etilenodiaminotetracético dissódico
NaCl – cloreto de sódio

NAD – *nicotinamide adenine dinucleotide*
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NK – célula *natural killer*
nm – nanômetro
NO – óxido nítrico
NOD – *non-obese diabetic*
nTregs – células T regulatórias naturais
ORF – janela aberta de leitura
PBS – *phosphate buffered saline*
pCMV – promotor de citomegalovírus
pH – potencial hidrogeniônico
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
q.s.p. – quantidade suficiente para
rIL-4 – proteína IL-4 recombinante
ROS – espécies reativas de oxigênio
rpm – rotações por minuto
SD – desvio padrão
sIgA – imunoglobulina A secretória
STAT6 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
STZ – estreptozotocina
SV40 – vírus vacuolante símio 40
T1D – diabetes tipo 1
T2D – diabetes tipo 2
TCR – receptor de célula T
TGF-β – *transforming growth factor β*
TGI – trato gastrointestinal
Th – célula T auxiliar
TNF-α – fator de necrose tumoral α
Treg – linfócito T regulador
TSDR – *Treg specific demethylated region*
UFC – unidade formadora de colônia
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
WHO – *World Health Organization*
ZNT – transportador de zinco

RESUMO

A diabetes tipo 1 (T1D) é uma doença autoimune órgão-específica, caracterizada pela destruição progressiva das células β pancreáticas, produtoras de insulina, por leucócitos autorreativos e seus mediadores. Na progressão da inflamação nas ilhotas de Langerhans, observa-se o papel determinante de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ autorreativos com especificidade para auto-antígenos pancreáticos, assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α . Para mimetizar a T1D experimentalmente em camundongos, foi escolhido o modelo de múltiplas doses de estreptozotocina (STZ), um agente alquilante com ação citotóxica que é capaz de instaurar fenótipo e infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas mais semelhante com o que é visto na T1D humana. Paralelamente, estudos anteriores mostraram que respostas imunes devidas a estímulos provenientes do intestino podem modular a inflamação prejudicial que culmina com o estabelecimento da T1D. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial imunomodulatório da linhagem *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadora dos vetores de expressão eucariótica pValac::dts::IL-4 ou pValac::IL-10, administrada pela via intragástrica a camundongos C57BL/6 machos, no modelo de T1D induzido quimicamente por múltiplas doses de STZ. Através do monitoramento do peso e do acompanhamento dos níveis de glicemia e glicosúria, verificou-se que todos os animais que receberam múltiplas doses de STZ se tornaram diabéticos, logo após a indução química da T1D experimental. Entretanto, os animais que receberam a administração combinada das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) apresentaram o menor grau de insulite entre os demais grupos que também receberam injeções intraperitoneais de STZ e também mostraram níveis, estatisticamente maiores, de IL-2, quando comparados aos animais que receberam apenas as injeções de STZ (Grupo controle positivo), indicando um estímulo à expansão e ativação de células Treg no pâncreas. Assim, este trabalho constitui um primeiro passo na busca pelo entendimento dos mecanismos intrínsecos à T1D utilizando *L. lactis* para a entrega de vetores codificadores das interleucinas 4 e 10, pela via intragástrica, no modelo de diabetes induzida quimicamente por STZ. Logo, os resultados obtidos trazem novos questionamentos sobre os efeitos imunomodulatórios verificados, visando uma melhor compreensão dos mecanismos associados à progressão da T1D e, possivelmente, auxiliando na busca por terapias alternativas.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an organ-specific autoimmune disease, characterized by the progressive destruction of insulin-producing pancreatic islets β cells by autoreactive leukocytes and their mediators. In the progression of inflammation in the islets of Langerhans, the determinant role of autoreactive $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes with specificity for pancreatic autoantigens, as well as the increase of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , is observed. In order to mimic the experimental diabetes in mice, it was chosen the model of multiple doses of streptozotocin (STZ), an alkylating agent with cytotoxic action able to establish phenotype and cellular infiltrate in the pancreatic islets more similar with the human T1D. Simultaneously, previous studies have shown that immune responses due to stimuli from the gut can modulate the harmful inflammation, which culminates in the onset of the disease. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the immunomodulatory potential of *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA⁺ carrying the eukaryotic expression vectors pValac::dts::*IL-4* and pValac::*IL-10*, administered by the intragastric route to male C57BL/6 mice, in the T1D chemically induced model by multiple doses of STZ. By monitoring weight and glycemia and glycosuria levels, all animals that received multiple doses of STZ became diabetic soon after the chemical induction of experimental T1D. However, animals that received both the *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) and the *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) strains showed the lowest degree of insulinitis among the groups that also received the intraperitoneal injections of STZ and also presented statistically higher levels of IL-2, when compared to the animals that received only the injections of STZ (positive control group), indicating a stimulus to expansion and activation of Treg cells in the pancreas. Thus, this study constitutes a first step in the search for the understanding of the mechanisms intrinsic to T1D using *L. lactis* for delivery of vectors encoding interleukins 4 and 10, by the intragastric route, in the STZ-induced diabetes model. Therefore, the results obtained raise new questions about the immunomodulatory effects verified, aiming at the understanding of the mechanisms associated with the progression of T1D and, possibly, helping in the search for alternative therapies.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus é uma desordem metabólica complexa que pode provocar disfunções fisiológicas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, sendo seu principal sinal clínico a hiperglicemia persistente, causada pela ausência da secreção, resistência ou deficiência de insulina (Karamanou, 2016; Zaccardi *et al.*, 2016). Atualmente, de acordo com a *International Diabetes Federation*, um entre onze adultos no mundo tem diabetes, o que equivale a, aproximadamente, 415 milhões de pessoas, e a estimativa é que esse número suba para 642 milhões até o ano de 2040 (International Diabetes Federation, 2015). No Brasil, cerca de 6% da mortalidade registrada, entre todas as idades, é devido à diabetes (World Health Organization, 2016).

Existem duas principais formas de diabetes mellitus: a diabetes tipo 1 (T1D – do inglês, *Type 1 Diabetes*), que é uma doença autoimune na qual ocorre a destruição progressiva das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina; e a diabetes tipo 2 (T2D – do inglês, *Type 2 Diabetes*), na qual o indivíduo pode apresentar resistência à insulina em tecidos periféricos ou a produção desse hormônio ocorre de forma anormal (Harcourt *et al.*, 2013).

1.1.1 Diabetes tipo 1

A T1D é uma doença autoimune órgão-específica, caracterizada pela infiltração de células mononucleares (incluindo linfócitos T e B), monócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK) nas ilhotas pancreáticas – processo denominado insulite, resultando na destruição seletiva das células β (Boldison & Wong, 2016). Apesar da T1D ser diagnosticada em qualquer idade, trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns da infância, sendo diagnosticada, em sua maioria, entre 5-7 anos de idade ou próximo à puberdade (Atkinson *et al.*, 2014). Atualmente, a T1D representa 10 a 15% dos casos de diabetes mellitus, porém, a cada ano, o número de acometidos aumenta cerca de 3%. O Brasil é o terceiro país do mundo com o maior número de crianças com T1D (International Diabetes Federation, 2015).

Os critérios para diagnóstico da diabetes foram estabelecidos por um consenso da WHO (do inglês, *World Health Organization*), *American Diabetes Association* (ADA) e *Canadian Diabetes Association* (CDA), sendo eles: (i) glicemia ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) após jejum de oito horas; (ii) glicemia ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) medida duas horas após a ingestão de 1,75 g de glicose por kg (dose máxima permitida: 75 g de glicose) pela via oral;

(iii) glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L); ou (iv) níveis de HbA1c (hemoglobina glicada) $\geq 6,5\%$. Porém, a classificação entre T1D e T2D depende de variáveis na apresentação clínica do diagnóstico, como a idade do paciente, brusquidão da hiperglicemia, presença de cetose, grau de obesidade e necessidade de insulina no momento do diagnóstico (Alam *et al.*, 2014; World Health Organization, 2016). Apesar dos esforços para padronizar o diagnóstico da T1D e, assim, agilizar a terapia adequada para o acometido, as causas e a tipologia da doença em questão permanecem incertas. Entre 5 e 15% dos adultos diagnosticados com T2D podem, na realidade, ter T1D com autoanticorpos circulantes, o que significa que o número de casos de T1D pode estar subestimado e, mais importante, que pessoas podem estar em risco devido ao diagnóstico incorreto (Atkinson *et al.*, 2014). Dessa forma, a busca incessante pela compreensão da T1D por completo, como o seu desenvolvimento, diagnóstico, particularidades e terapias efetivas são de extrema importância, considerando o preocupante cenário global dessa desordem.

Atualmente, os sinais clínicos mais comuns apresentados pelos afetados da T1D são: polidipsia (sede excessiva), poliúria (aumento da produção de urina) e perda de peso (Simmons & Michels, 2015). Apesar das melhorias na terapia insulínica intensiva e no monitoramento da glicemia alcançadas nas últimas décadas, a maioria dos indivíduos portadores da T1D não se mantém na faixa recomendada de níveis glicêmicos. Sendo assim, essas pessoas estão sujeitas, por um alto risco, a desenvolver complicações microvasculares (como retinopatias, nefropatias e neuropatias) e, também, macrovasculares (como doenças cardiovasculares) associadas ao diabetes, hipoglicemia severa e depressão (Simmons *et al.*, 2016).

A T1D pode ser classificada como pré-sintomática, que se caracteriza por um declínio na massa de células β , mas o acometido ainda não apresenta os sintomas; ou como sintomática, fase em que os sintomas da hiperglicemia, como poliúria, sede e perda de peso se tornam evidentes. Alternativamente, a T1D pode ser subdividida em três estágios: no primeiro observa-se a presença de autoanticorpos e ausência de disglucemia (alteração da taxa glicêmica); já no segundo estágio o indivíduo apresenta, além de autoanticorpos, disglucemia; enquanto no terceiro estágio os sintomas aparecem, caracterizando a fase sintomática da doença (Figura 1.1) (Katsarou *et al.*, 2017).

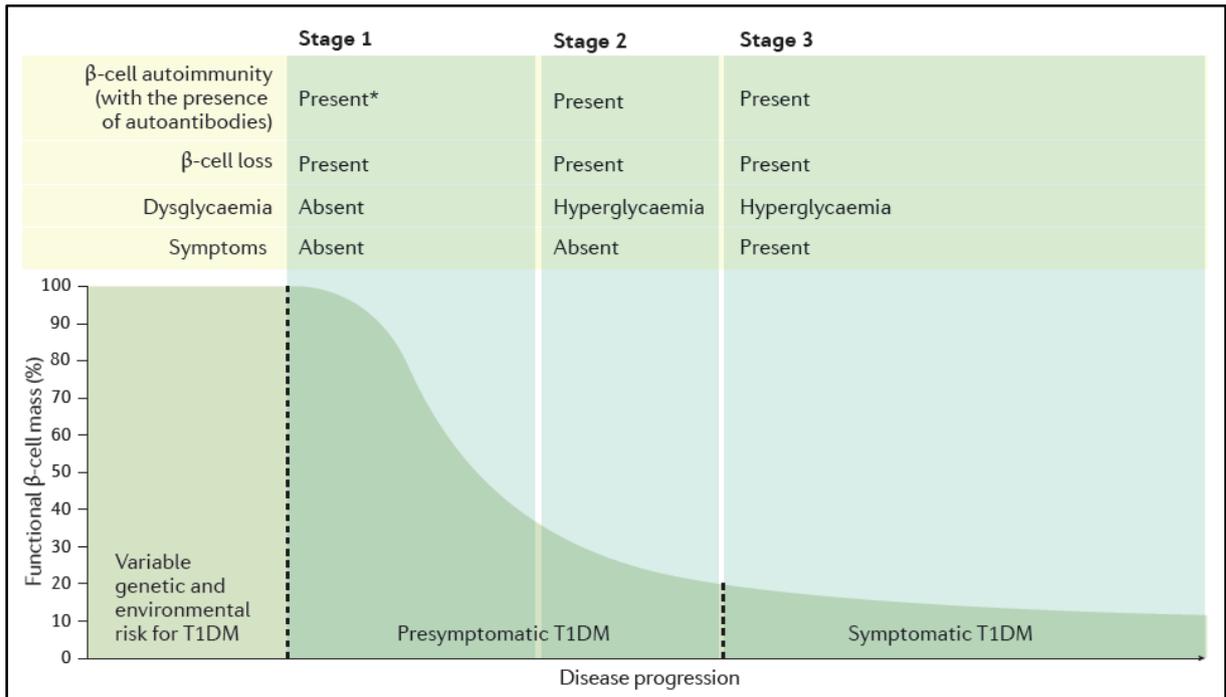


Figura 1.1: Estágios de desenvolvimento da T1D. *: Autoimunidade direcionada às células β , marcada pela presença de autoanticorpos anti-antígenos das ilhotas pancreáticas, geralmente está presente meses ou até anos antes do início da perda de células β . **Fonte:** Katsarou *et al.*, 2017.

Nos estudos que visam traçar uma correlação entre os fatores de suscetibilidade à doença e o desenvolvimento da T1D, destacam-se a influência de fatores genéticos, ambientais e a presença de autoanticorpos específicos. As regiões gênicas associadas à suscetibilidade à doença em questão foram denominadas loci *idd* (do inglês, *insulin-dependent diabetes*). O locus do HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen system*) de classe II, localizado no cromossomo 6, é um dos loci *idd* mais bem estudados na literatura. Os genes HLA codificam proteínas de superfície celular envolvidas na apresentação de antígenos e auto-tolerância, sendo, assim, genes críticos na regulação da resposta imunológica (Zaccardi *et al.*, 2016). Os haplótipos HLA-DR3-DQ2 e HLA-DR4-DQ8 são indicados como os principais fatores de risco genético à T1D devido a sua associação com o aparecimento de autoanticorpos [como anti-insulina e anti-GAD65 (do inglês, *Glutamic Acid Decarboxylase*)]. Ademais, esses haplótipos parecem determinar a idade em que ocorrerá a soroconversão, a qual consiste na idade mais precoce em que algum autoanticorpo específico é detectado. Logo, isso implica que indivíduos que possuem esses haplótipos de suscetibilidade apresentam um risco aumentado de desenvolver autoanticorpos mais precocemente e, por conseguinte, chegar à fase sintomática da doença mais rapidamente (Wållberg & Cooke, 2013; Li *et al.*, 2014).

Estudos mostraram que a T1D é uma doença que possui vários fatores genéticos de risco associados, porém, apenas esses fatores não são suficientes para o desenvolvimento da desordem – já que possuem baixa penetrância. Nota-se, também, que a taxa de concordância para T1D entre gêmeos monozigóticos é de 30%; o que também ressalta a influência dos fatores ambientais no progresso da doença. Várias influências ambientais têm sido propostas como possíveis fatores etiológicos da T1D, como: infecções virais (principalmente por enterovírus), a introdução de leite de vaca e alimentos com glúten, prematuramente, na alimentação do bebê e, até, eventos gestacionais. No entanto, ainda é necessária a validação desses agentes como possíveis determinantes da doença, através da compreensão de como esses mecanismos influenciariam a autoimunidade ou como uma combinação de eventos ambientais dispararia o aparecimento de autoanticorpos contra células β pancreáticas (Simmons & Michels, 2015; Katsarou *et al.*, 2017).

Os primeiros indícios de autoimunidade nos indivíduos que, posteriormente, desenvolverão a T1D consistem na presença de autoanticorpos anti-insulina e anti-GAD65; sendo a ordem de aparecimento desses determinada por diferenças genéticas e idade. Subsequentemente, outros autoanticorpos podem surgir, como aqueles que têm como alvo as tirosina fosfatases IA-2 (do inglês, *Insulinoma Antigen 2*) e IA-2 β (do inglês, *Insulin Antibody-2 β*) ou o transportador de zinco ZNT8. Essas proteínas são encontradas na membrana de vesículas secretórias e a função de IA-2 e IA-2 β ainda não foi esclarecida. Sabe-se, porém, que o aparecimento de autoanticorpo anti-IA-2 aumenta, significativamente, o risco do indivíduo chegar à fase sintomática da T1D (Waldron-Lynch & Herold, 2011; Katsarou *et al.*, 2017).

Sabe-se que, antes de chegar à fase clínica, quando geralmente a doença é diagnosticada, ocorre uma série de eventos (fase pré-clínica) que são determinantes para o progresso da T1D (Figura 1.2). O desenvolvimento da diabetes inicia-se com a suscetibilidade genética do indivíduo concomitante a um fator ambiental. No pâncreas, ocorre um aumento de produção de interferon alfa (IFN- α) pelas células β e, subsequentemente, da expressão de MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I. Isso faz com que as células β sejam expostas ao ataque de linfócitos T CD8⁺ autorreativos com especificidade para auto-antígenos pancreáticos. Por conseguinte, esses auto-antígenos liberados pelas células produtoras de insulina são internalizados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs – do inglês, *Antigen-Presenting Cells*) residentes e levados para o linfonodo pancreático.

Simultaneamente a esses eventos, na periferia, o fator ambiental causou uma mudança no perfil metabólico do indivíduo, criando um ambiente pró-inflamatório que favorece respostas de linfócitos T efetores, em detrimento das respostas de linfócitos T reguladores (Treg). Os auto-antígenos das células β pancreáticas apresentados nesse contexto pró-inflamatório, juntamente com linfócitos T $CD4^+$, induzem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, dando início, assim, à produção de auto-anticorpos (soroconversão). Os linfócitos T $CD8^+$ autorreativos também são estimuladas a proliferar e migrar para o pâncreas. Há, então, uma segunda onda de morte de células β , decorrente da ação de grânulos citotóxicos, como perforina e granzima, assim como a atuação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (interferon γ) e TNF- α (fator de necrose tumoral α – do inglês, *Tumor Necrosis Factor α*), resultando no comprometimento da produção de insulina – chamado de pseudo-atrofia. Tal fato causa a liberação de novos auto-antígenos que são englobados pelas APCs, incluindo os linfócitos B que migraram para o pâncreas, e essas se transportam para o linfonodo pancreático. Isso faz com que surjam novas especificidades de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e linfócitos B, em um processo conhecido como espalhamento de epítopo, provocando uma depleção ainda mais severa das células β , tanto na função como na massa. De forma surpreendente, a inflamação auto-imune gerada pode estimular a proliferação de células β . Ademais, em alguns casos, os linfócitos Treg podem se sobrepor e atenuar a resposta imune efetora. Assim sendo, o balanço entre a resposta autorreativa destrutiva e a resposta reguladora pode promover um estado transiente de produção de insulina auto-suficiente, mesmo após o início clínico da doença – período conhecido como “fase de lua-de-mel”. Eventualmente, a resposta autorreativa prevalece, levando à destruição quase que completa das células β produtoras de insulina, o que faz com que, quando a T1D é diagnosticada, apenas 10-30% das células β estão funcionais (Van Belle *et al.*, 2011).

Apesar desses eventos propostos, ainda há vários questionamentos que precisam ser esclarecidos acerca do desenvolvimento da T1D. Em busca dessas respostas, a utilização dos modelos experimentais em camundongos tem sido fundamental para o avanço das pesquisas visando a elucidação dos mecanismos envolvidos na progressão da doença.

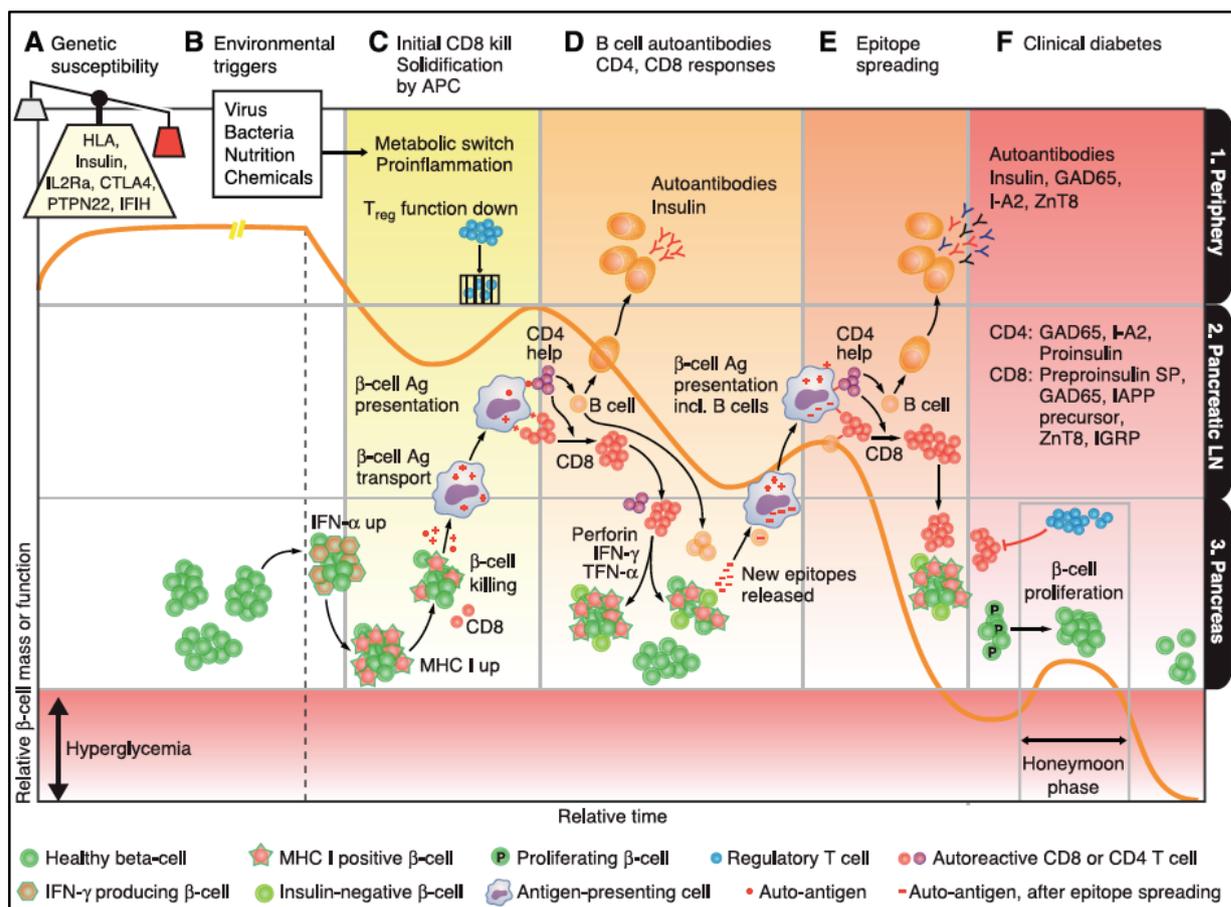


Figura 1.2: Representação esquemática dos possíveis eventos envolvidos no surgimento e desenvolvimento da T1D. Fonte: Van Belle *et al.*, 2011.

1.1.1.1 Modelos experimentais: camundongos NOD e indução química por estreptozotocina

Cientes da importância e da necessidade de buscar o entendimento da doença com o intuito de proporcionar melhorias na qualidade de vida dos diabéticos, ao longo dos últimos 35 anos, pesquisas têm sido realizadas utilizando, como principal modelo animal, o camundongo NOD (do inglês, *Non-Obese Diabetic*). Essa linhagem foi desenvolvida a partir de intercruzamentos da linhagem de camundongos propensa a catarata JcI:ICR na década de 80, por Makino e colaboradores (Makino *et al.*, 1980; Kikutani & Makino, 1992). Os camundongos NOD desenvolvem a diabetes autoimune espontaneamente, entretanto, a incidência dessa desordem é de 60-80% em fêmeas e 20-30% em machos. Essa incidência tende a se manter alta quando os camundongos são mantidos em um ambiente *germ-free*. O aparecimento da T1D geralmente ocorre entre 12 a 14 semanas de idade em camundongos NOD fêmeas e um pouco mais tardiamente em machos. Análises histológicas demonstraram

que um infiltrado mononuclear pode ser visualizado ao redor das ilhotas pancreáticas (peri-insulite) com 3-4 semanas de idade. Esse infiltrado evolui e invade as ilhotas (insulite) nas semanas subsequentes, sendo que a maioria dos animais NOD apresenta insulite severa na 10ª semana de vida (Anderson & Bluestone, 2005).

A linhagem de camundongos NOD apresenta algumas similaridades importantes com a T1D em humanos, como a presença de autoanticorpos específicos para antígenos pancreáticos, células T autorreativas e o componente genético na suscetibilidade à doença (Pearson *et al.*, 2016). Desde que essa linhagem foi criada, muitas drogas testadas em camundongos NOD mostraram-se eficientes em prevenir, atrasar e, até mesmo, reverter a T1D experimental. Contudo, essas mesmas substâncias não demonstraram o efeito esperado em testes clínicos. Assim, visto que a validade do modelo animal mais utilizado na pesquisa da T1D é questionável, outros modelos animais para o estudo da doença devem ser considerados (Reed & Herold, 2015).

Antes do uso dos camundongos NOD, a T1D era induzida quimicamente em camundongos com múltiplas doses de estreptozotocina (STZ). Esse modelo para estudo da T1D foi criado por Like e Rossini, em 1976, e desde então, foi vastamente utilizado na pesquisa por apresentar semelhanças significativas com a doença em humanos (Like & Rossini, 1976; Leiter, 1982). A STZ é um composto natural, isolado da bactéria encontrada no solo *Streptomyces achromogenes*, que apresenta, em sua estrutura química, uma nitrosourea ligada a um grupo metilo e a uma molécula de glicose (Figura 1.3). Esse composto químico caracteriza-se como um agente alquilante, hidrofílico e que possui meia-vida de 5-15 minutos (Rossini *et al.*, 1977).

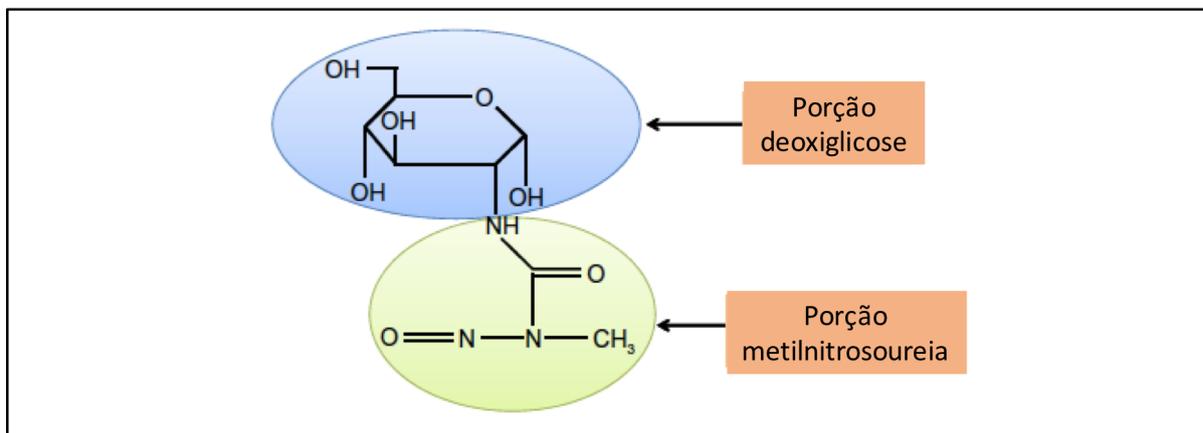


Figura 1.3: Estrutura química da estreptozotocina. Adaptado: Wu & Yan, 2015.

A STZ é particularmente danosa para as células β pancreáticas por ser um análogo citotóxico da glicose que é transportado para o interior das mesmas, via proteína transportadora de glicose 2 (GLUT2). Esse receptor é o único transportador de glicose de células mamíferas que reconhece a STZ e faz com que ela se desloque para dentro da célula. Ademais, as células β apresentam altos níveis de expressão de GLUT2, tornando, assim, a toxicidade de STZ sítio-específica (Lenzen, 2008).

Dentro da célula produtora de insulina, o mecanismo de ação de STZ que culmina na morte celular tem sido muito estudado ao longo dos anos. Logo, foram propostas três vias envolvidas:

- i) Metilação do DNA (ácido desoxirribonucleico – do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*): a adição de grupos metila ao DNA da célula β resulta na ativação da enzima nuclear poli-ADP (adenosina difosfato – do inglês, *Adenosine Diphosphate*) ribose-sintetase, em uma tentativa de reparo celular, levando à depleção de NAD^+ (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) e, conseqüentemente, dos estoques de ATP (adenosina 5'-trifosfato – do inglês, *Adenosine 5'-Triphosphate*), como resultado de uma super-estimulação dos mecanismos de reparo do DNA. O esgotamento das reservas de energia da célula β resulta na inibição da biossíntese e secreção de insulina, culminando com o processo de necrose celular. Apesar do processo de metilação do DNA ser o principal responsável pela morte celular, a metilação de proteínas por STZ também contribui para a toxicidade desse composto às células β pancreáticas (Murata *et al.*, 1999; Pieper *et al.*, 1999; Bolzán & Bianchi, 2002).
- ii) Produção de óxido nítrico (NO – do inglês, *Nitric Oxide*): outro mecanismo responsável pela ação diabetogênica do STZ tem sido atribuído a sua capacidade de agir como doador de NO nas células pancreáticas, levando à alquilação do DNA e, como consequência, a morte celular. As células β são particularmente sensíveis aos danos causados pelo NO e também pelos radicais livres devido a essas apresentarem baixos níveis de enzimas de eliminação desses compostos danosos (Spinass, 1999).
- iii) Geração de radicais livres: STZ é conhecido por causar aumento nos níveis de malonaldeído (MDA – do inglês, *Malondialdehyde*) e, paralelamente, diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, glutatona-peroxidase e superóxido dismutase. Essas alterações resultam na suscetibilidade do pâncreas à indução de estresse oxidativo por STZ. Outro envolvimento importante de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*) durante o metabolismo de STZ é a produção de ácido

úrico como produto final da degradação de ATP. Essa reação gera ROS, como os radicais hidroxil e superóxido, acelerando o processo de destruição das células β (Eleazu *et al.*, 2013).

A indução química da T1D por múltiplas doses de STZ proporciona o estabelecimento rápido e eficaz da doença em camundongos C57BL/6 machos, facilitando, assim, o estudo dessa desordem. Esse modelo experimental exhibe fenótipo e infiltrado celular das ilhotas pancreáticas mais parecidos com o que é visto na T1D humana (Müller *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2016). Além disso, já foi demonstrado que o tratamento com STZ é responsável pelo desenvolvimento de uma resposta humoral com produção de anticorpos e, também, elicitava uma resposta celular mediada por linfócitos T autorreativos para antígenos das células β (Herold *et al.*, 1995; Horwitz *et al.*, 2002). Em função dessas características, o modelo de múltiplas doses de STZ foi o escolhido para indução experimental da T1D neste trabalho.

1.1.1.2 A IL-4 e IL-10 no contexto da T1D

Descoberta em 1982, a interleucina (IL) 4 consiste em uma citocina atraente para o estudo da T1D por ser produzida por células T auxiliares (Th – do inglês, T *helper*) do tipo Th2 ativadas (Jansen *et al.*, 1990; Luzina *et al.*, 2011) e induzir a diferenciação e ativação de macrófagos M0 (macrófagos *naive*) para o perfil M2, os quais são reconhecidos por regular a inflamação (Gordon & Martinez, 2010). Além disso, a IL-4 induz a diferenciação de células Th em células Th2, o que resulta na liberação de citocinas desse padrão de resposta imunológica e inibição da diferenciação de células Th1 e Th17 (Opal & DePalo, 2000; Luzina *et al.*, 2012).

Já a IL-10 se torna interessante nos estudos envolvendo a T1D por ser reconhecidamente uma citocina com potente atividade anti-inflamatória (Moore *et al.*, 2001). Ademais, a IL-10 pode ser produzida por várias células, como monócitos, macrófagos, células B, células Treg, Th1, Th2, Th17 e células dendríticas (Tian *et al.*, 2014). Essa citocina atua como um importante regulador imune, podendo inibir a secreção de citocinas do padrão Th1, como IFN- γ , e estimular a diferenciação e proliferação de linfócitos B, T e macrófagos (Asadullah, 2003).

Assim, visto a importância da regulação imunológica e do papel chave das citocinas no desenvolvimento da T1D, vários estudos testaram o potencial terapêutico de IL-4 e IL-10, por diferentes formas de entrega e rotas de imunização, em camundongos NOD que tiveram

como resultado a redução da severidade da insulite e normoglicemia (Rapoport *et al.*, 1993; Pennline *et al.*, 1994; Rabinovitch *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1997; Papaccio *et al.*, 2002).

Em 1999, Wood e colaboradores demonstraram que a administração de STZ suprime a proliferação de linfócitos T do timo em resposta à estimulação com mitógeno *in vitro*. Foi visto, também, que a secreção de IL-4 foi dramaticamente reduzida, enquanto que a secreção de IL-2 e IFN- γ por linfócitos T não foi, significativamente, inibida. Foi, então, adicionado IL-4 à cultura de linfócitos T provenientes de animais que passaram pela administração de STZ. Como resultado, observou-se a restauração da resposta proliferativa das células em cultura. Nos testes *in vivo*, camundongos BALB/c machos foram submetidos a cinco doses diárias e consecutivas de STZ na concentração de 40 mg/kg. Os animais foram pré-tratados com a proteína IL-4 recombinante (rIL-4), pela via subcutânea, por duas semanas antes e duas após a indução química da T1D; o que resultou na reversão do defeito de proliferação de tímocitos induzido por STZ e preveniu tanto a destruição da ilhota pancreática como a hiperglicemia (Wood *et al.*, 1999).

Em outro estudo, foram utilizadas nanomicelas catiônicas, injetadas pela via intramuscular, para entrega de plasmídeos codificadores de IL-4 e IL-10 no modelo de múltiplas doses de STZ em camundongos BALB/c machos. Os resultados mostraram níveis, significativamente, maiores de IL-4 e IL-10 no soro dos animais que receberam as nanomicelas contendo um único plasmídeo codificador dessas citocinas, assim como níveis reduzidos de glicemia. Na análise histológica, os pâncreas desses animais exibiram um pouco de infiltrado inflamatório nas ilhotas, mas esse era bem menor do que o exibido por animais que tiveram apenas a administração de STZ, indicando um efeito protetor das citocinas IL-4 e IL-10 (Mandke & Singh, 2012).

Dessa forma, no contexto inflamatório da T1D, as citocinas IL-4 e IL-10 surgem como boas candidatas para o estudo dos mecanismos envolvidos nessa desordem, assim como uma nova terapia, visando a manutenção das células β pancreáticas e, conseqüentemente, a normoglicemia (Waldron-Lynch & Herold, 2011). Entretanto, a estratégia para entrega dessas citocinas é um desafio recorrente nas pesquisas atuais. Nesse cenário, o uso de bactérias como veículos de entrega de DNA emerge como uma alternativa favorável, abrindo novas perspectivas para o estudo de diversas desordens por meio da imunomodulação.

1.2 Bactérias como veículos de entrega de DNA

Em 1980, Schaffner demonstrou, pela primeira vez, que as bactérias também são capazes de transferir material genético diretamente para células mamíferas *in vitro*, quando cópias em tandem do genoma do vírus SV40 carregadas por *Escherichia coli* foram transferidas, em co-cultura, para células de mamíferos. Desde então, vários sistemas de transferência têm sido desenvolvidos e/ou melhorados (Schoen *et al.*, 2004).

Assim, o processo de transferência do DNA plasmidiano para células mamíferas consiste na entrada da bactéria na célula alvo por meio de endocitose e, então, essa é mantida em uma vesícula que irá se fundir ao lisossomo, formando o fagolisossomo com o intuito de degradar a bactéria. Nesse momento, por esses mecanismos não estarem completamente esclarecidos, há duas hipóteses: na primeira, a bactéria é lisada no fagolisossomo e o plasmídeo consegue escapar para o citoplasma ou, como segunda hipótese, a bactéria escapa do compartimento de degradação, sofre lise no citoplasma e libera o plasmídeo. Subsequentemente, esse plasmídeo é translocado para o núcleo, onde a ORF (janela aberta de leitura – do inglês, *Open Reading Frame*) de interesse será expressa (Figura 1.4) (Schoen *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2011).

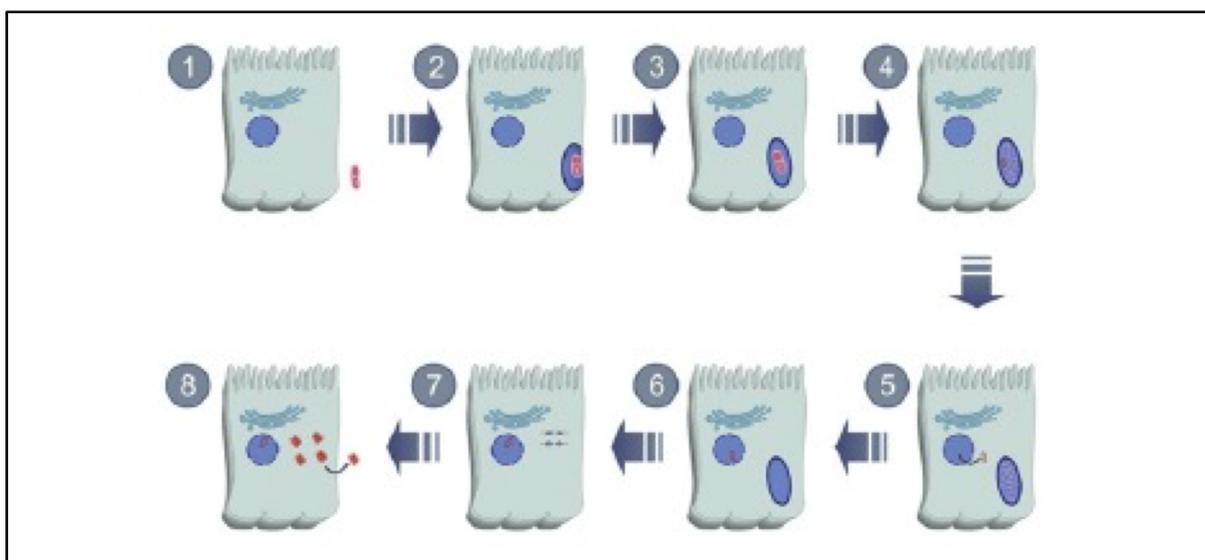


Figura 1.4: Representação esquemática da transferência do DNA plasmidiano carregado por uma bactéria para células mamíferas. (1) A célula intestinal e a bactéria com a ORF de interesse. (2) Entrada da bactéria na célula alvo. (3) Escape da bactéria do fagolisossomo. (4) Lise bacteriana. (5 e 6) Liberação dos plasmídeos no citoplasma e transferência desses para o núcleo da célula hospedeira. (7) Expressão da ORF de interesse dentro do núcleo. (8) Transcrição e tradução da proteína de interesse pela maquinaria da célula eucariótica. **Adaptado:** Pontes *et al.*, 2011.

A utilização de bactérias como veículos de entrega de vacinas de DNA apresenta várias vantagens em comparação com outras estratégias de vacinação, como carreadores virais, DNA nu, entrega de purificados ou antígenos proteicos. A primeira vantagem observada é a entrega da ORF de interesse de maneira “segura” diretamente para a célula mamífera, dado que a bactéria funciona como uma barreira contra possíveis degradações por nucleases, por exemplo. Uma outra vantagem é a permissão de expressão de antígenos modificados pós-traducionalmente e a apresentação de epítopos restritos conformacionalmente, já que todo o processamento é feito pela maquinaria eucariótica. Além disso, linhagens bacterianas carreadoras são de fácil manipulação, uma vez que, nesse caso, não são necessárias etapas adicionais de amplificação e purificação do plasmídeo (Schoen *et al.*, 2004). Ademais, a utilização de bactérias vivas por si só já contribui como um adjuvante imunostimulatório devido às características inatas desse vetor (da Silva *et al.*, 2014).

Um fator importante para alcançar o sucesso na estratégia de vacinação de DNA utilizando bactérias carreadoras é a escolha de uma boa rota de imunização. Dessa forma, a via de mucosas se destacou das demais por apresentar efeitos secundários reduzidos, ser de fácil administração, ter custos de produção e implementação reduzidos e, principalmente, pela capacidade de estimular tanto respostas imunes locais quanto sistêmicas – o que não ocorre na via parenteral, por exemplo (Schoen *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2014; Banerjee & Mitragotri, 2017). Para que essas respostas imunológicas ocorram, primeiramente a bactéria precisa transpor a barreira epitelial, o que pode acontecer de três formas distintas: pelas células M das vilosidades intestinais não-associadas à placa de Peyer [folículo indutivo de mucosa no qual ocorre apresentação de antígenos pelas APCs para os linfócitos e formação da resposta imune, incluindo também a síntese de IgA (imunoglobulina A)], pela extensão dos dendritos das células dendríticas entre as junções das células epiteliais e, o que se sucede na maioria dos casos, pela absorção das células M que estão localizadas no epitélio associado a folículos de tecidos linfoides associados a mucosas (GALT – do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissues*), como as Placas de Peyer. Essas células M, caracterizadas pela borda irregular “em escova” e redução de microvilos, são especializadas em transpor macromoléculas luminiais, antígenos particulados e microrganismos comensais e patogênicos pela barreira epitelial (Figura 1.5). Logo, quando esses chegam na placa de Peyer, eles são capturados pelas APCs, podendo se propagar para o baço, fígado e linfonodos. Após essa ingestão pelas células dendríticas, por exemplo, o DNA plasmidiano é liberado no citosol, chegando até o núcleo, onde é expresso. O antígeno é então reconhecido como endógeno e, assim, apresentado via

moléculas MHC de classe I, gerando uma resposta T CD8⁺ específica. Porém, o antígeno também pode ser produzido por outras células infectadas, sendo esse capturado por uma APC para processamento e posterior apresentação via MHC de classe II, o que resulta na ativação de linfócitos Th CD4⁺ e linfócitos B, sendo que esse último culmina na produção de anticorpos (Schoen *et al.*, 2004; Meeusen, 2011; Lamichhane *et al.*, 2014).

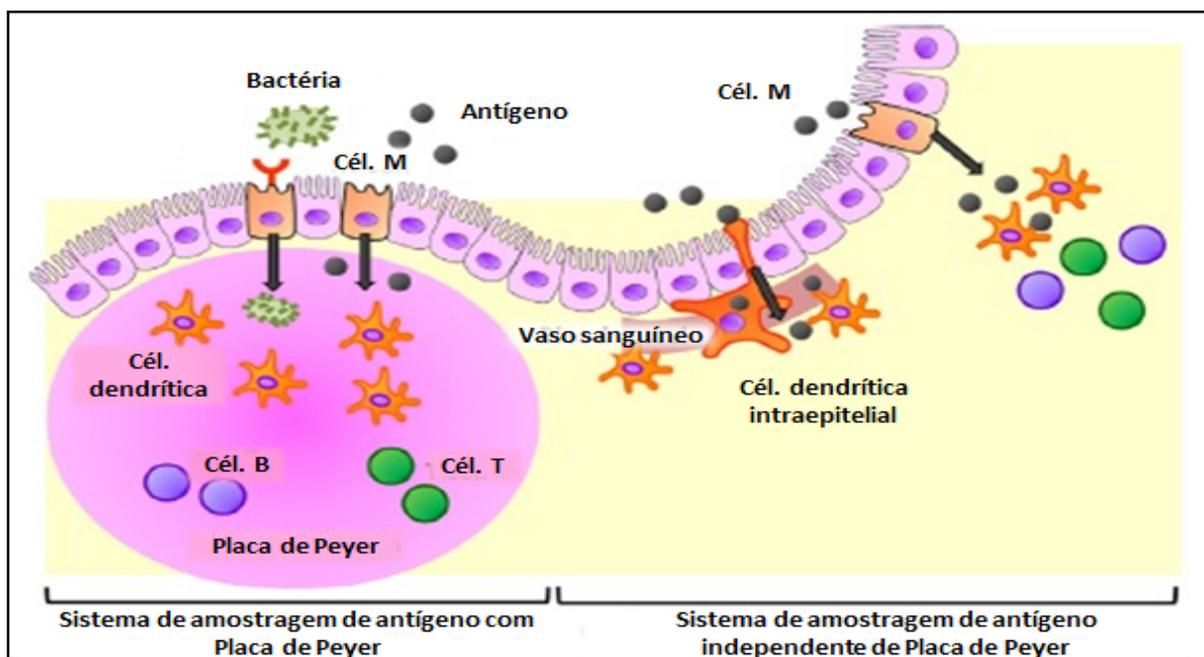


Figura 1.5: Representação esquemática da dinâmica do sistema de amostragem dos antígenos da mucosa. A maioria dos antígenos presentes na mucosa é recolhida do lúmen pelas células M localizadas no epitélio associado a folículos de GALT (como as placas de Peyer, por exemplo). Nessa estrutura linfoide, abaixo da barreira epitelial, estão presentes linfócitos e APCs, como as células dendríticas. Antígenos e microrganismos internalizados são capturados por essas APCs e conseqüentemente são apresentados a linfócitos, iniciando, assim, respostas imunes antígeno-específicas. Ademais, células M das vilosidades intestinais funcionam como uma porta para amostragem de bactérias entéricas e também algumas células dendríticas intraepiteliais podem estender protusões até o lúmen intestinal e capturar antígenos diretamente. **Adaptado:** Lamichhane *et al.*, 2014.

Para a escolha da bactéria carreadora do plasmídeo vacinal/terapêutico, existem duas alternativas: patógenos atenuados e bactérias não-patogênicas. Ciente de que, com a utilização de patógenos atenuados, há o risco de reversão do potencial patogênico e restrição do uso em crianças e pacientes imunossuprimidos, surge a predileção pelo uso de bactérias não-patogênicas. Nesse cenário, devido as suas características intrínsecas, um grupo de bactérias se destaca como vetores promissores: as bactérias lácticas (BL).

1.2.1 Bactérias lácticas

As BL formam um grupo de microrganismos que são caracterizados como Gram-positivos, não-formadores de esporos, imóveis e anaeróbios facultativos. Esse agrupamento não reflete uma classificação filogenética, mas sim um conjunto de bactérias que, dentre as outras características em comum supracitadas, apresentam a relevante habilidade de produzir ácido láctico a partir da fermentação de açúcares. Dentre os gêneros bacterianos que pertencem ao grupo das BL e que contêm uma porcentagem G (Guanina) + C (Citosina) inferior a 54% no genoma, destacam-se: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Azevedo & Miyoshi, 2004; Wells & Mercenier, 2008; Pontes *et al.*, 2011; Castillo Martinez *et al.*, 2013).

A fermentação de alimentos através das BL é uma das mais antigas formas de biopreservação realizada pela humanidade (Soomro *et al.*, 2002). Sabe-se, por exemplo, que essas bactérias são muito utilizadas para a produção de queijo (espécies de *Lactococcus*) e iogurtes (espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus*) (Wells & Mercenier, 2008). Ademais, as BL também são utilizadas na indústria alimentícia para formação de sabor, preservação, produção de aditivos e suplementos, síntese de bacteriocinas e exopolissacarídeos (Zhu *et al.*, 2009). Dessa forma, verifica-se a existência de uma associação segura de longa duração entre as BL, os humanos e a sua alimentação (Wells & Mercenier, 2008; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011). Todos esses exemplos culminam com a classificação das BL em organismos “GRAS” (do inglês, *Generally Recognized As Safe*), considerados seguros para o consumo humano (Pontes *et al.*, 2011).

Dentre as várias propriedades das BL, salienta-se a sua capacidade probiótica (Pontes *et al.*, 2011). De acordo com a FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) e a WHO, probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Wells & Mercenier, 2008). A utilização das BL e de seus produtos como probióticos têm demonstrado resultados efetivos na prevenção do desenvolvimento de lesões na mucosa gástrica, no alívio de sintomas alérgicos e auxílio na proteção contra infecções via patógenos, através de efeitos imunomodulatórios na imunidade inata e adaptativa (Tsai *et al.*, 2012).

Além de todas essas aplicações das BL na indústria alimentícia, essas também são visadas como “biorreatores” para a produção de moléculas de interesse biotecnológico; utilizadas como veículos para síntese e apresentação de antígenos e, ainda, para a entrega de

vacinas de DNA. Desse modo, a aplicação de BL recombinantes para a entrega de compostos com finalidades terapêuticas e profiláticas tem recebido destaque devido aos resultados positivos. Seguindo essa estratégia, tem sido investigada a utilização da BL modelo *Lactococcus lactis* como vetor para experimentos de entrega de vacinas de DNA (Wells & Mercenier, 2008; Pontes *et al.*, 2011).

1.2.1.1 *Lactococcus lactis*: a bactéria láctica modelo

Lactococcus lactis é uma bactéria heterofermentativa mesofílica (com temperatura ideal de crescimento por volta de 30°C), não-invasiva e que não coloniza o trato gastrointestinal (TGI) de homens e animais. Além de ser vastamente utilizada na indústria láctea, *L. lactis* é considerada o organismo modelo das BL por ter o seu genoma completamente sequenciado, é fácil de ser manipulado geneticamente e pelo fato de existirem muitas ferramentas genéticas já desenvolvidas para utilização nessa espécie. Ademais, a linhagem mais utilizada de *L. lactis* (MG1363) não possui plasmídeo e não produz nenhuma protease extracelular. Contudo, a principal vantagem de se usar *L. lactis* como vetor para entrega de proteínas ou vacinas de DNA consiste no perfil de segurança existente, ratificado pelo status “GRAS” da mesma (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011; Pontes *et al.*, 2011).

O avanço das pesquisas e, por consequência, uma melhor compreensão sobre *L. lactis*, resultou na expansão do uso desse organismo modelo para novos campos além da indústria alimentícia. Expressão de proteínas heterólogas, transferência gênica, entrega de drogas terapêuticas e utilização como vetores vacinais são exemplos das novas abordagens possíveis de *L. lactis* atualmente (Bahey-El-Din *et al.*, 2010; Bahey-El-Din & Gahan, 2011).

1.2.1.1.1 *L. lactis* como carreadora de vacinas de DNA

Considerando a estratégia de entrega de plasmídeos terapêuticos/vacinais via mucosa, a bactéria *L. lactis* se destaca por, além de suas características supracitadas, ser uma bactéria Gram-positiva e, assim, não possuir lipopolissacarídeos (LPS) endotóxicos; apresentar resistência ao pH ácido do suco gástrico e, logo, ser capaz de sobreviver no TGI; ser não-comensal e, desse modo, apresentar menores chances de provocar imunotolerância ou efeitos colaterais após longo tempo de ingestão. Ademais, agindo como um vetor, *L. lactis* elicita uma resposta imune no seu hospedeiro, sendo considerada pouco imunogênica – característica considerada vantajosa em comparação com outros vetores bacterianos patogênicos. Assim sendo, esforços têm sido feitos por toda a comunidade científica para explorar todo o

potencial de *L. lactis* como vetor vacinal via mucosa (Bahey-El-Din & Gahan, 2011; Wyszynska *et al.*, 2015).

Em 2006, Guimarães e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que a incubação por 3 horas de células da linhagem Caco-2 com *L. lactis* MG1363 contendo um plasmídeo, o qual detinha um cassete de expressão eucariótica com cDNA de β -lactoglobulina (BLG – do inglês, *β -lactoglobulin*) bovina, resultou na transferência desse plasmídeo para as células eucarióticas e consequente expressão e secreção da proteína BLG (Guimaraes *et al.*, 2006). Assim, dois anos depois, Chatel e colaboradores comprovaram que, por administração oral em camundongos dessa mesma linhagem bacteriana, células intestinais murinas foram capazes de produzir a proteína BLG em 53% dos animais testados. Ainda que os resultados obtidos foram favoráveis, notou-se que a taxa de transferência de DNA *in vivo* foi baixa. Dessa forma, é possível hipotetizar que, pelo menos em parte, esse fato pode ser explicado devido à *L. lactis* não ser uma bactéria patogênica e, assim, não ser capaz de persistir por um tempo maior no TGI e interagir com as células intestinais, de modo a dificultar a entrega do plasmídeo (Chatel *et al.*, 2008).

Cientes de que a entrada do carreador bacteriano na célula do epitélio intestinal consiste em uma etapa fundamental para a entrega eficiente do plasmídeo, diversas estratégias foram testadas visando amplificar propriedades de entrega de DNA por *L. lactis*. Uma das tentativas que alcançaram sucesso foi a modificação da bactéria carreadora para que essa fosse capaz de expressar uma invasina denominada proteína A de ligação à fibronectina (FnBPA – do inglês, *Fibronectin-Binding Protein A*) de *Staphylococcus aureus*. A FnBPA é uma glicoproteína que medeia a adesão bacteriana ao fibrinogênio, elastina e fibronectina, além de intermediar a captação da bactéria por células hospedeiras não-fagocíticas. Experimentos *in vitro* e *in vivo* comprovaram que as linhagens de *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ exibem maior invasividade que as linhagens nativas, fazendo, assim, que essas linhagens recombinantes sejam reconhecidas como vetores de entrega de plasmídeos terapêuticos/vacinais com grande potencial (Innocentin *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2011, 2012).

Com a finalidade de melhorar a estratégia de entrega de DNA por *L. lactis* e subsequente expressão desse pela célula eucariótica, no ano de 2009, Guimarães e colaboradores construíram um novo plasmídeo de expressão denominado pValac (do inglês, *Vaccination Using Lactic Acid Bacteria*). Esse vetor contém uma região eucariótica composta

pelo promotor de citomegalovírus (pCMV), um sítio de clonagem múltipla e uma sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A), necessária para a expressão gênica por células hospedeiras eucarióticas. Enquanto que a região procariótica do plasmídeo possui origens de replicação para que esse possa se propagar tanto em *E. coli* quanto em *L. lactis*, além do gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm) para auxiliar a seleção de linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Um dos fatores limitantes ao sucesso de toda a estratégia desenhada para a entrega de plasmídeos terapêuticos/vacinais por *L. lactis* via mucosa é a baixa eficiência de importação do DNA para o núcleo da célula hospedeira. Como consequência dessa limitação, observam-se níveis reduzidos de expressão gênica, impedindo, assim, o êxito desses experimentos. Visando resolver essa problemática, Souza e colaboradores inseriram a sequência de endereçamento nuclear (DTS – do inglês, *DNA Nuclear Targeting Sequence*) do vírus SV40 no plasmídeo pValac, logo, criando uma nova versão para esse vetor. Dessa forma, pValac::*mts* tem como objetivo aumentar a exportação do DNA plasmidiano para o núcleo e, por conseguinte, obter maiores taxas de expressão gênica pela célula hospedeira (Souza *et al.*, 2016).

Desse modo, a utilização da linhagem recombinante *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ contendo o vetor pValac codificando uma ORF de interesse, como de IL-4 ou IL-10, para a expressão dessas citocinas pelas células da mucosa intestinal poderia representar uma estratégia alternativa nos estudos para compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de desordens, assim como, para prevenir ou tratar diversas enfermidades que ainda não possuem métodos eficazes para essas finalidades.

1.3 Justificativa de realização de trabalho

O número de casos de T1D vem crescendo a cada ano e as projeções mostram um aumento assustador da doença em todo o mundo. Apesar de, atualmente, existir o tratamento com a reposição insulínica exógena, sabe-se que o acometido tem muitas limitações, principalmente alimentares; precisa passar por um processo de mudança e adaptação a novos hábitos na sua rotina; e até implicações psicossociais e comportamentais, atribuídas à doença. Logo, a busca pelo entendimento dessa desordem é o primeiro passo para alcançar uma terapia que traga melhor qualidade de vida aos afetados e, até, formas de prevenção da T1D.

Ao mimetizar a doença em questão, através do modelo de múltiplas doses de STZ, observa-se um perfil de suscetibilidade à T1D associado ao aumento da expressão de citocinas do padrão Th1 em detrimento das citocinas de perfil Th2 (Müller *et al.*, 2002). É reconhecido, também, que as células que produzem IL-4 ou outras citocinas do padrão Th2 são protetivas, sugerindo que uma intervenção capaz de afetar a diferenciação de linfócitos T pode resultar em um tratamento efetivo da T1D (Wållberg & Cooke, 2013).

Dessa forma, a estratégia escolhida para levar ao aumento das citocinas IL-4 e IL-10 foi o uso de linhagens de *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadoras dos vetores de expressão eucariótica pValac::dts::IL-4 (Figura 1.6-A) e pValac::IL-10 (Figura 1.6-B) – ambos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa –, cuja funcionalidade já foi comprovada e o potencial terapêutico atestado em diferentes modelos murinos de inflamação intestinal (Del Carmen *et al.*, 2013; Zurita-Turk *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016). As linhagens bacterianas recombinantes dadas pela via oral, ao alcançar o cólon intestinal, são internalizadas pelas células eucarióticas, culminando na síntese dessas citocinas pela maquinaria de transcrição e tradução da célula hospedeira. Hipotetiza-se que o aumento de IL-4 e IL-10, durante o tempo de ingestão das bactérias, chegue, por meio da circulação esplâncnica, até os principais órgãos envolvidos no desenvolvimento da T1D – pâncreas e timo. Ademais, os linfonodos duodenopancreáticos podem ser uma via “mais direta” de ligação entre as bactérias recombinantes amostradas no duodeno e cólon transversal e o local de montagem da resposta imune durante o desenvolvimento da T1D – o linfonodo que drena o pâncreas. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar qual o efeito imunomodulatório provocado pela ingestão das linhagens recombinantes *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), individual e conjuntamente, no modelo experimental de T1D induzido quimicamente por múltiplas doses de estreptozotocina, constituindo, assim, uma abordagem alternativa para a compreensão dos mecanismos associados à progressão e desenvolvimento da T1D.

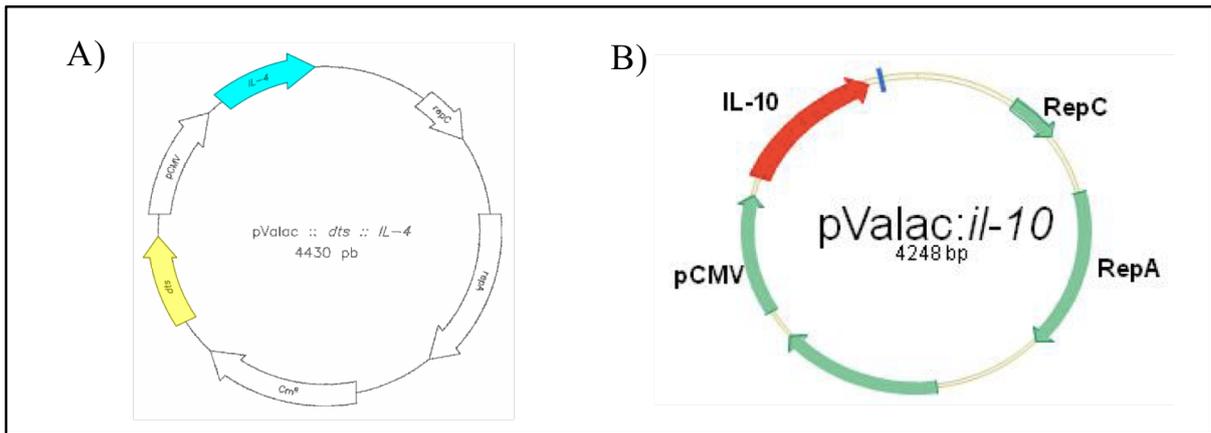


Figura 1.6: Representação esquemática dos plasmídeos (A) pValac::dts::IL-4 e (B) pValac::IL-10. Em (A) observa-se a sequência de endereçamento nuclear DTS (amarelo), o promotor pCMV, a ORF *IL-4* (azul), as origens de replicação eucariótica repC e procariótica repA e a ORF que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cm^R). **Fonte:** Souza *et al.*, 2016. Em (B) observa-se o promotor pCMV, as origens de replicação eucariótica repC e procariótica repA e a ORF *IL-10*. **Fonte:** Del Carmen *et al.*, 2013.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial imunomodulatório da linhagem invasiva *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadora dos vetores de expressão eucariótica pValac::dts::*IL-4* ou pValac::*IL-10* no modelo de diabetes tipo 1 induzido quimicamente por múltiplas doses de estreptozotocina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a incidência da diabetes experimental em camundongos induzidos com STZ e tratados com as linhagens recombinantes *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*);
- Avaliar o efeito das linhagens recombinantes *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) no trato gastrointestinal de camundongos induzidos com múltiplas doses de STZ;
- Avaliar o potencial imunomodulatório das linhagens recombinantes *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) no modelo murino de diabetes experimental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares, plasmídeos e condições de cultivo

Foram utilizadas as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺, *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Tabela 3.1), as quais foram cultivadas em caldo M17 ou meio M17 sólido (1,5% de ágar bacteriológico) suplementado com 0,5% de glicose, acrescidos ou não dos antibióticos eritromicina (Ery) (5 µg/mL) e cloranfenicol (Cm) (10 µg/mL), a 30°C por 24-48 horas.

Tabela 3.1: Linhagens bacterianas usadas neste trabalho.

Linhagem	Características	Referência
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺	<i>L. lactis</i> MG1363 expressando a FnBPA de <i>S. aureus</i> .	Que <i>et al.</i> , 2001.
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::dts::IL-4)	Linhagem <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ portadora do plasmídeo pValac::dts::IL-4.	Souza <i>et al.</i> , 2016.
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::IL-10)	Linhagem <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ portadora do plasmídeo pValac::IL-10.	Zurita-Turk <i>et al.</i> , 2014.

3.2 Avaliação do potencial imunomodulatório da linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadora dos vetores pValac::dts::IL-4 ou pValac::IL-10 em modelo experimental de T1D

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 8-9 semanas de idade, pesando ~24 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em micro isoladores no sistema IVC (do inglês, *Individually Ventilated Caging*), com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz (12 horas no claro e 12 horas no escuro) controlados e com livre acesso à água e ração.

3.2.2 Indução da T1D experimental

A indução da T1D experimental foi feita pela injeção intraperitoneal (i.p.) de cinco doses (50 mg/kg) diárias e consecutivas de STZ (Sigma-Aldrich[®]) dissolvido em tampão citrato de sódio pH 4,5 (0,05 M), sendo essa solução injetada em, no máximo, dez minutos

após o preparo (Figura 3.1). Os animais foram mantidos em jejum por quatro horas antes e duas horas após a indução da diabetes experimental.

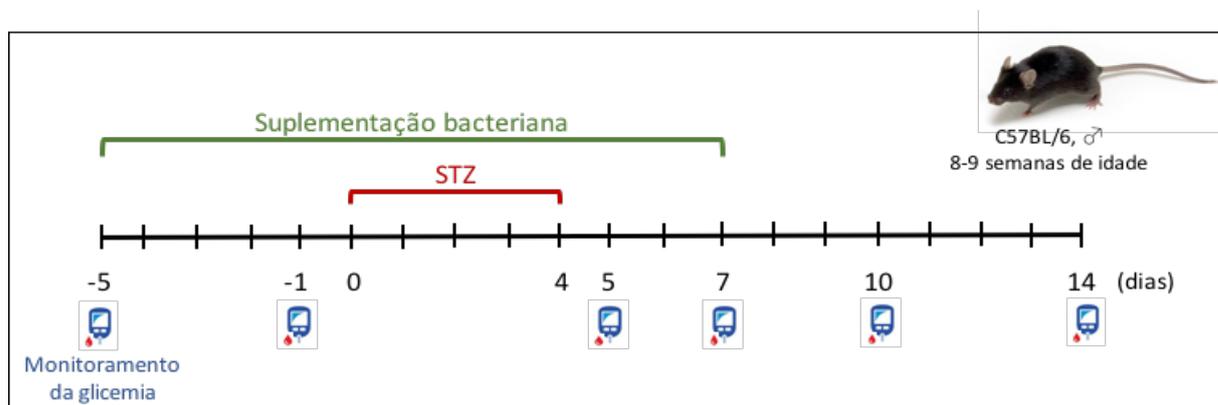


Figura 3.1: Representação esquemática do protocolo de indução química e tratamento da T1D experimental.

3.2.3 Tratamento da T1D experimental

3.2.3.1 Preparo de doses de *L. lactis*

O preparo das doses das diferentes linhagens de *L. lactis* foi iniciado com o pré-inóculo de 10 μ L da devida linhagem bacteriana em 5 mL de caldo M17 contendo glicose 0,5% (M17-Gli) e suplementado com o antibiótico correspondente. Caso a dose a ser preparada fosse da linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺, adicionou-se Ery (5 μ g/mL); caso fossem as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) ou *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), adicionou-se Ery (5 μ g/mL) e Cm (10 μ g/mL). O pré-inóculo foi, então, deixado em estufa a 30°C por 18 horas.

Passado esse tempo, uma alíquota de cada pré-inóculo foi diluída em 150 mL de caldo M17-Gli suplementado com o devido antibiótico de modo que as culturas apresentassem um valor inicial de densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros (DO₆₀₀) de 0,05. Assim, essa cultura foi mantida na estufa a 30°C até atingir uma DO₆₀₀ de 1,0-1,2. Logo após, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram estocadas a -80°C, utilizando-se glicerol 80% estéril na proporção de 3:1.

Após o preparo e estocagem das doses, foi feito um teste para verificar a viabilidade das culturas bacterianas presentes nas doses. Dessa maneira, foi feito o plaqueamento da diluição 10⁻⁶ de uma alíquota de cada cultura em meio M17-Gli, suplementado com o

respectivo antibiótico de cada linhagem bacteriana, em duplicata. As placas foram feitas em duplicata e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas.

Passado esse intervalo, foi feita uma estimativa da viabilidade de cada uma das linhagens por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs)/mL. A partir desse dado, foi calculado o volume necessário de cada cultura para se obter o número de UFCs estipulado para cada dose (1×10^9 UFCs para cada animal).

3.2.3.2 Administração de doses de *L. lactis*

Nos dias de suplementação bacteriana (dias -5 a 7 do cronograma experimental) (vide Figura 3.1), o volume de cultura a ser utilizado, segundo o cálculo de viabilidade das doses, foi centrifugado a 7.000 rpm (rotações por minuto) por dois minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi suspenso em 100 µL de solução salina 0,9% (9 g NaCl; 1 L água destilada). Após o preparo, as doses foram mantidas resfriadas até o momento da sua administração.

A cada animal, foi administrada uma dose composta por uma suspensão da linhagem bacteriana em questão na concentração de 10^9 UFCs em 100 µL de solução salina 0,9% durante os treze primeiros dias do cronograma experimental (vide Figura 3.1).

Para tanto, os camundongos foram divididos em grupos que receberam as seguintes doses de tratamento pela via intragástrica (i.g.): (i), (ii) e (iii) solução salina 0,9%; (iv) *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺; (v) *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4); (vi) *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10); e (vii) *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Divisão dos grupos experimentais quanto à indução e ao tratamento da T1D experimental.

	Grupo	Indução (i.p.)	Constituição da dose do tratamento (i.g.)	Nº de animais
Camundongos não submetidos à indução da diabetes experimental	Controle -	Solução salina 0,9%	Solução salina 0,9%	18
	Controle do veículo	Tampão citrato de sódio	Solução salina 0,9%	18
Camundongos submetidos à indução da diabetes experimental	Controle +	STZ + Tampão citrato de sódio	Solução salina 0,9%	18
	F	STZ + Tampão citrato de sódio	<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺	18
	F-IL-4	STZ + Tampão citrato de sódio	<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::dts::IL-4)	18
	F-IL-10	STZ + Tampão citrato de sódio	<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::IL-10)	18
	F-IL-4/IL-10	STZ + Tampão citrato de sódio	<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::dts::IL-4) e <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺ (pValac::IL-10)	18

3.2.4 Avaliação da incidência da T1D experimental

O monitoramento do peso dos animais foi feito ao longo de todo o experimento, como forma de acompanhar e avaliar o estado de saúde dos mesmos. Além disso, em seis ocasiões do cronograma experimental (dias -5, -1, 5, 7, 10 e 14 – vide Figura 3.1), os níveis de glicemia e glicosúria dos animais foram aferidos. Para verificação dos níveis glicêmicos, foi feita a coleta de uma mínima amostra de sangue periférico, obtido através de um corte transversal na cauda dos animais, sem que fosse necessária a contenção desses. A dosagem foi feita em fitas próprias para o glicosímetro Accu-Chek[®] Active (Roche). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram duas medidas seguidas de níveis de glicose sanguínea superiores a 200 mg/dL (Costa *et al.*, 2016). Ao passo que, para determinação semi-quantitativa dos níveis de glicosúria, a urina dos animais foi coletada de forma passiva e a medição foi feita utilizando tiras reativas Keto-Diabur-Test[®] 5000 (Roche). Esse teste possui limite prático de detecção de aproximadamente 50 mg/dL e as medições variam entre: negativo; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 5 g/dL de glicose na urina.

3.2.5 Avaliação do potencial imunomodulatório das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10)

No dia da eutanásia (20° dia de experimentação animal), os animais foram submetidos a uma sobredose de solução anestésica (composta por Xilazina 2%, Cetamina 0,1 g/mL e PBS 1X), administrada pela via intraperitoneal, visando a anestesia e analgesia dos mesmos. Posteriormente, o soro sanguíneo e o pâncreas foram coletados para avaliação das respostas imunológicas induzidas por meio da realização de testes ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.2.5.1 ELISA para detecção de citocinas no pâncreas

Primeiramente, foi feito o processamento das amostras de pâncreas para possibilitar a realização dos testes ELISA. Sendo assim, as amostras foram homogeneizadas num tampão especial para a detecção de citocinas [23,4 g NaCl; 500 µL Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich[®]); 5g BSA (USBiological); 34 mg PMSF (Sigma-Aldrich[®]); 1 mL DMSO (Sigma-Aldrich[®]); 44,6 mg cloreto de benzetônio (Sigma-Aldrich[®]); 372 mg Na₂EDTA; 40 µL aprotinina (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich[®]); PBS 1X q.s.p. 1 L], utilizando o homogeneizador de amostras Omni (Omni InternationalTM). O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C até o momento da sua utilização.

Os procedimentos dos ELISAs do tipo “sanduíche” (Figura 3.2) foram feitos segundo as instruções dos fabricantes dos *kits* – BD OptEIATM (BD) e R&D DuoSet (R&D SystemsTM) – para a dosagem das seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β (do inglês – *Transforming Growth Factor* β) e TNF- α . A leitura de todos os testes ELISA foi feita a 492 nm utilizando a leitora de microplacas POLARIS MA616 (Marconi).

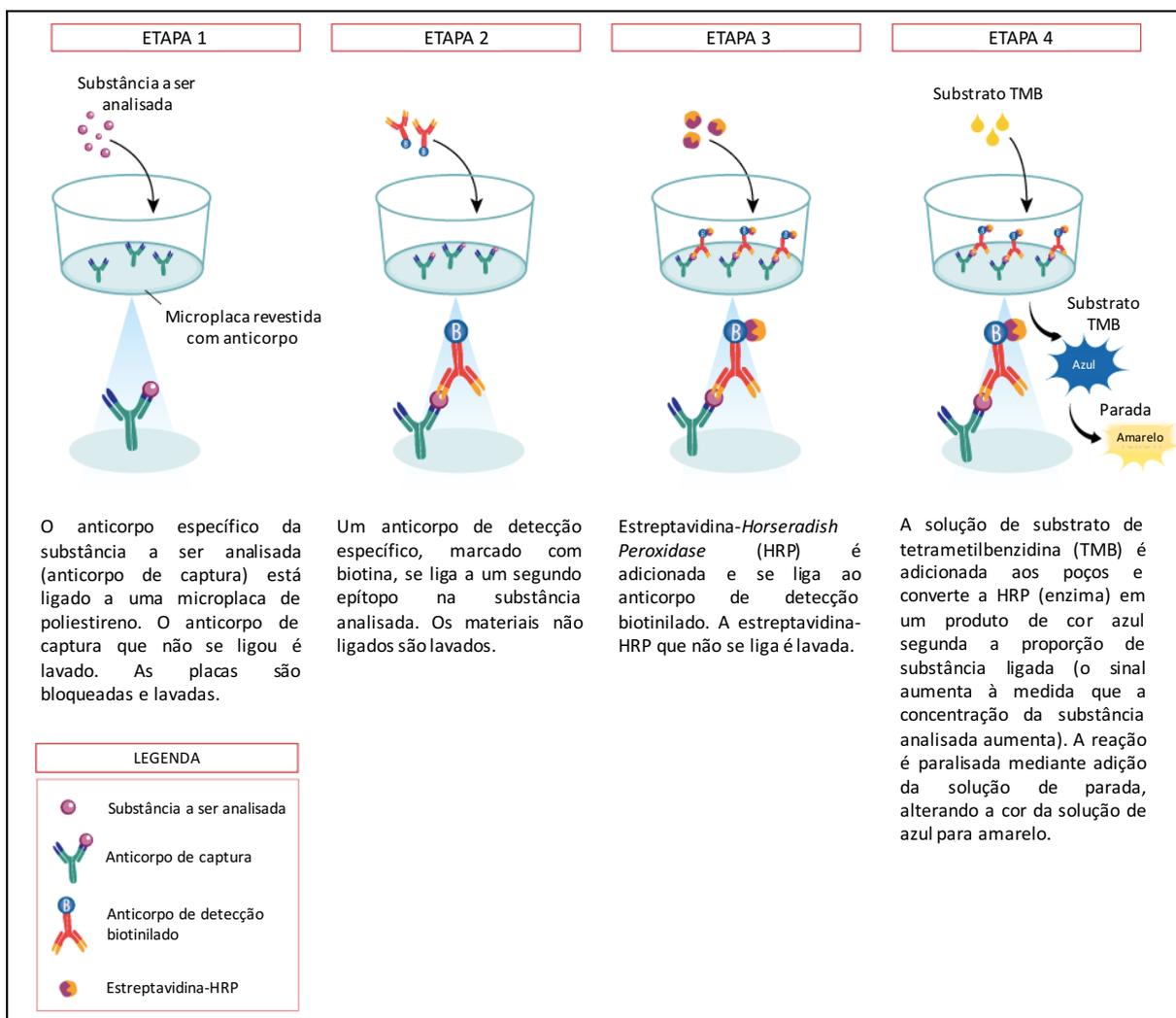


Figura 3.2: Representação esquemática das etapas para realização do ELISA do tipo “sanduíche”. Adaptado: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/duoset-elisa-development-systems-assay-principle>

3.2.5.2 ELISA para detecção de citocinas no soro sanguíneo

O sangue foi coletado, através da punção da aorta descendente, e processado para posterior análise de citocinas por meio dos testes ELISA. Para isso, as amostras de sangue foram incubadas em estufa à 37°C por, no máximo, 1 hora. Essas foram, então, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O soro sanguíneo foi retirado e armazenado a -20°C até o momento da sua utilização.

Os procedimentos dos ELISAs do tipo “sanduíche” (vide Figura 3.2) foram feitos segundo as instruções dos fabricantes dos kits – R&D DuoSet (R&D SystemsTM) – com o intuito de detectar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ no soro sanguíneo. A

leitura de todos os testes ELISA foi feita a 492 nm utilizando a leitora de microplacas POLARIS MA616 (Marconi).

3.2.5.3 Análise histológica

Por fim, amostras do pâncreas dos camundongos foram fixadas em formalina e processadas para análise histológica. Cortes corados com hematoxilina e eosina foram

Parâmetro	Pontuação
Sem sinais visíveis de infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans.	0
Poucos elementos infiltrados nas ilhotas pancreáticas, com uma distribuição irregular, principalmente na periferia das ilhotas (peri-insulite).	1
Infiltração moderada (peri- e intra-ilhota), com < 50% de destruição das ilhotas de Langerhans.	2
Infiltração extensa, com > 50% de destruição das ilhotas de Langerhans.	3

ranqueados às cegas com base no sistema descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Índice para avaliação do grau de infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans. **Adaptado:** Papaccio, 1993 e Greiner *et al.*, 2014.

3.2.6 Avaliação do efeito das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) no trato gastrointestinal de camundongos induzidos à T1D experimental

Lavado intestinal e amostras do cólon dos animais foram coletadas no dia da eutanásia e utilizadas para a avaliação das respostas imunológicas locais induzidas pela administração das linhagens bacterianas. Para isso, foram realizados testes ELISA para detecção de imunoglobulina A secretória (sIgA) do lavado intestinal e detecção de citocinas no homogenato de cólon.

3.2.6.1 ELISA para detecção de sIgA

Para analisar os níveis de sIgA do lavado intestinal dos animais, foi necessário, primeiramente, lavar o lúmen do cólon dos animais com 5 mL de PBS 1X e centrifugar o

lavado a 1.200 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi, então, armazenado a -80°C até o momento da sua utilização.

Os testes ELISA foram realizados do seguinte modo: alíquotas de 100 µL do anticorpo de captura (1 mg/mL) – anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo [*Goat Anti-Mouse Ig, Human ads*-UNLB (Southern Biotech)] – diluído em tampão carbonato pH 9,6 (1,86 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; água destilada q.s.p. 1L) numa proporção de 1:4.000 foram adicionadas a cada um dos poços utilizados de placas de 96 poços (NuncTM). As placas foram, então, incubadas em câmara úmida à 4°C *overnight*. Passado esse tempo, os poços foram lavados com solução salina-tween [NaCl 0,15 M; Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich[®]) 0,05%] três vezes e a eles foram adicionados 200 µL de PBS-caseína. Uma hora depois, os poços foram lavados, novamente, com solução salina-tween três vezes. Depois, foram adicionadas alíquotas de 100 µL do padrão – IgA de camundongo [*Mouse IgA Isotype Control* (Southern Biotech)] – em diluição seriada em cada um de oito poços. Além disso, foram adicionados 200 µL de cada um dos lavados e 200 µL de PBS-caseína (branco) em seus respectivos poços. Após uma hora, os poços foram lavados com solução salina-tween três vezes e a eles foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção – anticorpo de cabra anti-IgA de camundongo conjugado com HRP [do inglês, *Goat Anti-Mouse IgA (α chain specific) Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate* (Southern Biotech)] diluído em PBS-caseína numa proporção de 1:8.000. Mais uma hora depois, os poços foram lavados com solução salina-tween três vezes. Foram, então, adicionados 100 µL da solução para revelação a cada poço, sendo a placa incubada ao abrigo da luz até que a cor fosse desenvolvida. Nesse momento, a revelação foi interrompida por meio da adição de 20 µL de H₂SO₄ 2N a cada um dos poços. A leitura das amostras foi realizada a 492 nm por meio da utilização da leitora de microplacas POLARIS MA616 (Marconi).

3.2.6.2 ELISA para detecção de citocinas no cólon

As amostras de cólon foram homogeneizadas com tampão especial para a detecção de citocinas (descrito no item 3.2.5.1), utilizando o homogeneizador de amostras Omni (Omni InternationalTM). O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C até o momento da sua utilização.

Os procedimentos dos ELISAs do tipo “sanduíche” (vide Figura 3.2) foram feitos segundo as instruções dos fabricantes dos *kits* – BD OptEIA™ (BD) e R&D DuoSet (R&D Systems™) – para a dosagem das seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TGF- β e TNF- α . A leitura de todos os testes ELISA foi feita a 492 nm utilizando a leitora de microplacas POLARIS MA616 (Marconi).

3.3 Análises estatísticas

Para os testes *in vivo*, cada grupo experimental era composto por seis animais (quatro animais foram utilizados para a realização dos testes ELISA e dois, para a realização do índice de danos microscópicos), sendo os resultados, obtidos a partir de três réplicas experimentais, analisados em conjunto.

Tais resultados foram, primeiramente, analisados pelo programa computacional online *GraphPad QuickCalcs Outlier Calculator* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) (GraphPad Software) com o fim de excluir as leituras estatisticamente fora da média ($p < 0,05$). Em seguida, com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), a análise de variância foi realizada por meio do uso do teste *One-Way* ANOVA e do pós-teste Tukey. Assim, os valores com intervalo de confiança menor que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

3.4 Aspectos bioéticos e de biossegurança

3.4.3 Bioéticos

Os procedimentos e as manipulações dos animais foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo o protocolo do CEUA para uso de animais em experimentação encontrado sob o número 206/2016.

3.4.4 Biossegurança

As devidas precauções de biossegurança foram tomadas de acordo com normas e regulamentos de biossegurança estabelecidos pela Universidade Federal de Minas Gerais [Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da UFMG].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da incidência da T1D experimental

Para avaliação da incidência da T1D experimental, foi feito o monitoramento do peso, permitindo, assim, analisar a variação desse antes da injeção do agente indutor da diabetes experimental – o STZ – e também seu efeito subsequente, comparativamente ao peso corporal inicial dos animais. Dessa forma, observou-se que os animais de todos os grupos mantiveram o peso próximo ao inicial – com variação de 0,5 a 2,1% – até o dia -1 do cronograma experimental (dia anterior ao início das injeções de STZ). Essa oscilação é considerada normal e foi vista, inclusive, nos animais que recebiam doses das linhagens bacterianas, demonstrando, assim, que essas não influenciaram, de forma significativa, no peso dos animais nos dias em que essa era a única intervenção experimental. Além disso, observa-se que os animais do controle negativo (Grupo -) e do controle do veículo (Grupo CV) aumentaram a porcentagem do peso corporal inicial em até 5,3% ao longo do experimento. Já os animais dos demais grupos (Grupos +, F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL- 4/IL-10) – todos que passaram pela indução química da T1D – apresentaram uma redução significativa da porcentagem do peso corporal inicial a partir do dia 3 do cronograma experimental até o último dia do experimento, quando comparados ao Grupo -. Observou-se também uma diminuição, estatisticamente significativa, entre todos os grupos que receberam STZ + tampão citrato de sódio (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) e o grupo que recebeu apenas a injeção de tampão citrato de sódio (Grupo CV) do dia 5 até o dia 14 (Figura 4.1). Esses resultados coincidem com o que foi visto por Diab e colaboradores, em 2015, ao estudar os efeitos do STZ e verificar que esse reduz, de forma drástica, o peso corporal dos animais após sua injeção, sendo, assim, um indicador relevante do estabelecimento da T1D experimental (Diab *et al.*, 2015).

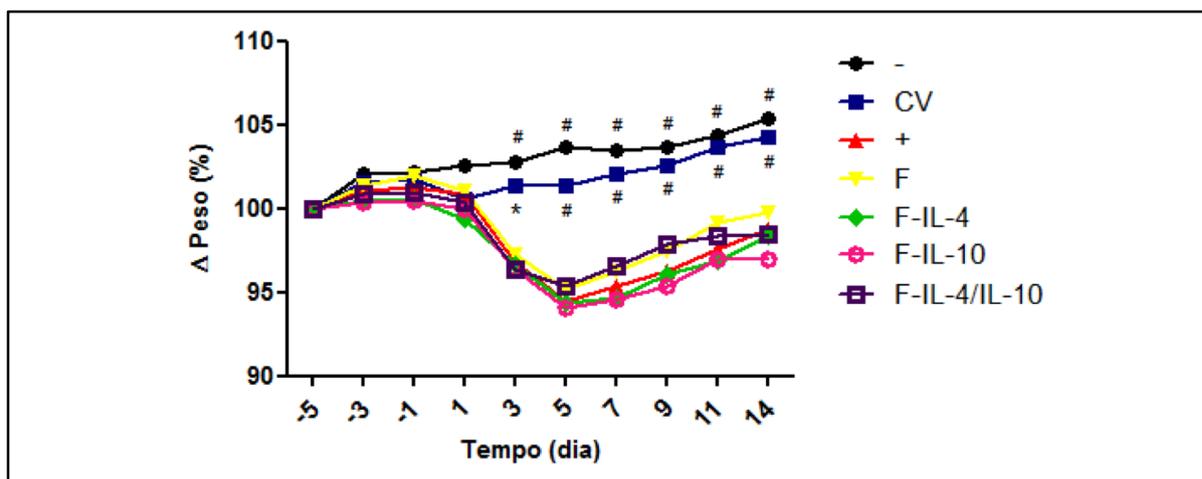


Figura 4.1: Porcentagem do peso corporal inicial (%) de camundongos C57BL/6 submetidos ou

não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia). #: grupo experimental cuja porcentagem do peso corporal é estatisticamente diferente da porcentagem dos grupos +, F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10; *: grupo experimental cuja porcentagem do peso corporal é estatisticamente diferente da porcentagem dos grupos +, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10 ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm SD (desvio padrão – do inglês, *Standard Deviation*) de 6 animais/grupo de três experimentos independentes.

A medição da glicemia ao longo de todo o experimento possibilitou distinguir animais diabéticos e não-diabéticos, correlacionando com o tempo e as intervenções experimentais. Assim, verificou-se que todos os animais mantiveram o nível glicêmico abaixo de 200 mg/dL (não-diabéticos) até o dia anterior à indução química da T1D – dia -1 do cronograma experimental (Figura 4.2). Como esperado, os animais pertencentes aos grupos – e CV permaneceram com níveis glicêmicos normais ao longo de todo o experimento. Ao passo que, no dia 5 (dia seguinte à última dose de STZ), já é possível perceber um aumento de glicemia nos animais pertencentes aos grupos que receberam as injeções intraperitoneais de STZ. Sendo que, a partir do dia 7 do cronograma experimental, esses animais (Grupos +, F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL e, assim, foram considerados diabéticos até o final dos experimentos.

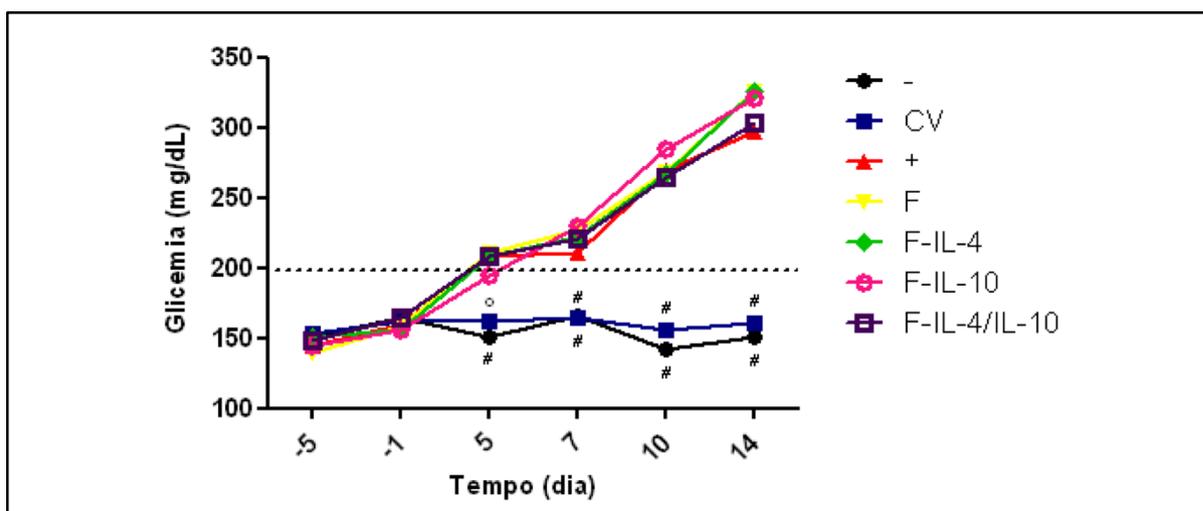


Figura 4.2: Glicemia (mg/dL) de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia). #: grupo experimental cuja glicemia é estatisticamente diferente dos grupos +, F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10; °: grupo experimental cuja glicemia é estatisticamente diferente dos grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-4/IL-10 ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm SD de 6 animais/grupo de três experimentos independentes.

Uma outra forma de avaliar a incidência da T1D experimental é através da medição da glicosúria. Na figura 4.3 nota-se que, até o dia 5, todos os animais apresentavam níveis

normais de glicose na urina, o que corresponde a um valor $< 0,1$ g/dL (marca destacada pela linha tracejada). No dia 7, foi detectado um aumento na glicosúria, acima do nível considerado normal, apenas nos animais que receberam a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (Grupo F). Enquanto que, no dia 10, verifica-se um aumento, estatisticamente significativo, nos grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10, quando comparados aos grupos – e CV. Entretanto, os animais que tiveram suplementação oral das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Grupo F-IL-4/IL-10) mostraram níveis de glicosúria nem tão altos como os apresentados pelos animais do Grupo + e nem tão basais quanto os dos animais dos Grupos – e CV (valores com significância estatística, comparativamente). Interessantemente, no dia 14, os Grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10 mantiveram os altos níveis de glicosúria e o Grupo F-IL-4/IL-10 foi o único a apresentar uma redução na concentração de glicose na urina.

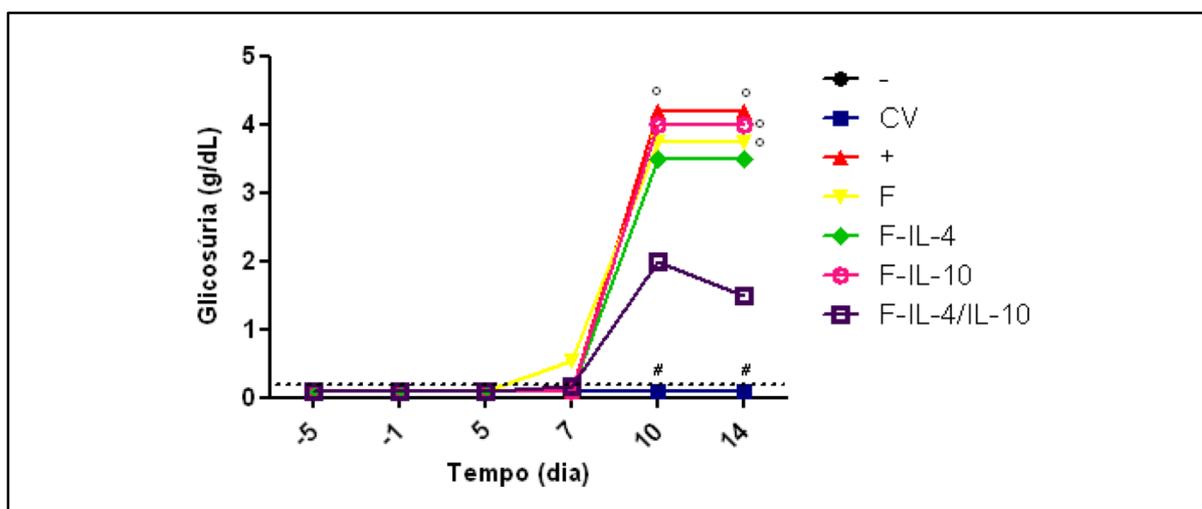


Figura 4.3: Glicosúria (g/dL) de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à administração intraperitoneal de STZ em função do tempo (dia). #: grupos experimentais (– e CV) cuja glicosúria é estatisticamente diferente dos grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10 ($p < 0,001$); °: grupo experimental cuja glicosúria é estatisticamente diferente do grupo F-IL-4/IL-10 ($p < 0,05$). A linha tracejada indica o limite inferior de detecção da glicose na urina (0,1 g/dL). Os dados são apresentados como média \pm SD de 6 animais/grupo de três experimentos independentes.

4.2 Avaliação do efeito das linhagens bacterianas no trato gastrointestinal dos camundongos submetidos ao modelo experimental de T1D

Uma vez que as linhagens bacterianas foram entregues pela via intragástrica, salienta-se a necessidade de verificar se essas provocaram alguma alteração no trato gastrointestinal (TGI) dos animais. Para isso, foram medidos os níveis de sIgA, já que essa é,

reconhecidamente, a primeira linha de defesa do epitélio intestinal contra microrganismos patogênicos e enterotoxinas e, também, a imunoglobulina mais abundante da mucosa gastrointestinal, sendo, assim, um componente vital na comunicação entre a microbiota e o sistema imune. A síntese de sIgA contra antígenos-específicos da mucosa é dependente da amostragem por células M, processamento pelas APCs, ativação de células T e, por último, recombinação para mudança de classe das células B nos GALTs, linfonodos mesentéricos e lâmina própria. Sabe-se que muitas citocinas – como TGF- β e IL-6 – são fundamentais na estimulação intestinal para produção de sIgA (Mantis *et al.*, 2011; Corthésy, 2013; Alexander *et al.*, 2014). É possível observar, na figura 4.4 que todos os animais que foram submetidos à suplementação bacteriana (grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) apresentaram níveis de sIgA, estatisticamente menores, dos apresentados por pelo menos um dos grupos que não tiveram a indução química da T1D – Grupos – e CV. Além disso, nota-se que não houve diferença estatística entre os grupos que receberam apenas salina 0,9% pela via oral (Grupos – , CV e +). Primeiramente, esses dados indicam que a indução química da T1D pelo modelo de múltiplas doses de STZ não afeta, significativamente, os níveis de sIgA. Segundo, a passagem das bactérias pelo TGI, como forma de entrega dos plasmídeos de expressão eucariótica codificadores de IL-4 e/ou IL-10, parece induzir uma diminuição nos níveis de sIgA. Isso pode ser um indício positivo de que as bactérias foram internalizadas por células intestinais e, as que possuíam os plasmídeos codificadores de IL-4 e/ou IL-10 (administradas aos animais dos grupos F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10), podem ter feito, com êxito, a função de veículo para esses plasmídeos, culminando com a síntese, pela maquinaria da célula eucariótica, de IL-4 e/ou IL-10.

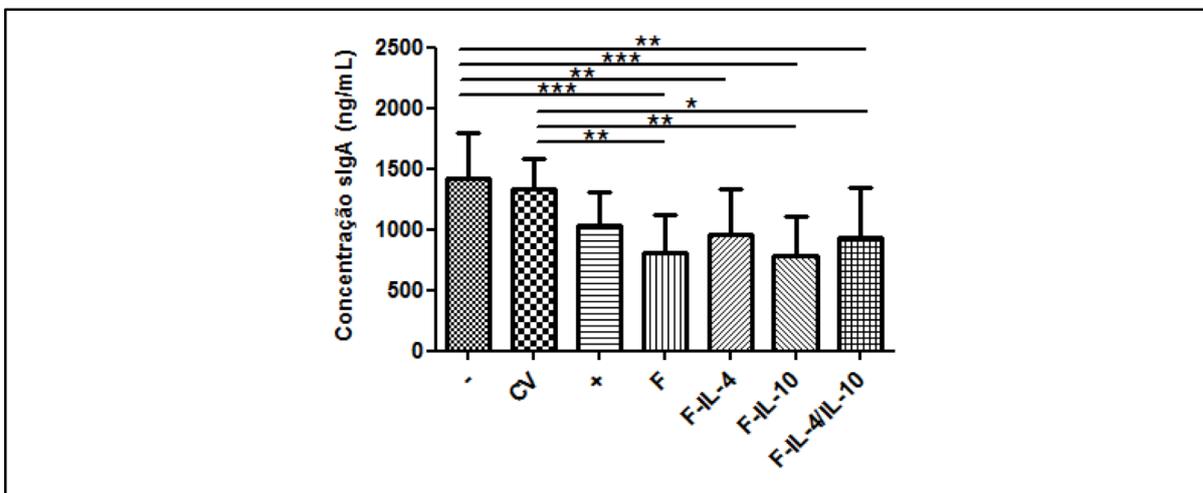


Figura 4.4: Concentração de IgA secretória do lavado intestinal de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à injeção de STZ. *: p < 0,05; **: p < 0,01; *: p < 0,001. Os dados são apresentados como média \pm SD de 6 animais/grupo de três experimentos independentes.**

O sistema imunológico tem papel fundamental na mediação das interações entre o hospedeiro e os microrganismos presentes no lúmen. A homeostase intestinal surge de um equilíbrio dinâmico entre a imunidade protetora do hospedeiro e mecanismos regulatórios compartilhados entre populações celulares presentes (Izcue *et al.*, 2009). Nesse contexto, as citocinas são, reconhecidamente, reguladoras-chave de diversos processos no microambiente intestinal, de modo que os níveis dessas podem ser bastante informativos na avaliação da homeostase intestinal. A presença de microrganismos, como bactérias não-comensais, no TGI pode induzir uma resposta antimicrobiana caracterizada por um aumento de células do tipo Th1 associado às citocinas IFN- γ e IL-12 (Gause *et al.*, 2013). Ao observar a Figura 4.5-A e B, nota-se que não existe diferença significativa entre os níveis dessas citocinas ao comparar todos os grupos experimentais entre si. A manutenção dos níveis basais de IFN- γ e IL-12 parece indicar que, tanto os animais do grupo que recebeu apenas a injeção de STZ (Grupo +), como os pertencentes aos grupos que receberam a indução química da T1D e, pela via oral, as linhagens bacterianas recombinantes (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10), não tiveram estímulo para o aumento dessas citocinas, as quais são associadas a um perfil pró-inflamatório.

Assim como IFN- γ e IL-12, TNF- α consiste em uma citocina pró-inflamatória, associada às respostas imune inatas, fundamental para a imunidade de mucosas. Tanta importância é ilustrada pelo fato de TNF- α ter sido a primeira citocina a ser alvo de um anticorpo neutralizante clinicamente aplicável. Entretanto, tem sido mostrado que TNF- α pode também exercer propriedades anti-inflamatórias, dependendo do cenário clínico e do alvo celular. Essas particularidades evidenciam a relevância dessa citocina tanto na homeostase de mucosa quanto em um contexto inflamatório (Bohan *et al.*, 2003; Bamias *et al.*, 2012). O TNF- α pode induzir a apoptose de células efetoras ativadas – propriedade que pode explicar os casos observados de melhora de inflamação aguda associadas ao efeito dessa citocina (Zheng *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Além disso, TNF- α também exerce um efeito protetivo na manutenção da integridade da barreira epitelial, como foi demonstrado por Pagnini e colaboradores, em 2010, em que o aumento da produção da citocina em questão está diretamente relacionado ao restabelecimento da função da barreira epitelial em um modelo de inflamação intestinal (Pagnini *et al.*, 2010). Ao medir os níveis de TNF- α , observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram níveis similares dessa citocina, não havendo diferenças estatísticas entre eles (Figura 4.5-C). Isso, por sua vez, sugere que, ao final dos experimentos, tanto os grupos que foram submetidos à passagem de bactérias recombinantes

pelo TGI, quanto os grupos que receberam salina 0,9% pela via oral, não apresentaram nenhuma perturbação capaz de alterar os níveis intestinais de TNF- α .

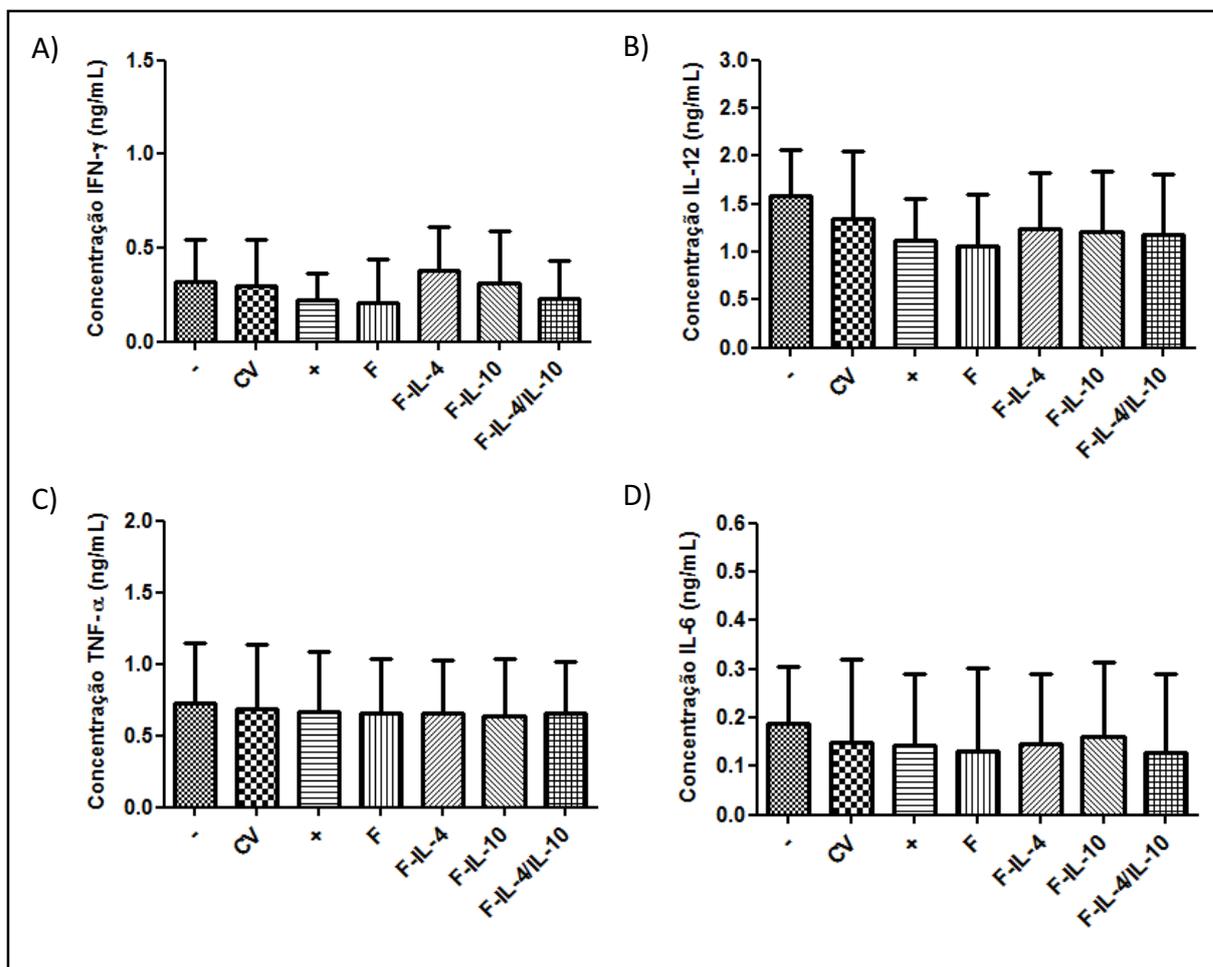


Figura 4.5: Concentração de IFN- γ (A), IL-12 (B), TNF- α (C) e IL-6 (D) de amostras de cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

Sabe-se que a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que, durante lesões intestinais agudas, parece estimular a proliferação epitelial – necessária para a cicatrização eficaz da mucosa após injúria. Observa-se também que, em alguns modelos de inflamação intestinal, IL-6 apresenta níveis aumentados na mucosa intestinal. Durante a homeostase, o papel dessa citocina ainda não foi esclarecido (Maloy & Powrie, 2011; Kuhn *et al.*, 2014). Dessa forma, após mensurar os níveis de IL-6 no cólon dos animais submetidos ou não à indução química da T1D, verifica-se que todos os grupos experimentais mantiveram os níveis basais dessa citocina, sugerindo que as múltiplas doses de STZ e o meio escolhido para entrega dos plasmídeos codificadores de IL-4 e/ou IL-10 – por meio das linhagens bacterianas – não são capazes de causar de injúria na mucosa intestinal (Figura 4.5-D).

A diferenciação das células Th17, principais produtoras de IL-17, ocorre pela sinalização de IL-6, juntamente com TGF- β . Os subtipos predominantes de IL-17, IL-17A e IL-17F, têm efeitos pró-inflamatórios e medeiam a quimiotaxia de neutrófilos (Hooper & Macpherson, 2010). IL-17 também é um importante regulador da função de barreira, intrínseca à mucosa, e tem sido demonstrado que essa citocina estimula a expressão de claudinas, as quais são componentes das junções oclusivas nas células epiteliais intestinais. Portanto, é reconhecido que IL-17 desenvolve um papel na manutenção da homeostase intestinal, apesar da função exata dessa citocina ainda ser incerta (Jin *et al.*, 2012). Ao medir os níveis de IL-17 no cólon, observa-se que não há diferença significativa entre todos os grupos experimentais, constituindo, assim, mais um indício da preservação da homeostase intestinal dos animais, apesar das diferenças na suplementação intragástrica e na indução ou não da T1D experimental (Figura 4.6-A).

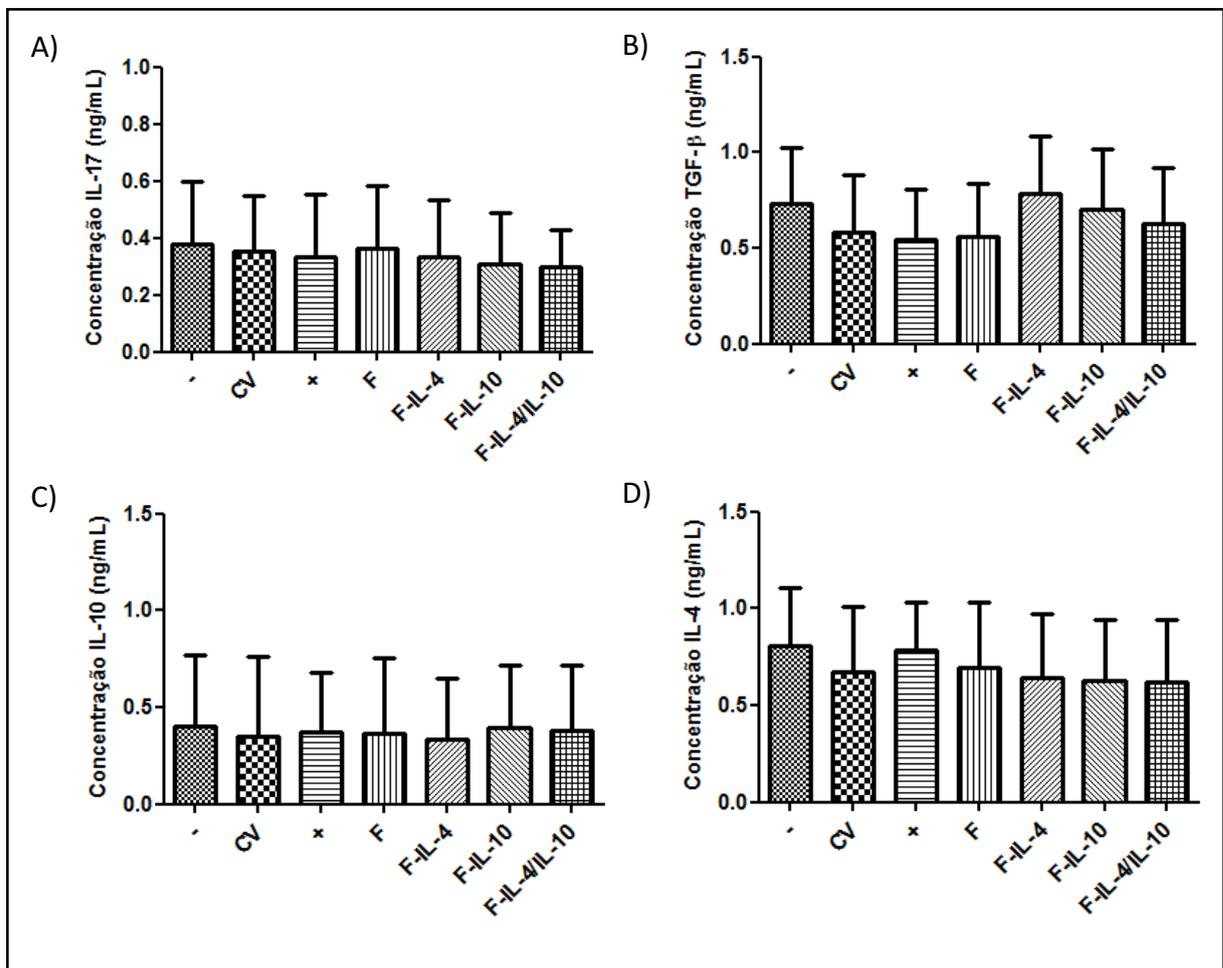


Figura 4.6: Concentração de IL-17 (A), TGF- β (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) de amostras de cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

A citocina TGF- β está presente em altas concentrações no intestino e tem um envolvimento crucial na modulação da resposta imune. Na imunidade intestinal, TGF- β suprime respostas inflamatórias a antígenos bacterianos do lúmen e contribui para a indução de tolerância imunológica (Ihara *et al.*, 2017). TGF- β é produzido como um precursor inativo que precisa ser modificado pós-traducionalmente para se tornar biologicamente ativo. Este é um processo rigorosamente controlado que, recentemente, demonstrou envolver a expressão da molécula de integrina $\alpha_v\beta_8$ em células dendríticas e macrófagos intestinais (Coombes & Powrie, 2008), bem como a expressão da pro-proteína convertase furina em células T (Pesu *et al.*, 2008). Como as células epiteliais intestinais sofrem apoptose em condições fisiológicas, isso pode fornecer uma fonte de TGF- β que promove a tolerância em condições de homeostase. Por fim, um estudo recente sugere que a estimulação de respostas intestinais de IgA dependente de TGF- β é outro mecanismo através do qual as células Treg podem reforçar a homeostase intestinal (Cong *et al.*, 2009). Desse modo, foi possível observar que todos os grupos experimentais foram capazes de expressar TGF- β em níveis basais similares, indicando que, apesar de alguns grupos receberem múltiplas doses de STZ e linhagens bacterianas recombinantes, a promoção da tolerância e manutenção da homeostase ocorreram em níveis semelhantes em todos os animais (Figura 4.6-B).

Assim como TGF- β , IL-10 também pode ser produzida por linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (linfócitos Treg). O intestino contém um grande número de células CD4⁺IL-10⁺; no cólon, essas são principalmente Foxp3⁺. As bactérias intestinais podem promover a atividade das células Treg do cólon induzindo a produção de IL-10 (Izcue *et al.*, 2009). Em conjunto, estudos genéticos e funcionais destacam a importância da IL-10 na homeostase intestinal e sugerem que a capacidade das bactérias intestinais de induzir a síntese de IL-10 pode ser uma importante faceta do mutualismo hospedeiro-comensal (Maloy & Powrie, 2011). Ao verificar os níveis intestinais de IL-10, percebe-se que os níveis dessa citocina não diferem significativamente entre os grupos experimentais (Figura 4.6-C). Logo, acredita-se que, caso a síntese de IL-10 tenha sofrido alguma alteração motivada pela passagem das linhagens bacterianas recombinantes (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) ou pela transcrição e tradução do plasmídeo pValac::*IL-10* (Grupos F-IL-10 e F-IL-4/IL-10), esse efeito já não é mais observado no dia em que foi preparado o homogenato do cólon (dia 14 do cronograma). Assim, ao final dos experimentos, todos os grupos apresentaram níveis basais de IL-10, sugerindo que a homeostase intestinal dos animais foi mantida ou, pelo menos, restabelecida.

Igualmente a outras citocinas, os efeitos da IL-4 durante os períodos de homeostase intestinal não estão bem esclarecidos ainda. Sabe-se que níveis aumentados dessa citocina podem induzir a mastocitose intestinal. Além disso, foi demonstrado que a via STAT6 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 – do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*), ativada pela ligação de IL-4 e/ou IL-13 no receptor IL-4R, é crítica para diversos efeitos subsequentes na fisiologia da mucosa intestinal, como aumento da permeabilidade da mucosa e diminuição da absorção de glicose (Madden *et al.*, 2002). Dessa forma, observou-se que os níveis de IL-4 mantiveram valores próximos, ao comparar todos os grupos experimentais (Figura 4.6-D). Nos grupos F-IL-4 e F-IL-4/IL-10, nos quais os animais receberam doses contendo a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4), acredita-se que os níveis igualmente basais de IL-4 se deve ao fato de que as bactérias administradas são transientes no TGI dos camundongos, persistindo por no máximo 24 horas (Mercenier *et al.*, 2000), e essa análise foi feita uma semana após a última suplementação bacteriana.

Sendo assim, os dados coletados sugerem que, nem a administração de múltiplas doses de STZ e nem a suplementação intragástrica com as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺, *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), parecem ter alterado, de forma significativa, o microambiente do TGI ou, caso tenham alterado, isso ocorreu temporariamente e por um curto período.

4.3 Avaliação das respostas imunológicas no soro sanguíneo de camundongos que receberam linhagens bacterianas recombinantes codificadoras de IL-4 ou IL-10 no modelo experimental de T1D

Com o intuito de verificar os níveis sistêmicos de algumas citocinas que podem ter efeitos significantes no desenvolvimento da T1D experimental, foram mensurados os níveis de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 no soro sanguíneo dos animais (Figura 4.7).

Sabe-se que a conservação dos níveis de IL-2 em um estado basal pode ser considerada um estímulo “fraco” para as células T efectoras e também as células NK. Entretanto, esses mesmos níveis são cruciais para a manutenção das células Treg. Assim, uma redução na biodisponibilidade periférica de IL-2 pode interferir na homeostase e função de Treg, e levar à quebra da tolerância imune (Malek, 2008). Além disso, já foi demonstrado que a administração de anticorpos neutralizantes anti-IL-2 acelera a T1D experimental no modelo

de camundongos NOD (Pérol *et al.*, 2016). Dessa forma, a IL-2 caracteriza-se como uma citocina importante para ser acompanhada no estudo da T1D. Sendo assim, nota-se, na figura 4.7-A, que a concentração de IL-2, em todos os grupos, manteve-se em valores muito próximos, não sendo diferentes estatisticamente. Os níveis similares de IL-2 de animais dos grupos -, CV e + sugere que o modelo de múltiplas doses de STZ não provoca a diminuição da concentração dessa citocina no soro sanguíneo, dez dias após a indução química da T1D experimental. Ademais, a observação desses mesmos níveis nos demais grupos (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) indica que, nesse momento da amostragem, a administração de diferentes linhagens bacterianas recombinantes não foi capaz de alterar os níveis de IL-2 no soro sanguíneo.

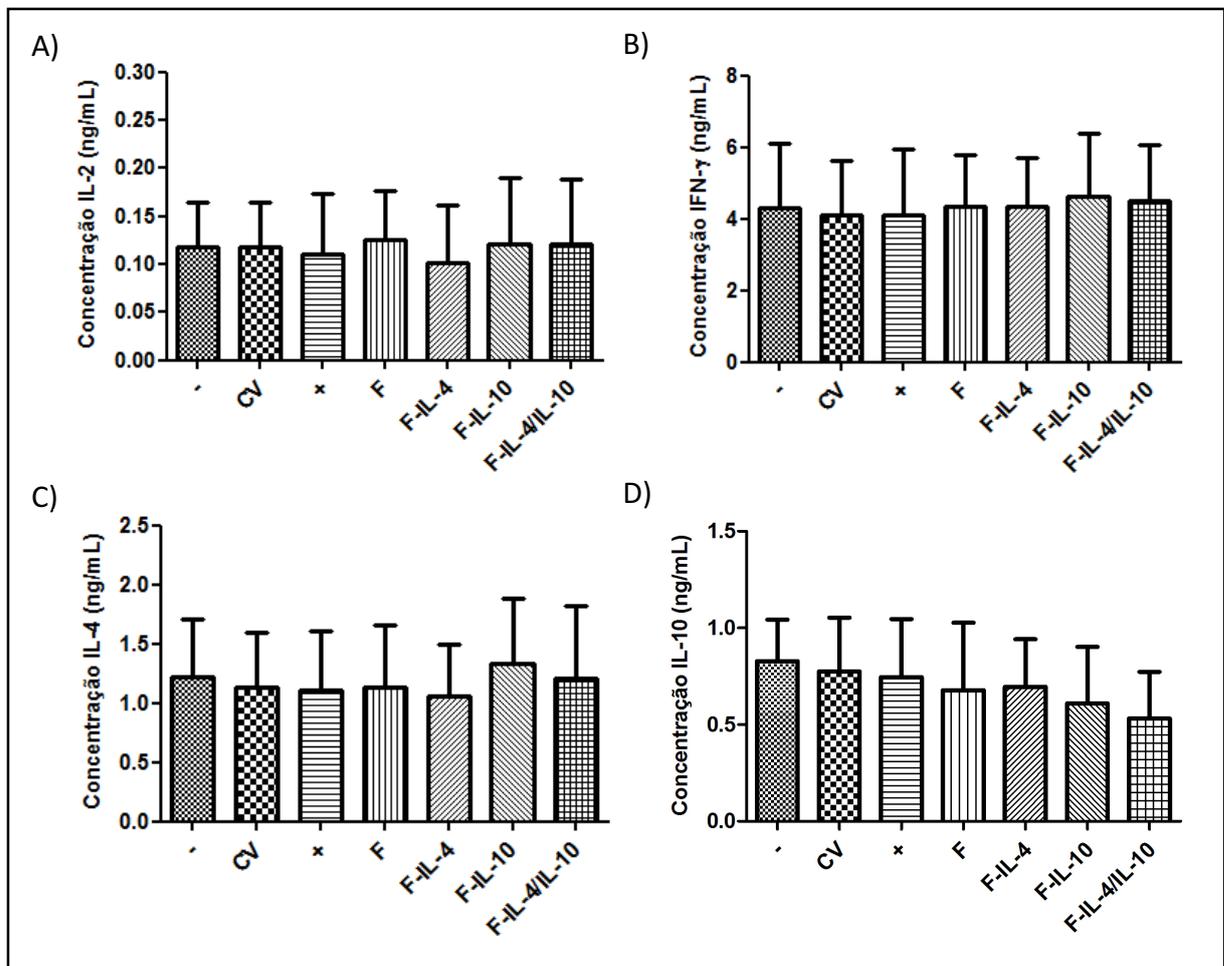


Figura 4.7: Concentração de IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) de amostras de soro sanguíneo de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. *: $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 6 animais/grupo de três experimentos independentes.

IFN- γ é, reconhecidamente, uma citocina do perfil Th1, a qual sinaliza e medeia diversos processos pró-inflamatórios. Desse modo, o monitoramento dessa citocina, tanto nas respostas locais quanto nas sistêmicas, é de extrema importância nas doenças autoimunes, como a T1D (Padgett *et al.*, 2013). A figura 4.7-B mostra que os níveis de IFN- γ não apresentaram diferença estatística entre todos os grupos experimentais. Ademais, sabe-se que a ausência de alteração dos níveis basais de IFN- γ não indica que o mesmo ocorre localmente, podendo haver uma alta concentração dessa citocina no infiltrado inflamatório das ilhotas pancreáticas, por exemplo (Bending *et al.*, 2012).

Também foi observado que as citocinas IL-4 e IL-10 no soro sanguíneo apresentaram níveis semelhantes, ao comparar todos os grupos experimentais (Figura 4.7-C e D, respectivamente). Tal fato concilia com o que já era esperado, pois os níveis, possivelmente, aumentados dessas citocinas no soro sanguíneo ocorreriam nos dias em que foram administradas as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), uma vez que essas permanecem por, no máximo, 24 horas no TGI (Mercenier *et al.*, 2000). Desse modo, o efeito dessas linhagens e do aumento das citocinas IL-4 e IL-10, concomitante ao impacto subsequente dessas no modelo de múltiplas doses de STZ, seria analisado, mais satisfatoriamente, nas análises pancreáticas; possibilitando avaliar o efeito imunomodulatório causado pelas intervenções feitas ao longo da progressão da T1D experimental.

4.4 Avaliação das respostas imunológicas no pâncreas de camundongos que receberam linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadoras dos vetores pValac::dts::IL-4 ou pValac::IL-10 no modelo de múltiplas doses de STZ

Para investigar os possíveis efeitos imunomodulatórios causados pelas diferentes linhagens bacterianas recombinantes no modelo de T1D induzido por múltiplas doses de STZ, primeiramente, foi analisado o grau de insulite nas ilhotas pancreáticas de cada grupo experimental. Os grupos – e CV, nos quais os animais receberam, pela via intraperitoneal, salina 0,9% e tampão citrato de sódio, respectivamente, e, pela via intragástrica, salina 0,9%, apresentaram ilhotas pancreáticas sem nenhum infiltrado inflamatório (Figura 4.8). A arquitetura histológica normal, de um animal proveniente do grupo –, foi exemplificada na figura 4.9-A. Já os animais que receberam as múltiplas doses de STZ e, apenas salina 0,9% pela via intragástrica (Grupo +), apresentaram uma média de grau de insulite de 1,5. Esse valor se encaixa entre os parâmetros de peri-insulite e infiltração moderada das ilhotas de

Langerhans. Nota-se, entretanto, que os animais submetidos à indução química da T1D e que receberam doses de *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (Grupo F) apresentaram grau de insulite estatisticamente superior que a do grupo +. Isso indica que essa linhagem bacteriana favoreceu o aumento da inflamação, de maneira quantitativa e qualitativa, nas ilhotas pancreáticas, a qual culmina com o estabelecimento da T1D. Uma secção histológica demonstrando o grau de insulite 3, proveniente de um animal do grupo F, ilustra um infiltrado linfocitário extenso em uma ilhota pancreática (Figura 4.9-B).

Ao administrar, individualmente, as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) (Grupos F-IL-4 e F-IL-10, respectivamente), observou-se o mesmo grau de insulite (0,75) nas ilhotas pancreáticas (Figura 4.8). Esse grau se encaixa entre os parâmetros de peri-insulite e ausência de infiltrado inflamatório. Além disso, nota-se que o grau de insulite desses grupos foi estatisticamente menor ($p < 0,001$) que o apresentado pelos animais do controle positivo da T1D experimental (Grupo +).

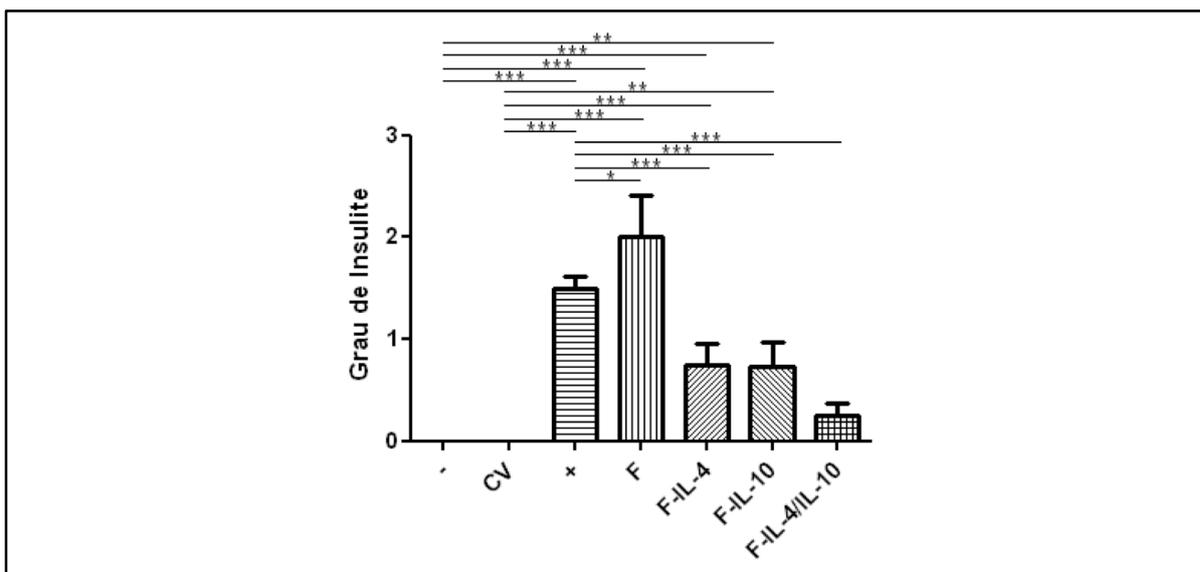


Figura 4.8: Grau de insulite visualizado nas ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da T1D experimental e suplementados com diferentes linhagens bacterianas recombinantes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 2 animais/grupo de três experimentos independentes.

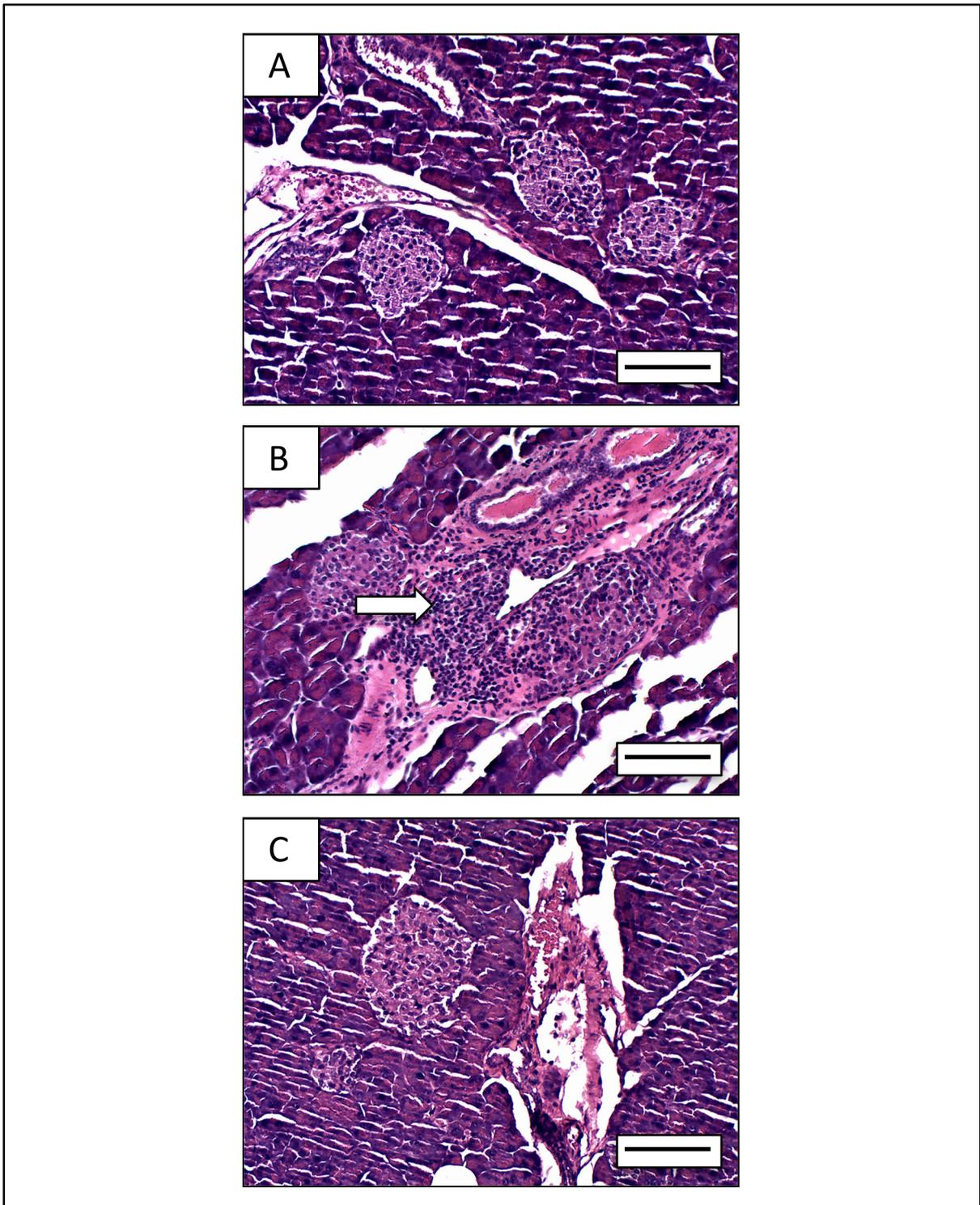


Figura 4.9: Cortes histológicos mostrando as ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da T1D experimental e suplementados com diferentes linhagens bacterianas recombinantes. (A) Ilhotas pancreáticas de um animal pertencente ao controle negativo da T1D (Grupo -) demonstrando a arquitetura histológica normal. (B) Ilhota pancreática de um animal pertencente ao grupo que recebeu doses de *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (Grupo F), demonstrando o infiltrado linfocitário (seta branca) que se compromete uma área superior a 50% da área da ilhota – considerado grau 3 de insulite. (C) Ilhota pancreática de um animal pertencente ao grupo que recebeu doses de *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) (Grupo F-IL-4/IL-10), demonstrando a manutenção da arquitetura normal da ilhota pancreática. A barra de escala corresponde a 100 μ m.

Como foi visto até agora, todos os animais que receberam a indução química da T1D experimental – Grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10 – apresentaram algum grau de insulite. O mesmo ocorreu com os animais do grupo F-IL-4/IL-10, entretanto, esses foram os que apresentaram o menor grau de insulite, comparado com os que receberam injeções de STZ (Figura 4.8). O grau de insulite de 0,25 dos animais que receberam, conjuntamente, doses contendo *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), mostrou-se estatisticamente menor ($p < 0,001$) que o apresentado pelos animais do grupo +. Esses dados sugerem que a suplementação oral dessas linhagens bacterianas juntas (Grupo F-IL-4/IL-10) potencializou o efeito das linhagens administradas individualmente (Grupos F-IL-4 e F-IL-10), resultando em uma proteção parcial da destruição das ilhotas pancreáticas. A preservação da arquitetura histológica normal, de um animal proveniente do grupo F-IL-4/IL-10, foi exemplificada na figura 4.9-C.

O modelo de múltiplas doses de STZ, assim como a T1D em humanos, é mediado por linfócitos T e caracteriza-se pela progressão de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas e desequilíbrio de citocinas (Cetkovic-Cvrlje *et al.*, 2017). Sendo assim, para investigar o efeito positivo observado na redução significativa do grau de insulite e preservação de grande parte das ilhotas pancreáticas, com arquitetura histológica normal, decorrente da administração intragástrica das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), os níveis de várias citocinas envolvidas no desenvolvimento da T1D foram mensuradas.

A síntese da citocina pró-inflamatória IFN- γ por células T diabetogênicas tem sido reconhecida como um importante fator contribuidor para a patogênese autoimune na T1D. Evidências adicionais também mostraram que o aumento da expressão de MHC é mediado por IFN- γ (Cockfield *et al.*, 1989; Klinkhammer *et al.*, 1989) e linfoproliferação é observada após administração de STZ (Klinkhammer *et al.*, 1988). No entanto, o mecanismo pelo qual essa citocina induz autoimunidade, correlacionado à diferentes períodos no desenvolvimento da T1D, ainda não foi totalmente elucidado (Bending *et al.*, 2012). Ao mensurar os níveis de IFN- γ , nota-se que todos os grupos apresentaram níveis próximos dessa citocina (Figura 4.10). Essa observação condiz com os relatos na literatura, em que estudos que acompanharam a progressão da T1D induzida quimicamente mostraram um pico inicial de IFN- γ , entre o 3º e 6º dia após a última injeção de STZ, enquanto que, no 11º dia, os níveis dessa citocina nos grupos que receberam e nos que não receberam as múltiplas doses de STZ

são estatisticamente iguais. Os níveis de IFN- γ começaram a se diferenciar novamente, entre os esses dois grupos, apenas no 25º dia após a indução química da T1D (Müller *et al.*, 2002; Yaochite *et al.*, 2013). Como a amostragem dos pâncreas, do presente trabalho, foi feita no dia 14 do cronograma experimental, o qual corresponde ao 10º dia após a última injeção de STZ, sugere-se que seja o intervalo entre os picos registrados de IFN- γ .

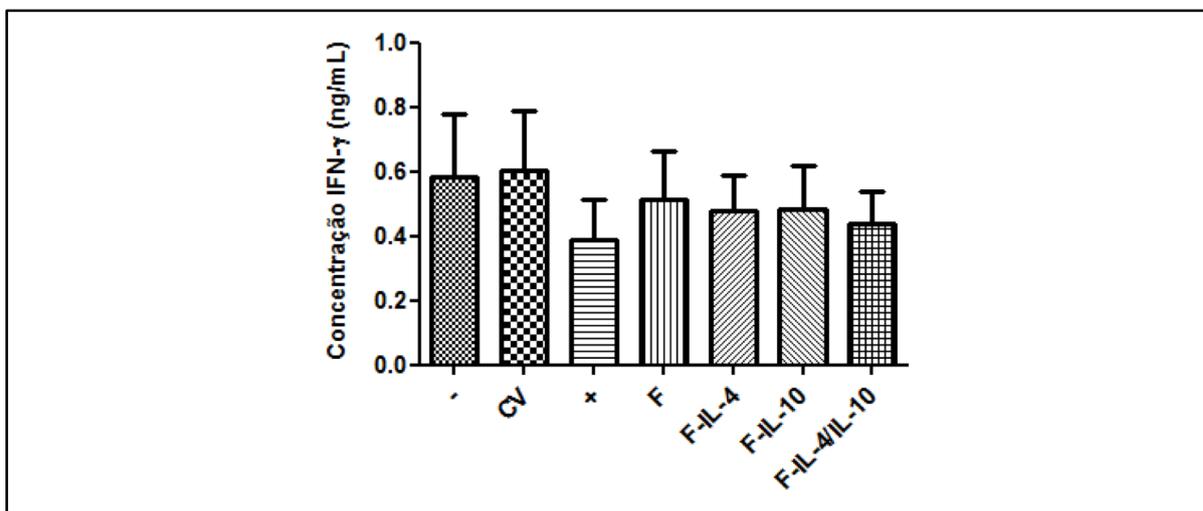


Figura 4.10: Concentração de IFN- γ de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

Um outro importante efector da patogênese da T1D consiste na citocina TNF- α , a qual promove adesão celular por ativação de células endoteliais, endereçamento (*homing*) leucocitário, regulação positiva de MHC de classe I e II dentro da ilhota pancreática e ativação de células T e APCs. A produção de TNF- α por linfócitos T CD8⁺ é diretamente citotóxico para células β . Ademais, esses linfócitos secretam IFN- γ e TNF- α para favorecer a apresentação de autoantígenos por células dendríticas e aumentar a expressão de Fas e MHC de classe I nas células β , aumentando, assim, a autoimunidade mediada por linfócitos T e promovendo a destruição das células produtoras de insulina (Padgett *et al.*, 2013). Em 2001, Holstad e Sandler demonstraram que um inibidor transcricional de TNF- α é capaz de prevenir a T1D experimental induzida por múltiplas doses de STZ (Holstad & Sandler, 2001). Ademais, vários estudos já demonstraram que a combinação de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ induzem a morte das células β pancreáticas (Thomas *et al.*, 2002; Gysemans *et al.*, 2005; Vincenz *et al.*, 2011). Na figura 4.11 observa-se que os níveis de TNF- α no homogenato pancreático seguiram o mesmo perfil observado na mensuração dos níveis de IFN- γ (vide

figura 4.10), na comparação entre todos os grupos experimentais. Visto que essas duas citocinas agem sinergicamente na indução da morte de células β e que, pela análise histológica, alguns grupos experimentais já apresentaram vasta destruição das ilhotas, no período em que a análise das citocinas foi feita, o pico de concentração de TNF- α já ocorreu e, então, a T1D experimental já está estabelecida.

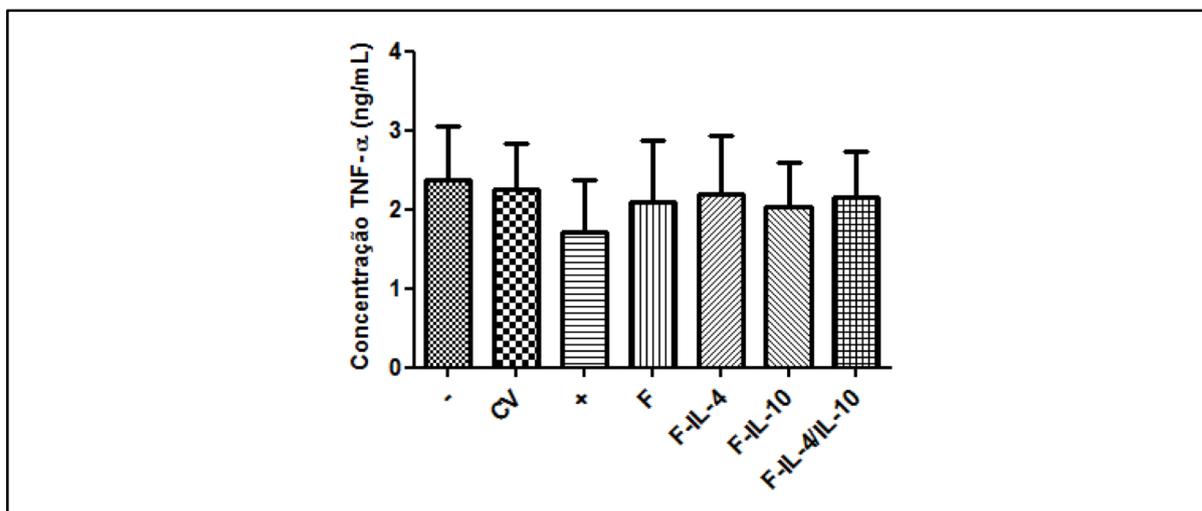


Figura 4.11: Concentração de TNF- α de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

No modelo de diabetes espontânea, estudos que utilizam como estratégia a transferência gênica de IL-4 mediada por biolística ou administração repetida de IL-4 obtiveram sucesso na prevenção do início do desenvolvimento da T1D experimental (Cameron *et al.*, 1997, 2000). A IL-4 é conhecida por induzir a geração de macrófagos do perfil M2 e, já foi demonstrado em camundongos NOD que, sincronicamente, assumem funções regulatórias no desenvolvimento da doença (Osada *et al.*, 2013). Sendo assim, por se apresentar como uma citocina do perfil Th2, a IL-4 se torna interessante para o modelo de T1D, uma vez que esse consiste em um modelo mediado por respostas pró-inflamatórias Th1. Como esperado, os animais do controle positivo (Grupo +) apresentaram níveis reduzidos de IL-4, quando comparados aos grupos - e CV (Figura 4.12). Nota-se, também, que os grupo F e os que receberam doses contendo a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) – Grupos F-IL-4 e F-IL-4/IL-10 – apresentaram níveis de IL-4 próximos ao que é visto em animais saudáveis (Grupo -). Interessantemente, os animais que receberam doses contendo apenas a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) apresentaram níveis de IL-4 estatisticamente menores que os apresentados pelos animais pertencentes aos grupos - e CV.

Sugere-se que isso se deve à ausência de estímulo suficiente de IL-4 nas fases iniciais do desenvolvimento da T1D experimental, uma vez que esses animais não receberam a linhagem contendo o plasmídeo codificador de IL-4.

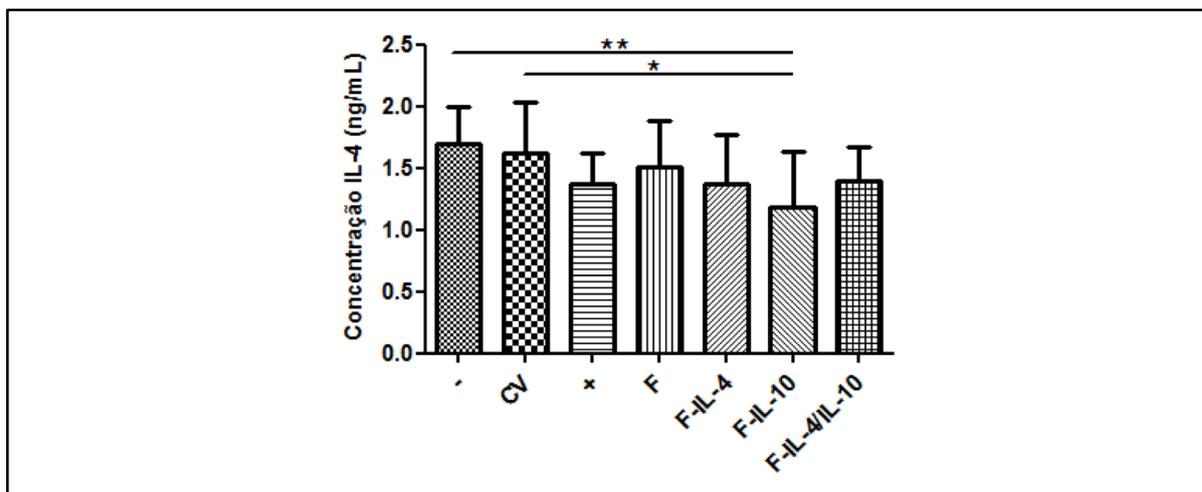


Figura 4.12: Concentração de IL-4 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

Pelo menos dois tipos de Tregs $CD4^+$ foram descritos com base em sua origem, função e mecanismos de ação. As Tregs naturais (nTregs) são gerados no timo e são específicos para auto-antígenos. Enquanto que as Tregs induzidas (iTregs) derivam de precursores maduros $CD4^+CD25^+FOXP3^-$ na periferia, após estimulação antigênica adequada na presença de TGF- β e IL-2. As iTregs podem ser distinguidas de nTregs com base na metilação de uma região definida dentro do locus FOXP3 (TSDR – do inglês, *Treg Specific Demethylated Region*), que é constantemente desmetilado, de maneira exclusiva, nas nTregs (Belkaid & Chen, 2010; Chatenoud, 2011). Paralelamente, estudos prévios mostraram que TGF- β possivelmente desempenha uma função importante na recuperação de ilhotas pancreáticas no modelo de diabetes espontânea, uma vez que essa citocina induz células Treg na periferia (Park *et al.*, 2008). Assim, visto que, na T1D, as células Treg exercem um papel regulatório fundamental e esta pode ser estimulada por TGF- β (Amu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011), os níveis dessa citocina foram mensurados. Observou-se que os animais que receberam múltiplas doses de STZ e apenas salina 0,9%, pela via intragástrica, (Grupo +) apresentaram concentração de TGF- β estatisticamente menor do que os animais que receberam salina 0,9% pelas vias intragástrica e intraperitoneal (Grupo -) (Figura 4.13). Ao passo que, os grupos que receberam linhagens bacterianas recombinantes (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10)

parecem estar em fase de recuperação dos níveis basais de TGF- β , já os níveis dessa citocina não diferem estatisticamente dos apresentados pelos grupos -, CV e +.

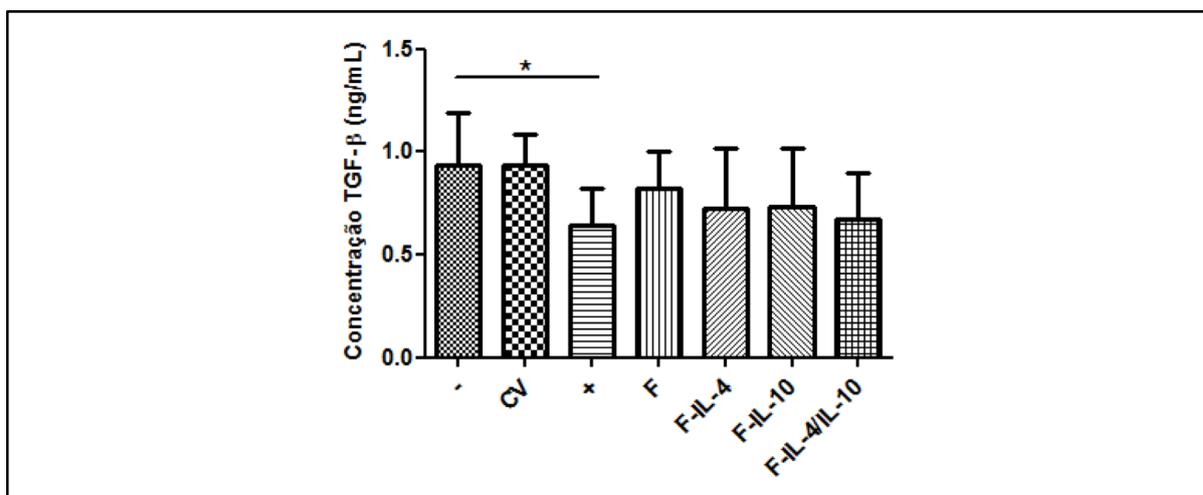


Figura 4.13: Concentração de TGF- β de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. *: $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

A IL-10 atua nas ilhotas pancreáticas suprimindo a produção de IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e TNF- α – citocinas pró-inflamatórias que estimulam a progressão da insulite destrutiva (Xu *et al.*, 2015). Há vários estudos que enfatizam a importância da IL-10 nas intervenções terapêuticas da T1D. Dentre esses, foi demonstrado que o tratamento sistêmico de camundongos NOD de 4 semanas de idade com altas doses de um vetor viral expressando IL-10 murina resultou no aumento da porcentagem de células Treg CD4⁺CD25⁺ e, assim, foi capaz de prevenir a T1D (Goudy *et al.*, 2003). Assim como foi observado por Yaochite e colaboradores, em 2013, no modelo de múltiplas doses de STZ (Yaochite *et al.*, 2013), os animais pertencentes ao controle positivo da T1D experimental (Grupo +) mostraram nível de IL-10 estatisticamente menor que o apresentado pelos animais do controle negativo da doença (Grupo -) (Figura 4.14). Tal observação suporta a ideia de que os animais pertencentes aos grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10, os quais receberam doses de linhagens bacterianas recombinantes, estão recuperando os níveis basais dessa citocina – que podem ser vistos nos animais dos grupos - e CV.

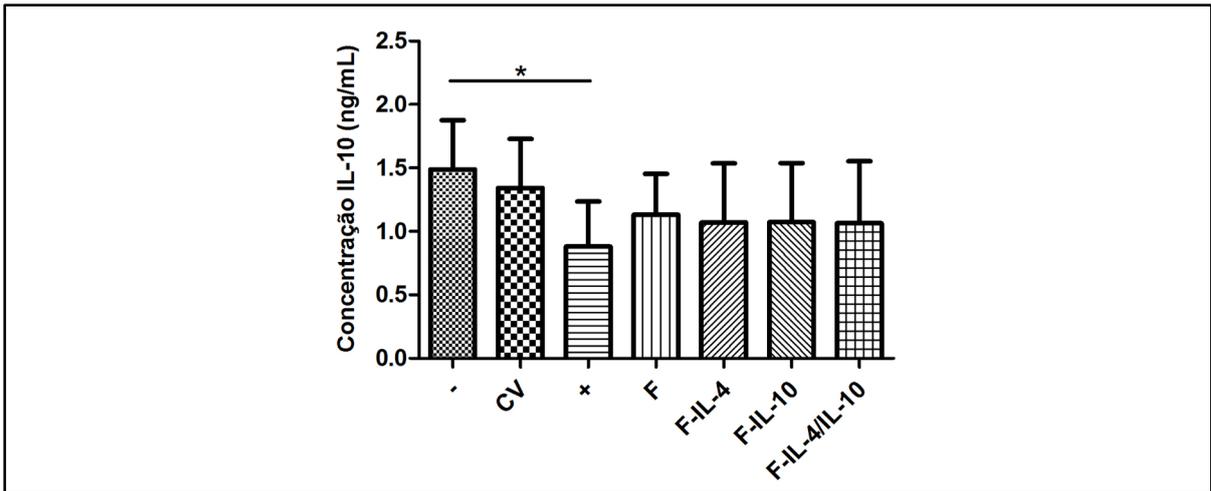


Figura 4.14: Concentração de IL-10 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. *: $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

A IL-2 é considerada uma citocina de extrema importância para o controle da progressão da T1D. Essa se caracteriza como uma citocina pleiotrópica que favorece a expansão e ativação de células Treg tanto em camundongos como humanos (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010). Como as células Treg não possuem a capacidade de produzir IL-2, essas células são dependentes da produção parácrina para o seu desenvolvimento e função. As principais células produtoras de IL-2 são os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados convencionalmente, mas linfócitos T autorreativos também são uma fonte possível de IL-2 (Hartemann & Bourron, 2012). É sugerido que os linfócitos T efetores autorreativos reconheçam autoantígenos apresentados pelas células dendríticas, produzam IL-2 quando ativados e, então, ativam Tregs específicas que já estão engajadas pelo TCR (receptor de célula T – do inglês, *T-Cell Receptor*). Por fim, essas células Tregs poderiam suprimir os linfócitos T autorreativos, mantendo, assim, a tolerância imune (Malek & Castro, 2010).

Já foi demonstrado que quantidades insuficientes de IL-2 no pâncreas foram responsáveis pela baixa sobrevivência de células Treg nesse tecido, o que levaria à quebra da auto-tolerância e, assim, ao desenvolvimento da T1D (Tang *et al.*, 2008). Dessa forma, para auxiliar a compreensão dos efeitos subsequentes à administração de linhagens bacterianas recombinantes no modelo de indução química da T1D, os níveis de IL-2 foram mensurados no homogenato pancreático. Na figura 4.15, nota-se que os animais pertencentes ao grupo controle + da T1D experimental (Grupo +) apresentaram níveis estatisticamente menores que os apresentados pelos animais pertencentes aos grupos – e CV. Essa observação evidencia que, no modelo de múltiplas doses de STZ, dez dias após a última injeção do agente indutor

da T1D experimental, há uma redução significativa na concentração de IL-2 – uma citocina reconhecida por favorecer a expansão e ativação de células Treg, as quais poderiam suprimir a autoimunidade. Surpreendentemente, observou-se que os animais que receberam doses com as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Grupo F-IL-4/IL-10) apresentaram níveis significativamente maiores que os apresentados pelos animais pertencentes ao controle positivo da T1D (Grupo +). Ademais, o grupo F-IL-4/IL-10 não se mostrou estatisticamente diferente dos grupos – e CV – considerados referência de animais saudáveis. Tais observações sugerem que a concentração aumentada de IL-2 visualizada nos animais que receberam linhagens bacterianas portadoras de vetores de expressão eucariótica de IL-4 e IL-10, em comparação aos animais do controle positivo, tenha induzido a expansão e ativação de células Treg nas ilhotas pancreáticas no período de injeção e ação do STZ. Logo, essas células seriam capazes de suprimir parte dos linfócitos T autorreativos, resultando na proteção parcial vista nas análises histológicas (vide figura 4.8 e 4.9).

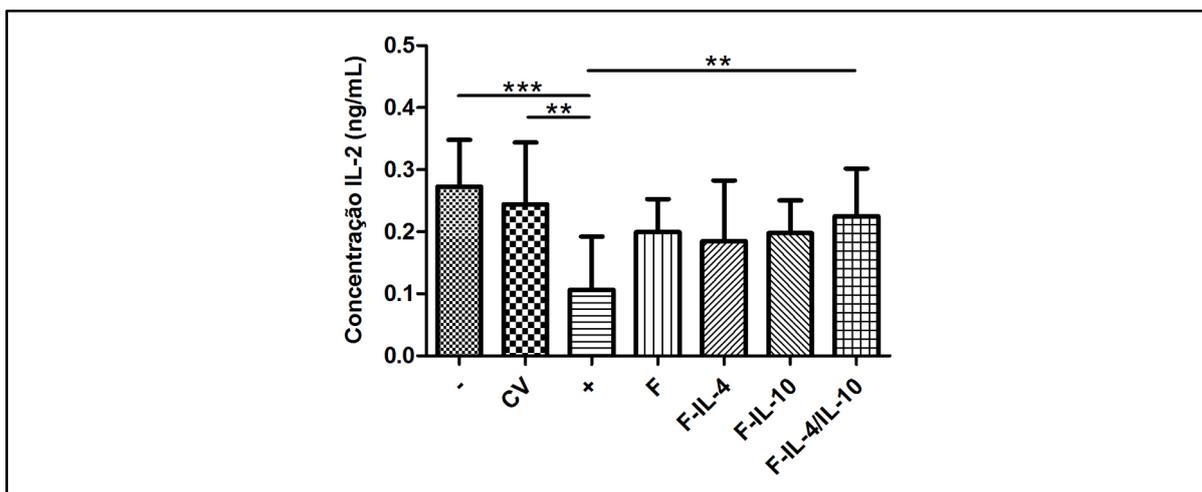


Figura 4.15: Concentração de IL-2 de amostras de pâncreas de camundongos C57BL/6 submetidos ou não à indução química da diabetes experimental. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média \pm SD de 4 animais/grupo de três experimentos independentes.

4.5 Discussão geral

Primeiramente, a escolha do modelo de diabetes quimicamente induzido foi feita devido a esse ter sido estabelecido a mais de trinta anos atrás e possibilitar a detecção do processo de insulite e hiperglicemia persistente, ambos resultantes da destruição seletiva de células β pancreáticas. Esse processo parece decorrer de uma lesão inicial, causada pela STZ,

nas células produtoras de insulina, a qual é amplificada pelas células do sistema imunológico – assemelhando-se à etiologia autoimune da T1D (Lenzen, 2008). O desenvolvimento da doença é dependente de linfócitos T e a contribuição de respostas imunes mediadas por essas células no modelo de T1D induzido por múltiplas doses de STZ é comprovada por diversos estudos (Müller *et al.*, 2002): (i) a doença experimental é inibida pela administração de anticorpos anti-CD3 ou essa pode ser induzida através da transferência adotiva de esplenócitos derivados de animais injetados com STZ (Paik *et al.*, 1980; Kim & Steinberg, 1984; Herold *et al.*, 1987); (ii) a suscetibilidade à T1D foi aumentada em camundongos transgênicos expressando a molécula co-estimulatória de linfócitos T – CD80 – nas células β pancreáticas (Harlan *et al.*, 1995); (iii) STZ induziu linfoproliferação dependente de linfócitos T locais *in vivo* e expressão transiente de antígenos complexados a moléculas de MHC de classe II (Klinkhammer *et al.*, 1988, 1989); (iv) STZ estimulou a secreção sistêmica de IFN- γ por linfócitos T (Cockfield *et al.*, 1989). Esse modelo de indução química da T1D experimental ainda apresenta outras vantagens, como o curto prazo de tempo para estabelecimento da doença e a maior acessibilidade ao modelo, já que os camundongos que desenvolvem diabetes espontaneamente não são comercializados por muitos biotérios, tornando mais difícil a replicação dos experimentos. Além disso, ainda há poucos estudos que testam drogas imunomodulatórias no modelo de múltiplas doses de STZ, contribuindo, também, para a escolha desse modelo de T1D experimental pelo presente trabalho.

Embora a entrega local de citocinas a locais de inflamação seja uma forma mais racional e plausível de imunoterapia, a maioria dos estudos de IL-4 e/ou IL-10 administrados sistematicamente demonstrou os benefícios desta estratégia na T1D experimental – todos realizados em camundongos NOD (Koh *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Nesse contexto, em 2008, foi proposto um modelo no qual evidencia-se como o ambiente intestinal pode interferir, de maneira crucial, no desenvolvimento da T1D (Figura 4.16). Ademais, nota-se que a liberação de citocinas – e, conseqüentemente, seus efeitos – é um fator-chave na integração das três facetas propostas (microbiota, absorção e imunidade de mucosa alteradas) associadas ao ambiente intestinal com o desenvolvimento da T1D. Paralelamente, diversos trabalhos indicam que respostas imunes devidas a estímulos provenientes do intestino podem modular a inflamação prejudicial que culmina com o estabelecimento da doença (Mishra *et al.*, 2013). Os resultados de Wen e colaboradores, em 2008, sugerem que a interação de microrganismos intestinais com o sistema imune inato é um fator epigenético crítico de modificação da pré-disposição à T1D (Wen *et al.*, 2008).

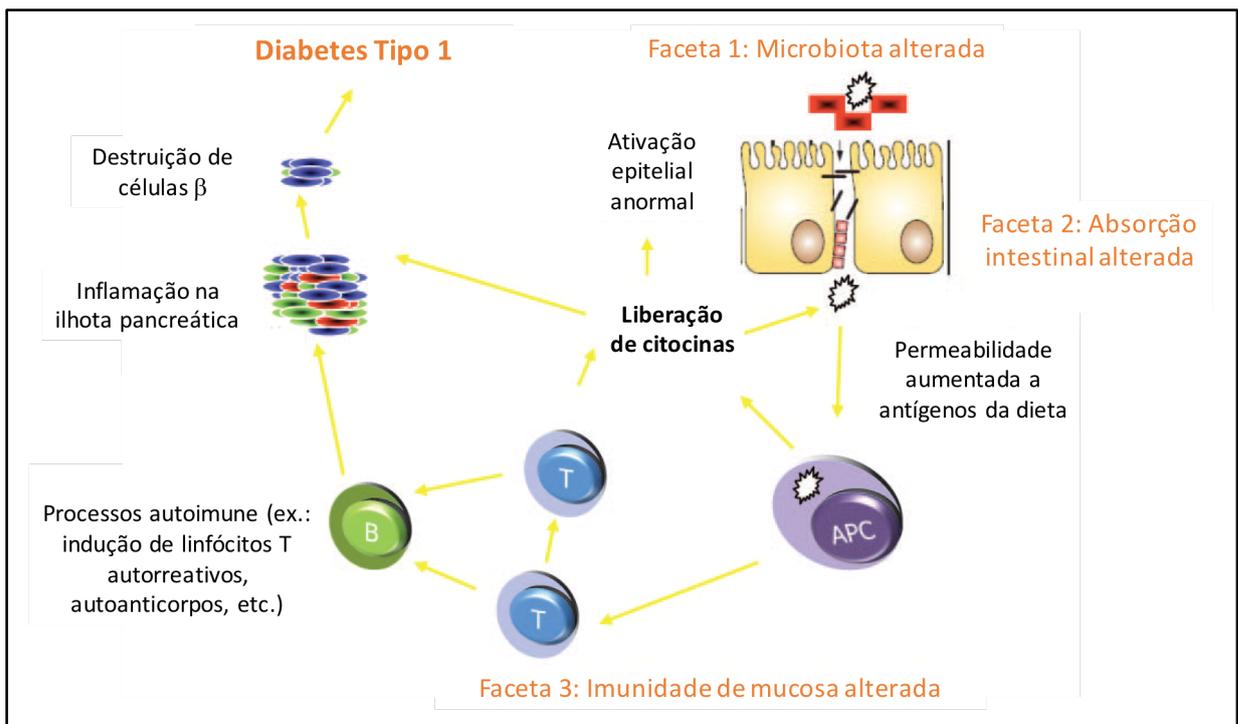


Figura 4.16: Modelo hipotético da contribuição de diversos componentes do ambiente intestinal na patogênese da T1D. Adaptado: Vaarala *et al.*, 2008.

No presente estudo, optou-se por avaliar se a passagem das linhagens bacterianas recombinantes alterou o *status* basal intestinal por meio da mensuração de citocinas, uma vez que essas desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal, orquestrando as ações da imunidade inata e adaptativa, através de seus efeitos pró- ou anti-inflamatórios (Elshaer & Begun, 2017). Sabe-se que, em circunstâncias normais, os mecanismos regulatórios superam os sinais inflamatórios induzidos pela reação do sistema imune aos estímulos presentes no lúmen intestinal (Figura 4.17). Após execução das réplicas experimentais, verificou-se uma redução nos níveis de sIgA, o que pode indicar que, previamente, as bactérias foram internalizadas por células intestinais. Esse indício é favorável visto que, apenas quando as bactérias administradas são englobadas pelas células eucarióticas, é possível a transcrição e tradução do plasmídeo codificador de IL-4 (pValac::dts::IL-4) ou IL-10 (pValac::IL-10). Ademais, com relação à todas as citocinas testadas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α e TGF- β), não foi visualizada nenhuma alteração que indicasse a modificação da homeostase imune intestinal, sete dias após a última suplementação bacteriana. Isso ressalta que a escolha da linhagem bacteriana *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ para entrega dos plasmídeos de expressão eucariótica pValac::dts::IL-4 ou pValac::IL-10 foi

acertada, uma vez que, caso a passagem das bactérias no TGI tenha favorecido a desregulação do microambiente intestinal, essa foi temporária e em um curto período.

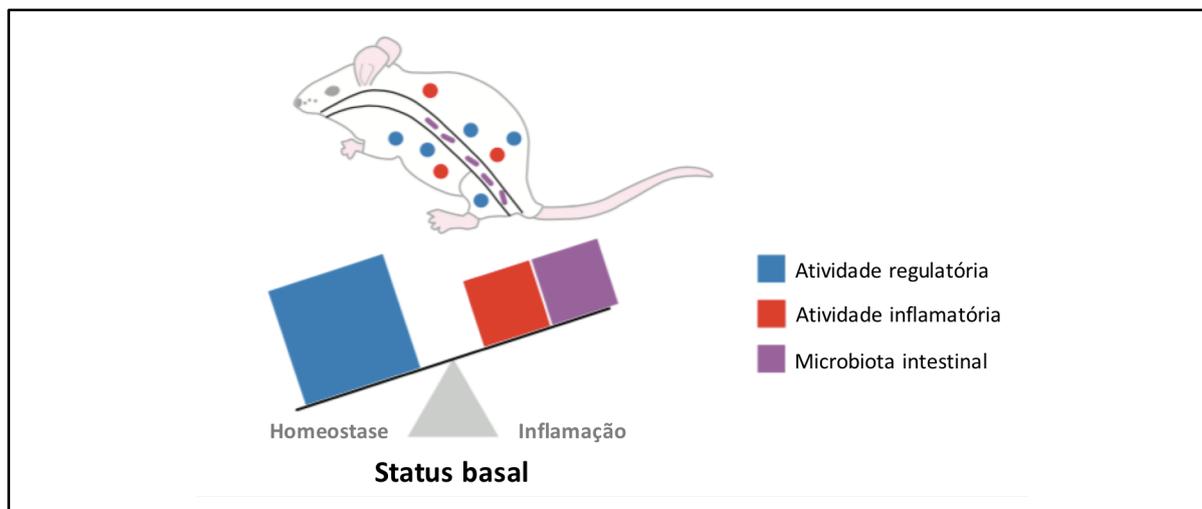


Figura 4.17: Representação esquemática da homeostase imune intestinal. Adaptado: Izcue *et al.*, 2009.

Ao analisar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ no soro sanguíneo, não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais. Tal observação é plausível devido à ausência de suplementação bacteriana por uma semana anterior à amostragem do soro sanguíneo. Hipotetiza-se que, caso essa medição fosse realizada nos dias em que eram administradas linhagens bacterianas recombinantes aos animais, poderia haver alterações nos níveis de algumas das citocinas supracitadas, principalmente IL-4 e IL-10.

Como resultado das análises histológicas do grau de insulite e dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no pâncreas, observou-se que a administração combinada das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-4*) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::*IL-10*) (Grupo F-IL-4/IL-10) apresentou uma proteção parcial à indução da T1D experimental pela preservação das ilhotas pancreáticas. Estudos anteriores sugerem que uma combinação de IL-4 e IL-10 exerce um efeito sinérgico na supressão da imunidade celular *in vivo* (Powrie *et al.*, 1993; Faust *et al.*, 1996). Embora o mecanismo subjacente não seja conhecido, os modos de ação ligeiramente diferentes de IL-4 e IL-10 podem contribuir para o efeito aumentado (Ko *et al.*, 2001). A IL-4 mostrou-se capaz de reduzir a produção de IL-1 de monócitos e induzir um antagonista do receptor de IL-1 *in vitro* (Vannier *et al.*, 1992). A regulação negativa, mediada por IL-4, de TNF- α , IL-1 e da síntese de radicais de oxigênio também foi demonstrada *in vivo* (Allen *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 1993). Além disso, IL-4

diminui a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados (Cenci *et al.*, 1993). Enquanto que a IL-10 mostrou ser capaz de suprimir TNF- α , IL-1 e a produção de radicais de oxigênio *in vitro* e *in vivo* (Bogdan *et al.*, 1991; Gérard *et al.*, 1993; Rott *et al.*, 1994), além de inibir a liberação de IFN- γ por linfócitos Th1 por meio da supressão da síntese de IL-12 nas APCs (Fiorentino *et al.*, 1991). Hipotetiza-se que essas variações, possivelmente causadas pelo efeito das linhagens bacterianas portadoras dos vetores de expressão eucariótica codificadores de IL-4 e/ou IL-10, não foram visualizadas na dosagem de citocinas devido ao período em que foi feita a amostragem do pâncreas. Caso essas mensurações fossem feitas nas fases mais iniciais do progresso da doença, provavelmente seriam verificadas alterações significativas nos níveis dessas citocinas. Entretanto, foi detectada a recuperação do nível basal de IL-2, citocina fundamental para ativação e expansão das células Treg, no homogenato pancreático dos animais que receberam doses contendo as linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10), de modo combinado.

Ademais, não foi possível desvendar os mecanismos envolvidos na piora, visualizada nas análises histológicas do grau de insulite, dos animais que receberam linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (Grupo F) e receberam múltiplas doses de STZ. Supõe-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias em resposta à passagem dessas bactérias no TGI pode ter exacerbado os efeitos destrutivos da STZ, culminando na piora da T1D. Visto que essas alterações só seriam detectadas durante o período de suplementação bacteriana, um monitoramento, com pequenos intervalos, feito ao longo do cronograma experimental poderia auxiliar na elucidação dos processos envolvidos.

Apesar do que foi visto nas análises pancreáticas, local primário do desenvolvimento da T1D, todos os animais que receberam a indução por múltiplas doses de STZ apresentaram hiperglicemia e apresentaram perda de peso ao longo do cronograma experimental. Entretanto, foram detectados níveis significativamente menores de glicosúria nos animais que receberam doses contendo *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Grupo F-IL-4/IL-10), em comparação com os demais grupos que receberam STZ (Grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10).

Adicionalmente aos dados concernentes à diabetes experimental, os resultados mostram que, a administração das linhagens bacterianas *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) parecem ser capazes de induzir não só uma resposta imunológica local, como visto nos trabalhos de inflamação

intestinal (Zurita-Turk *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016), mas também uma resposta sistêmica capaz de modular a progressão da inflamação em outros microambientes, como as ilhotas de Langerhans. De um modo geral, os resultados obtidos no presente trabalho trazem novos questionamentos para o estudo dos efeitos imunomodulatórios causados pela administração combinada de linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ portadoras de vetores de expressão eucariótica codificadores de IL-4 (pValac::dts::IL-4) e IL-10 (pValac::IL-10), visando uma melhor compreensão dos mecanismos associados à progressão da T1D e, possivelmente, auxiliando na busca por terapias alternativas.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- Através do monitoramento do peso e do acompanhamento dos níveis de glicemia e glicosúria, foi verificado que todos os animais que receberam múltiplas doses de STZ se tornaram diabéticos logo após a indução química da T1D experimental.
- Foi observada, nos dias 10 e 14 do cronograma experimental, uma redução significativa nos níveis de glicosúria nos animais que tiveram suplementação oral das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Grupo F-IL-4/IL-10), quando comparados aos demais grupos que também receberam STZ (Grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10).
- Os níveis de sIgA foram reduzidos nos grupos que receberam linhagens bacterianas recombinantes (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10), uma semana após a última administração dessas pela via intragástrica.
- Na mensuração de citocinas do cólon, amostrado no dia 14 do cronograma experimental, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α e TGF- β dos animais submetidos ou não à indução química da T1D experimental e suplementados com diferentes linhagens recombinantes.
- Os animais que receberam, intraperitonealmente, injeções de STZ e, pela via intragástrica, doses contendo *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ apresentaram piora no grau de insulite comparados aos animais que receberam apenas a indução química da T1D experimental (Grupo +).
- Os animais que receberam a administração combinada das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::IL-10) (Grupo F-IL-4/IL-10) apresentaram o menor grau de insulite entre os demais grupos que também receberam injeções intraperitoneais de STZ (Grupos +, F, F-IL-4 e F-IL-10), resultando na maior preservação das ilhotas pancreáticas.
- A dosagem de citocinas no homogenato pancreático não detectou diferenças significativas na concentração de IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β entre os grupos que receberam STZ e linhagens bacterianas recombinantes (Grupos F, F-IL-4, F-IL-10 e F-IL-4/IL-10) e o grupo controle positivo da T1D experimental (Grupo +).
- Os animais que foram submetidos à indução química da T1D e receberam suplementação oral das linhagens *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ (pValac::dts::IL-4) e *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺

(pValac::*IL-10*) (Grupo F-IL-4/IL-10) apresentaram níveis estatisticamente maiores de IL-2, quando comparados aos animais que receberam apenas as injeções de STZ (Grupo +).

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho constitui um primeiro passo na busca pelo entendimento dos mecanismos intrínsecos à diabetes tipo 1 utilizando bactérias lácticas para entrega de vetores codificadores das interleucinas 4 e 10, pela via intragástrica, no modelo de diabetes induzida quimicamente por STZ. Ao longo do desenvolvimento do trabalho, novos questionamentos surgiram, o que nos permite vislumbrar alguns cenários de continuidade a esse estudo.

Com a finalidade de monitorar, de forma mais satisfatória, as variações de citocinas e a progressão histológica da insulite, animais submetidos ao modelo de T1D induzido por STZ e suplementados com as linhagens bacterianas recombinantes utilizadas neste estudo serão eutanasiados a cada três dias do cronograma experimental, a partir do início da administração de STZ. Ademais, serão realizadas cultura de esplenócitos e linfonodos duodenopancreáticos para auxiliar no esclarecimento das respostas imunológicas até então observadas.

Por fim, com o intuito de entender, cada vez mais, os mecanismos intrínsecos à doença nos diferentes modelos animais disponíveis, as mesmas linhagens bacterianas serão testadas no modelo de diabetes espontânea, utilizando camundongos NOD, permitindo, também, uma análise comparativa dos resultados obtidos nos principais modelos experimentais de T1D.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, U., Asghar, O., Azmi, S. & Malik, R.A. (2014) General aspects of diabetes mellitus. In *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 211–222.
- Alexander, K.L., Targan, S.R. & Elson, C.O. (2014) Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, **260**, 206–220.
- Allen, J.B., Wong, H.L., Costa, G.L., Bienkowski, M.J. & Wahl, S.M. (1993) Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **151**, 4344–4351.
- Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A. & Fallon, P.G. (2010) Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**, 1114–1124.e8.
- Anderson, M.S. & Bluestone, J.A. (2005) THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annual Review of Immunology*, **23**, 447–485.
- Asadullah, K. (2003) Interleukin-10 Therapy--Review of a New Approach. *Pharmacological Reviews*, **55**, 241–269.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. & Michels, A.W. (2014) Type 1 diabetes. *The Lancet*, **383**, 69–82.
- Azevedo, V. & Miyoshi, A. (2004) Novas utilizações biotecnológicas e terapêuticas das bactérias do ácido láctico. In *Genômica*. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 801–818.
- Bahey-El-Din, M. & Gahan, C.G.M. (2011) Lactococcus lactis-based vaccines: current status and future perspectives. *Human Vaccines*, **7**, 106–109.
- Bahey-El-Din, M., Gahan, C.G.M. & Griffin, B.T. (2010) Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Current Gene Therapy*, **10**, 34–45.
- Bamias, G., Corridoni, D., Pizarro, T.T. & Cominelli, F. (2012) New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*, **59**, 451–459.
- Banerjee, A. & Mitragotri, S. (2017) Intestinal patch systems for oral drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology*, **36**, 58–65.
- Belkaid, Y. & Chen, W. (2010) Regulatory ripples. *Nature Immunology*, **11**, 1077–1078.
- Bending, D., Zaccane, P. & Cooke, A. (2012) Inflammation and type one diabetes. *International Immunology*, **24**, 339–346.
- Bermúdez-Humarán, L.G., Kharrat, P., Chatel, J.-M. & Langella, P. (2011) Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, **10**, S4.

- Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine*, **174**, 1549–1555.
- Bohan, A., Chen, W.-S., Denson, L.A., Held, M.A. & Boyer, J.L. (2003) Tumor Necrosis Factor α -dependent Up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) Reduces Liver Injury in Obstructive Cholestasis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36688–36698.
- Boldison, J. & Wong, F.S. (2016) Immune and Pancreatic β Cell Interactions in Type 1 Diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **27**, 856–867.
- Bolzán, A.D. & Bianchi, M.S. (2002) Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **512**, 121–134.
- Cameron, M.J., Arreaza, G.A., Zucker, P., Chensue, S.W., Strieter, R.M., Chakrabarti, S., *et al.* (1997) IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **159**, 4686–4692.
- Cameron, M.J., Strathdee, C.A., Holmes, K.D., Arreaza, G.A., Dekaban, G.A. & Delovitch, T.L. (2000) Biolistic-Mediated Interleukin 4 Gene Transfer Prevents the Onset of Type 1 Diabetes. *Human Gene Therapy*, **11**, 1647–1656.
- Castillo Martinez, F.A., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Domínguez González, J.M., Converti, A. & Oliveira, R.P. de S. (2013) Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **30**, 70–83.
- Cenci, E., Romani, L., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Schiaffella, E., Puccetti, P., *et al.* (1993) Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *European Journal of Immunology*, **23**, 1034–1038.
- Cetkovic-Cvrlje, M., Thinamany, S. & Bruner, K.A. (2017) Bisphenol A (BPA) aggravates multiple low-dose streptozotocin-induced Type 1 diabetes in C57BL/6 mice. *Journal of Immunotoxicology*, **14**, 160–168.
- Chatel, J.-M., Pothelune, L., Ah-Leung, S., Corthier, G., Wal, J.-M. & Langella, P. (2008) In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy*, **15**, 1184–1190.
- Chatenoud, L. (2011) Natural and induced T CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **677**, 3–13.
- Cockfield, S.M., Ramassar, V., Urmson, J. & Halloran, P.F. (1989) Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC expression in mice by triggering T cells to release IFN- γ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **142**, 1120–1128.
- Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R. & Elson, C.O. (2009) A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 19256–19261.

- Coombes, J.L. & Powrie, F. (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 435–446.
- Corthésy, B. (2013) Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmunity Reviews*, **12**, 661–665.
- Costa, F.R.C., Françoço, M.C.S., Oliveira, G.G. de, Ignacio, A., Castoldi, A., Zamboni, D.S., *et al.* (2016) Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. *The Journal of Experimental Medicine*, **213**, 1223–1239.
- Del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Lima, F.A., Dos Santos, J.C., Leclercq, S.Y., Chatel, J.-M., *et al.* (2013) A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *European Journal of Inflammation*, **11**, 641–654.
- Diab, R.A.H., Fares, M., Abedi-Valugerdi, M., Kumagai-Braesch, M., Holgersson, J. & Hassan, M. (2015) Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: In vitro and in vivo studies. *Immunology Letters*, **163**, 193–198.
- Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S. & Essien, U.N. (2013) Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, **12**, 60.
- Elshaer, D. & Begun, J. (2017) The role of barrier function, autophagy, and cytokines in maintaining intestinal homeostasis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **61**, 51–59.
- Faust, A., Rothe, H., Schade, U., Lampeter, E. & Kolb, H. (1996) Primary nonfunction of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10. *Transplantation*, **62**, 648–652.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., *et al.* (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **146**, 3444–3451.
- Gause, W.C., Wynn, T.A. & Allen, J.E. (2013) Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 607–614.
- Gérard, C., Bruyins, C., Marchant, A., Abramowicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., *et al.* (1993) Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *The Journal of Experimental Medicine*, **177**, 547–550.
- Gordon, S. & Martinez, F.O. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, **32**, 593–604.
- Goudy, K.S., Burkhardt, B.R., Wasserfall, C., Song, S., Campbell-Thompson, M.L., Brusko, T., *et al.* (2003) Systemic Overexpression of IL-10 Induces CD4+CD25+ Cell Populations In Vivo and Ameliorates Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice in a Dose-Dependent

Fashion. *The Journal of Immunology*, **171**, 2270–2278.

Greiner, T.U., Hyötyläinen, T., Knip, M., Bäckhed, F. & Orešič, M. (2014) The gut microbiota modulates glycaemic control and serum metabolite profiles in non-obese diabetic mice. *PLoS One*, **9**, e110359.

Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., *et al.* (2010) IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **207**, 1871–1878.

Guimarães, V., Innocentin, S., Chatel, J.-M., Lefèvre, F., Langella, P., Azevedo, V., *et al.* (2009) A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy*, **7**, 4.

Guimaraes, V.D., Innocentin, S., Lefevre, F., Azevedo, V., Wal, J.-M., Langella, P., *et al.* (2006) Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7091–7097.

Gysemans, C.A., Ladrière, L., Callewaert, H., Rasschaert, J., Flamez, D., Levy, D.E., *et al.* (2005) Disruption of the γ -Interferon Signaling Pathway at the Level of Signal Transducer and Activator of Transcription-1 Prevents Immune Destruction of β -cells. *Diabetes*, **54**, 2396–2403.

Harcourt, B.E., Penfold, S.A. & Forbes, J.M. (2013) Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nature Reviews Endocrinology*, **9**, 113–123.

Harlan, D.M., Barnett, M.A., Abe, R., Pechhold, K., Patterson, N.B., Gray, G.S., *et al.* (1995) Very-low-dose streptozotocin induces diabetes in insulin promoter-mB7-1 transgenic mice. *Diabetes*, **44**, 816–823.

Hartemann, A. & Bourron, O. (2012) Interleukin-2 and type 1 diabetes: New therapeutic perspectives. *Diabetes & Metabolism*, **38**, 387–391.

Herold, K.C., Bloch, T.N., Vezys, V. & Sun, Q. (1995) Diabetes Induced with Low Doses of Streptozotocin is Mediated by V 8.2+ T-Cells. *Diabetes*, **44**, 354–359.

Herold, K.C., Montag, A.G. & Fitch, F.W. (1987) Treatment with anti-T-lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozocin. *Diabetes*, **36**, 796–801.

Holstad, M. & Sandler, S. (2001) A Transcriptional Inhibitor of TNF- α Prevents Diabetes Induced by Multiple Low-Dose Streptozotocin Injections in Mice. *Journal of Autoimmunity*, **16**, 441–447.

Hooper, L.V. & Macpherson, A.J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, **10**, 159–169.

Horwitz, M.S., Ilic, A., Fine, C., Rodriguez, E. & Sarvetnick, N. (2002) Presented antigen from damaged pancreatic β cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune

diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, **109**, 79–87.

Ihara, S., Hirata, Y. & Koike, K. (2017) TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of Gastroenterology*, **52**, 777–787.

Innocentin, S., Guimarães, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, J.-M., *et al.* (2009) *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 4870–4878.

International Diabetes Federation. (2015) *IDF diabetes atlas*. International Diabetes Federation, Brussels.

Izcue, A., Coombes, J.L. & Powrie, F. (2009) Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology*, **27**, 313–338.

Jansen, J.H., Fibbe, W.E., Willemze, R. & Kluin-Nelemans, J.C. (1990) Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut*, **60**, 269–274.

Jin, Y., Lin, Y., Lin, L. & Zheng, C. (2012) IL-17/IFN- γ interactions regulate intestinal inflammation in TNBS-induced acute colitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, **32**, 548–556.

Karamanou, M. (2016) Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*, **7**, 1.

Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., *et al.* (2017) Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**, 17016.

Kikutani, H. & Makino, S. (1992) The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Advances in Immunology*, **51**, 285–322.

Kim, Y.T. & Steinberg, C. (1984) Immunologic studies on the induction of diabetes in experimental animals. Cellular basis for the induction of diabetes by streptozotocin. *Diabetes*, **33**, 771–777.

Klinkhammer, C., Dohle, C. & Gleichmann, H. (1989) T cell-dependent class II major histocompatibility complex antigen expression in vivo induced by the diabetogen streptozotocin. *Immunobiology*, **180**, 1–11.

Klinkhammer, C., Popowa, P. & Gleichmann, H. (1988) Specific immunity to streptozocin. Cellular requirements for induction of lymphoproliferation. *Diabetes*, **37**, 74–80.

Ko, K.S., Lee, M., Koh, J.J. & Kim, S.W. (2001) Combined Administration of Plasmids Encoding IL-4 and IL-10 Prevents the Development of Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Molecular Therapy*, **4**, 313–316.

- Koh, J.J., Ko, K.S., Lee, M., Han, S., Park, J.S. & Kim, S.W. (2000) Degradable polymeric carrier for the delivery of IL-10 plasmid DNA to prevent autoimmune insulinitis of NOD mice. *Gene Therapy*, **7**, 2099–2104.
- Kuhn, K.A., Manieri, N.A., Liu, T.-C. & Stappenbeck, T.S. (2014) IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PloS One*, **9**, e114195.
- Lamichhane, A., Azegamia, T. & Kiyono, H. (2014) The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*, **32**, 6711–6723.
- Lee, M., Ko, K.S., Oh, S. & Kim, S.W. (2003) Prevention of autoimmune insulinitis by delivery of a chimeric plasmid encoding interleukin-4 and interleukin-10. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **88**, 333–342.
- Leiter, E.H. (1982) Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, sex, and thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 630–634.
- Lenzen, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **51**, 216–226.
- Li, M., Song, L.-J. & Qin, X.-Y. (2014) Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 749–758.
- Like, A.A. & Rossini, A.A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science (New York, N.Y.)*, **193**, 415–417.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T. & Atamas, S.P. (2012) Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *Journal of Leukocyte Biology*, **92**, 753–764.
- Luzina, I.G., Lockett, V., Todd, N.W., Highsmith, K., Keegan, A.D., Hasday, J.D., *et al.* (2011) Alternatively spliced variants of interleukin-4 promote inflammation differentially. *Journal of Leukocyte Biology*, **89**, 763–770.
- Madden, K.B., Whitman, L., Sullivan, C., Gause, W.C., Urban, J.F., Katona, I.M., *et al.* (2002) Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **169**, 4417–4422.
- Makino, S., Kunitomo, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. & Tochino, Y. (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu. Experimental Animals*, **29**, 1–13.
- Malek, T.R. (2008) The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, **26**, 453–479.
- Malek, T.R. & Castro, I. (2010) Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, **33**, 153–165.

- Maloy, K.J. & Powrie, F. (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, **474**, 298–306.
- Mandke, R. & Singh, J. (2012) Cationic Nanomicelles for Delivery of Plasmids Encoding Interleukin-4 and Interleukin-10 for Prevention of Autoimmune Diabetes in Mice. *Pharmaceutical Research*, **29**, 883–897.
- Mantis, N.J., Rol, N. & Corthésy, B. (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, **4**, 603–611.
- Meeusen, E.N. (2011) Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. *Vaccine*, **29**, 8506–8511.
- Mercenier, A., Müller-Alouf, H. & Grangette, C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Current Issues in Molecular Biology*, **2**, 17–25.
- Mishra, P.K., Patel, N., Wu, W., Bleich, D. & Gause, W.C. (2013) Prevention of type 1 diabetes through infection with an intestinal nematode parasite requires IL-10 in the absence of a Th2-type response. *Mucosal Immunology*, **6**, 297–308.
- Moore, K.W., Waal Malefyt, R. de, Coffman, R.L. & O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, **19**, 683–765.
- Müller, A., Schott-Ohly, P., Dohle, C. & Gleichmann, H. (2002) Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology*, **205**, 35–50.
- Mulligan, M.S., Jones, M.L., Vaporciyan, A.A., Howard, M.C. & Ward, P.A. (1993) Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **151**, 5666–5674.
- Murata, M., Takahashi, A., Saito, I. & Kawanishi, S. (1999) Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 881–887.
- Opal, S.M. & DePalo, V.A. (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, **117**, 1162–1172.
- Osada, Y., Yamada, S., Nabeshima, A., Yamagishi, Y., Ishiwata, K., Nakae, S., *et al.* (2013) Heligmosomoides polygyrus infection reduces severity of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. *Experimental Parasitology*, **135**, 388–396.
- Padgett, L.E., Broniowska, K.A., Hansen, P.A., Corbett, J.A. & Tse, H.M. (2013) The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1281**, 16–35.
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K.O., Pizarro, T.T. & Cominelli, F. (2010) Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 454–459.

- Paik, S.G., Fleischer, N. & Shin, S.I. (1980) Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 6129–6133.
- Papaccio, G. (1993) Gangliosides prevent insulinitis but not islet B cell destruction in low-dose streptozotocin-treated mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **19**, 9–15.
- Papaccio, G., Pisanti, F.A., Montefiano, R.D., Graziano, A. & Latronico, M.V. (2002) Th1 and Th2 cytokines exert regulatory effects upon islet microvascular areas in the NOD mouse. *Journal of Cellular Biochemistry*, **86**, 651–664.
- Park, L., Lee, E., Lee, S., Lim, M., Hong, H., Shin, G., *et al.* (2008) TGFbeta plasmid construction and delivery for the prevention of type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1150**, 177–182.
- Pearson, J.A., Wong, F.S. & Wen, L. (2016) The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*, **66**, 76–88.
- Pennline, K.J., Roque-Gaffney, E. & Monahan, M. (1994) Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **71**, 169–175.
- Pérol, L., Lindner, J.M., Caudana, P., Nunez, N.G., Baeyens, A., Valle, A., *et al.* (2016) Loss of immune tolerance to IL-2 in type 1 diabetes. *Nature Communications*, **7**, 13027.
- Pesu, M., Watford, W.T., Wei, L., Xu, L., Fuss, I., Strober, W., *et al.* (2008) T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*, **455**, 246–250.
- Pieper, A.A., Verma, A., Zhang, J. & Snyder, S.H. (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacological Sciences*, **20**, 171–181.
- Pontes, D., Innocentin, S., Carmen, S. del, Almeida, J.F., LeBlanc, J.-G., Moreno de LeBlanc, A. de, *et al.* (2012) Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, **7**, e44892.
- Pontes, D.S., Azevedo, M.S.P. de, Chatel, J.-M., Langella, P., Azevedo, V. & Miyoshi, A. (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expression and Purification*, **79**, 165–175.
- Powrie, F., Menon, S. & Coffman, R.L. (1993) Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *European Journal of Immunology*, **23**, 2223–2229.
- Que, Y.A., François, P., Haefliger, J.A., Entenza, J.M., Vaudaux, P. & Moreillon, P. (2001) Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infection and Immunity*, **69**, 6296–6302.
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Sorensen, O., Bleackley, R.C., Power, R.F. & Rajotte,

- R.V. (1995) Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. Analysis of cytokine mRNA expression in the graft. *Transplantation*, **60**, 368–374.
- Rapoport, M.J., Jaramillo, A., Zipris, D., Lazarus, A.H., Serreze, D.V., Leiter, E.H., *et al.* (1993) Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**, 87–99.
- Reed, J.C. & Herold, K.C. (2015) Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM. *Nature Reviews Endocrinology*, **11**, 308–314.
- Rossini, A.A., Like, A.A., Chick, W.L., Appel, M.C. & Cahill, G.F. (1977) Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 2485–2489.
- Rott, O., Fleischer, B. & Cash, E. (1994) Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *European Journal of Immunology*, **24**, 1434–1440.
- Schoen, C., Stritzker, J., Goebel, W. & Pilgrim, S. (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *International Journal of Medical Microbiology*, **294**, 319–335.
- Silva, A.J. da, Zangirolami, T.C., Novo-Mansur, M.T.M., Giordano, R. de C. & Martins, E.A.L. (2014) Live bacterial vaccine vectors: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, **45**, 1117–1129.
- Simmons, K.M., Gottlieb, P.A. & Michels, A.W. (2016) Immune Intervention and Preservation of Pancreatic Beta Cell Function in Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, **16**.
- Simmons, K.M. & Michels, A.W. (2015) Type 1 diabetes: A predictable disease. *World Journal of Diabetes*, **6**, 380–390.
- Soomro, A.H., Masud, T. & Kiran Anwaar. (2002) Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1**, 20–24.
- Souza, B.M., Preisser, T.M., Pereira, V.B., Zurita-Turk, M., Castro, C.P. de, Cunha, V.P. da, *et al.* (2016) *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microbial Cell Factories*, **15**.
- Spinas, G.A. (1999) The Dual Role of Nitric Oxide in Islet beta-Cells. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, **14**, 49–54.
- Tang, Q., Adams, J.Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., *et al.* (2008) Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*, **28**, 687–697.
- Thomas, H.E., Darwiche, R., Corbett, J.A. & Kay, T.W.H. (2002) Interleukin-1 Plus γ -

Interferon-Induced Pancreatic β -Cell Dysfunction Is Mediated by β -Cell Nitric Oxide Production. *Diabetes*, **51**, 311–316.

Tian, G., Li, J.-L., Wang, D.-G. & Zhou, D. (2014) Targeting IL-10 in Auto-immune Diseases. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **70**, 37–49.

Tsai, Y.-T., Cheng, P.-C. & Pan, T.-M. (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **96**, 853–862.

Vaarala, O., Atkinson, M.A. & Neu, J. (2008) The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Diabetes*, **57**, 2555–2562.

Van Belle, T.L., Coppieters, K.T. & Von Herrath, M.G. (2011) Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews*, **91**, 79–118.

Vannier, E., Miller, L.C. & Dinarello, C.A. (1992) Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 4076–4080.

Vincenz, L., Szegezdi, E., Jäger, R., Holohan, C., O’Brien, T. & Samali, A. (2011) Cytokine-Induced β -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus.

Waldron-Lynch, F. & Herold, K.C. (2011) Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic β -cell function in type 1 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**, 439–452.

Wällberg, M. & Cooke, A. (2013) Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in Immunology*, **34**, 583–591.

Wells, J.M. & Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 349–362.

Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., *et al.* (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, **455**, 1109–1113.

Wood, S.C., Rao, T.D. & Frey, A.B. (1999) Multidose Streptozotocin Induction of Diabetes in BALB/cBy Mice Induces a T Cell Proliferation Defect in Thymocytes Which Is Reversible by Interleukin-4. *Cellular Immunology*, **192**, 1–12.

World Health Organization (Ed.). (2016) *Global report on diabetes*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wu, J. & Yan, L.-J. (2015) Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, **8**, 181–188.

- Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2015) Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 2967–2977.
- Xu, A., Zhu, W., Li, T., Li, X., Cheng, J., Li, C., *et al.* (2015) Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice. *Molecular Medicine Reports*.
- Yaochite, J.N.U., Caliar-Oliveira, C., Davanso, M.R., Carlos, D., Malmegrim, K.C.R., Cardoso, C.R. de B., *et al.* (2013) Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology*, **218**, 338–352.
- Zaccardi, F., Webb, D.R., Yates, T. & Davies, M.J. (2016) Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*, **92**, 63–69.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H. & Lenardo, M.J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*, **377**, 348–351.
- Zhou, T., Edwards, C.K., Yang, P., Wang, Z., Bluethmann, H. & Mountz, J.D. (1996) Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in lpr mice lacking tumor necrosis factor receptor I. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **156**, 2661–2665.
- Zhou, X., Kong, N., Zou, H., Brand, D., Li, X., Liu, Z., *et al.* (2011) Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, **44**, 43–50.
- Zhu, Y., Zhang, Y. & Li, Y. (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**, 597–610.
- Zurita-Turk, M., Del Carmen, S., Santos, A.C., Pereira, V.B., Cara, D.C., Leclercq, S.Y., *et al.* (2014) *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC biotechnology*, **14**, 73.