

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Mariana Camila Gonçalves Miranda Waldetário

**ALTERAÇÕES NA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS NOD
PRECEDEM O DESENVOLVIMENTO DA DIABETES TIPO 1**

Belo Horizonte
2019

Mariana Camila Gonçalves Miranda Waldetário

**ALTERAÇÕES NA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS NOD
PRECEDEM O DESENVOLVIMENTO DA DIABETES TIPO 1**

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

Orientadora: Prof. Dr. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Pires de oliveira

Belo Horizonte
2019

043

Waldetario, Mariana Camila Goncalves Miranda.

Alterações na mucosa intestinal de camundongos NOD precedem o desenvolvimento da diabetes tipo 1 [manuscrito] / Mariana Camila Goncalves Miranda Waldetario. – 2019. 121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ana Maria Caetano de Faria. Co-orientador: Rafael Machado Rezende.

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

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Diabetes Mellitus Tipo 1. 3. Mucosa Intestinal. 4. Imunoglobulina A Secretora. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA CAMILA GONÇALVES MIRANDA. Aos dezessete dias do mês de junho de 2019 às 09.00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Alterações na mucosa intestinal de camundongos NOD precedem o início da diabetes tipo """, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rafael Pires de Oliveira - Coorientador (Instituto Federal do Paraná), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Alessandra Filardy (Universidade Federal do RJ), aprovada; Dr. Denise Moraes da Fonseca (USP - SP), aprovada; Dr. Daniela Carlos Sartori (USP - Ribeirão Preto), aprovada; Dr. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de junho de 2019.

Dr. Rafael Pires de Oliveira - Coorientador (Instituto Federal do Paraná) *Rafael Pires de Oliveira*

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG) *Luis Henrique Franco*

Dr. Alessandra Filardy (Universidade Federal do RJ) *Alessandra Almeida Filardy*

Dr. Denise Moraes da Fonseca (USP - SP) *Denise Moraes da Fonseca*

Dr. Daniela Carlos Sartori (USP - Ribeirão Preto) *Daniela Sartori*

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

Aos meus pais José Antônio e Maria Gonçalves, dedico.

Agradecimentos

Agradeço imensamente à minha Professora e Orientadora Ana Maria Caetano de Faria, que me mostrou como é bom pesquisar e conhecer um pouco do que ainda é desconhecido. Muito obrigada por me ajudar a ser cada vez melhor, e me inspirar todos os dias com a sua dedicação e amor pela ciência. Agradeço a sua confiança, o carinho, os conselhos para a vida e todo o aprendizado que veio de discussões científicas de alto nível sou muito grata por todos estes anos que tive o prazer de ser sua aluna. Agradeço aos Coorientadores, Rafael Pires e Thais Garcias, que participaram dos primeiros passos da minha vida científica. Obrigada por todos os ensinamentos conselhos e amizade, mesmo à distância vocês sempre estiveram muito próximos. Sou grata a dedicação e o empenho de vocês.

Agradeço à Professora Tatiani Maiolli, sou grata por tudo que aprendi com você na bancada, pelos conselhos, discussões científicas e principalmente pela amizade. Você um exemplo de como é ser um profissional excelente e um ser humano maravilhoso. sua bondade me encanta! Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Imunologia, por participarem da construção deste trabalho em cada momento. E pelas amizades que vou levar para a vida toda.

Em especial, à Sarah pelo companheirismo pela amizade e pela força em todos os momentos. À Lícia amiga dedicada com quem posso sempre contar e o Gabriel, que também faz parte disso tudo, já estava na bancada antes de nascer. À Nat sempre amiga, prestativa e organizada. Além de grandes presentes na minha vida, vocês foram companheiras nas madrugadas, nos finais de semana e feriados de experimento. Aqueles experimentos enormes que eu sempre resolvia fazer da noite para o dia, e vocês sempre compraram a ideia! Muito obrigada!

Agradeço a Mini-Mari, Luísa, Mauro, Patrícia, Helder, Juliana, Dantas, Henrique, Carol, Camila que tornaram os dias de trabalho ainda mais agradável e divertido!
Agradeço a Professora Daniela Carlos, que contribuiu imensamente com este trabalho, me recebendo em seu laboratório. Obrigada pelas discussões Dani, aprendi muito com você.
Agradeço ao Professor Enio Ferreira pelo auxílio nos experimentos com IHQ, e à Professora Denise Carmona, sempre receptiva e disposta a ajudar.

Agradeço ao meu marido querido, Tácio, por toda dedicação e o amor, esse trabalho também é seu! Você esteve presente em todos os momentos e foi essencial em tudo, sou extremamente grata por você existir na minha vida!

Agradeço a Minha família, minha base, por ser a minha força diária, em especial a Minha mãe por todo amor e dedicação, você é meu exemplo de mulher e força, Ao meu pai por ser tão bom e maravilhoso obrigada por me ajudarem a ser uma pessoa melhor todos os dias.

E o mais importante, agradeço à **Deus** por permitir que tudo fosse possível!

Resumo

Alterações na composição da microbiota intestinal têm sido associadas ao desenvolvimento de diabetes tipo 1 (DM1), entretanto pouco se sabe sobre as alterações na homeostase intestinal que poderiam contribuir para o desencadeamento e patogênese da doença. Neste estudo, analisamos a indução de tolerância oral, os componentes da barreira intestinal, a microbiota fecal e os fenótipos de células imunes em camundongos *non-obese diabetic* (NOD) durante a progressão da doença em comparação com camundongos *non-obese diabetic resistant* (NOR). Camundongos NOD não desenvolveram tolerância oral e apresentaram defeitos em vários mecanismos protetores/reguladores da mucosa intestinal, incluindo diminuição do número de células caliciformes, diminuição da produção de muco e níveis mais baixos de IgA secretora total ligada a bactérias, bem como um perfil alterado de linfócitos intraepiteliais (IEL). Esses distúrbios correlacionaram-se com a translocação de bactérias para o nódulo linfático pancreático, possivelmente contribuindo para o início do DM1. A composição da microbiota fecal também estava alterada em camundongos NOD jovens e o aleitamento de camundongos NOD por mães adotivas NOR corrigiu seu defeito na produção de muco, indicando um papel da microbiota na disfunção da barreira intestinal de camundongos NOD. Além disso, camundongos NOD apresentaram uma redução de células dendríticas CD103⁺ (DCs) nos linfonodos mesentéricos (MLNs), juntamente com um aumento de células Th17 efectoras e células linfoides inatas tipo 3 (ILC3), bem como uma diminuição de células Th2, ILC2 e células T reguladoras (Treg) no intestino delgado. É importante ressaltar que a maioria dessas alterações intestinais precedeu o início da insulite sugerindo que essas alterações podem estar envolvidos nos eventos precoces que desencadeiam a doença. Distúrbios na mucosa intestinal de camundongos NOD podem potencialmente interferir no desenvolvimento de DM1 devido à estreita relação entre o intestino e o pâncreas. A compreensão dessas alterações precoces é importante para o planejamento de novas estratégias terapêuticas para prevenção de DM1.

Palavras-chave: diabetes tipo 1; mucosa intestinal; IgA secretora; ILCs; tolerância oral.

Abstract

Alterations in the composition of the intestinal microbiota have been associated with development of type 1 diabetes (DM1), but little is known about changes in intestinal homeostasis that contribute to development and disease pathogenesis. In this study we analyzed oral tolerance induction, components of the intestinal barrier, fecal microbiota and immune cell phenotypes in non-obese diabetic (NOD) mice during disease progression compared to non-obese diabetes resistant (NOR) mice. NOD mice failed to develop oral tolerance and had defective protective/regulatory mechanisms in the intestinal mucosa, including decreased numbers of goblet cells, diminished mucus production, and lower levels of total and bacteria-bound secretory IgA, as well as an altered IEL profile. These disturbances correlated with bacteria translocation to the pancreatic lymph node possibly contributing to DM1 onset. The composition of the fecal microbiota was altered in young NOD mice, and cross-fostering of NOD mice by NOR mothers corrected their defect in mucus production, indicating a role for NOD microbiota in gut barrier dysfunction. NOD mice had a reduction of CD103⁺ dendritic cells (DCs) in the MLNs, together with an increase of effector Th17 cells and ILC3, as well as a decrease of Th2 cells, ILC2 and Treg cells in the small intestine. Importantly, most of these gut alterations precede the onset of insulinitis suggesting that these changes may be involved in the early events that trigger the disease. Disorders in the intestinal mucosa of NOD mice can potentially interfere with the development of DM1 due to the close relationship between the gut and the pancreas. Understanding these early alterations is important for the design of novel therapeutic strategies for DM1 prevention.

Key words: type-1 diabetes; gut mucosa; secretory IgA; ILCs; oral tolerance.

Lista de abreviaturas

Al(OH)₃ - hidróxido de alumínio
APC - célula apresentadora de antígeno
BB - ratos *Bio-breeding*
BSA- albumina bovina sérica
CD - cluster of differentiation
cDC - células dendríticas convencionais
cm - centímetros
Cy - CyChrome
DTPA - diethylentriamine pentaacetate
DTT - dihidrotreitol
EAE - Encefalomielite autoimune experimental
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA - ensaio de absorção imunoenzimático
FACs - fluorescence activated cell sorting
FITC - isotiocianato de fluoresceína
FMO - *Fluorescence minus one*
Foxp3 - Fator de transcrição forkhead box p3
GAD - descarboxilase do ácido glutâmico
GALT - gut associated lymphoid tissue
GLUT2 - transportador de glicose 2
GVHD - graft-versus-host disease
H&E - hematoxilina & eosina
H₂O - água
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HBSS - Hank's balanced salt solution
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA - Human leukocyte antigen
Hsp - heat shock protein - proteína de choque térmico
i.p. - Intraperitoneal
IDDM - *insulin dependente diabetes mellitus*.
IEC - células do epitélio intestinal
IEL - linfócito intraepitelial
IFN - interferon
Ig - imunoglobulina
IHQ - Imuno-histoquímica
IL - interleucina
ILC - Innate lymphoid cells
IMF - intensidade média de fluorescência
LAP - latency associated peptide
LNC - Linfonodo cecal
LNM - linfonodo mesentérico
LPD - *Lamina propria* do intestino delgado
LPS - lipopolissacarídeo
MBq - megaBecquerel
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
Mm - milímetro
MUC - mucina

NF-KB - fator nuclear Kappa B
NLR- NOD like receptors
NOD - Non Obese Diabetic
NOR - Non Obese Resistant
OPD - Ortofenileno-diamino
OVA - ovalbumina
PBS - tampão salina fosfato
PE - ficoeritrina
PGE2 - prostaglandina E2
pH - potencial hidrogeniônico
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride
PP - Placa de Peyer
PRR - receptor de reconhecimento padrão
RPM - rotações por minuto
SFB - Segmented filamentous bacteria
SIgA - imunoglobulina A secretória
SPF - specific pathogen free
STZ - estreptozotocina
Tc - T citotóxica
TCR - receptor de células T
TGFβ - transforming growth factor beta
DM1 – Diabetes Melitus tipo 1
Th - T helper
TLR - receptor do tipo Toll
pTreg - célula T reguladora periférica

Lista de Figuras

Figura 1 - Células epiteliais do intestino formando uma interface física e química entre comunidades microbianas no lúmen e o tecido linfoide associado à mucosa (GALT).	19
Figura 2 - Função da IgA secretória.....	23
Figura 3: Subtipos de células T CD4 efetoras.....	26
Figura 4 - Origem embrionária do pâncreas junto ao duodeno primitivo.....	32
Figura 5 - Patogênese do diabetes mellitus tipo 1.....	34
Figura 6: Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (IEL) no epitélio do intestino delgado.....	50
Figura 7: Imunofenotipagem de plasmócitos produtores de IgA na <i>lamina propria</i> do intestino delgado e Placas de Peyer	50
Figura 8: Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ e ILCs na <i>lamina propria</i> do intestino delgado.....	51
Figura 9: Imunofenotipagem de células dendríticas das placas de Peyer, da lâmina própria e do baço.....	51
Figura 10: Análise das bactérias da microbiota ligadas à SIgA.....	52
Figura 11: Incidência de diabetes em camundongos NOD e NOR.....	54
Figura 12. Análise histopatológica do Pâncreas	55
Figura 13: Concentração de citocinas no extrato do pâncreas de camundongos NOD e NOR.	56
Figura 14: Fotografia dos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD após a gavagem com azeite de oliva.....	57
Figura 15. Produção de muco em camundongos NOD e NOR.....	58
Figura 16: Avaliação da expressão das proteínas MUC2 e MUC1 na mucosa intestinal de camundongos NOR e NOD	60
Figura 17: Concentração de IgA secretória (SIgA) no lúmen do intestino de camundongos NOD e NOR.	61
Figura 18: Plasmócitos produtores de IgA na mucosa intestinal de camundongos NOD e NOR.....	62
Figura 19: Avaliação das bactérias IgA+da microbiota do intestino delgado e cólon de camundongos NOR e NOD.....	63
Figura 20: Translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos	64
Figura 21: Abundância dos filamentos da microbiota intestinal no intestino delgado e PLNs de camundongos NOD e NOR.....	65
Figura 22: Abundância relativa de espécies da microbiota intestinal	67
Figura 23: Influência da microbiota intestinal na produção de muco em camundongos NOD.	68
Figura 24: Contagem total de células extraídas do epitélio do intestino delgado de camundongos NOD e NOR. O intestino delgado foi incubado com DTT (Ditiotreitol), para e remoção das células epiteliais, em seguida, os linfócitos foram separados usando Percoll em diferentes gradientes de concentração.....	70
Figura 25 - Frequência de IEL no intestino delgado de camundongos NOD e NOR.	71
Figura 26: Contagem total de células extraídas da lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.	72
Figura 27: Populações de células linfoides inatas (ILCs) na <i>lamina propria</i> do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.....	73
Figura 28 : Populações de células T CD4 na <i>lamina propria</i> do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.	75

Figura 29: Concentração de citocinas na mucosa intestinal de camundongos NOD e NOR...	76
Figura 30: Contagem total de células extraídas dos linfonodos mesentéricos que drenam segmentos diferentes do intestino de camundongos NOD e NOR.	77
Figura 31: Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o duodeno de camundongos NOD e NOR.	79
Figura 32 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o jejuno de camundongos NOD e NOR.	81
Figura 33 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o íleo de camundongos NOD e NOR.	83
Figura 34 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o cecum de camundongos NOD e NOR.....	85
Figura 35: Análise da frequência de células T reguladoras CD4+ Foxp3+ nos linfonodos mesentéricos e cecal.....	87
Figura 36: Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD	89

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Populações de células dendríticas convencionais na mucosa intestinal.....	30
Tabela 2 - Primers	47
Tabela 3 - Presença de E.colli nos linfonodos pancreáticos (PLNs).....	66

Sumário

1. Justificativa	15
2. Estado da Arte	18
2.1. A mucosa Intestinal e a importância da estimulação antigênica	18
2.2. A Tolerância oral e Suas Aplicações	27
2.3. Células apresentadoras de antígenos na mucosa intestinal	29
2.3. Diabetes Autoimune.....	32
2.3.1. Patogênese e Componentes Genéticos	32
2.3.2. A influência da microbiota no diabetes tipo 1	35
2.3.3. Camundongos NOD, um modelo experimental valioso de diabetes autoimune	36
2.3.4. A conexão pâncreas e intestino	39
3. Objetivos	40
3.1. Objetivo Geral.....	40
3.2. Objetivos Específicos.....	40
4. Material e Métodos	42
4.1. Animais	42
4.2. Avaliação da Incidência de Diabetes Autoimune	42
4.3. Obtenção das Amostras.....	42
4.4. Coleta do Conteúdo Intestinal.....	43
4.5. Lâminas Histológicas	43
4.5.1. Avaliação Histopatológica do Pâncreas	43
4.5.2. Avaliação da produção de muco do Intestino Delgado e Cólon	43
4.6. Ensaio de Imuno-histoquímica.....	44
4.8. Tratamento para Indução de Tolerância Oral.....	44
4.9. Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA).....	45
4.10. Extração de DNA para avaliação da microbiota intestinal	46
4.11. Obtenção de Suspensões Celulares dos Órgãos Linfoides.....	47
4.11. Obtenção de Células da Lâmina Própria Intestinal	48
4.12. Citometria de Fluxo	48
4.12.1. Imunofenotipagem	48
4.12.2. Estratégias de Determinação das Populações de Interesse.....	49
4.12.3. Ensaio de IgA ligada a bactérias da microbiota	51

4.13. Modelo de aleitamento cruzado (<i>cross-fostering</i>).....	52
4.14. Análises Estatísticas	52
5. Resultados	53
5.1. Os pâncreas de camundongos NOD apresentam infiltrado inflamatório progressivo durante o desenvolvimento do Diabetes Tipo 1.....	53
5.2. Camundongos NOD apresentavam defeitos na barreira intestinal antes do desenvolvimento da insulite.....	56
5.3. Camundongos NOD apresentavam translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos e alterações na microbiota antes do desenvolvimento da insulite	63
5.4. Camundongos NOD apresentavam alterações nos linfócitos intra-epiteliais (IEL) nas células linfoides inatas (ILCs) e nos linfócitos T CD4+ efetores na lâmina própria do intestino	69
5.5. Camundongos NOD apresentavam alterações nas células dendríticas nos linfonodos mesentéricos antes do desenvolvimento da insulite.....	77
5.6. Camundongos NOD apresentavam redução na frequência de células T reguladoras e resistência à indução de tolerância oral a uma proteína da dieta antes do desenvolvimento da insulite.....	86
6. Discussão	90
7. Conclusão.....	100
8. Referências.....	101
8. Anexos	122

1. Justificativa

A Diabetes tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune na qual ocorre destruição das células beta pancreáticas pela atividade desregulada de linfócitos autorreativos. A perda gradual das células produtoras de insulina resulta em níveis de glicose elevados com consequências patológicas graves. A DM1 constitui a principal causa de amputação de membros inferiores, insuficiência renal e cegueira entre adultos, assim como de doenças cardiovasculares. O tratamento atual para a diabetes tipo 1 é baseado na reposição exógena de insulina. Entretanto, complicações agudas e secundárias ainda são inevitáveis e provocam impedimentos na qualidade de vida e a necessidade constante e crescente de monitoramento da glicemia e de cuidados médicos à medida que a doença progride (Gale 2005; Diretrizes SBD 2015).

A etiologia do DM1 relaciona-se com a perda da tolerância central aos autocomponentes (Kantárová and Buc 2007). A tolerância imunológica foi definida como o conjunto de mecanismos pelos quais o sistema imune controla a auto-reatividade de modo a evitar o desenvolvimento de respostas imunes inflamatórias contra os autocomponentes através da eliminação de linfócitos T autorreativos com alta afinidade e da formação de linfócitos T reguladores ($CD4^+CD25^+ Foxp3^+$) autorreativos no timo (Klein et al. 2014). A autoimunidade surge de falhas nesse processo. Em diabéticos, são encontrados linfócitos T inflamatórios reativos a antígenos do pâncreas como insulina e GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) (Haskins and Cooke 2011). Acredita-se que essas alterações podem estar relacionados a uma ligação ineficiente de peptídeos de autocomponentes ao MHC presente em células apresentadoras de antígeno presentes no timo (Kishimoto and Sprent 2001). De fato, alguns genes do HLA são altamente relacionados à predisposição a diabetes, como o HLA DR3-DQ2 enquanto que os alelos DR4-DQ8 são protetores. Esses alelos são responsáveis por 50% da predisposição genética a DM1 (Kantárová and Buc 2007). Além disso, falhas no processo de regulação da inflamação durante a progressão da doença são altamente discutidos evidenciando o papel das células reguladoras (Treg) $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ (Shao et al. 2012; Bluestone and Tang 2005).

A incidência de diabetes tem aumentado consideravelmente nos últimos 30 anos e esse aumento só pode ser explicado por fatores ambientais e alterações no estilo de vida (Rewers and Ludvigsson 2016). De fato, apesar da forte pressão dos fatores genéticos, os fatores ambientais moldam o desenvolvimento da diabetes e podem funcionar como gatilhos de

desenvolvimento ou proteção da doença. Infecções virais, componentes alimentares, tempo de aleitamento materno e alterações na composição da microbiota são frequentemente relacionados ao desenvolvimento da diabetes tipo 1 (Rewers and Ludvigsson 2016).

A área de contato com estímulos ambientais mais importante do corpo é a mucosa intestinal. Além de compreender a maior área de superfície do corpo, essa mucosa é constantemente exposta a uma vasta gama de agentes externos, como antígenos alimentares e microbiota. Assim, o epitélio intestinal e o tecido linfóide associado à mucosa devem discriminar entre organismos patogênicos e não-patogênicos mantendo-se capazes de responder rapidamente de maneira protetora e tolerogênica ao mesmo tempo. A falha na adaptação da mucosa intestinal para lidar com esses desafios diários e dicotômicas representados pela estimulação antigênica pode levar ao desenvolvimento de uma variedade de doenças alérgicas e autoimunes. (Robert et al. 2014) A organização do tecido linfóide associado à mucosa intestinal bem como a integridade da barreira de células epiteliais são essenciais para a manutenção da homeostase do organismo e o estabelecimento da tolerância oral (A. M. I. Mowat 2003; A. M. C. Faria, Reis, and Mucida 2017; Reis and Mucida 2012). As células epiteliais intestinais regulam a homeostase imunológica local e sistêmica através de interações físicas e bioquímicas com as células do sistema imune inato e adaptativo (Hooper and MacPherson 2010).

O pâncreas tem origem embrionária a partir do endoderma, como o restante do trato gastrointestinal, a partir de duas evaginações, dorsal e ventral, do duodeno primitivo que, ao se fundirem, originam um órgão único formado por uma complexa rede de canais com funções exócrinas e endócrinas relacionadas à digestão (Oriá et al. 2016). O pâncreas adulto é um órgão heterogêneo formado por dois tipos celulares, o compartimento exócrino das células acinares e ductais e o compartimento endócrino, constituído por células localizadas nas ilhotas de Langerhans. As ilhotas de Langerhans, produtoras de hormônios-chave para a regulação dos níveis de glicose no sangue, são constituídas por quatro tipos de células diferentes: células β produtoras de insulina; células α produtoras de glucagon; células δ produtoras de somatostatina e células P produtoras de polipeptídeo pancreático. Essa origem comum com o duodeno assegura uma estreita conexão pâncreas-intestino. Além disto, os vasos linfáticos intestinais, compartilhados pelo pâncreas, formam uma rota física para antígenos e células da mucosa intestinal que se encontram com antígenos próprios nos linfonodos pancreáticos-duodenais (Turley et al. 2005). Desta forma, é razoável pensar que perturbações na mucosa intestinal podem interferir no curso diabetes tipo 1 assim como podem desencadear o início da doença.

De fato, uma inflamação subclínica do intestino e defeitos no funcionamento de APCs e na geração de Tregs têm sido observados no intestino de camundongos e pacientes diabéticos (Alam et al. 2010; Badami et al. 2011; Outi Vaarala 2011). Sabemos que modificações na dieta ou na microbiota têm efeitos positivos no curso da doença (Knip and Siljander 2016). Recentemente, um estudo com indivíduos diabéticos demonstrou que alterações intestinais relacionadas à função das células epiteliais do intestino e a alterações nas populações de linfócitos inatos (ILCs) estão fortemente ligados ao desenvolvimento da doença (Graves et al. 2017). Nossa hipótese de trabalho é que desordens causadas por defeitos em elementos chave no controle da homeostase intestinal podem impactar diretamente no início da diabetes tipo 1 funcionando como um gatilho para a reatividade inflamatória autoimune no pâncreas. Entender as alterações que precedem o desenvolvimento espontâneo da diabetes tipo 1 é um importante passo para o delineamento de novas estratégias terapêuticas que permitam reequilibrar os fenômenos imunológicos envolvidos na sua origem e fisiopatologia.

2. Estado da Arte

2.1. A mucosa Intestinal e a importância da estimulação antigênica

O intestino forma um longo e contínuo tubo que vai da boca ao ânus. Os diferentes segmentos intestinais apresentam diferenças morfológicas que podem ser observadas em análise histológica ao microscópio. Enquanto o intestino delgado é caracterizado pela presença de projeções do epitélio chamadas vilosidades, essas projeções estão ausentes no cólon (Allan M. Mowat and Agace 2014). Além disso, as populações de células epiteliais especializadas e os linfócitos associados ao epitélio estão presentes em proporções diferentes ao longo do intestino: enquanto que as células de Paneth e os linfócitos intraepiteliais (IEL) são mais abundantes no segmento proximal do intestino delgado, as células caliciformes se tornam progressivamente mais numerosas nas porções mais distais do intestino delgado e no cólon.

Sabe-se que a mucosa intestinal abriga mais células linfóides que todos os outros órgãos linfóides do corpo juntos. Dessa maneira, o intestino é cenário para uma série de processos e respostas imunes. (A. M. C. Faria, Reis, and Mucida 2017) O tecido linfóide associado a ela é denominado GALT, do inglês, *Gut associated lymphoid tissue*. O GALT constitui-se de uma variada coleção de células e folículos linfóides altamente organizados e distribuídos ao longo do intestino, é composto pelas placas de Peyer, folículos linfóides isolados e apêndice. Além disto, os sítios efetores linfóides da mucosa intestinal são compostos pelos linfócitos intraepiteliais (IEL) dispersos entre as células epiteliais e a lâmina própria que localiza-se abaixo do epitélio intestinal e é composta por células linfóides e mielóides tais como linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Os linfonodos mesentéricos e cecais, que drenam o intestino delgado e cólon respectivamente e também são sítios linfóides envolvidos nas respostas imunes induzidas na mucosa intestinal (Brandtzaeg et al. 2008).

Os linfonodos mesentéricos (mLN) que drenam o intestino são os maiores do corpo provavelmente como consequência da constante estimulação antigênica a que estão submetidos. Frequentemente, os mLN são designados como um linfonodo único que drena o intestino delgado em sua totalidade. Entretanto, o mLN é composto por linfonodos separados que drenam diferentes segmentos do intestino (Allan M. Mowat and Agace 2014). Desta forma, a resposta imune nesse local é altamente compartimentalizada com o direcionamento preferencial da resposta imune tolerogênica para os linfonodos que drenam as partes proximais do intestino e a geração de resposta inflamatória protetora para os linfonodos que drenam as porções distais

do intestino delgado (Esterhazy et al. 2019).

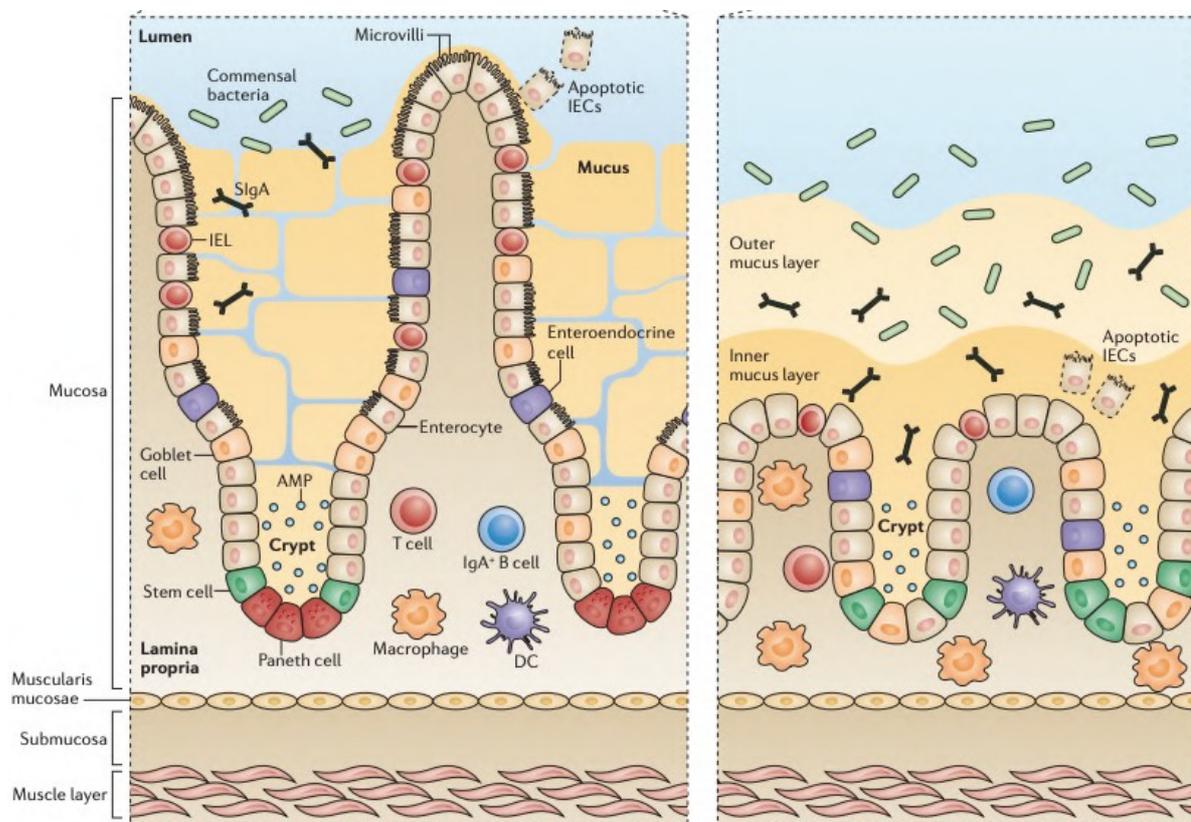


Figura 1 - Células epiteliais do intestino formando uma interface física e química entre comunidades microbianas no lúmen e o tecido linfóide associado à mucosa (GALT).

As células-tronco do epitélio intestinal controlam a renovação contínua da camada de células epiteliais. Células epiteliais diferenciadas, com a exceção das células de Paneth, migram para cima do eixo cripta-viloso. As células caliciformes secretam muco e as células de Paneth peptídeos antimicrobianos (AMPs). A produção local de IgA secretória (SIgA) contribui para a função de barreira do epitélio especializado da mucosa. Células M (*microfold*) e células caliciformes medeiam o transporte de antígenos luminiais e bactérias vivas através da barreira epitelial para as células dendríticas (DC) e macrófagos residentes do intestino. Além disso, as células dendríticas e macrófagos que expressam CX3CR1, receptor da quimiocina fractalina, podem emitir projeções através do epitélio intestinal e captar antígenos diretamente do lúmen (O Pabst and Mowat 2012; Niess 2005; Mazzini et al. 2014) (Adaptado de Peterson, 2014)

Estima-se que aproximadamente 30 kg de proteínas da dieta entram em contato com o intestino humano durante um ano e, em média, 190g dessas proteínas são absorvidas diariamente no intestino (Brandtzaeg 1998). Além disso, o intestino é constantemente estimulado por variados filamentos de bactérias que o colonizam (Y. K. Lee and Mazmanian 2010). A densidade de microrganismo é crescente ao longo do intestino, com maior densidade no cólon chegando à quantidade de 10^{11} bactérias por grama de fezes. (Sender, Fuchs, and Milo 2016)

O estímulo antígeno tanto das proteínas da dieta quanto da microbiota é fundamental

para a maturação e desenvolvimento do sistema imune. Camundongos *germ-free* que são animais mantidos em condições isentas de germes, possuem o tecido linfóide associado à mucosa pouco desenvolvido, níveis reduzidos de SIgA e baixos níveis séricos de anticorpos IgA e IgG (Macpherson and Harris 2004). De maneira similar, as proteínas da dieta também desempenham um papel importante no desenvolvimento do sistema imune. Camundongos adultos mantidos, desde o desmame, sob dieta livre de proteínas contendo apenas aminoácidos também apresentam alterações na maturação dos órgãos linfóides associados à mucosa similares àquelas observadas em camundongos isentos de germes. (da Silva Menezes et al. 2003; Paula-Silva et al. 2015).

Apesar da estimulação antigênica ser indispensável para a maturação do sistema imune, o contato dos antígenos na mucosa intestinal com as células do sistema imune presentes no intestino deve ocorrer de maneira controlada e organizada. A lâmina própria do intestino abriga uma grande diversidade de células do sistema imune, como mastócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, B e células linfóides inatas (ILCs). Essas células são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos, diferenciação celular, direcionamento da resposta imune e produção de anticorpos como imunoglobulina A (IgA) (Izcue, Coombes, and Powrie 2006; A. M. I. Mowat 2003; Olivares-Villagómez and Van Kaer 2018). Desta forma, existe uma rede de interações celulares, estruturas e compartimentos intestinais que criam um microambiente altamente adaptado para o contato dessas células com os antígenos externos levando à manutenção do ambiente tolerogênico local (A. M. C. Faria, Reis, and Mucida 2017).

2.1.1- Interface Imunológica: Como as células do sistema imune lidam com os antígenos do lúmen

Uma única camada de células epiteliais impede que a passagem de antígenos seja contínua através da mucosa intestinal. Essa função depende da integridade das proteínas das junções intraepiteliais que funcionam como barreira protetora do intestino.

As células do epitélio intestinal (IEC) são heterogêneas, a maioria são enterócitos absorptivos e adaptados para funções metabólicas. Outras são especializadas em funções específicas como células caliciformes, células de Paneth e células enteroendócrinas. A secreção de proteínas antimicrobianas e mucinas pelas células de Paneth e células caliciformes, respectivamente, estabelece uma barreira física que minimiza a exposição contínua a estímulos presentes no lúmen. (Crosnier, Stamataki, and Lewis 2006).

Sabemos que o epitélio intestinal e os componentes produzidos por ele desempenham papéis que vão além de uma simples barreira. As células epiteliais do intestino expressam receptores de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos e de dano celular (PAMPs e DAMPs) tais como TLR e NLR capazes de agir como sensores intestinais que, quando ativados, participam do direcionamento da resposta imune no intestino, levando à secreção de citocinas e à ativação ou recrutamento de células apresentadoras de antígenos e de linfócitos (Cario, Gerken, and Podolsky 2007). Além disso, a ativação desses receptores nas células epiteliais do intestino (IECs) tem um papel protetor que contribui para a manutenção da homeostase intestinal e para o reparo do epitélio pela indução de vários fatores e citocinas citoprotetoras como defensinas, mucinas, TGF- β , IL-1 β e IL-10 (Rakoff-Nahoum et al. 2004).

A camada de muco recobre todo o trato TGI localiza-se logo acima do epitélio e é composta por uma solução de glicoproteínas chamadas mucinas. As células caliciformes sintetizam e secretam a grande maioria das proteínas que compõem o muco intestinal, sendo que a mais abundante delas é a MUC2, que forma o esqueleto do muco do intestino (Pelaseyed et al. 2014). A importância da MUC2 fica evidenciada em camundongos deficientes nessa proteína que apresentam uma camada de muco intestinal desestruturada e o desenvolvimento progressivo de doença inflamatória intestinal (Van der Sluis et al. 2006). A camada de muco funciona como uma barreira física que limita o número de bactérias que pode entrar em contato direto com o epitélio intestinal e com as células da lâmina própria. Entretanto, seus mecanismos de proteção e contribuição para a homeostase intestinal vão além da capacidade de barreira. Foi demonstrado que a MUC2 pode levar a uma cascata de sinalização em células dendríticas no intestino induzindo a expressão de um perfil tolerogênico nessas células e direcionando assim o tipo de resposta imunológica a antígenos na mucosa intestinal (Shan et al. 2013). Outra mucina importante no intestino é a MUC 1. Esta mucina é uma proteína transmembrana mais expressa no estômago e pouco expressa no intestino em condições normais (Pelaseyed et al. 2014). Entretanto, seu nível de expressão aumenta durante a inflamação intestinal (Guang et al. 2010), o que indica um papel importante na fisiologia da inflamação. Já foi descrito que a MUC1 é capaz de bloquear a sinalização de TLR durante a inflamação intestinal (Kato, Lillehoj, and Kim 2014). Além disso, essa mucina transmembrana é capaz de modular a ativação de NF κ -B em diferentes contextos, inibindo-o ou ativando-o (Guang et al. 2010; Ahmad et al. 2007). Assim, seu papel na modulação da inflamação é altamente complexo.

Imersa na matriz de muco do intestino, estão as moléculas de imunoglobulina A, a principal classe de imunoglobulina na mucosa intestinal. Produzidas por plasmócitos na lâmina própria e translocadas para o lúmen através de um receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR

- *polymeric immunoglobulin receptor*) presente nas células epiteliais, a IgA secretória (SIgA) que se encontra diluída no muco está ligada a uma parte do receptor de Ig (componente secretor) que a protege da digestão enzimática no lúmen do intestino (Johansen and Kaetzel 2011),

Diversas citocinas incluindo TGF- β (*transforming growth factor beta*), IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6 são necessárias para promover a troca de classe e a maturação dos plasmócitos produtores de IgA (Brandtzaeg 1998; Oliver Pabst 2012). Após a captura e o processamento, as APCs podem apresentar os antígenos diretamente para células T nas placas de Peyer (PP) que auxiliam os linfócitos B presentes a se diferenciarem em células B IgA+. Após migração para os linfonodos mesentéricos, essas células ganham a circulação sistêmica e finalmente se alojam na lâmina própria do intestino onde se diferenciam em plasmócitos produtores de IgA (Allan M. Mowat and Agace 2014). Esse mecanismo é responsável pela indução de IgA dependente de células T (TD). No entanto, já foi demonstrado que a diferenciação de linfócitos B produtores de IgA pode ocorrer na lâmina própria do intestino de forma independente de células T (TI). Essas células seriam estimuladas diretamente por fatores como BAFF e APRIL produzidos por células dendríticas locais e se tornariam células B IgA+ e posteriormente plasmócitos produtores de IgA. As células B1 residentes na lâmina própria se diferenciam em IgA+ por esse mecanismo sendo responsáveis pela produção de 50% da SIgA presente no lúmen do intestino (Bunker et al. 2015; Macpherson et al. 2000).

Uma vez secretada, a IgA torna-se parte da matriz de muco e atua como um anticorpo neutralizante que se liga a toxinas e receptores de adesão de microrganismos presentes no lúmen. Ao contrário de outras classes de imunoglobulina, a IgA não estimula uma resposta efetora inflamatória e, por esse motivo, pode ser considerada uma imunoglobulina anti-inflamatória (Goll and van Beelen Granlund 2015; Oliver Pabst 2012).

A IgA secretória (SIgA) pode mediar a imunidade contra patógenos e contribuir para a homeostase intestinal. Defeitos na secreção dessa Ig estão relacionados a aumento na suscetibilidade à doenças inflamatórias intestinais, doença celíaca e alergia alimentar (Cunningham-Rundles 2001). Estudos em camundongos deficientes em AID (*activation-induced cytosine deaminase*) incapazes de realizar a mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgA, IgG ou IgE nos seus linfócitos B, mostraram que esses camundongos exibem hiperplasia linfoide do intestino e alteração na composição da microbiota, favorecendo assim o crescimento de classes específicas de bactérias (Suzuki et al., 2004).

A SIgA liga-se a distintos filos da microbiota prevenindo sua adesão ao epitélio e neutralizando patógenos podendo controlar, dessa maneira, a composição da microbiota comensal e sua interação com o hospedeiro (Sutherland and Fagarasan 2012; Bunker et al.

2015) Recentemente foi demonstrado que uma parte das moléculas de SIgA presente no intestino não são específica para um único táxon de bactérias, mas são polirreativas, com ampla reatividade a um subconjunto diversificado, porém definido, da microbiota comensal (Bunker et al. 2017). Esses anticorpos surgem em baixas frequências entre células B *naive* e são selecionadas no repertório de IgA após recirculação nas placas de Peyer. Esse processo de seleção acontece independentemente de antígenos da microbiota ou da dieta, sugerindo um mecanismo endógeno homeostático que induz a produção de IgA polirreativa com especificidade inata à microbiota (Bunker et al. 2017).

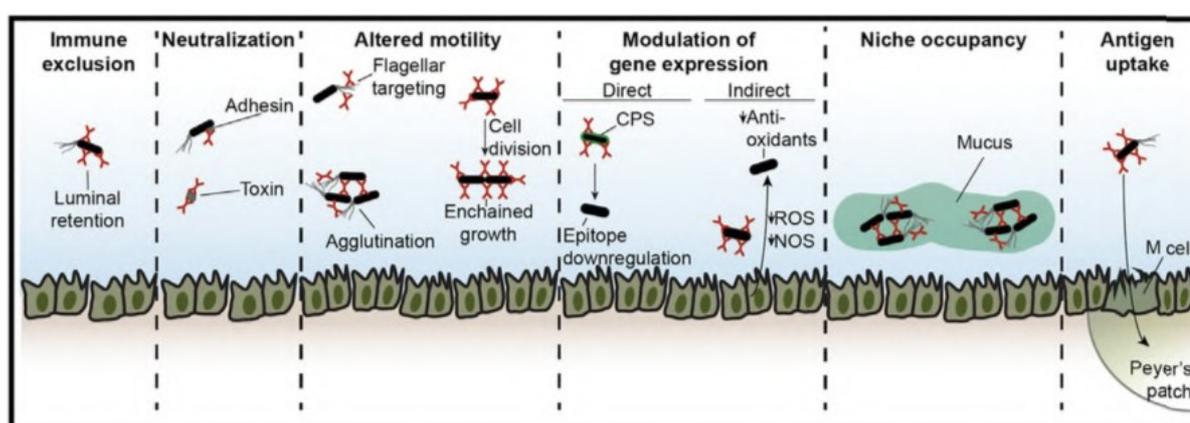


Figura 2 - Função da IgA secretória.

A Interação da SIgA com as bactérias comensais pode levar à exclusão imune, neutralização de toxinas, alteração da motilidade de bactérias, modulação da expressão gênica, induzir a ocupação de nichos específicos e aumentar a captação de antígenos. (Bunker and Bendelac 2018).

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) residem entre as células do epitélio intestinal. São aproximadamente 1 IEL para cada 10 IEC e a proporção é reduzida no cólon. Sua localização privilegiada garante proximidade imediata com antígenos do lúmen e, desta forma, os IEL são a primeira linha de defesa imune contra patógenos (Olivares-Villagómez and Van Kaer 2018). Eles são móveis e constantemente patrulham o espaço entre as células epiteliais acima da membrana basal. São rapidamente ativados, apresentam ação citotóxica em resposta a antígenos do lúmen e promovem uma resposta do tipo Th1 (Cheroutre, Lambolez, and Mucida 2011; McDonald, Jabri, and Bendelac 2018)

Os IEL são derivados de células T ativadas e expressam constitutivamente mediadores de adesão ao epitélio intestinal como CD103(αE β 7) que liga à E-caderina expressa pelos enterócitos. Constituem uma população heterogênea e podem ser classificados em “naturais”

ou “induzidos”. Os IEL naturais são ativados durante a seleção tímica na presença de antígenos próprios. No timo, eles adquirem $\alpha\beta$ e CCR9 que são moléculas de endereçamento ao intestino. Eles podem possuir o receptor de linfócito T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ e expressam CD8 na forma homodimérica (CD8 $\alpha\alpha$). Os IEL induzidos são derivados de linfócitos TCD4 ou TCD8 convencionais portando TCR $\alpha\beta$ que são ativados no GALT em resposta a antígenos da periferia. A ativação do linfócito T *naive* no contexto da mucosa leva à expressão de CCR9, receptor que direciona o linfócito para a lâmina própria do intestino delgado. CCR9 se liga à quimiocina CCL25 naturalmente expressa pelas células epiteliais do intestino. Os IEL induzidos são TCR $\alpha\beta$ +, expressam CD4 ou CD8 na forma heterodimérica (CD8 $\alpha\beta$). Além da citotoxicidade em resposta a antígenos do lúmen, outras funções conhecidas dos IEL são o reparo da barreira epitelial, o controle do crescimento e rotatividade das células epiteliais, o auxílio na indução de mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgA além de exercerem um papel ainda não esclarecido na tolerância oral dependente de IL-10 (Komano et al. 1995; Mengel et al. 1995; Shires, Theodoridis, and Hayday 2001).

2.1.2 Células linfoides inatas: ligação entre a resposta inata e adaptativa

As células linfoides inatas (ILCs) são células semelhantes a linfócitos que não expressam receptores de diversidade antigênica ou fazem rearranjo gênico como linfócitos B ou T. A descoberta dessas células, na última década, contribuiu para o nosso entendimento sobre os mecanismos de regulação da homeostase tecidual principalmente nas mucosas e pele, onde essas células são abundantes (Vivier et al. 2018) (Klose and Artis 2016). As ILCs parecem ser particularmente importantes na regulação das barreiras epiteliais e são classificadas em ILC1s, ILC2s e ILC3s. Suas funções são análogas àquelas das células T *helper* CD4⁺, Th1, Th2 e Th17 respectivamente (Klose and Artis 2016). Além disso, expressam receptores de citocinas como o receptor de IL-2 (CD25) e de IL-7 (CD127) (Spits and Cupedo 2012; Spits and Di Santo 2011).

As ILC1s expressam o fator de transcrição T-bet, produzem IFN- γ e TNF e são ativadas por IL-12 derivada de células dendríticas. Esse grupo de células inclui as células NK e ILC1s que atuam na resposta imune contra patógenos intracelulares como vírus e bactérias intracelulares (Klose et al. 2014) (Diefenbach, Colonna, and Koyasu 2014). As ILC2s expressam GATA-3, secretam IL-5, IL-13 e amphiregulina e recebem sinais de ativação, como IL-33 e TSLP, de células epiteliais e células mieloides e IL-25 de células *Tuft*. A IL-5 secretada pelas ILC2 é importante no recrutamento de eosinófilos e a IL-13 na produção de muco pelas

células caliciformes (Howitt et al. 2016). As ILC3s são um grupo heterogêneo de células ROR γ t⁺ que podem ser divididas em duas sub-populações pela expressão do receptor de quimiocina CCR6 ou pela expressão do receptor NKp46 (presente em células NK). Elas são ativadas por IL-23, IL-1 α e IL-1 β secretadas por células mielóides epiteliais (Melo-Gonzalez and Hepworth 2017). As ILC3 CCR6⁺ são uma população não citotóxica, compreende as células indutoras de tecido linfóide (LTi), secretam IL-22, que estimula células de Paneth e células estromais do intestino, e também secretam IL-17. Em contraste, a sub-população ILC3 CCR6⁻ expressa T-bet e NKp46 e são, portanto, comumente referidos como NCR⁺ (receptor de citotoxicidade natural). A regulação positiva da expressão de T-bet em ILC3 induz a regulação negativa do fator de transcrição ROR γ t e adaptação dessas células a um fenótipo semelhante ao das ILC1 (Diefenbach, Colonna, and Koyasu 2014).

Devido à sua localização estratégica e pelo fato dessas células serem ativadas primariamente por receptores de citocinas, as ILC são consideradas como sentinelas da mucosa intestinal e estão aptas a reagir rapidamente contra patógenos e modular a resposta imune adaptativa.

2.1.3 Linfócitos T efetores na mucosa intestinal: Adaptação e Regulação

Os linfócitos T CD4⁺ *naive* na mucosa intestinal podem se diferenciar em células efetoras com diferentes características de resposta. Células T helper 1 (Th1) produtoras de IFN γ ; células T helper 2 (Th2) produzindo IL4, IL-5 e IL-13; células T helper 17 (Th17), produtoras de IL-17A/IL-17F; células T helper 22 (Th22) produzindo IL-22 ou ainda células T reguladoras induzidas (iTreg) produzindo IL-10 e TGF- β (A. M. C. Faria, Reis, and Mucida 2017). Cada grupo celular é regulado por um fator de transcrição distinto e específico para cada linhagem. O fator de transcrição T-bet é necessário para o desenvolvimento de células Th1, o fator de transcrição GATA-3 é requerido para as Th2, o fator de transcrição ROR γ t é o responsável pelo desenvolvimento de Th17 e, finalmente, o fator de transcrição Foxp3 é expresso em células Treg. A ativação desses fatores de transcrição é dependente da via de sinalização de proteínas STATs. Das sete STATs identificadas no camundongo, STAT1/STAT4, STAT6, STAT3 e STAT5 executam funções não redundantes na diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e iTreg, respectivamente. Uma vez que cada linhagem celular é primada e se compromete com um fenótipo, elas expandem clonalmente (Wu et al. 2016).

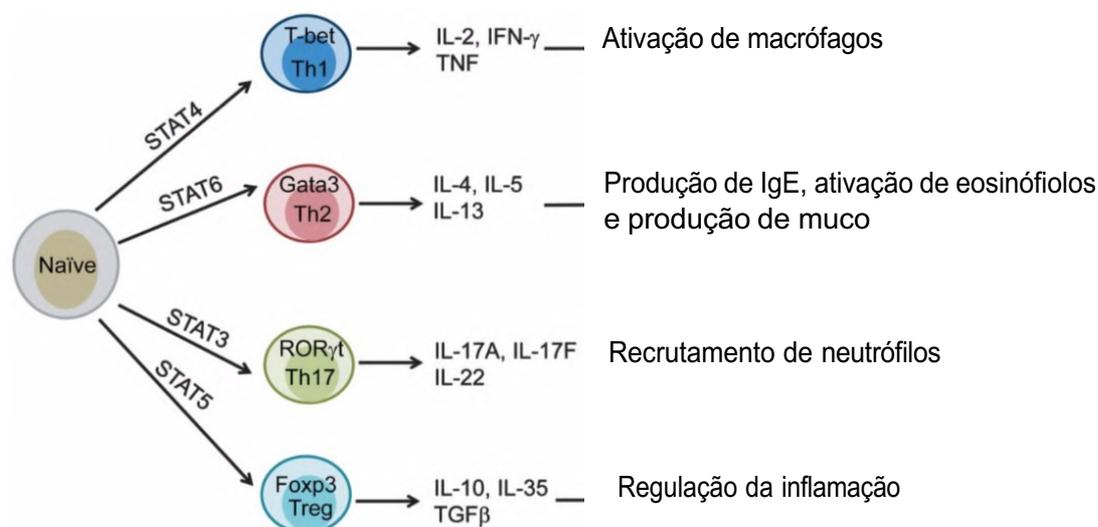


Figura 3: Subtipos de células T CD4 efectoras.

Após a estimulação antigênica, a célula TCD4 *naïve* pode se diferenciar em Th1, Th2, Th17 ou Treg de acordo com o estímulo de citocinas do microambiente (Wu et al. 2016).

Em função do microambiente diferenciado da mucosa intestinal, a ativação de células T CD4+ nesse local envolve fatores regulatórios e células altamente especializadas no direcionamento da resposta imune. O ácido retinóico (RA), um metabólito da vitamina A produzido por células dendríticas (DCs) intestinais, é o co-fator principal da citocina TGF- β que promove o desenvolvimento de células T reguladoras induzidas (iTreg) ou periféricas (pTreg) e inibe o desenvolvimento de células Th17 (Mora and von Andrian 2009). Mesmo na presença de IL-6 e TGF β , o RA inibe fortemente o programa de diferenciação de células Th17 favorecendo o desenvolvimento do iTreg. (Howard L Weiner et al. 2011). Apesar da produção robusta de ácido retinóico pelas DCs intestinais, as células Th17 são relativamente abundantes no intestino e sua presença é fundamental para a regulação da homeostase intestinal. A IL-17 promove a proliferação de células epiteliais intestinais e aumenta a função de barreira epitelial, estimula a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais e induz a expressão de pIgR, receptor que transloca a IgA produzida na lâmina própria para o lúmen intestinal (Wu et al. 2016).

Por outro lado, uma resposta Th17 exacerbada pode causar danos na mucosa e levar ao desencadeamento de doenças inflamatórias graves e doenças autoimunes. As células Th17

patogênicas são ativadas em um contexto de alta produção de IL23, como nas doenças inflamatórias crônicas do intestino (Wu et al. 2016).

As células Th17 não são encontradas no intestino de camundongos *germ free* (GF), o que indica que a microbiota é responsável pela geração dessas células. Um elegante trabalho realizado por Ivanov e colaboradores demonstra que um único filo de bactérias, as Bactérias filamentosas segmentadas (SFB), é capaz de induzir a diferenciação de células Th17 no intestino de camundongos (Ivanov et al. 2009).

Além disso, uma porcentagem substancial de células Th17 na lâmina própria intestinal co-expressa FoxP3 e essa população tem propriedades reguladoras especialmente da resposta mediada por células Th17 e é descrita como envolvida na tolerância imunológica às bactérias da microbiota (Ohnmacht 2016).

O contato antigênico pela mucosa pode levar a três principais consequências: a) uma reposta imune local com produção de IgA secretória (imunização local); b) uma reposta inflamatória sistêmica com produção de anticorpos séricos específicos (imunização oral) que ocorre apenas mediante condições especiais de administração oral de antígenos; ou c) mais frequentemente, um fenômeno denominado tolerância oral (A. M. C. Faria and Weiner 2006).

2.2. A Tolerância oral e Suas Aplicações

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

Para que o fenômeno ocorra, é necessário que os antígenos presentes no lúmen do intestino penetrem a barreira da mucosa e tenham acesso à lâmina própria do intestino onde interagem com as células do sistema imune (Castro-Sánchez and Martín-Villa 2013). As proteínas são degradadas no trato gastrointestinal durante o processo digestório e, poucos minutos após a ingestão dos alimentos, peptídeos são encontrados na lâmina própria. Algumas proteínas, no entanto, entram intactas (Husby, Jensenius, and Svehag 1985). A apresentação desses antígenos na mucosa desencadeia a produção de citocinas com atividade supressora como a IL-10, IL-35 e TGF- β inicialmente, essa atividade observada na mucosa intestinal foi atribuída a um aumento de células do tipo Th2 levando à supressão de células do tipo Th1 (Khoury, Hancock, and Weiner 1992; H L Weiner et al. 2003). Posteriormente, foi observado que a apresentação de antígenos na mucosa intestinal leva à indução de células T reguladoras antígeno-específicas que secretam citocinas anti-inflamatórias. Essas células T reguladoras induzidas ou periféricas (iTregs ou pTregs) são induzidas nos linfonodos mesentéricos que drenam a mucosa intestinal e migram de lá para outros sítios no corpo onde elas controlam/suprimem a resposta inflamatória local (FARIA & WEINER, 2005).

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

As células T reguladoras foram descritas em 1995 por Sakaguchi e seus colaboradores como uma população de células T CD4⁺ com capacidade supressora. Os autores demonstraram que essas células expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2, o CD25. Essas células ficaram conhecidas como T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi et al. 1995). Posteriormente, foi identificado o fator de transcrição Foxp3 (forkhead box P3), capaz de conferir as propriedades reguladoras a essa população linfoide (HORI, 2003; FONTENOT, GAVIN, & RUDENSKY, 2003). Os trabalhos de Sakaguchi demonstraram que as células reguladoras autorreativas são geradas no timo sendo chamadas de células reguladoras naturais (nTreg). No entanto, células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ reativas a antígenos externos também podem ser geradas em órgãos linfóides da periferia a partir de células T naïve, as células reguladoras induzidas (iTreg) ou periféricas (pTregs), sendo o intestino um sítio privilegiado para a indução dessas células. A presença da molécula neuropilina 1 na superfície das nTreg é capaz de diferenciá-las das iTregs (Weiss et al. 2012).

Outra importante população de células reguladoras são células TCD4⁺ que expressam, em sua superfície, o LAP (*latency associated peptide*). O LAP é um peptídeo que está associado de forma não covalente ao domínio amino-terminal do TGF-β1 formando um complexo de TGF-β1 latente (Howard L Weiner and Wu 2011). Essas células T foram identificadas como células supressoras em estudos de modelos murinos de inflamação intestinal e denominadas Th3. O mecanismo supressor pelo qual essas células inibem a reatividade inflamatória de outros linfócitos T efetores ocorre através da liberação de TGF-β1. Essa citocina está presente em abundância no intestino, é capaz de promover, em linfócitos B, a troca de isotipo de imunoglobulinas para IgA e é fundamental na homeostase do intestino e de todo o corpo já que camundongos geneticamente deficientes em TGF-β 1 apresentam eventos inflamatórios multifocais e morrem com 20 dias de idade (SHULL ET AL., 1992). A produção aumentada de TGF-β1 foi detectada em diversos estudos sobre tolerância oral, o que indica a sua grande importância no desenvolvimento desse fenômeno (A. M. C. Faria et al. 2003; H L Weiner 2001).

2.3. Células apresentadoras de antígenos na mucosa intestinal

As células apresentadoras de antígenos têm um papel central na conversão de células T CD4⁺ *naïves* em células T reguladoras. Macrófagos residentes do intestino e células dendríticas (DCs) são fundamentais no processo de manutenção do equilíbrio das respostas pro e anti-inflamatórias locais. (Kelsall 2008).

Os macrófagos intestinais são células com alta capacidade fagocítica e que possuem baixa capacidade migratória. Os macrófagos residentes da mucosa intestinal têm características singulares típicas do tecido em que residem e, dessa forma, não podem ser classificados dentro do paradigma M1/M2 (Allan McI Mowat and Bain 2011). Eles têm, como função, a manutenção da integridade do epitélio através da secreção de fatores como PGE2 (prostaglandina E2) e IL-1, entre outros mediadores que estimulam a renovação das células epiteliais (Bain and Mowat 2011). Primordialmente, os macrófagos residentes expressam CX3CR1 e secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Takada et al. 2010) que, na presença de TGF-β, contribuem para a manutenção do seu estado não inflamatório dessa mucosa intensamente estimulada (Smith et al. 2011; Timothy L Denning et al. 2007).

A IL-10 secretada por macrófagos intestinais contribui para a formação do ambiente tolerogênico necessário para a manutenção das células da mucosa, em destaque as células T

reguladoras. Apesar desse papel na homeostase intestinal, foi demonstrado que, mesmo com a depleção de macrófagos, o fenômeno da indução de tolerância oral é preservado, de forma que somente a depleção total de células dendríticas foi capaz de abolir completamente o fenômeno, evidenciando a importância dessas células na tolerância oral (Esterházy et al. 2016).

As cDCs (células dendríticas convencionais) são células apresentadoras profissionais que direcionam a diferenciação de células T CD4⁺ efetoras, incluindo Th1, Th2, Th17, T reguladoras e também de células T CD8⁺ (Coombes and Powrie 2009). No intestino, as populações de cDC são heterogêneas e, assim como macrófagos, seu papel e fenótipo estão intimamente relacionados ao microambiente. Os estudos mais recentes têm facilitado o processo de identificação do fenótipo e função das 3 principais populações encontradas na mucosa intestinal (**tabela 1**).

Fenótipo		Ontogenia		Funções		Abundância		
Comum	Linhagem específica	FC	Fator de Transcrição	Funções comuns	Funções Especializadas	LPD	L	
CD11c+ MHC II+ CD64- F4/80- MerTK- Ly6C- CD3- CD19- B220- NK1.1-	XCR1+	FLT3L-dependente ZBTB46	IRF8 BatF3 ID2	<ul style="list-style-type: none"> Migração para o linfonodo drenante dependente de CCR7 Apresentação de antígenos solúveis 	<ul style="list-style-type: none"> Th1 Apresentação cruzada Indução de linfócitos Intraepiteliais Predominante na Indução de CCR9 	+	-	
	SIRPα+		CD103+ CD11b+ CX3CR1low		IRF4 KLF4 Notch2	<ul style="list-style-type: none"> Th17 Th2 Ativação de ILC-3 	+++	-
			CD103- CD11b+ CX3CR1int		Zeb2 IRF4 Notch2? KLF4?	<ul style="list-style-type: none"> Th1 priming Th2 priming Th17 priming Arivação de ILC3? 	+	+

Tabela 1 - Populações de células dendríticas convencionais na mucosa intestinal.

Fonte: “Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes” (Joeris, Müller-Luda, Agace, & Mowat, 2017).

O ambiente singular da mucosa intestinal favorece a diferenciação de células dendríticas CD103⁺ capazes de produzir citocinas como IL-10 e TGF-β, ácido retinóico e de expressar moléculas tolerogênicas como CTLA-4 e PDL-1 (Kelsall 2008). A captação de antígenos pelas células dendríticas CD103⁺ na lâmina própria do intestino delgado leva ao desencadeamento de uma resposta anti-inflamatória. Essas cDCs migram para os linfonodos mesentéricos de maneira dependente de CCR7 onde são capazes de direcionar a conversão de células T CD4⁺ *naive* em células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ induzidas (iTregs) (Worbs 2006). Além disso, elas podem induzir, em linfócitos T, a expressão de moléculas como CCR9 e α4β7 que

facilitam a sua migração para a mucosa intestinal (Coombes and Maloy 2007).

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

A células apresentadoras de antígenos (APCs) da mucosa intestinal mantêm o ambiente tolerogênico necessário para a manutenção da homeostase local. Como descrito, essas células estão intimamente relacionadas com a geração e manutenção de células T com perfil regulador no intestino e alterações nas subpopulações de APCs levam a um desequilíbrio de mediadores pro e anti-inflamatórios e ao surgimento de doenças inflamatórias locais com repercussões em outros sítios do corpo que tenham conexão direta com o intestino (Bouma and Strober 2003).

Um dos sítios de comunicação com o intestino é o pâncreas. A estreita ligação entre o pâncreas e o intestino já foi demonstrada por trabalhos experimentais de vários grupos (Turley et al. 2005). O desenvolvimento do pâncreas ocorre a partir do endoderma e do intestino primitivo, o que demonstra uma estreita relação entre esses dois órgãos (Figura 5). Além disto, estudos recentes demonstram que o intestino e o tecido linfoide associado a ele podem ser fortes reguladores da progressão da insulite. O papel das células do sistema imune associadas ao intestino na patogênese do DM1 tem se tornado cada vez mais claro por estudos pioneiros mostrando que a dieta e a microbiota estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da diabetes autoimune (O. Vaarala, Atkinson, and Neu 2008). Foi demonstrado que o linfonodo pancreático (PLN) drena antígenos próprios (autocomponentes) do pâncreas, mas também drena antígenos externos do trato gastrointestinal e da cavidade peritoneal. Além disso, perturbações na fisiologia do intestino parecem ter um impacto direto na ativação de células T reativas às células β pancreáticas. (Turley et al. 2005). Estudos em animais e em humanos relatam ainda que a manipulação de componentes da dieta pode acelerar ou impedir o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (Knip et al. 2010; Visser et al. 2010). A exposição a antígenos alimentares constituintes do trigo (como a gliadina) também pode desencadear autoimunidade a células β em crianças com predisposição genética (Norris 2003).

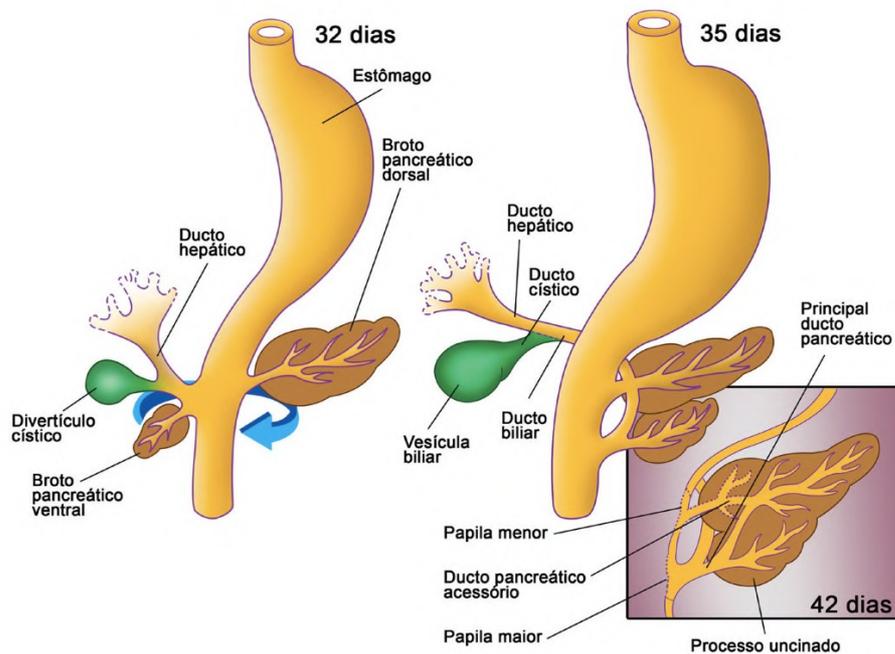


Figura 4 - Origem embrionária do pâncreas junto ao duodeno primitivo.

O pâncreas surge de duas evaginações do duodeno primitivo que, a partir de 32 dias de desenvolvimento fetal, gira para a direita. A evaginação ventral segue esse movimento de rotação para a direita, passando pela face posterior do duodeno e funde-se com a evaginação dorsal. (Oriá et al. 2016)

Assim, torna-se indispensável avaliar alterações na mucosa intestinal que possam estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças relacionadas às funções do pâncreas, como a diabetes autoimune.

2.3. Diabetes Autoimune

2.3.1. Patogênese e Componentes Genéticos

O *diabetes mellitus* Tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis. Representa de 5% a 10% dos casos de *diabetes mellitus*. A doença pode ocorrer em qualquer idade, com picos de incidência na puberdade (Tuomilehto 2013). Trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Gale 2005). Nos últimos

30 anos, a incidência de DM1 tem aumentado significativamente em todo o mundo, principalmente em crianças. A projeção é que, em 10 anos, o número de casos em crianças menores de 5 anos seja duplicado (Tuomilehto 2013). O aumento progressivo na incidência de diabetes tipo 1 sugere que há uma grande pressão de fatores ambientais orquestrando o desenvolvimento da doença. De fato, infecções virais, produtos alimentares, vacinação, toxinas, estresse e alterações da microbiota intestinal já foram apontados como gatilho para o desenvolvimento da doença (Rewers and Ludvigsson 2016). Entretanto pouco se sabe ainda sobre como esses fatores interferem no desenvolvimento da doença.

A patogênese da DM1 ocorre de forma contínua podendo ser dividida em 3 estágios: (1) reatividade autoimune direcionada às células β pancreáticas com surgimento de autoanticorpos; (2) perda de função e massa das células β pancreáticas que ocorre com a progressão do infiltrado inflamatório e (3) surgimento dos sintomas e da hiperglicemia. (Lehuen et al. 2010; Lightfoot, Chen, and Mathews 2012)

A associação entre fatores genéticos e ambientais orquestram o início da doença que é caracterizado por uma resposta inflamatória crônica e progressiva contra antígenos do pâncreas. (Kantárová and Buc 2007). Esses antígenos são transportados por células dendríticas para o linfonodo pancreático onde irão ativar células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ específicas que migram para as ilhotas de Langerhans e iniciam uma resposta inflamatória dando origem à insulite (Yadav et al. 2004) Os mecanismos de destruição das células β pancreáticas envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias, liberação de radicais livres, ação de granzima e perforina e a indução de apoptose via Fas/Fas-L (Mathis, Vence, and Benoist 2001; Rabinovitch and Suarez-Pinzon 1998). Já foi demonstrada a grande importância da resposta de células T $CD8^+$ (Tc) e T $CD4^+$ (Th) na patogênese da DM1, sendo que a inflamação nas ilhotas é mediada principalmente por células Th1 e Th17 (Figura 6). As células do tipo Th1 secretam citocinas como IFN- γ e IL-2 que são mediadores chave da autoreatividade às células β pancreáticas. Inicialmente, foi demonstrado que a transferência de células Th1 para camundongos NOD neonatos (modelo murino de estudo da doença que será detalhado mais adiante) era suficiente para desencadear o diabetes (Katz, Benoist, and Mathis 1995). Além disso, camundongos que não expressam o receptor de IFN- γ falham em desenvolver a doença (Wang et al. 1997).

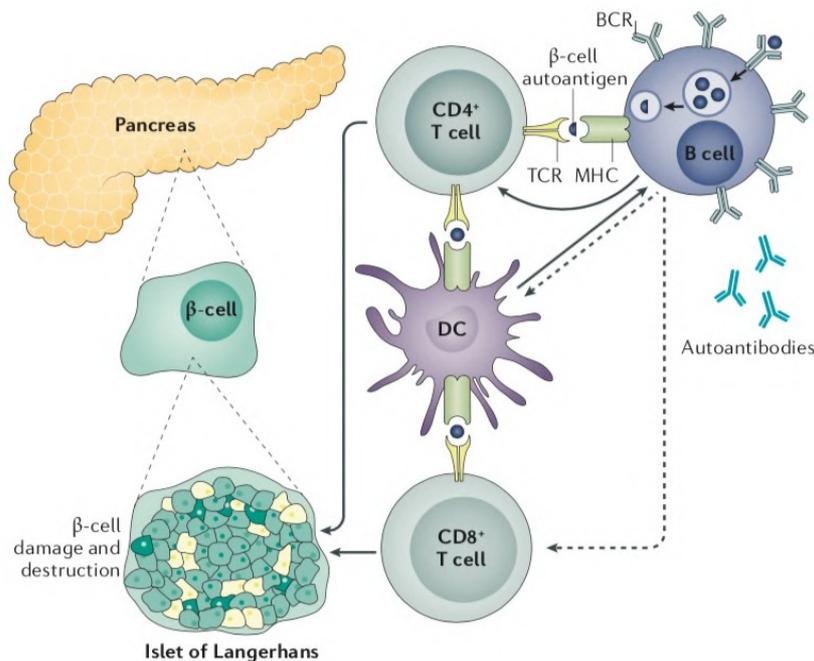


Figura 5 - Patogênese do diabetes mellitus tipo 1.

O DM1 é uma doença autoimune mediada pela atividade desregulada de Linfócitos B, e T (Peakman et al. 2012)

A identificação das células Th17 proporcionou avanços no entendimento da patogênese da DM1, porém o completo esclarecimento de seu papel na doença não está totalmente desvendado (HASKINS; COOKE, 2011; SHAO *et al.*, 2012; Zheng Z, Zheng F. 2019. A complex auxiliary: IL-17/Th17 signaling during type 1 diabetes progression. *Mol Immunol.*, 105:16-31). Já foi demonstrado que a frequência de células Th17 está aumentada em pacientes com diabetes tipo 1 (Honkanen et al. 2010). A importância dessas células na doença foi confirmada por estudos que mostram que o bloqueio da ação da IL-17 em camundongos NOD leva à redução do escore clínico da doença (Emamaullee et al. 2009). Uma possível hipótese para explicar o papel das células Th17 nessa doença é o ambiente favorável à conversão de Th17 com a alta secreção de IL-6 e IL-1 β por monócitos e, ao mesmo tempo, uma incapacidade de ação de células Treg em indivíduos suscetíveis (Shao et al. 2012).

A participação das células Treg na patogênese do diabetes tipo 1 é notável sendo que a progressão da doença é controlada por células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Shao et al. 2012; Bluestone and Tang 2005). Porém, alguns autores sugerem que o seu efeito não estaria relacionado a alterações na frequência dessas células, mas sim a deficiências na sua capacidade funcional de supressão (D'Alise et al. 2008). Outros trabalhos sugerem um defeito, nos indivíduos diabéticos, na produção ou ação de IL-2, citocina fundamental para a sobrevivência e

proliferação das células nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Setoguchi et al. 2005; Sgouroudis, Kornete, and Piccirillo 2011).

Já foram identificados polimorfismos em diferentes regiões do genoma que são associados à predisposição a diabetes. Os *loci* relacionados ao diabetes mellitus tipo 1 (DM1) são denominados pelo mesmo nome da doença, *IDDM*, do inglês *insulin dependente diabetes mellitus*. Vários *IDDM* foram identificados no genoma humano. O *IDDM 1* contém os genes do HLA sendo que o HLA DR3-DQ2 e DR4-DQ8 são os tipos mais frequentes de MHC envolvidos na predisposição ao diabetes em humanos. Esses alelos são responsáveis por 50% da predisposição genética a DMI. Esses mesmos alelos estão relacionados a outras desordens autoimunes como, por exemplo, a doença celíaca (Kantárová and Buc 2007). Regiões de *IDDM* incluem também genes associados à imunorregulação como AIRE, IL-2R, CTLA-4, PD-1. A ação efetora de células T e B inflamatórias juntamente com defeitos no mecanismo de imunorregulação levam a uma contínua destruição das ilhotas e à redução significativa da massa de células β (entre 70 a 90%), o que resulta na perda progressiva da capacidade de produzir e secretar insulina e leva, a longo prazo, a um estado de deficiência absoluta desse hormônio (Tooley, Waldron-Lynch, and Herold 2012).

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

2.3.2. A influência da microbiota no diabetes tipo 1

A microbiota auxilia na digestão de componentes da alimentação, fornece vitaminas ao hospedeiro, proteção contra o crescimento de patógenos e promove a manutenção dos componentes da barreira intestinal (Round and Mazmanian 2009).

A disbiose, definida como distúrbios na composição da microbiota intestinal, leva à perda de elementos chave na manutenção do equilíbrio da homeostase intestinal com repercussões sistêmicas que podem desencadear doenças autoimunes incluindo diabetes tipo 1. De fato, apenas 10% dos indivíduos que têm predisposição genética ao diabetes tipo 1 chegam a desenvolver a doença (Daniels 2011). O que indica uma forte pressão de componentes ambientais e da microbiota. Vários estudos realizados com pacientes diabéticos ou com predisposição genética indicam que a doença é relacionada à redução da razão entre Firmicutes e Bacteroidetes, com aumento de bactérias do filo bacteroidetes, aumento de bactérias patogênicas do filo Proteobacteria, redução de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* e

Bifidobacteria e redução de bactérias produtoras de butirato (“Gut Microbiota in Children with Type 1 Diabetes Differs from That in Healthy Children: A Case-Control Study” 2013; Alkanani et al. 2015; De Goffau et al. 2014; Dogra et al. 2015).

Além disso, um estudo comparando 1650 crianças com predisposição genética que nasceram por parto vaginal ou cesariana, indicou que a incidência de diabetes foi duas vezes maior entre as crianças que nasceram por cesariana (Bonifacio et al. 2011)

A interação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro é regulada pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) incluindo receptores *Toll-like* (TLRs) e *NOD-like* (NLRs) (Westwell-Roper et al. 2014)

Camundongos NOD, modelo espontâneo de diabetes tipo 1, que não possuem a proteína MyD88, uma proteína sinalizadora dos receptor TLR, são resistentes ao desenvolvimento do diabetes (Wen et al. 2008). Interessantemente, quando esses animais são mantidos em condições isentas de germes (*germ free*), a incidência de diabetes aumenta muito e os animais são protegidos da diabetes quando recolonizados com a microbiota de camundongos NOD MyD88^{-/-}.

A interação entre o pâncreas e a microbiota intestinal é feita, em parte, através da ação de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) produzidos pela fermentação bacteriana no intestino. Camundongos NOD alimentados com dietas que resultam em alta produção de SCFAs são protegidos do desenvolvimento do diabetes (Mariño et al. 2017). Além disso, a administração após o desmame do prebiótico VSL#3, uma mistura de *Bifidobacteria B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacilli L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus thermophiles*, previne o diabetes em camundongos NOD. A prevenção da doença pela administração de VSL#3 foi associada ao aumento de células produtoras de IL-10 no pâncreas e nas placas de Peyer e à redução da resposta Th/Th17 no pâncreas e na mucosa intestinal de animais tratados com o prebiótico (Calcinaro et al. 2005) (Dolpady et al. 2016).

2.3.3. Camundongos NOD, um modelo experimental valioso de diabetes autoimune

Os modelos animais são de fundamental importância nos estudos visando o entendimento da patogênese e etiologia do DM1. Existem muitos modelos animais de diabetes tipo 1 que podem ser divididos em modelos químicos e espontâneos. Em cada modelo, a maneira como animal desenvolve a doença pode variar sendo que a escolha do modelo se dá em função do objetivo de estudo.

Foram descritos modelos químicos que utilizam a administração de estreptozotocina (STZ) ou aloxano, substâncias tóxicas para as células β pancreáticas, em animais experimentais. Ambos podem induzir a hiperglicemia com baixas doses de administração. Seu uso leva a efeitos específicos pois essas drogas são transportadas para as células β pancreáticas a partir do transportador de glicose GLUT2.

Existem outros modelos de animais com predisposição genética que desenvolvem espontaneamente a doença (King and Bowe 2015). Dois modelos animais são amplamente utilizados em estudos do DM1, os ratos BB (*Bio-breeding*) e os camundongos NOD (*non obese diabetic*) que desenvolvem espontaneamente o diabetes. Ambos os modelos apresentam muita similaridade com o DM1 em humanos, porém, como o diabetes é claramente uma doença mediada por células T, os camundongos NOD apresentam grande vantagem sobre os ratos BB que são linfopênicos (Pearson, Wong, and Wen 2016).

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

A incidência da doença nesses animais varia com o sexo, sendo maior a frequência em fêmeas (60% a 80%) do que em machos (20% a 30%). A incidência também é muito influenciada pela ação de fatores ambientais. Camundongos mantidos em condições livres de patógenos específicos (*specific pathogen free*, SPF) têm maior propensão a desenvolver DM1 (Of et al. 2005).

Assim como em humanos, o mais importante fator genético associado à doença é o MHC. Camundongos NOD expressam a molécula de MHC-II I-A^{g7}, gene ortólogo ao HLA-DQ em humanos (Kanagawa et al. 1998). Os demais genes associados ao diabetes estão espalhados pelo genoma e, em camundongos, são chamados *idd* (*insulin dependent diabetes*) (Pearson, Wong, and Wen 2016).

Estudos histopatológicos demonstram que é possível observar células dendríticas e macrófagos na periferia das ilhotas β pancreáticas de camundongos NOD de 3 a 4 semanas de idade (Jansen et al. 1994). Esse infiltrado periférico precede o infiltrado de linfócitos que é observado por volta da oitava ou décima semana e é necessário para o desenvolvimento da

doença. Quando macrófagos e células dendríticas são eliminados, os camundongos NOD não apresentam infiltrado inflamatório no pâncreas e não desenvolvem a doença (Nikolic et al. 2005). Similarmente, essas células também são identificadas em infiltrados pancreáticos de indivíduos diabéticos (Willcox et al. 2009).

As células T inflamatórias nos camundongos NOD são específicas para antígenos presentes nas ilhotas β pancreáticas, incluindo epitopos da insulina, glicose-6-fosfatase, glutamato descarboxilase (GAD65) e proteína transportadora de zinco (ZNT8). Similarmente, esses são antígenos alvo encontrados em indivíduos com diabetes (Pearson, Wong, and Wen 2016). Várias hipóteses já foram propostas para explicar o desencadeamento da autorreatividade típica do diabetes. Alguns mostram defeitos na seleção negativa de linfócitos T no timo que podem estar relacionados a uma ligação ineficiente de peptídeos próprios ao MHC (Kishimoto and Sprent 2001); alguns identificaram alterações morfológicas no timo (Savino et al. 1993); outros ainda propõem que a expressão alterada do gene AIRE está envolvida e que a formação de células T autoreativas no timo ocorre de uma maneira dependente da idade (He et al. 2013).

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

Camundongos NOR são uma linhagem congênita recombinante nos quais regiões limitadas do genoma de camundongos NOD/LtJ foram substituídas por porções do genoma de camundongos C57BL/KSJ. Apesar de compartilhar a maior parte do genoma com os camundongos NOD, incluindo o haplótipo de MHC-II I-A^{g7} e muitos outros *loci idd*, os camundongos NOR são resistentes à insulite e, por esse motivo, não desenvolvem o diabetes. Os alelos de resistência recebidos da linhagem C57BLKS estão localizados nos cromossomos 1, 2 e 4 favorecendo o estado de resistência à autoimunidade (SERREZE et al., 1994).

2.3.4. A conexão pâncreas e intestino

Alguns estudos mostram que alterações na organização do tecido linfoide associado à mucosa ou na integridade da barreira epitelial do intestino podem acelerar o desenvolvimento do diabetes em ratos com DM1 (*biobreding rats*) (Neu et al. 2005). Em camundongos NOD, o aumento da permeabilidade intestinal também foi associado ao desenvolvimento do diabetes. Nesse modelo, a infecção por uma bactéria que causa quebra da barreira epitelial, *Citrobacter rodentium*, acelera o desenvolvimento do diabetes. (a. S. Lee et al. 2010).

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

As evidências de que o diabetes autoimune é influenciado por componentes da dieta e da microbiota do intestino fundamentam este trabalho. Alterações em células e fatores do sistema linfoide associados à mucosa intestinal ainda são pouco estudados no diabetes tipo 1. Nossa hipótese de trabalho é que tais alterações podem ser relevantes para o desencadeamento e desenvolvimento do diabetes autoimune e que o entendimento do papel dessas interações entre a mucosa intestinal e o pâncreas pode auxiliar na criação de novas estratégias terapêuticas para o diabetes tipo 1.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Identificar alterações na microbiota e em mecanismos de imunorregulação na mucosa intestinal de camundongos NOD que precedam o desenvolvimento do diabetes tipo 1.

3.2. Objetivos Específicos

- a.** Avaliar a incidência e o desenvolvimento do diabetes tipo 1, na colônia de camundongos NOD mantida no Laboratório de Imunobiologia;
- b.** Avaliar a produção de muco intestinal antes e durante o desenvolvimento do diabetes tipo 1 em camundongos NOD;
- c.** Analisar o fenótipo das populações de linfócitos intraepiteliais no intestino de camundongos NOD antes do início do diabetes em comparação com camundongos NOR;
- d.** Avaliar a produção e função da IgA secretória antes e durante o desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD;
- e.** Avaliar a translocação bacteriana para o linfonodo pancreático antes e durante o diabetes tipo 1;
- f.** Avaliar a composição da microbiota intestinal antes e durante o diabetes tipo 1;
- g.** Determinar se as alterações na microbiota podem restaurar defeitos na barreira intestinal;
- h.** Avaliar os números e frequências de linfócitos T efetores CD4⁺ e linfócitos inatos presentes na lâmina própria da mucosa intestinal antes e durante o diabetes tipo 1 em comparação com camundongos NOR;

- i.** Avaliar os números e frequências de células dendríticas convencionais presentes nos linfonodos mesentéricos compartimentalizados antes e durante o diabetes tipo 1 em comparação com camundongos NOR;
- j.** Avaliar o número e a frequência de células T CD4⁺ Foxp3⁺ reguladoras nos linfonodos mesentéricos compartimentalizados antes e durante o diabetes tipo 1;
- k.** Avaliar a capacidade de indução de tolerância oral em camundongo NOD em comparação com camundongos NOR.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos NOD (*non-obese diabetic*), fêmeas, obtidos do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, São Paulo, SP). Utilizamos, como controle, camundongos NOR (*non obese resistant*) fêmeas obtidas diretamente do Jackson Laboratory, ME, EUA. As colônias desses animais foram geradas e mantidas no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB, UFMG, sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*.

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

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da UFMG (CEUA 117/2010).

4.2. Avaliação da Incidência de Diabetes Autoimune

Os níveis glicêmicos foram monitorados a cada 15 dias através da coleta de amostra do sangue periférico obtido da cauda para dosagem em fitas apropriadas para glicosímetro automático (Accu-Check Active, Roche, Basileia, Suíça). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram duas medidas seguidas de glicose superiores a 250mg/dL.

4.3. Obtenção das Amostras

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

4.4. Coleta do Conteúdo Intestinal

O conteúdo do intestino delgado e cólon foi coletado logo após a retirada dos órgãos e transferido para um tubo de plástico onde foi diluído em PBS 1x estéril e gelado à concentração de 0,1mg/ml. Cada amostra foi homogeneizada em vórtex por 5 min para a total diluição do conteúdo fecal e em seguida centrifugada à velocidade de 4000g por 5 minutos à temperatura de 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado em *cell strainer* de 70µm. O sobrenadante filtrado foi utilizado para a dosagem de SIgA e para o ensaio de IgA ligada às bactérias da microbiota.

4.5. Lâminas Histológicas

Amostras do intestino delgado, cólon e pâncreas foram fixadas em solução de 80% metanol e 20% DMSO. Após, o material foi desidratado em soluções crescentes de alcoóis, clarificado em xilol e incluído em parafina. Foram obtidos cortes de 5 µm corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou Coloração Ácido Periódico-Schiff (PAS) ou processadas para Imuno-histoquímica. Os cortes corados foram utilizados para a análise histopatológica do intestino delgado, cólon e pâncreas. As imagens das lâminas foram obtidas utilizando um máquina fotográfica acoplada ao microscópio Olympus BX41 (Olympus, Center Valley, PA, USA).

4.5.1. Avaliação Histopatológica do Pâncreas

Todas as ilhotas de cada animal foram contadas e avaliadas quanto à progressão da insulite. Cada ilhota foi pontuada de acordo com o grau de inflamação sendo 0 para ilhotas sem insulite, 1 para ilhotas com peri-insulite, 2 com insulite invasiva acometendo uma área menor que 50% da ilhota ou 3 para ilhotas com área de infiltrado maior que 50% ou acometimento total. Após pontuar todas as ilhotas, os dados foram avaliados de acordo com a frequência de ilhotas em diferentes estágios.

4.5.2. Avaliação da produção de muco do Intestino Delgado e Cólon

Foram capturadas 10 imagens de cada fragmento do intestino delgado e cólon para avaliação da produção de muco. No intestino delgado, foi contado o número de células

caliciformes PAS⁺ por campo. No colón, a análise da marcação de PAS foi feita utilizando o recurso de grade sobre a imagem com espaçamento de (250 μm^2 ou 300 μm^2). A marcação positiva foi contabilizada em cada interseção da grade sobre a imagem. A contagem foi feita em 10 campos do mesmo animal e os resultados foram expressos pela média por animal .

As medidas foram feitas com o auxílio do programa de edição de imagens ImageJ. Com o auxílio do mesmo programa, foram inseridas as barras de escala em todas as imagens.

4.6. Ensaio de Imuno-histoquímica

As lâminas gelatinizadas contendo cortes de 4 μm de espessura foram desparafinizadas em xilol e álcool, em seguida hidratadas para a imunomarcação, de acordo com o Sistema de Detecção de Polímero (NovoLink, Leica), utilizando os anticorpos isolados em lâminas separadas. As reações de recuperação antigênica foram feitas em calor úmido pressurizado (Pascal®) com citrato pH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) a 125oc por 2 minutos, com resfriamento de 20 minutos após a retirada das cubas. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos em PBS, seguidas pelo bloqueio da peroxidase (3 vezes de 5 minutos) e da proteína endógena (15 minutos) à temperatura ambiente, com 3 lavagens em PBS entre o bloqueio da peroxidase e da proteína. As amostras foram então marcadas com anti-MUC2 (Abcam 1:300) ou anti MUC1 (Abcam 1:200), por incubação *overnight* em temperatura 4°C. No dia seguinte, após 16 horas de incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, sendo realizada novamente 3 lavagens em PBS e aplicação do polímero, por mais 30 minutos. Foram utilizados todos os reagentes do Kit Novo Link – Leica® de acordo com as instruções do fabricante. A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos (NovoLink - Leica), diluído em 50 μl de DAB para 1 ml de diluente, 15 minutos antes da aplicação, também conforme instruções do fabricante. A contra coloração foi feita com Hematoxilina. Foram capturadas 10 imagens no aumento de 40X de cada fragmento de intestino marcado para MUC1 e MUC2 e contado o número de células positivas por campo. O resultado foi dado pela média de células por campo.

4.8. Tratamento para Indução de Tolerância Oral

Camundongos NOD e NOR fêmeas de 6 semanas de idade receberam tratamento oral com solução contendo 4 mg/ml de ovalbumina (OVA, grau 3, Sigma) (Grupo OVA oral) por

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

4.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A determinação dos títulos de anticorpos séricos IgG1 anti-OVA, e IgA no conteúdo intestinal foram determinados por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

a. Medida de IgG1 anti-OVA

Placas de poliestireno (Sarstedt) foram sensibilizadas com 2 µg de ovalbumina por poço em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia posterior, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 0,25% de caseína por uma hora à temperatura ambiente (200 µl/poço). O soro foi diluído a partir de 1:200. Foram feitas diluições seriadas (1:2) e utilizado soro de animal não imunizado como controle negativo da reação. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e, então, lavadas com salina-*tween* e expostas a solução contendo anticorpos anti-IgG1 de camundongos ligados a peroxidase (*goat anti-mouse IgG1-HRP*, Southern Bioetchnology). Após uma hora de incubação a 37°C, finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de *o-orthophenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Sigma), 2 µL de H₂O₂ diluídos em 10mL de tampão citrato 100µl/poço, A reação foi paralisada pela adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad), em comprimento de onda de 492 nm. O resultado de cada animal foi calculado utilizando o somatório das absorbâncias em 8 diluições do soro (entre 1:100 e 1:12,800). Esse método representa mais precisamente os títulos de anticorpos séricos como previamente descrito em estudos prévios do nosso grupo (Carvalho and Vaz 1996; Oliveira et al. 2015).

b. Medida de IgA secretória (SIgA)

As placas de poliestireno (Sarstedt) foram sensibilizadas com 100µl/poço de solução

contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1mg/mL (Southern Biotechnology), diluídos (1:10000) em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com PBS-caseína PBS-0,25% caseína por uma hora à temperatura ambiente (200 µl/poço). O sobrenadante do muco foi diluído 1:80. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2). As placas foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas, cinco vezes com salina-tween. Anticorpos anti-IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100µL/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37 °C. A seguir, foram lavadas e adicionou-se solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) na diluição 1:10000 (100µl/poço) em PBS-0,25% caseína durante uma hora a temperatura ambiente. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2µL de H₂O₂ diluídos em 10mL de tampão citrato 100µl/poço, A reação foi paralisada pela adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad), em comprimento de onda de 492 nm. Essa reação de ELISA acima descrita teve como controle positivo (padrão), anticorpos purificados IgA (10 mg mL⁻¹) de camundongo (Southern Biotechnology) em uma diluição 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

c. Medida de citocinas no pâncreas e no intestino

Para a extração de citocinas, o tecido foi triturado com 1 ml de tampão de extração para cada 100 mg de tecido. As amostras foram centrifugadas por 10 min 4,650 g, 4 °C. O sobrenadante coletado foi utilizado para os ensaios de ELISA. Para a medida de IL-17, IL-10 and IFN-γ, utilizamos os procedimentos descritos pelo fabricante dos kits IL-17 (DuoSets, R&D Systems), IL-10 e IFN-γ (ELISA Max Standard Set, BioLegend).

4.10. Extração de DNA para avaliação da microbiota intestinal

As amostras de fezes e LNPs foram coletados para avaliar a expressão gênica de filos de bactérias da microbiota intestinal (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobactéria). O DNA das amostras de fezes foi extraído utilizando o kit de extração de DNA QuiampStool

(Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA dos LNPs foi extraído utilizando o kit de extração de DNA DneasyBlood&Tissue (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada utilizando o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). A quantificação das espécies da microbiota intestinal foi feita utilizando placas de PCR-Array (Microbial DNA qPCR Arrays). Os valores foram expressos como diferenças (ΔCT) entre *cycle threshold* (CT) e foram normalizados de acordo com a expressão de Eubacteria constitutivo. Grupos específicos de bactérias foram utilizados como os níveis normalizadores de cada grupo de bactérias ($2^{-\Delta CT}$). Após a normalização dos dados, os valores foram expressos em abundância relativa comparada com os dados do grupo controle de camundongos NOR.

Actinobacteria	F- TGTAGCGGTGGAATGCGC R- AATTAAGCCACATGCTCCGCT
Bacteroidetes	F- GTTTAATTCGATGATACGCGAG R- TTAASCCGACACCTCACGG
Firmicutes	F- ATGTGGTTTAATTCGAAGCA R- AGCTGACGACAACCATGCAC
Proteobacteria	F- CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG R- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
Eubacteria universal	F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R- ATTACCGCGGCTGCTGGC
16S	F- AACAGGATTAGATACCCTGGTAG R- GGTTCTTCGCGTTGCATC

Tabela 2 - Primers

4.11. Obtenção de Suspensões Celulares dos Órgãos Linfoides

Foi utilizado meio RPMI 1640 (Life Technologies) enriquecido com 2nM de L-glutamina, 50mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 10% de soro fetal bovino (SFB)

inativado. As suspensões de células das placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e cecal foram obtidos utilizando um macerador de tecidos de vidro de 2ml. Após centrifugação as amostras foram ressuspensas em meio RPMI e as células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul de tripano. Para os experimentos em que foram avaliadas células apresentadoras de antígenos, anteriormente a maceração, os tecidos foram digeridos durante 1h a 37°C com meio RPMI incompleto contendo colagenase tipo IV (SIGMA- ALDRICH) 2mg/ml.

4.11. Obtenção de Células da Lâmina Própria Intestinal

O intestino foi coletado e aberto longitudinalmente. As placas de Peyer, muco, fezes e tecido gorduroso aderido foram removidos. O tecido limpo foi dividido em porções de cerca de 2cm. Depois de 3 lavagens em PBS com agitação manual e filtração do tecido em rede de metal, os tecidos foram incubados durante 15 minutos a 37 em RPMI contendo 0.15mg/ml de DTT (Dithiothreitol, Sigma) para desestruturação da camada epitelial. Posteriormente os tecidos foram agitados manualmente para remoção das células epiteliais e filtrados novamente. O tecido restante foi então incubado por 1h a 37°C em meio IMDM (Life Technologies) contendo 10% de SFB, 0.17 mg/ml de Liberase TL (Roche) e 30µg/ml de DNase I (Roche) para desagregar a matriz extracelular e permitir extração dos leucócitos. Após este período as células foram centrifugadas, lavadas, sepradas por gradiente de concentração em percoll e filtradas em filtros de nylon (cell strainer, BD) de 40µm. As células viáveis foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul de tripano em seguida as células isoladas foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

4.12. Citometria de Fluxo

4.12.1. Imunofenotipagem

Depois de isoladas dos órgãos linfoides, as células foram incubadas em placas de poliestireno por 10min com anticorpo anti-CD16 (*Fc block*, BD Pharmingen) e em seguida com marcador de viabilidade celular (eBioscience Fixable Viability Dye eFluor™ 506) e então as células foram encubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para moléculas de superfície. Para a marcação intracelular do fator de

transcrição, após essa primeira etapa, foi utilizado kit de fixação/permeabilização (e-Bioscience) e em seguida as amostras foram incubadas por mais trinta minutos com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para moléculas intracelulares. Após as lavagens com PBS-BSA (albumina sérica bovina 0.5%), as amostras foram fixadas com paraformaldeído 3% durante 30 minutos, lavadas e armazenadas em PBS a 4°C para leitura no citômetro. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro FACScanto ou FACSfortessa acoplados a um computador com o software Diva. A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (*Forward Scatter x Side Scatter*), foram delimitadas as populações de interesse e, a partir destas, foram gravados 100 mil eventos para análise de linfócitos e APCs. Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas.

Foram utilizados os seguinte anticorpos conjugados: eBioscience (USA) (Anti mouse CD8b, 48008380, Efluor 450; Anti mouse CD11b 47-0112-82, APC-eFluor 780; anti mouse FOXP3,56-573-82 AF700; anti-CD45, 25-0451-82, PE/Cy 7; CD19, 15-0.193-82 PerCP-Cy 5.5; Anti mouse CD127, 48-1271-80, eFluor 450; Anti mouse MHCII I-Ad, 17-5323-80 APC; Anti mouse T-bet, 644813, APC; anti- ROR γ t, 12-6988-82, Pe; anti-FOXP3, 12-5773-82, Pe; anti-CD11b, 47- 0112-82, APC; anti-mouse CD11c, 49-0114-80, e-fluor 450; anti-mouse CD4, 17-0041-82, APC; LIVE/DeadTM Fixable Aqua Stain Kit, L34957); BD (USA)(Rat anti-mouse Foxp3, 560403, Alexa Fluor 488; anti-mouse CD3, 555276, PE-cy5; anti-GATA 3, 580405, Pe-Cy7; rat anti-mouse CD11b, 550993; PerCP-Cy 5.5) or Biolegend (Anti-mouse CD4, 116015, PE/Cy7; anti-mouse CD45 103108, FITC; anti-mouse TCR γ/δ , 118107, PE; CD103 anti-mouse, 121419, FITC, F4/80 anti-mouse, 123113, PE/Cy7).

Nos usamos FMO (Fluorescence minus one) para determinar os canais positivos e criar o delineamento dos *gates*. (Herzenberg et al. 2006).

4.12.2. Estratégias de Determinação das Populações de Interesse

As células extraídas dos, linfonodos mesentéricos, cecal, placas de Peyer e lâmina

própria foram avaliadas por citometria de fluxo com o objetivo de identificar os linfócitos T CD4, ILCs, plasmócitos produtores de IgA e células dendríticas da mucosa intestinal e linfócitos intraepiteliais. A identificação foi feita através da seleção por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (*gate* para linfócitos ou granulócitos) e posterior separação de populações negativas ou positivas para os marcadores utilizados.

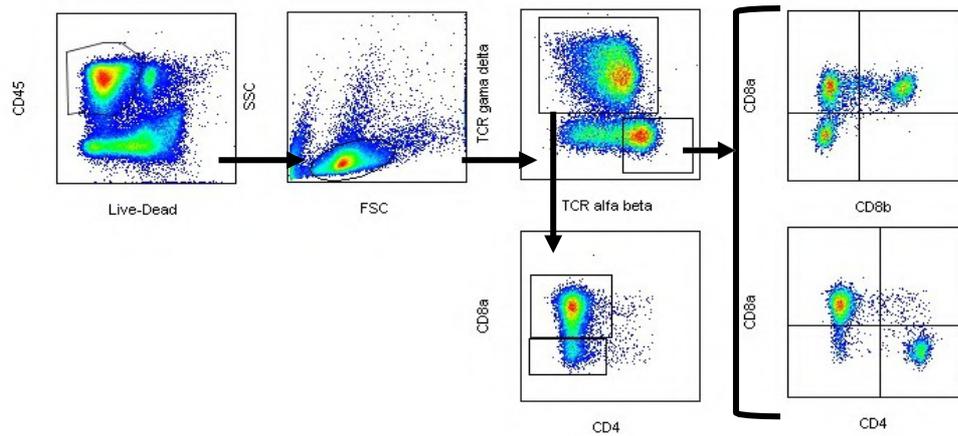


Figura 6: Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (IEL) no epitélio do intestino delgado.

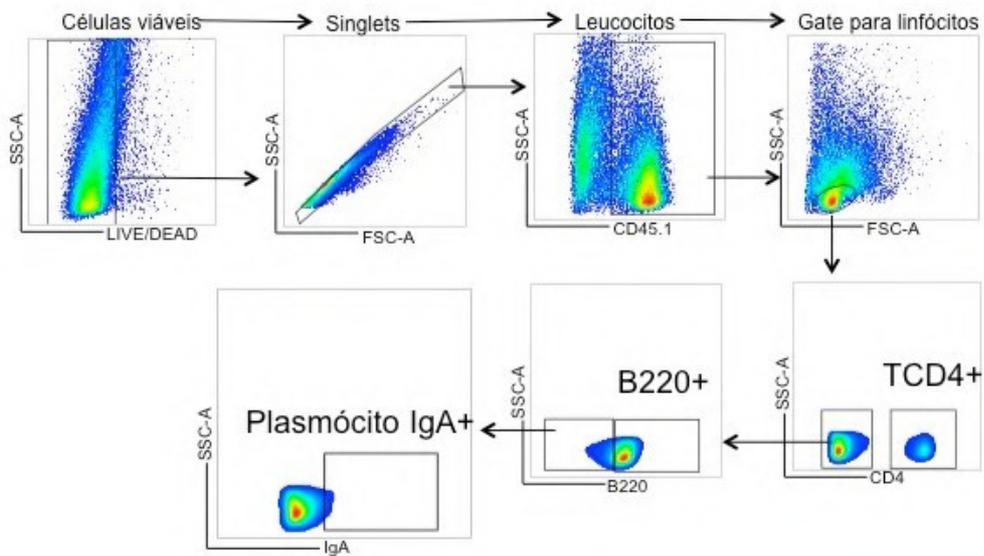


Figura 7: Imunofenotipagem de plasmócitos produtores de IgA na lamina propria do intestino delgado e Placas de Peyer

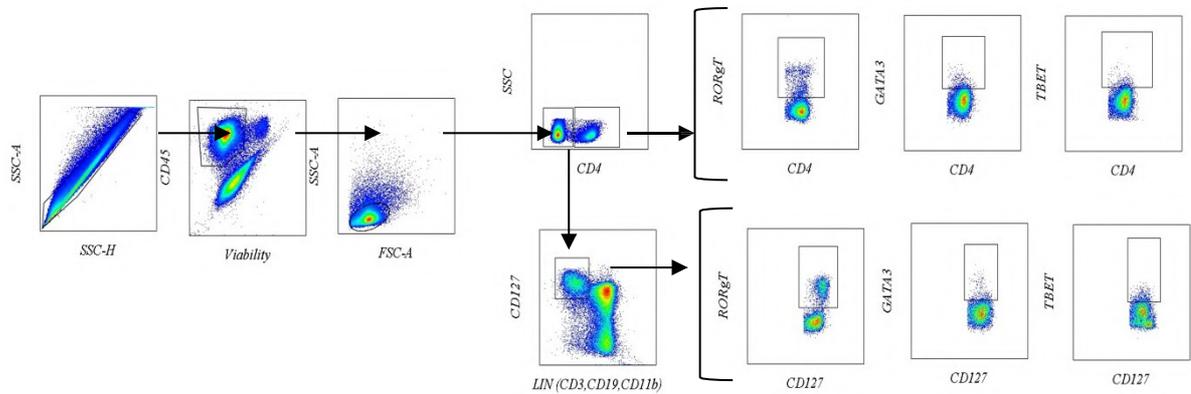


Figura 8: Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ e ILCs na *lamina propria* do intestino delgado.

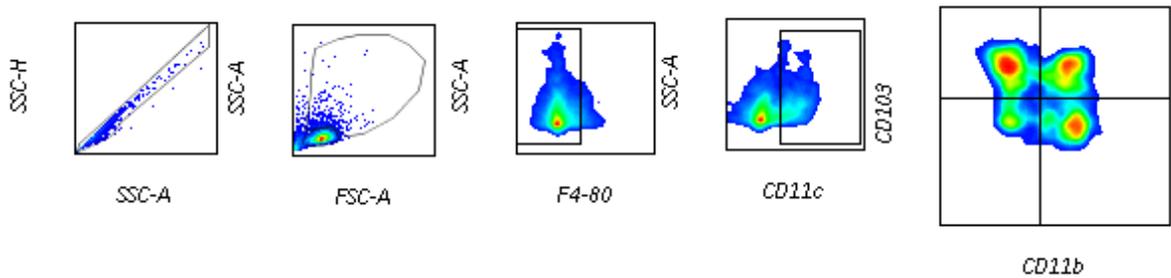


Figura 9: Imunofenotipagem de células dendríticas das placas de Peyer, da lâmina própria e do baço.

4.12.3. Ensaio de IgA ligada a bactérias da microbiota

O conteúdo intestinal foi preparado conforme descrito no item 3.4. Em seguida, este foi centrifugado a 8.000g para precipitar as bactérias. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em PBS-BSA e incubado por 30 minutos com anticorpo anti-IgA biotina, lavado e centrifugado novamente a 8.000g e incubado por 20 minutos com estreptavidina-APC. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScan) para avaliação das bactérias ligadas a SIgA. A análise foi feita utilizando o software FlowJo e a estratégia está demonstrada na Figura 11.

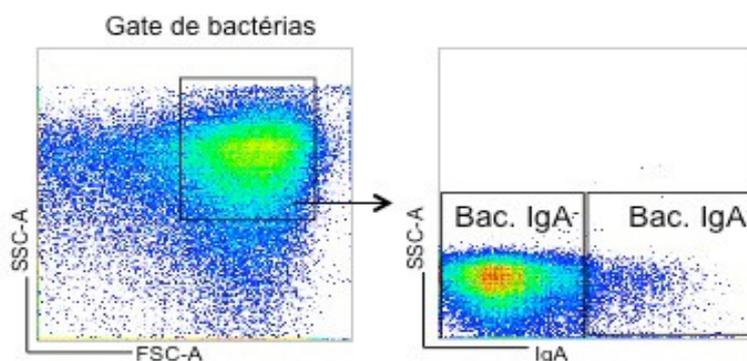


Figura 10: Análise das bactérias da microbiota ligadas à SIgA.

As bactérias foram isoladas do conteúdo fecal por centrifugação e marcadas com anticorpos anti-IgA. Em seguida, foi feita a avaliação por citometria de fluxo. As bactérias foram selecionadas pelo seu tamanho e pouca granulosidade reduzido utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) como descrito por Palm e colaboradores, (Palm et al. 2014). A população positiva para IgA foi quantificada. Os *dot plots* representam a estratégia de análise utilizada.

4.13. Modelo de aleitamento cruzado (*cross-fostering*)

Camundongos NOD com menos de 24 horas de nascimento foram retirados das suas mães e colocados para serem amamentados por mães adotivas NOR até o desmame com 4 semanas de idade. Após o desmame, os filhotes foram eutanasiados para a análise da produção de muco.

4.14. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados, para avaliar as diferenças significativas entre os grupos, pelo teste t de *Student* para dados paramétricos de dois grupos e *One-way* ANOVA com pós teste Tukey para se obter os dados paramétricos quando comparados mais de dois grupos. Foram consideradas como significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Os pâncreas de camundongos NOD apresentam infiltrado inflamatório progressivo durante o desenvolvimento do Diabetes Tipo 1.

Sabe-se que as condições ambientais em que o camundongo NOD é mantido são determinantes para o desenvolvimento do diabetes tipo 1. Condições de controle de patógenos são necessárias para o desenvolvimento do diabetes (Wen et al., 2008; ANDERSON; BLUESTONE, 2005). Estudos histológicos mostram que é possível observar o início do infiltrado inflamatório no pâncreas de camundongos com 4 a 8 semanas de idade. Essa fase inicial é chamada de peri-insulite e consiste na presença de poucas células inflamatórias circundando as ilhotas β pancreáticas. A progressão do infiltrado inflamatório leva à perda de células B-pancreáticas nas semanas que se seguem e, em um estágio mais avançado, o animal para de produzir insulina e apresenta níveis elevados de glicose no sangue (Anderson and Bluestone 2005).

No nosso estudo, os camundongos NOD foram mantidos em microisoladores, com água e ração autoclavada, condições de limpeza suficientes para o desenvolvimento do diabetes. Eles apresentaram 60% de incidência de diabetes entre 16 e 20 semanas de idade chegando a uma maior incidência após as 21 semanas de idade (Figura 11).

Utilizamos, como controle negativo da doença, camundongos da linhagem congênica NOR de idade correspondente àquela dos camundongos NOD. Os camundongos da linhagem NOR compartilham a maior parte do genoma com camundongos NOD incluindo o MHC-II I-A^{g7}, mas são resistentes ao desenvolvimento da doença. Como esperado, camundongos NOR não apresentaram hiperglicemia. Somente camundongos NOD com mais que 12 semanas de idade apresentavam elevados índices glicêmicos (>250mg/dL) sendo considerados diabéticos.

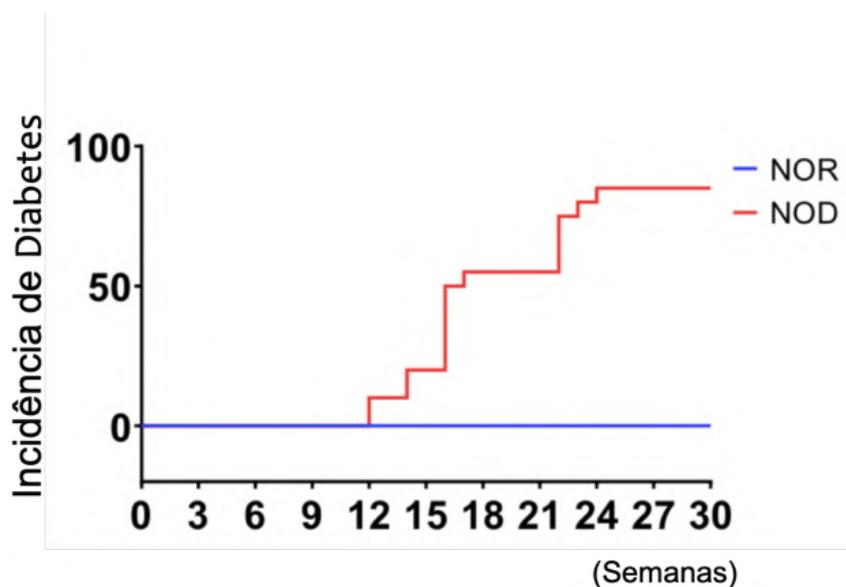


Figura 11: Incidência de diabetes em camundongos NOD e NOR.

Camundongos NOD e NOR tiveram a glicemia aferida a cada 15 dias desde seu nascimento. Animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL em duas medidas consecutivas foram considerados diabéticos.

Em seguida, avaliamos a progressão da insulite e a resposta inflamatória no pâncreas de camundongos NOD. Dividimos os animais em grupos de acordo com a idade e a linhagem, de 4 a 6 semanas e 16 a 20 semanas. Os camundongos NOD de 16 a 20 semanas foram divididos entre pré-diabéticos, animais que apresentaram glicemia menor que 250mg/dL, e diabéticos, animais que apresentaram glicemia maior que 250mg/dL. Para essa divisão, foram realizadas duas medidas consecutivas da glicemia antes da eutanásia.

Não foi observada insulite nos camundongos NOD de 4-6 semanas indicando que o infiltrado inflamatório que leva à destruição das células β -pancreáticas se inicia após esse período nos camundongos da nossa colônia. Camundongos NOD com 16-20 semanas pré-diabéticos apresentaram infiltrado inflamatório progressivo com grande parte das ilhotas β -pancreáticas acometidas. Camundongos NOD com 16-20 semanas diabéticos apresentaram um infiltrado mais agressivo e acometimento quase total das ilhotas pela insulite. (Figura 12).

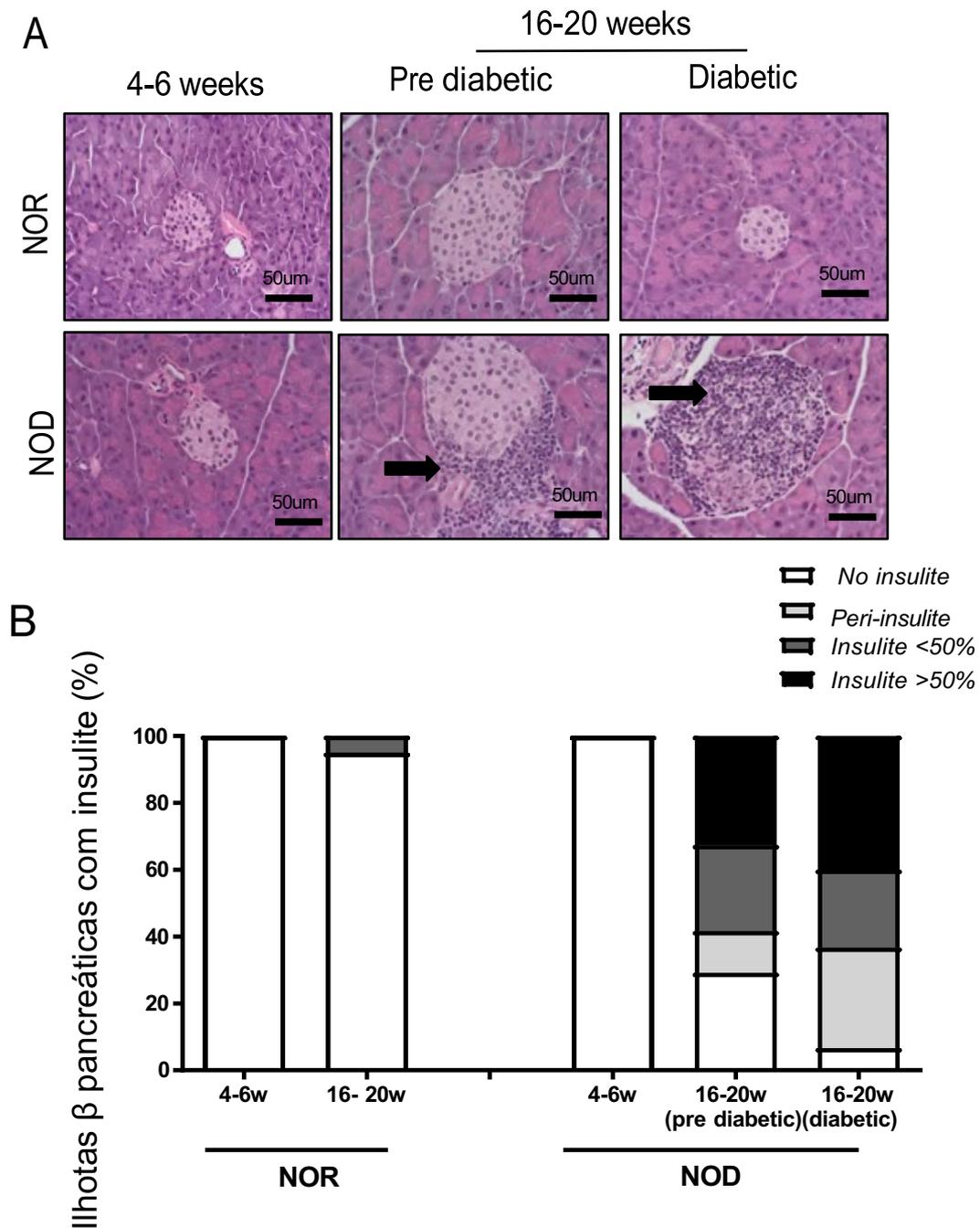


Figura 12. Análise histopatológica do Pâncreas.

(A) Fotos representativas de cortes histológicos do pâncreas de camundongos NOD e NOR com 4-6 semanas de idade, 16 - 20 semanas com glicemia abaixo de 250mg/dL e 16-20 semanas com glicemia superior a 250mg/dL. Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (H&E) e examinados no microscópio ótico no aumento de 40x. (B). Foi avaliado o estágio de progressão da insulite em cada ilhota β pancreática de todos animais e atribuído valores de escore: sem insulite = 0, Peri insulite = 1, insulite invasiva < 50% = 2, insulite invasiva > 50% = 3. O gráfico representa a porcentagem de cada estágio identificado (n= 4 animais por grupo).

O IFN- γ e a IL-17 são citocinas bem descritas como importantes na patogênese do diabetes autoimune (Lehuen et al. 2010)(Jain et al. 2008; Emamaullee et al. 2009)(Rothe et al. 1997). Desta forma, nosso próximo passo foi analisar a produção de citocinas nos pâncreas de camundongos NOD. Os níveis de IL-17 estavam aumentados em todos os tempos avaliados, mesmo na ausência de sinais de insulte. Observamos também um aumento progressivo nos níveis de IFN- γ após o estágio pre-diabético, mas não observamos alterações nos níveis de IL-10 (Figura 13A). Apesar da ausência de sinais histológicos de insulite em camundongos NOD com 4-6 semanas de idade, estes já apresentavam um ambiente pro-inflamatório no pâncreas com níveis mais altos de IL-17.

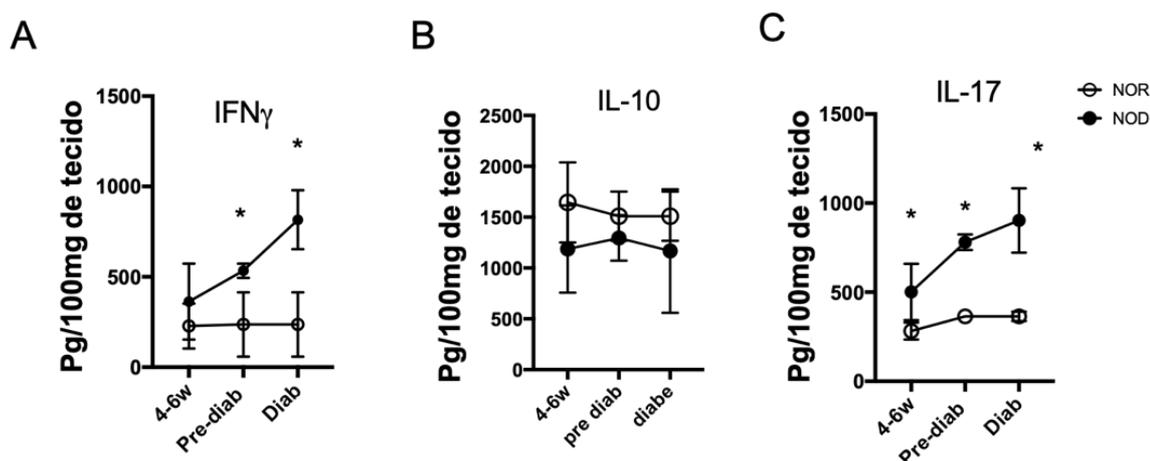


Figura 13: Concentração de citocinas no extrato do pâncreas de camundongos NOD e NOR.

As concentrações das citocinas foram medidas em extratos do pâncreas dos camundongos por ELISA. (A) IFN γ , (B) IL-10 e (C) IL-17. O gráfico representa as concentrações de citocinas por grama de tecido. (n= 4-5 animais por grupo). A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. *p < 0,05. N=4-5

5.2. Camundongos NOD apresentavam defeitos na barreira intestinal antes do desenvolvimento da insulite.

O pâncreas se desenvolve a partir do duodeno primitivo (endoderma) e essa conexão embrionária parece estar preservada durante a vida adulta. Na última década, vários estudos tentaram desvendar a ligação imunológica entre o pâncreas e o intestino (Vaarala et al., 2008). Entretanto pouco se sabe ainda sobre a influência dos elementos da mucosa intestinal na fisiologia do pâncreas.

Os linfonodos pancreáticos estão associados com o trato gastrointestinal e drenam simultaneamente o pâncreas e o duodeno (Van den Broeck, Derore, and Simoens 2006; Turley et al. 2005). Nossa hipótese, neste estudo, é que os antígenos intestinais, linfócitos e células dendríticas podem ganhar os linfonodos pancreáticos via vasos linfáticos através desses linfonodos comuns.

Para confirmar a conexão entre o linfonodo pancreático e a mucosa intestinal, administramos azeite de oliva por gavagem em camundongos NOD de 8 semanas de idade. Esse método nos permitiu evidenciar os linfonodos proximais que drenam o intestino delgado devido à absorção de quilomícrons pelos vasos linfáticos. O linfonodo pancreático tornou-se mais evidente no animal que recebeu o azeite de oliva quando comparado com o animal que não recebeu (Figura 14). Esse resultado confirmou os relatos que os linfonodos pancreáticos drenam a mucosa intestinal e poderiam servir de conexão entre intestino e pâncreas.

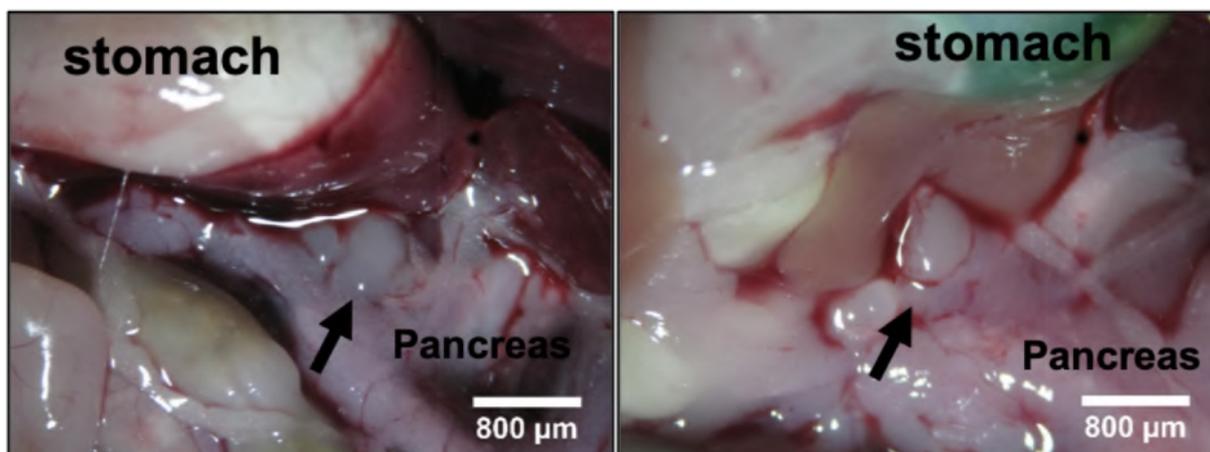


Figura 14: Fotografia dos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD após a gavagem com azeite de oliva.

O painel à esquerda mostra o linfonodo pancreático dos animais controle e o painel à direita mostra o linfonodo dos animais que receberam a gavagem de azeite de oliva.

Para entender como o eixo pâncreas intestino poderia interferir na fisiologia do pâncreas em um cenário patológico, avaliamos alterações na mucosa intestinal de camundongos NOD durante o desenvolvimento do diabetes. A secreção de muco pelas células caliciformes é essencial para proteger a mucosa intestinal da invasão por bactérias evitando o contato direto do epitélio intestinal com microorganismos que podem causar dano tecidual e inflamação (Pettersson et al. 2011). Observamos que a frequência de células caliciformes e a produção de

muco se encontravam reduzidas no intestino delgado e cólon de camundongos NOD em todos os tempos avaliados. (Figura 15).

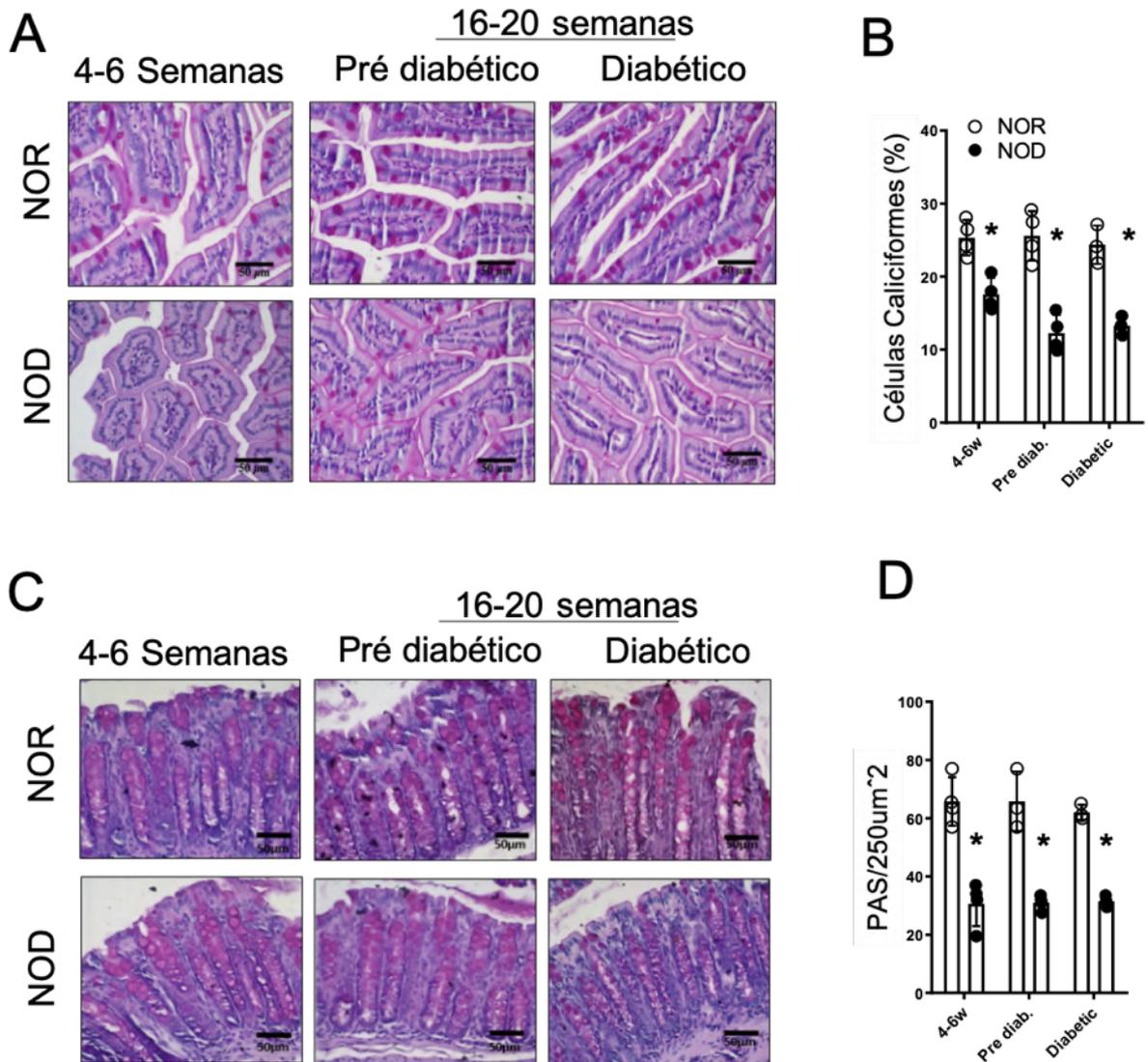


Figura 15. Produção de muco em camundongos NOD e NOR.

O intestino delgado e grosso de camundongos NOD e NOR foram isolados, incluídos em parafina e foram preparados cortes histológicos que, após coloração com H&E ou PAS, foram examinados ao microscópio ótico no aumento de 40X. (A) Fotos representativas do intestino delgado. (B) Frequência de células calliciformes PAS⁺ no intestino delgado. (C) Fotos representativas do cólon. (D) Frequência de células PAS⁺ no cólon. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N=4-5.

A quantificação da mucina 2 (MUC 2), principal componente do muco intestinal em camundongos (Pelaseyed et al. 2014), foi realizada por imunohistoquímica em camundongos NOD pré- diabéticos e seus controles NOR. Observamos que os camundongos NOR apresentavam um padrão de marcação forte para MUC2 em 100% das células no intestino

delgado enquanto que os camundongos NOD apresentavam um padrão fraco a moderado de marcação em 100% das células (Figura 16). No cólon, o padrão de marcação no grupo controle NOR foi de moderada a forte enquanto que, nos camundongos NOD, a marcação exibe um padrão fraco e menos evidente na base da cripta (Figura 16D). Além disso, o tamanho das vesículas contendo muco foi consideravelmente menor no intestino dos camundongos NOD. Juntos, esses resultados nos mostram que a deficiência na produção de muco em camundongos NOD está associada a uma menor produção de MUC2. Tem sido descrito que a MUC2, além de ser o principal componente estrutural do muco, é capaz de modular a resposta tolerogênica das células dendríticas CD103⁺ da lâmina própria contribuindo assim para a homeostase intestinal e o estabelecimento da tolerância oral (Shan et al. 2013).

A MUC 1, por outro lado, é uma mucina transmembrana fisiologicamente mais expressa no estômago e pouco expressa no intestino em condições normais (Agrawal, Gupta, and Konowalchuk 2018). Por ser menos frequente na composição do muco intestinal, a MUC1 apresentou um padrão de marcação muito fraco ou mesmo ausente nas células caliciformes do intestino delgado e cólon dos dois grupos de camundongos (Figura 16A). Curiosamente, houve um aumento de células positivas para MUC1 na lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD que pode estar relacionado ao contexto mais inflamatório presente nessa mucosa. A presença de MUC 1 na membrana de células da lâmina própria já havia sido previamente relatada (Agrawal, Gupta, and Konowalchuk 2018). Foi descrito que a expressão de MUC1 aumenta durante a inflamação intestinal sugerindo um papel importante dessa molécula na fisiologia da inflamação (Guang et al. 2010).

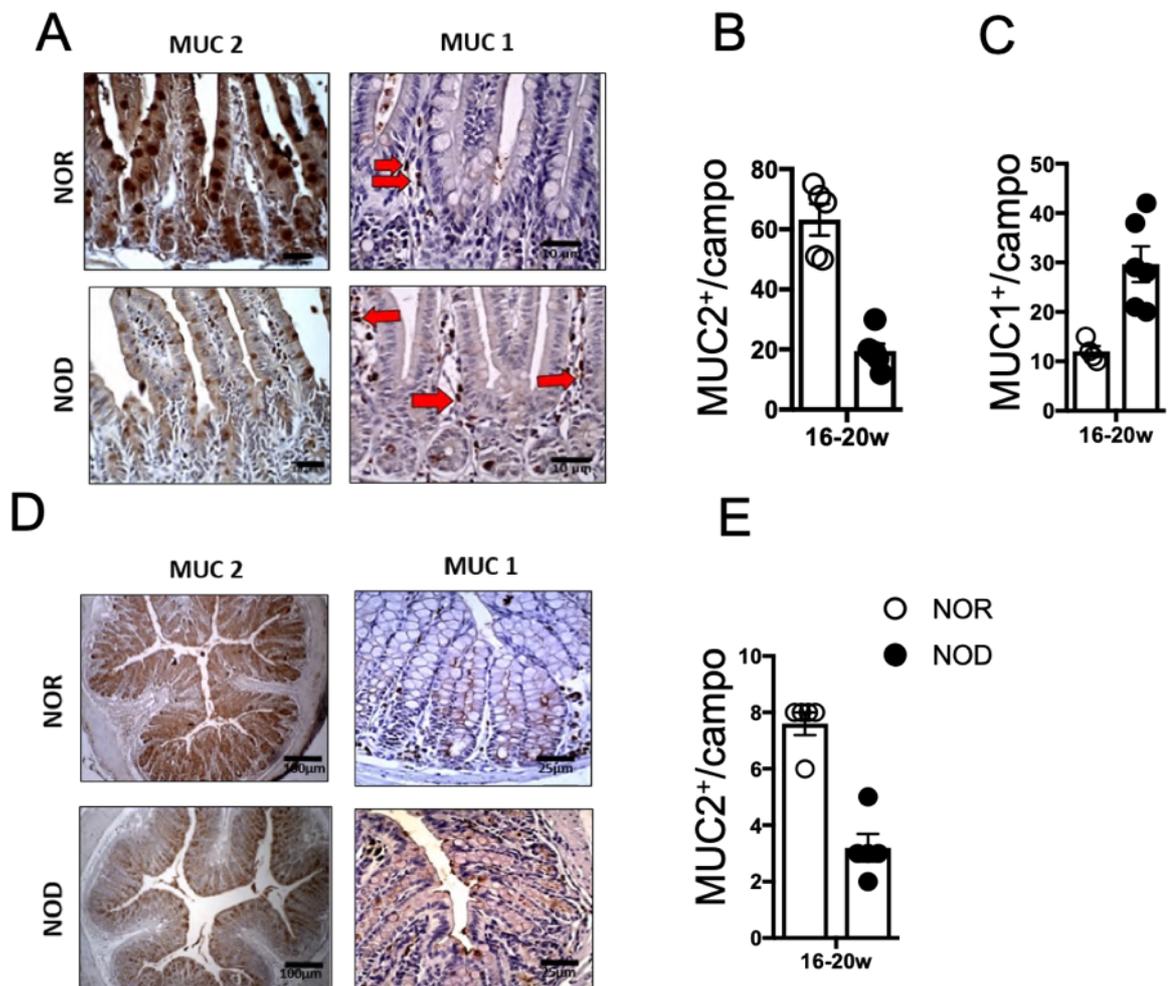


Figura 16: Avaliação da expressão das proteínas MUC2 e MUC1 na mucosa intestinal de camundongos NOR e NOD.

A avaliação da expressão das proteínas MUC2 e MUC1 foi feita por imunohistoquímica (IHQ). As fotos são representativas da mucosa intestinal de camundongos NOD pre-diabéticos e de camundongos NOR da mesma idade. (a) Imagem da marcação por imunohistoquímica de MUC2 no intestino delgado. (b) Número de células MUC2+, (c) número de MUC1+ por campo analisado. (d) Imagem da marcação por imunohistoquímica de MUC2 no cólon e (e) número de células MUC2+. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N=4-5

A IgA secretória (SIgA) também faz parte dos mecanismos de proteção da mucosa. Assim como o muco, a IgA pode controlar a penetração de microrganismos comensais através do epitélio e manter a homeostase intestinal (Oliver Pabst 2012). Camundongos NOD apresentaram uma concentração menor de SIgA no conteúdo intestinal quando comparados com camundongos NOR. É importante notar que a redução na concentração de SIgA no lúmen dos camundongos NOD precede o início da insulite nesses animais (Figura 17).

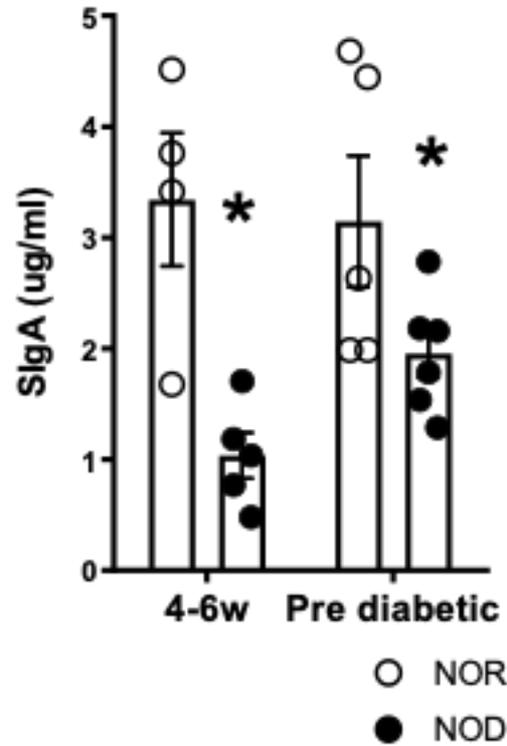


Figura 17: Concentração de IgA secretória (SIgA) no lúmen do intestino de camundongos NOD e NOR.

Os níveis de SIgA do conteúdo intestinal foram medidos por ELISA. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N= 4-6. Valores representativos de dois experimentos independentes.

A produção de IgA ocorre principalmente na lâmina própria e nas placas de Peyer por plasmócitos produtores de IgA (Oliver Pabst 2012). Para determinar se a menor concentração de IgA secretória observada nos camundongos NOD estaria relacionada a um defeito na sua produção, avaliamos a frequência de plasmócitos produtores de IgA na lâmina própria e nas placas de Peyer durante a evolução do diabetes tipo 1 e nas placas de Peyer antes do início da insulite. A redução da frequência dessas células foi constatada em todos os tempos avaliados, indicando que camundongos NOD apresentam defeitos na diferenciação ou manutenção de plasmócitos produtores de IgA na mucosa intestinal antes do início da insulite (Figura 18).

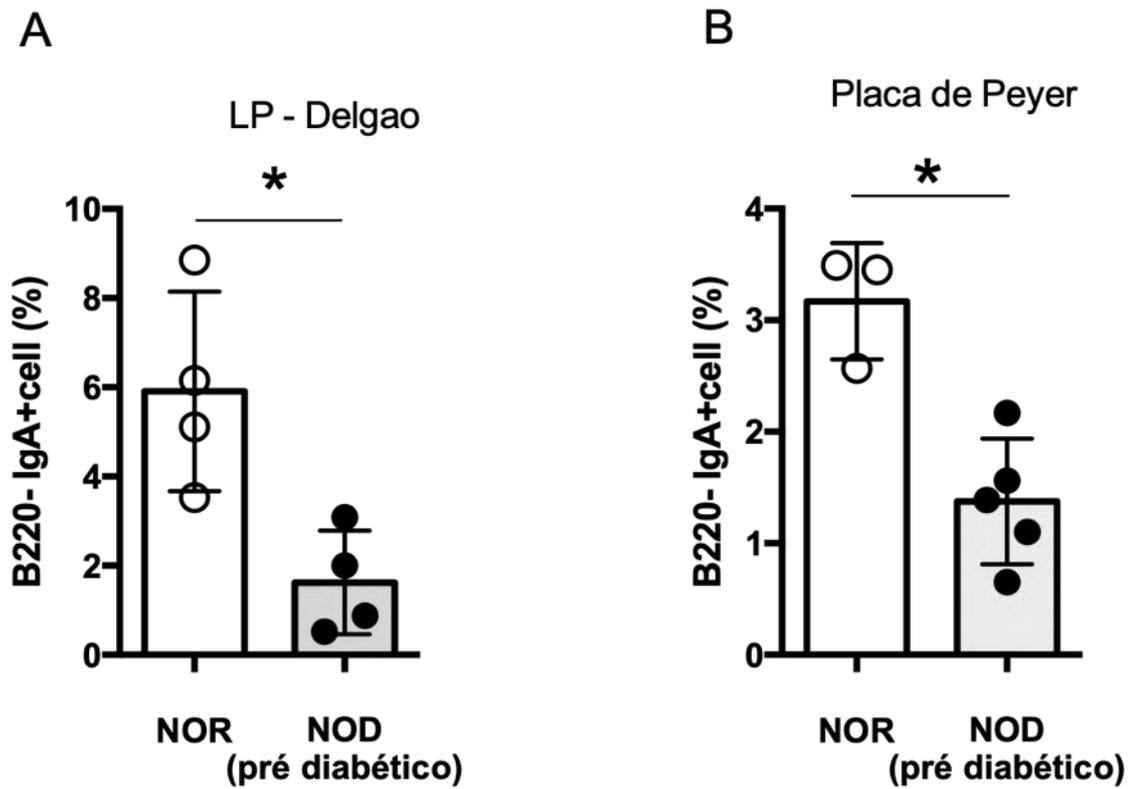


Figura 18: Plasmócitos produtores de IgA na mucosa intestinal de camundongos NOD e NOR.

(A) As frequências de plasmócitos CD4- B220- IgA+ na lâmina própria do intestino delgado e (B) nas placas de Peyer foram avaliadas por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm desvio padrão frequências de células para cada animal. A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N= 4-5.

Avaliamos também se a deficiência na produção de IgA poderia resultar no prejuízo da sua função de ligação às bactérias da microbiota. Para esse fim, isolamos as bactérias das fezes de camundongos NOD e NOR e avaliamos por citometria de fluxo a porcentagem de bactérias ligadas a IgA. (Figura 19).

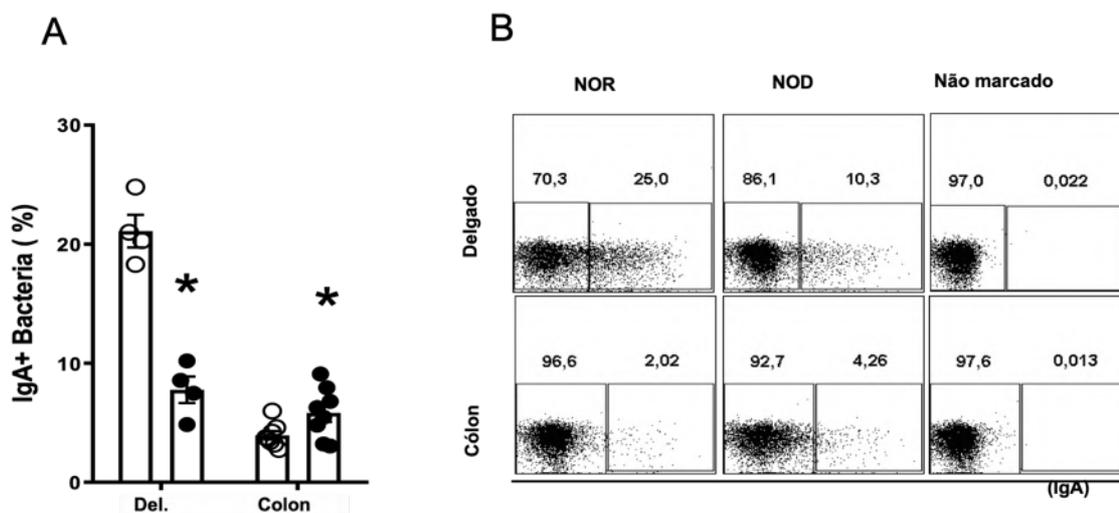


Figura 19: Avaliação das bactérias IgA+ da microbiota do intestino delgado e cólon de camundongos NOR e NOD.

(A) Frequência de bactérias IgA+ da microbiota do intestino delgado e cólon de camundongos NOR e NOD. (B) *Dot plots* representativos de amostras de bactérias intestinais não marcadas e a porcentagem média de bactérias marcadas (IgA+) em camundongos NOR e NOD. Os gráficos são resultado de dois experimentos independentes. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. A análise estatística utilizada foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N=4-5. Valores representativos de dois experimentos independentes.

Curiosamente, o padrão de ligação da IgA às bactérias mostrou-se completamente alterado em camundongos NOD de forma que a proporção de bactérias IgA+ estava reduzida no intestino delgado e aumentada no cólon quando comparados com as frequências obtidas em camundongos NOR. Essa variação pode ser atribuída a diferenças de microbiota existente entre as duas linhagens (K. Brown et al. 2015). Além disso, a geração de IgA com reatividade à microbiota parece estar fortemente ligada a uma resposta T independente (Bunker et al., 2015).

5.3. Camundongos NOD apresentavam translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos e alterações na microbiota antes do desenvolvimento da insulite

Em seguida, avaliamos se essas alterações na barreira intestinal de camundongos NOD antes do início do diabetes poderiam levar à translocação de bactérias do intestino para os linfonodos pancreáticos. Para isso, realizamos a extração de DNA dos linfonodos pancreáticos e analisamos a expressão da sequência de RNA 16S por PCR quantitativo com o objetivo de

determinar a densidade bacteriana nesse órgão. Surpreendentemente, a abundância de bactérias nos linfonodos pancreáticos antes do início da insulite e após o estabelecimento da doença foi maior quando comparadas com camundongos NOR indicando que a translocação bacteriana ocorria antes do início do infiltrado inflamatório e estava intensificada após o estabelecimento da insulite (Figura 20)

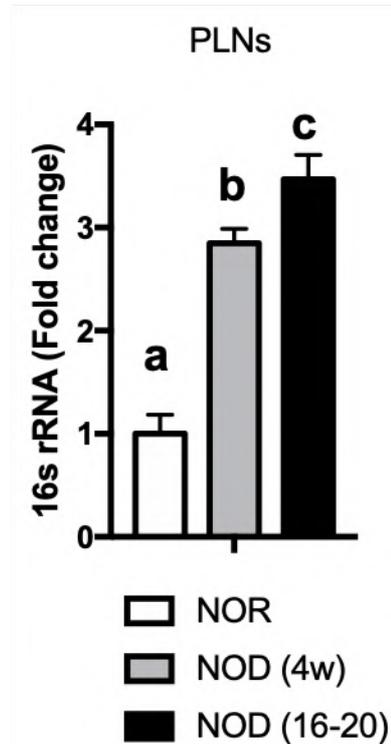


Figura 20: Translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos.

Abundância relativa do gene bacteriano (16srRNA) nos PLNs. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. O teste estatístico utilizado foi *One-way* ANOVA, pós teste Tukey. * $p < 0,05$. (N=5).

Avaliamos também a expressão relativa dos principais filos de bactérias da microbiota intestinal no intestino delgado e nos linfonodos pancreáticos. Os camundongos NOD com 4 semanas apresentaram aumento do filo Firmicutes e redução do filo Actinobacteria no intestino delgado em comparação com camundongos NOR. Além disto, após o início da doença, todos os filos estavam aumentados no intestino delgado em comparação com camundongos NOR. (Figura 21).

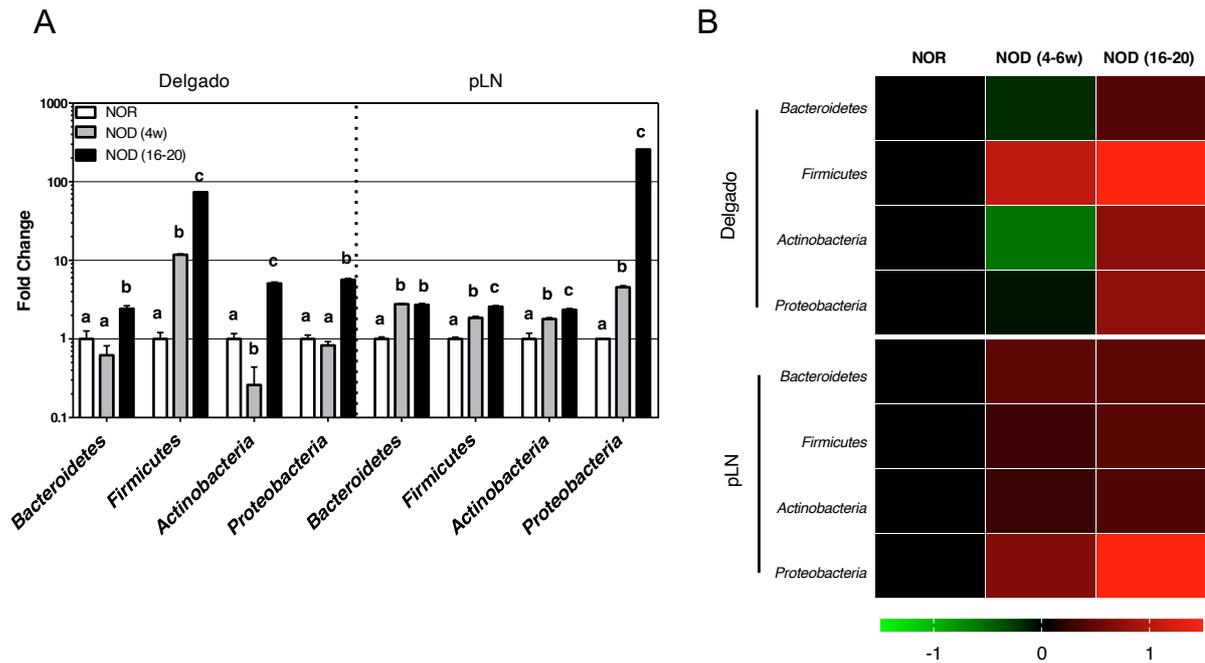


Figura 21: Abundância dos filós da microbiota intestinal no intestino delgado e PLNs de camundongos NOD e NOR.

(A) Abundância relativa de filós microbianos no intestino delgado e nos PLNs. Os valores foram expressos em LOG10. (B) *Heat map* representativo da abundância dos filós bacterianos. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. O teste estatístico utilizado foi *One-way* ANOVA, pós teste Tukey. As letras representam as diferenças estatísticas. (N=5 animais por grupo)

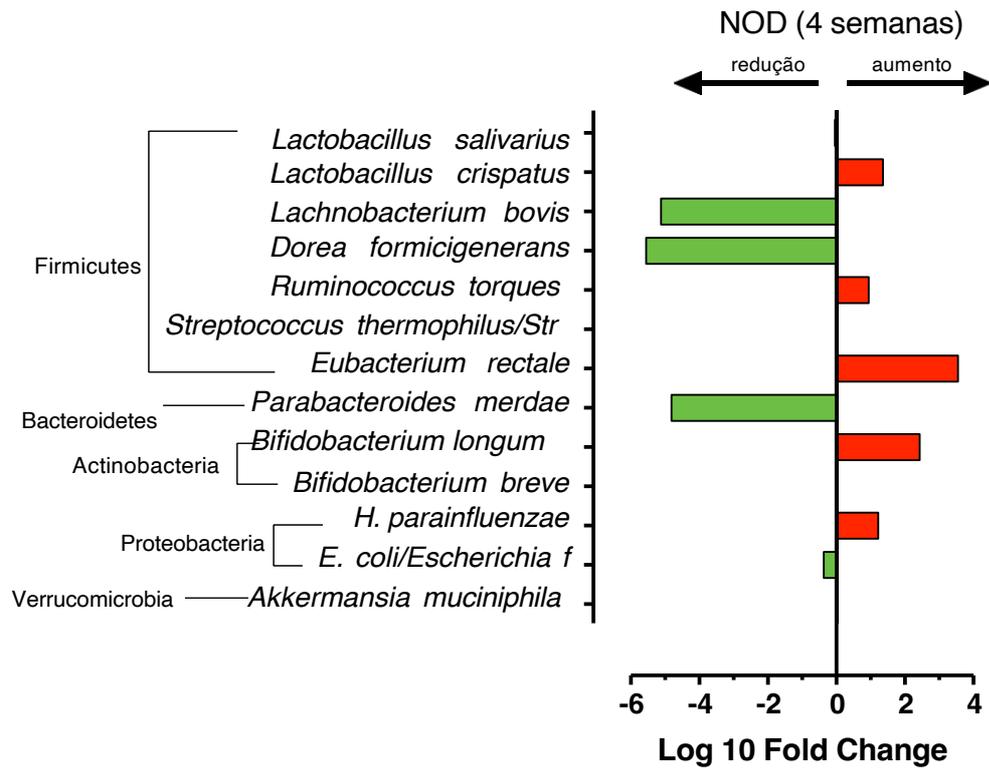
Nos linfonodos pancreáticos, observamos a presença dos filós Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, e Proteobactéria. A abundância de bactérias nos camundongos NOD em relação àquela presente nos camundongos controle NOR estava aumentada antes do início da insulite e a diferença foi intensificada com a progressão da doença nos camundongos NOD. De maneira interessante, a abundância de Proteobacteria foi 200 vezes maior nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD com a doença estabelecida (Figura 21B). Esse aumento estava associado à presença de *E. coli* no linfonodo pancreático de 1 camundongo NOD com 4-6 semanas de idade e 3 camundongos NOD pre-diabéticos (Tabela 3).

ID do animal	NOR					NOD (4-6 semanas)					NOD pré-dabético				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>E. coli</i> (PLNs)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

Tabela 3 - Presença de *E.colli* nos linfonodos pancreáticos (PLNs)

Em seguida, avaliamos as alterações na microbiota intestinal a nível de espécies. Em camundongos NOD com 4 semanas, a abundancia de algumas espécies do filo Firmicutes (*Lachnobacterium bovis* e *Dorea Formicigenerans*) foi reduzida, enquanto que *Lactobacillus crispatus*, *Ruminococcus torques*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* e em particular, *Eubacterium rectale* foram aumentadas. Além disso a abundancia de *Parabacteroides merdae* um espécie do genero Bacterioidetes, e *Escherichia coli* do filo Proteobacteria estavam diminuidas quando comparado com camundongos NOR. Observamos também que a abundância de *Bifidobacterium longum* do filo Actinobacteria e de *Haemophilus parainfluenzae* do filo Proteobacteria estavam aumentados nos camundongos NOD dessa idade (Figure 22). O surgimento da doença foi associado com a redução da abundancia de várias espécies como, *Lactobacillus salivarius*, *Lachnobacterium bovis*, *Dorea Formicigenerans* and *S. thermophilus Streptococcus* do filo Firmitutes, e Actinobacteria (*Bifidobacterium breve*). *E. coli* e *Arkkemansia muciniphila* foram aumentadas. E importante destacar que *E. coli* e *P. merdae* aumentaram durante a progressão da doença e ao mesmo tempo, *Ruminococcus torques*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Bifidobacterium breve* e *Eubacterium* diminuíram em abundância (Figure 22 E).

A



B

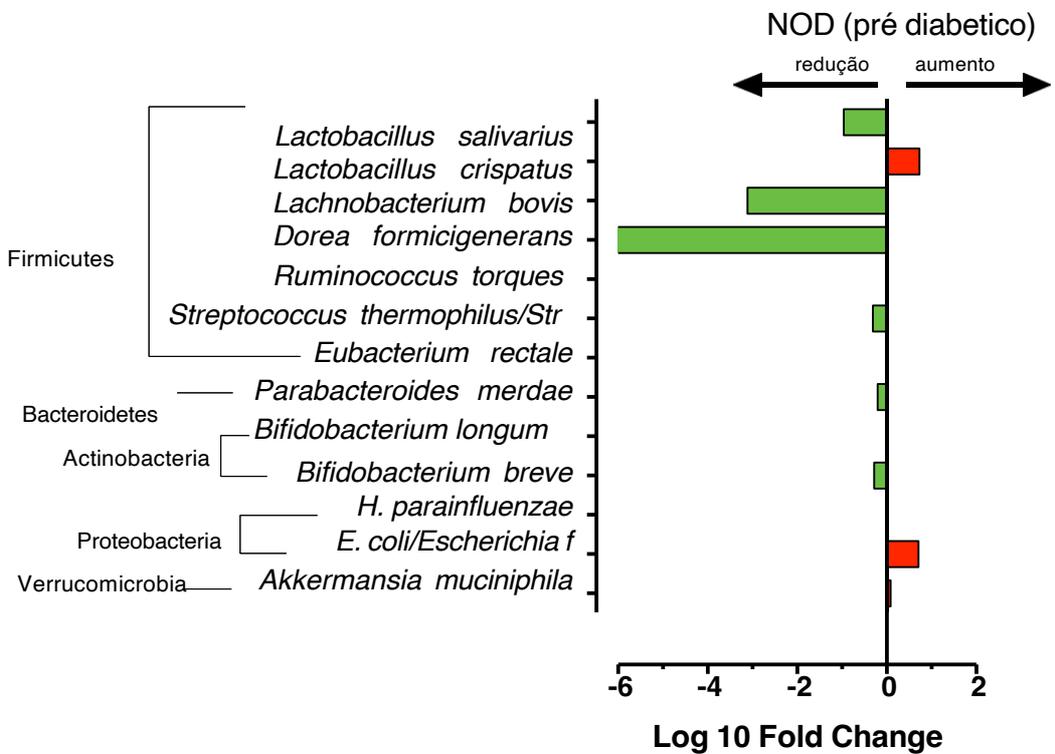


Figura 22: Abundância relativa de espécies da microbiota intestinal.

A análise das espécies de bactérias da microbiota intestinal foi realizada utilizando placas de PCR-Array (*Microbial DNA qPCR Arrays*). (A) Abundância relativa de bactérias da microbiota intestinal de camundongos NOD jovens em comparação com camundongos NOR. (B) Abundância relativa de bactérias da microbiota intestinal de camundongos NOD pré-diabéticos em comparação com camundongos NOR. Os valores foram expressos em Log10. N = 5 animais por grupo.

A transmissão materna da microbiota de camundongos NOR a filhotes recém-nascidos de camundongos NOD é capaz de induzir mudanças no estabelecimento da microbiota desses animais e de conferir proteção ao diabetes (Daft et al. 2015). Para avaliar se essa mudança seria capaz de restaurar a função da barreira intestinal em camundongos NOD, realizamos experimentos de troca de filhotes. Os filhotes recém-nascidos de mães NOD foram amamentados por mães adotivas NOR. A troca de filhotes foi realizada até 24 horas após o nascimento. Após o período de amamentação de 4 semanas, foi realizado o desmame e eutanásia dos filhotes NOD (Figura 23).

Avaliamos a produção de muco como uma medida da função de barreira intestinal nos camundongos NOD por ser este um dos sinais alterados precocemente na barreira intestinal dos camundongos NOD (Figura 15). Curiosamente, a amamentação de camundongos NOD por mães adotivas NOR foi capaz de normalizar a frequência de células caliciformes no intestino delgado e no cólon desses camundongos (Figura 23 B-D) sugerindo que a microbiota pode estar relacionada com as alterações de barreira intestinal observadas em camundongos NOD.

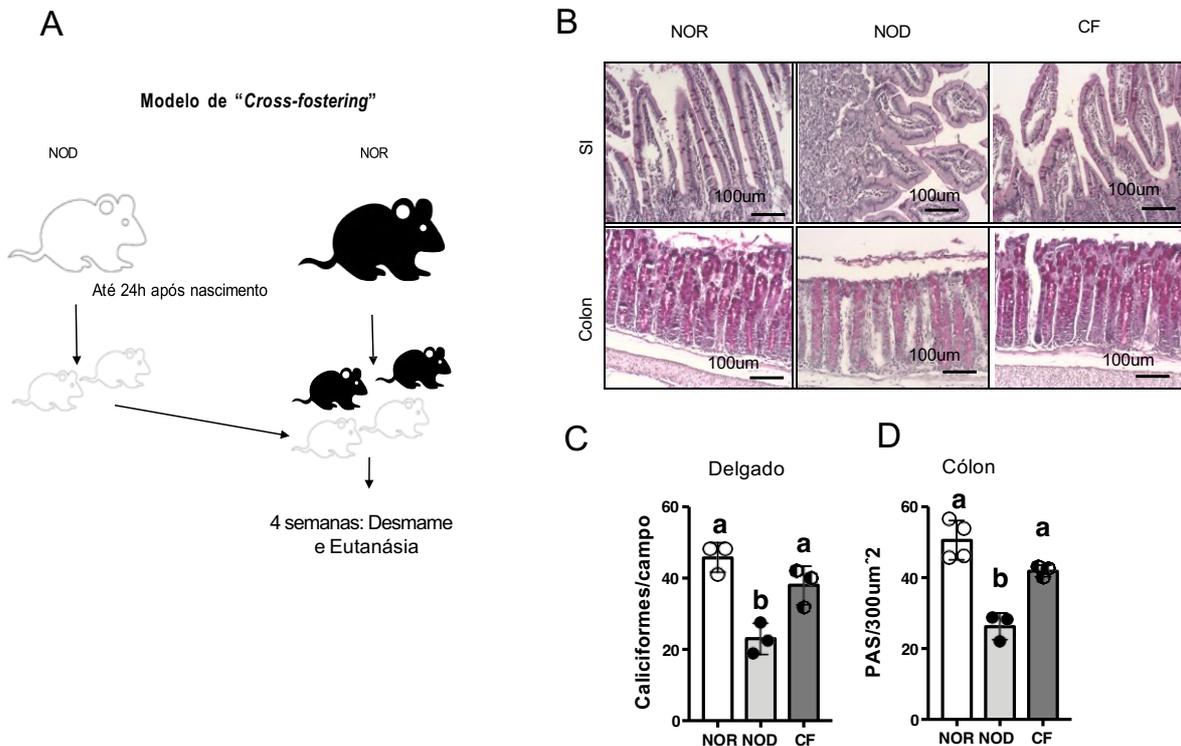


Figura 23: Influência da microbiota intestinal na produção de muco em camundongos NOD.

Camundongos NOD foram amamentados por mães adotivas NOD. (A) Estratégia experimental do modelo de “*Cross-Fostering*”. (B) Fotos representativas de cortes histológicos corados com PAS do intestino delgado e cólon (C) Frequência de células caliceformes PAS⁺ no intestino delgado. (D) Frequência de células PAS⁺ no cólon. As barras representam a média ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. O teste estatístico utilizado foi *One-way ANOVA*, pós teste Tukey. As letras representam as diferenças estatísticas. (N=3-4 animais por grupo).

5.4. Camundongos NOD apresentavam alterações nos linfócitos intra-epiteliais (IEL) nas células linfoides inatas (ILCs) e nos linfócitos T CD4⁺ efetores na lâmina própria do intestino

Todas essas alterações na mucosa intestinal sugerem que camundongos NOD podem apresentar defeitos nos mecanismos relacionados à regulação do contato direto de antígenos e células epiteliais. Para garantir a homeostase intestinal, as células imunes locais devem ser capazes de responder rapidamente aos antígenos patogênicos, e manter uma resposta regulatória. Várias populações linfoides e da imunidade inata participam da preservação dessa dualidade crítica na resposta imune intestinal. Entre elas, os linfócitos intraepiteliais (IEL) que se encontram dispersos na camada epitelial assim como os linfócitos T CD4⁺ (Th) e as células linfoides inatas (ILC) localizados na lâmina própria abaixo do epitélio. Nosso próximo passo foi verificar se haveria comprometimento também nessas populações de células em camundongos NOD.

Separamos das células epiteliais do intestino delgado de camundongos NOD de 4 semanas de idade e, em seguida, realizamos a separação de linfócitos por gradiente de densidade em Percoll (ver métodos). O número de células recuperadas foi maior nos camundongos NOD (Figura 24).

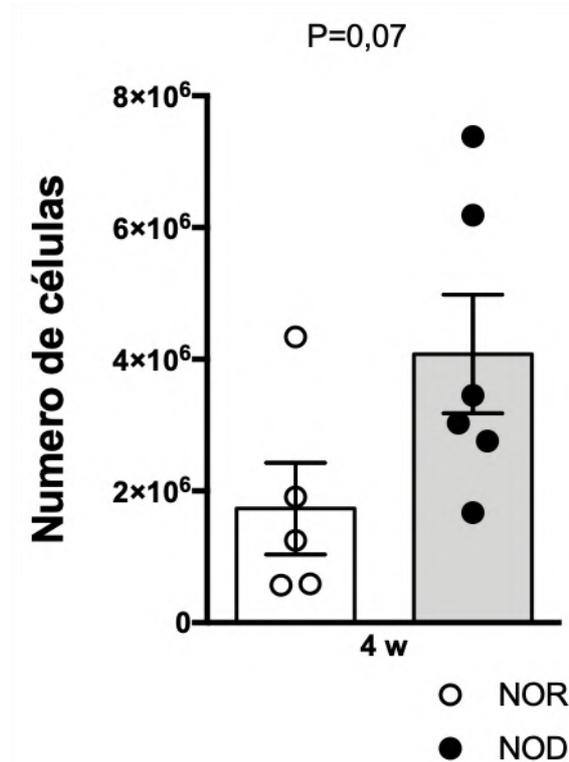


Figura 24: Contagem total de células extraídas do epitélio do intestino delgado de camundongos NOD e NOR. O intestino delgado foi incubado com DTT (Ditiotreitól), para a remoção das células epiteliais, em seguida, os linfócitos foram separados usando Percoll em diferentes gradientes de concentração.

As barras representam a média \pm desvio padrão do número total de leucócitos viáveis por animal. O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. $N=5-6$.

Em seguida, analisamos a frequência e o número absoluto de células das populações clássicas de IEL (Figura 25). As duas populações de IEL naturais são $CD8\alpha\alpha^+$ e podem expressar $TCR\gamma\delta$ ou $TCR\alpha\beta$. Seu desenvolvimento é dependente de antígenos próprios e não próprios, povoam o epitélio intestinal durante o desenvolvimento embrionário e sua frequência é reduzida com o passar da idade. Os IEL naturais expressando $TCR\gamma\delta$ (fenótipo IEL $\gamma\delta$), apresentaram frequências similares entre os dois grupos (NOD e NOR), entretanto os IEL naturais $TCR\alpha\beta$ (fenótipo IEL $\alpha\beta$) estavam em frequências muito menores em camundongos NOD.

A diferenciação de IEL induzidos é dependente do estímulo da microbiota e de antígenos da dieta, possuem $TCR\alpha\beta$ e podem ser $CD8^+$, $CD4^+$ ou duplo positivos. As frequências de IEL (fenótipo induzido $CD8$) e (fenótipo induzido duplo) foram expressivamente menores em camundongos NOD. Os números absolutos das células dessas populações não estavam alterados. Apesar da frequência de células da população de IEL $TCR\alpha\beta^+ CD4^+$ (fenótipo induzido $CD4$) não apresentar alteração, o número absoluto dessas

células foi maior nos camundongos NOD quando comparado com camundongos NOR (Figura 25). Mais uma vez, as alterações observadas precedem o início da insulite em camundongos NOD.

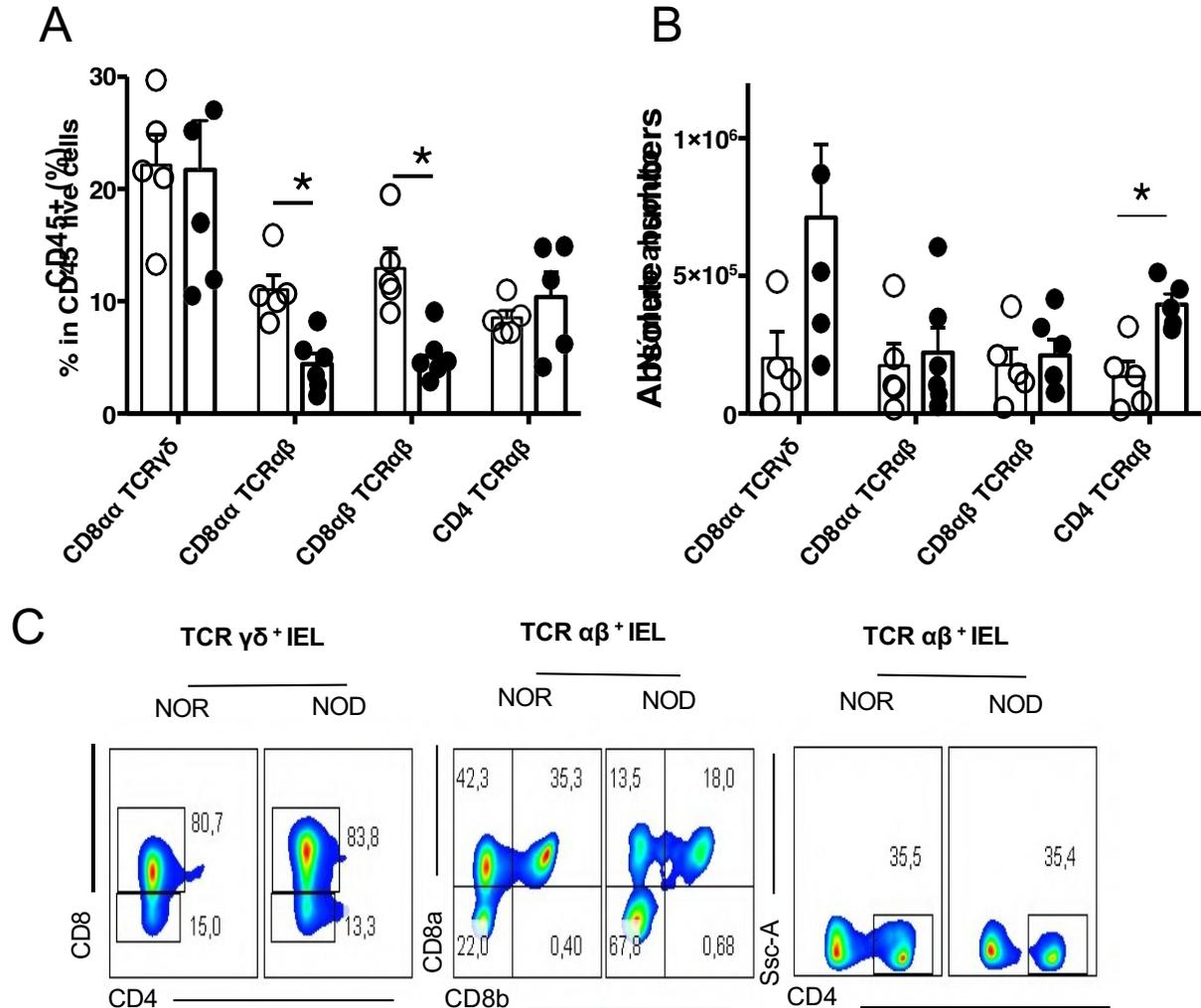


Figura 25 - Frequência de IEL no intestino delgado de camundongos NOD e NOR.

A imunofenotipagem dos linfócitos T foi feita pela técnica de citometria de fluxo para identificação das diferentes populações de IEL. (A) Frequência e (B) número absoluto das células. (C) *Dot plots* representativos das análises. As barras representam a média ± desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

Em seguida, isolamos as células da lâmina própria do intestino delgado e avaliamos a frequência de células linfoides inatas (ILCs) e as células T CD4+ efetoras. A extração de células da lâmina própria foi realizada após a separação das células epiteliais e a digestão do tecido com liberase e DNase (ver métodos). Apesar da ausência de infiltrado inflamatório, o número de células viáveis recuperadas da lâmina própria de camundongos NOD com a doença estabelecida foi maior em comparação com as células recuperadas de camundongos NOR. Esse resultado foi similar ao observado por (Oliveira 2014)(Figura 26).

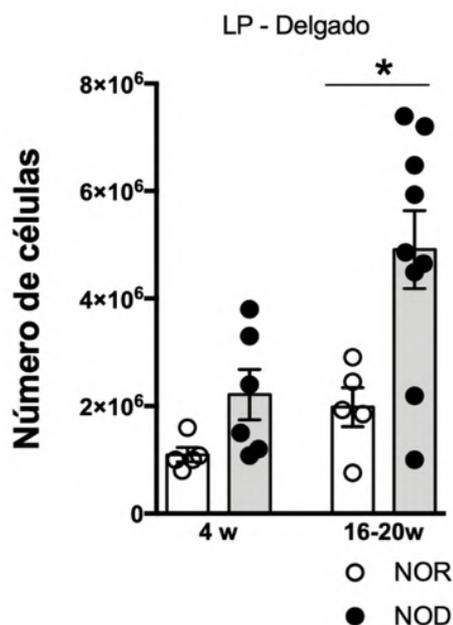


Figura 26: Contagem total de células extraídas da lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.

As células foram extraídas após a digestão do tecido usando liberase de acordo com técnica detalhada nos materiais e métodos. As barras representam a média \pm desvio padrão do número total de leucócitos viáveis por animal. O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$. N=5-9

As ILCs são especialmente numerosas em superfícies mucosas e são reguladores importantes das barreiras epiteliais no intestino (Vivier et al. 2018). A ativação inapropriada de ILCs tem sido associada à patogênese de distúrbios inflamatórios e autoimunes (Xiong and Turner 2018). Não encontramos diferença nas frequências ou números absolutos de ILC2 ou ILC3 quando comparamos camundongos NOD de 4-6 semanas com seus controles NOR de mesma idade (Figura 27). No entanto, camundongos NOD pré-diabéticos apresentaram menor frequência de ILC2 e números similares quando comparados com camundongos NOR. As ILC3 apresentaram maior frequência e número absoluto em camundongos NOD pré-diabéticos quando comparados com camundongos controle NOR da mesma idade. Não houve diferença na frequência ou número absoluto de ILC1 (Figura 27). Esses resultados indicam que as alterações nas populações de ILC2 e ILC3 em camundongos NOD pode estar diretamente relacionada com a progressão da insulite nestes animais e progressivo acúmulo de alterações na mucosa intestinal.

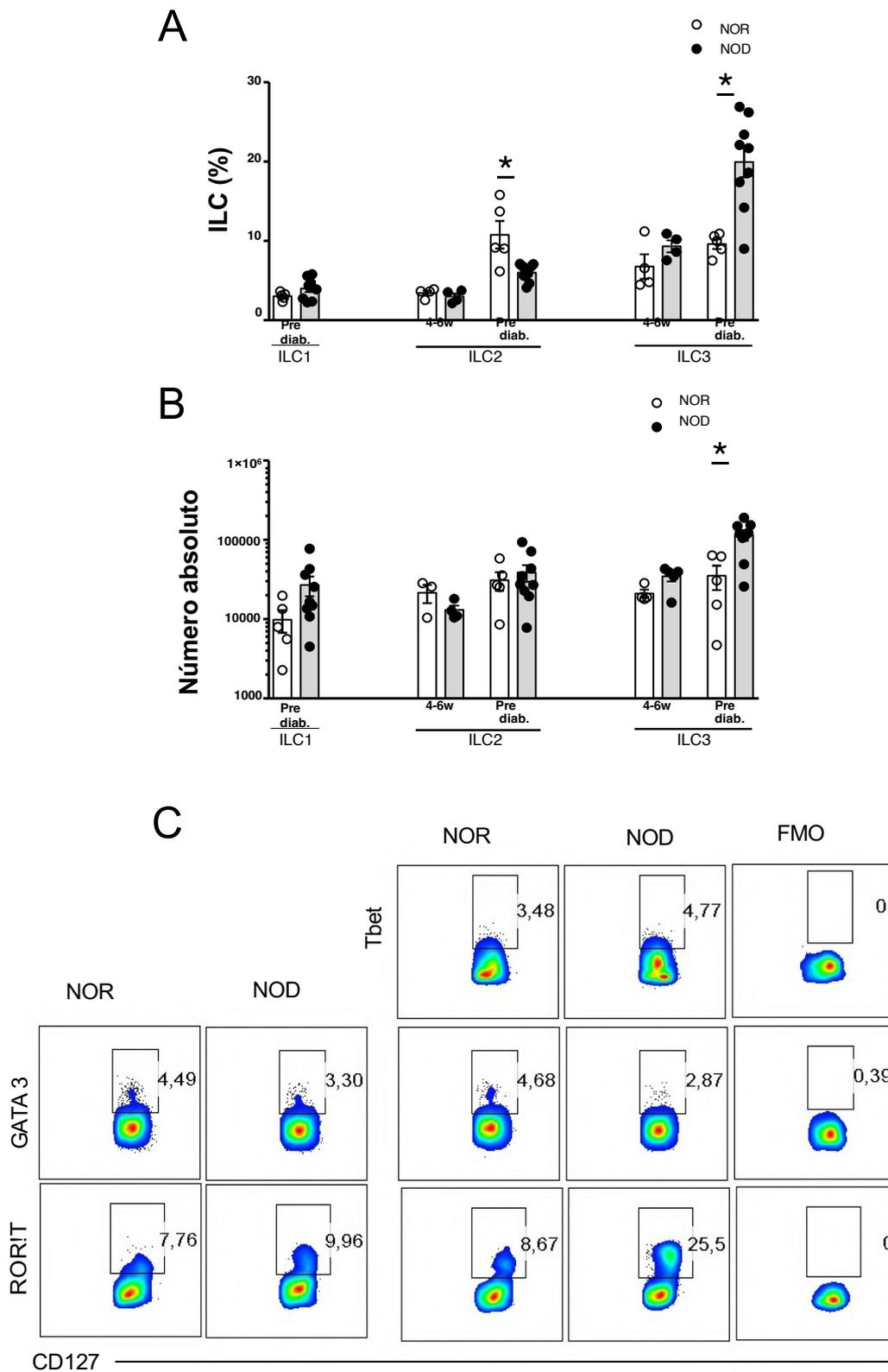


Figura 27: Populações de células linfoides inatas (ILCs) na *lamina propria* do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.

A imunofenotipagem das ILCs foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências e (B) números absolutos de ILCs. (C) *Dot plots* representativos. As barras representam a média \pm desvio

padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

Avaliamos também se o eixo pâncreas intestino afetaria as populações de linfócitos T CD4+ muito abundantes na lâmina própria do intestino delgado durante a progressão do diabetes. Similarmente aos resultados observados nas populações de ILCs, não observamos alteração nas frequências ou números absolutos de linfócitos T CD4+ efetores em camundongos NOD de 4-6 semanas em comparação com camundongos NOR (Figura 28).

A frequência e número absoluto de células T CD4+ RORYT+ (Th17) foi comparável em camundongos NOD e NOR com 4-6 semanas de idade. No entanto, a frequência e número absoluto dessas células estava aumentada em camundongos NOD pré-diabéticos (Figura 28). Por outro lado, a frequência e número absoluto de células T CD4+ GATA3+ (Th2) foi semelhante em camundongos NOD e NOR de 4-6 semanas e a frequência estava reduzida em camundongos NOD pré-diabéticos quando comparados com camundongos NOR controle. O número absoluto dessas células foi similar entre as duas linhagens de camundongos. A frequência e o número de células T CD4 + tbet+ (Th1) em camundongos de 16-20 semanas de idade foi a mesma nas duas linhagens (Figura 28).

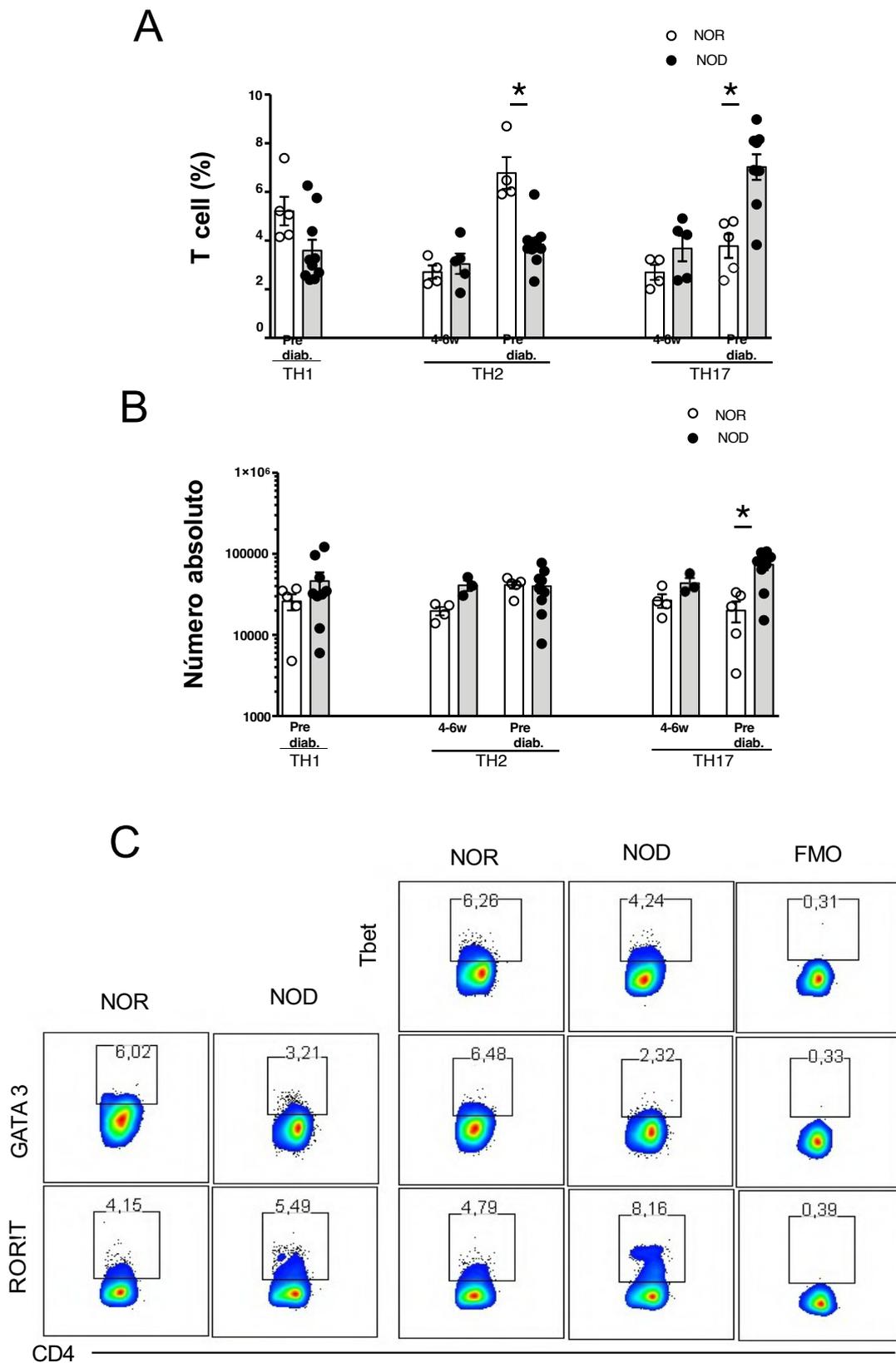


Figura 28 : Populações de células T CD4 na lamina propria do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.

A análise da frequência e número absoluto das células T CD4⁺ foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências (B) e números absolutos das diferentes sub-populações de células T CD4⁺. (C) *Dot plots* representativos da análise. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

Apesar de haver um aumento na frequência e número absoluto de células T inflamatórias CD4⁺ RORyT⁺ na lâmina própria do intestino de camundongos NOD durante a progressão da diabetes tipo 1, a frequência de células Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) não se alterou indicando uma perda do balanço inflamação/regulação na mucosa intestinal desses animais.

Como observamos um perfil mais inflamatório nas células T CD4⁺ do intestino delgado de camundongos NOD, decidimos avaliar também a produção de citocinas no extrato desse tecido. Não observamos alterações nas concentrações de IFN- γ e TNF nos camundongos NOD em nenhuma idade avaliada (Figura 29). Entretanto, camundongos NOD pre-diabéticos apresentaram um aumento na secreção de IL17 no intestino delgado, o que está em acordo com a maior frequência de células T CD4⁺ RORyT⁺ e ILC3 na lâmina própria no intestino.

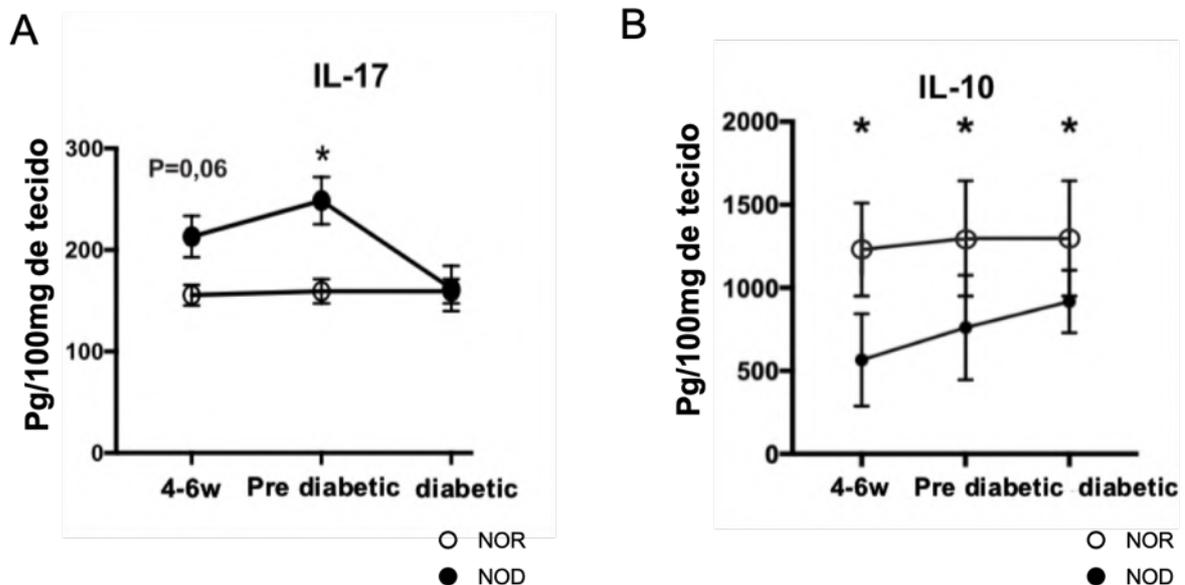


Figura 29: Concentração de citocinas na mucosa intestinal de camundongos NOD e NOR.

As concentrações das citocinas (A) IL-17 e (B) IL-10 no extrato de intestino delgado dos camundongos foram medidas por ELISA. Os gráficos representam a concentração de citocina por grama de tecido. (n= 4-5 animais por grupo). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * P>0,05.

De maneira interessante, a produção de IL-10 estava reduzida no intestino delgado de camundongos NOD de todas as idades avaliadas inclusive antes do início da insulite. A IL-10 é uma citocina chave no controle da inflamação e particularmente na homeostase intestinal (Gomes-Santos et al. 2012). A deficiência de IL-10 e o aumento de IL-17 confirmou nossa hipótese de que camundongos NOD apresentam perda do equilíbrio inflamação/regulação na mucosa intestinal. Além disso, mais uma vez os camundongos NOD apresentaram defeitos nessa mucosa que precederam a insulite.

5.5. Camundongos NOD apresentavam alterações nas células dendríticas nos linfonodos mesentéricos antes do desenvolvimento da insulite.

Os linfonodos mesentéricos drenam o intestino de maneira compartimentalizada e esta compartimentalização é importante na organização da resposta imune na mucosa intestinal (ESTERHAZY et al, 2019).

Para analisar a composição de células dendríticas (DCs) e células T reguladoras (Treg) nos linfonodos mesentéricos, coletamos cada linfonodo que drena os diferentes segmentos do intestino e realizamos a análise separada desses segmentos: duodeno (D), Jejuno (J), Ileo (I) e cólon (C). Inicialmente, notamos que o número total de células foi similar entre NOD e NOR no linfonodo que drenam o duodeno. No entanto, houve uma redução de células nos linfonodos que drenam o jejuno, e o ceco (Figura 30).

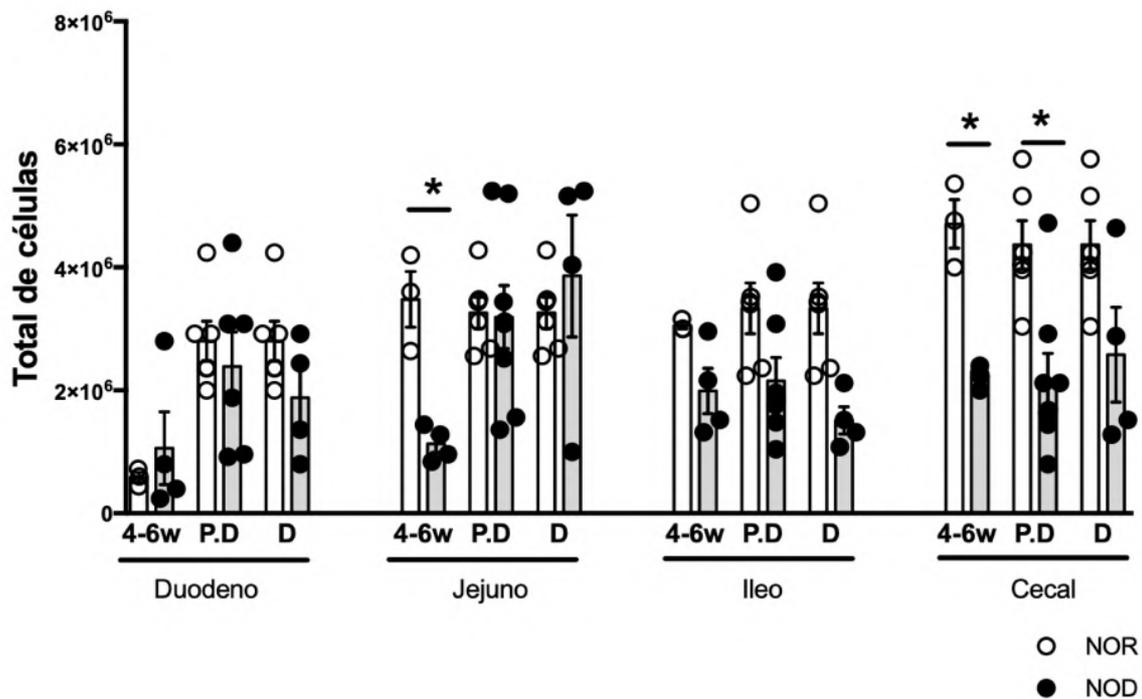


Figura 30: Contagem total de células extraídas dos linfonodos mesentéricos que drenam segmentos diferentes do intestino de camundongos NOD e NOR.

Número total de células dos linfonodos mesentéricos compartimentalizados. As barras representam a média ± desvio padrão do número total de leucócitos viáveis por animal. O teste estatístico utilizado foi o teste t de Student. * p < 0,05. N=4-7

Em seguida, nos avaliamos as frequências e números absolutos das sub-populações de células dendríticas convencionais (cDCs) nos diferentes linfonodos mesentéricos (mLN). Os vasos linfáticos intestinais locais estão ligados através de linfáticos aferentes aos mLNs e fornecem uma rota física para as células dendríticas que suportam simultaneamente a tolerância e as respostas imunes protetoras através da compartimentalização da drenagem linfática diferentes segmentos do intestino para linfonodos mesentéricos distintos (Esterhazy et al. 2019).

As duas populações de DCs migratórias, DCs CD103+ CD11b- e CD103+ CD11b+, estão presentes em altas frequências nos mLN e são capazes de gerar células Treg (Esterházy et al. 2016). Ao analisar as frequências dessas duas sub-populações de cDCs, observamos que, no linfonodo mesentérico que drena o duodeno, não houve alteração na frequência de células CD103+CD11b-, mas o número absoluto dessas células estava reduzido em camundongos NOD diabéticos.

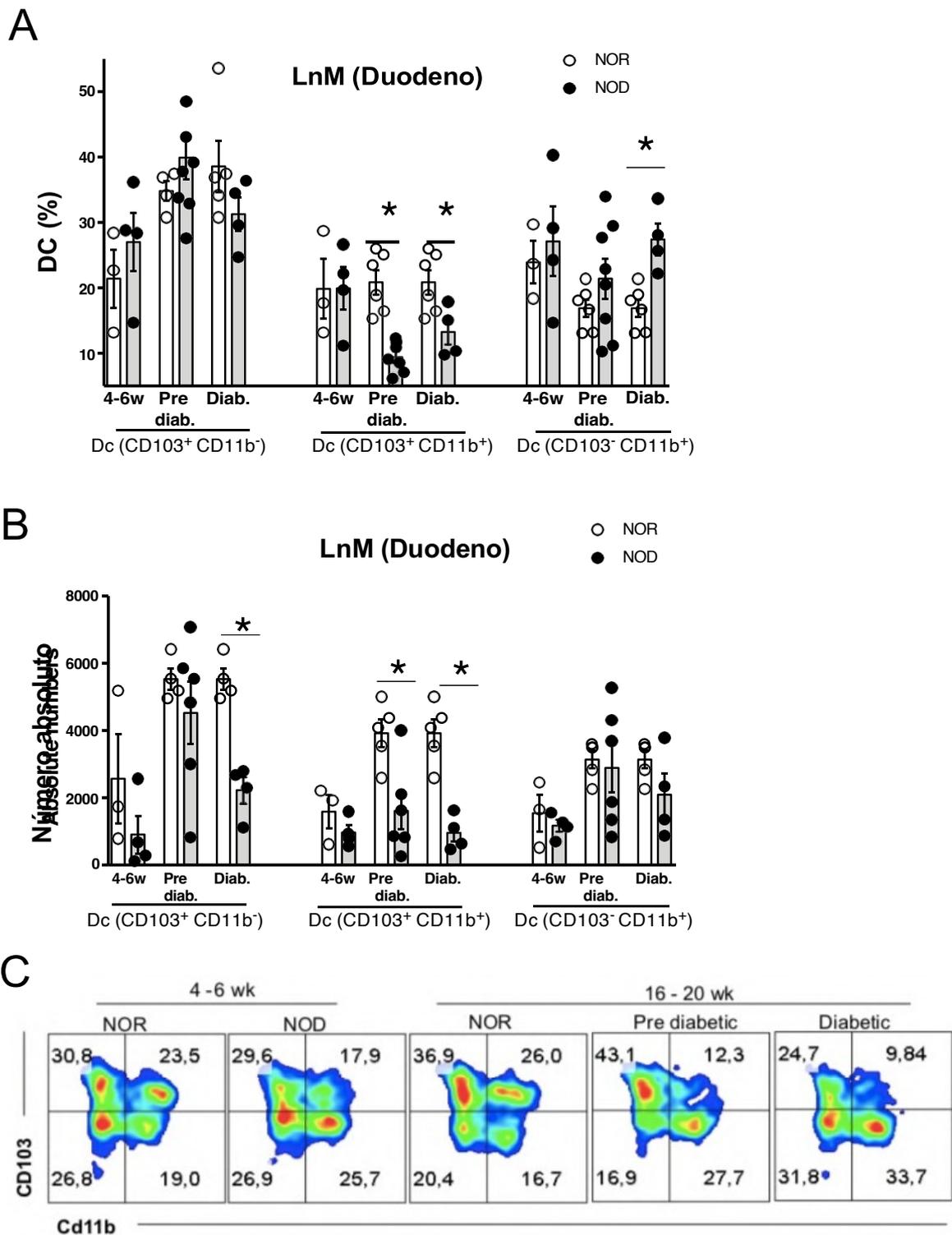


Figura 31: Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o duodeno de camundongos NOD e NOR.

A análise das frequências e números absolutos das DCs foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências e (B) números absolutos das células. (C) *Dot plots* representativos das análises. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais) . O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

As frequências e os números de células CD103⁺CD11b⁺ estavam reduzidas nos linfonodos duodenais de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos. Por outro lado, neste linfonodo, a frequência de células dendríticas CD103⁻CD11b⁺ foi aumentada apenas no grupo pre diabético, sem alterações nos números absolutos (Figura 31).

As frequências e números absolutos de células dendríticas CD103⁺CD11b⁻ estava reduzida nos linfonodos mesentéricos que drenam o jejuno de camundongos NOD pre-diabéticos.

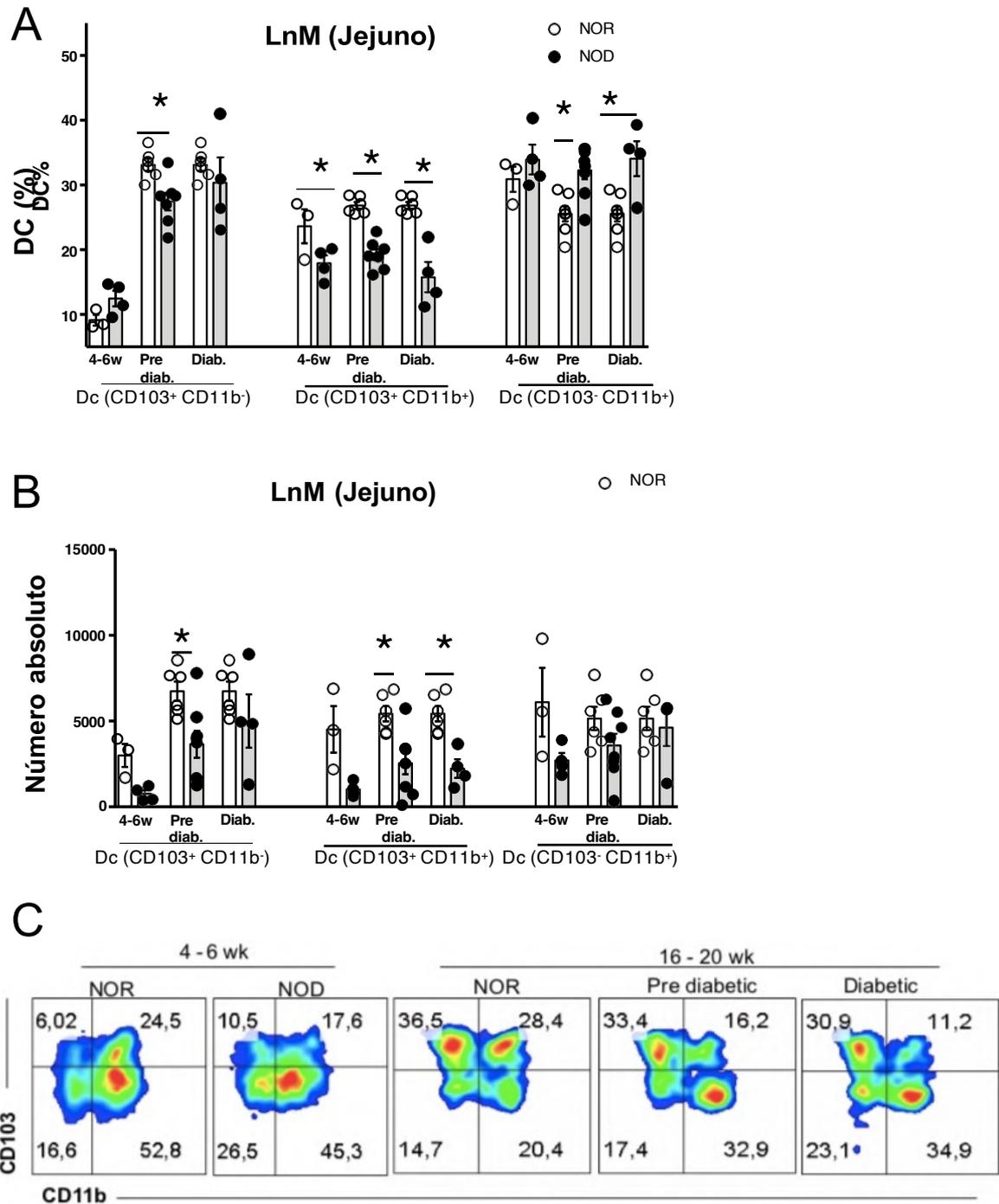


Figura 32 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o jejuno de camundongos NOD e NOR.

A análise das frequências e números absolutos das DCs foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências e (B) números absolutos das células. (C) *Dot plots* representativos das análises. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

Nesse mesmo linfonodo, observamos redução das frequências de células dendríticas CD103⁺ CD11b⁺ em camundongos NOD de todas as idades analisadas inclusive antes do

desenvolvimento da insulite. Os números absolutos dessa população estavam reduzidos apenas nos camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos. O aumento da frequência de células DC103-CD11b⁺ não estava associado com o aumento do número absoluto dessas células. (figura 32).

Nos linfonodos mesentéricos que drenam o íleo, apenas as frequências de células dendríticas CD103⁺CD11b⁻ estavam reduzidas em camundongos NOD. Entretanto a análise dos números absolutos revelou uma redução nas células CD103⁺CD103⁻ em camundongos NOD diabéticos. Além disso, houve redução das DCs CD103⁺CD11b⁺ em camundongos NOD de todas as idades analisadas, mesmo antes do início da insulite.

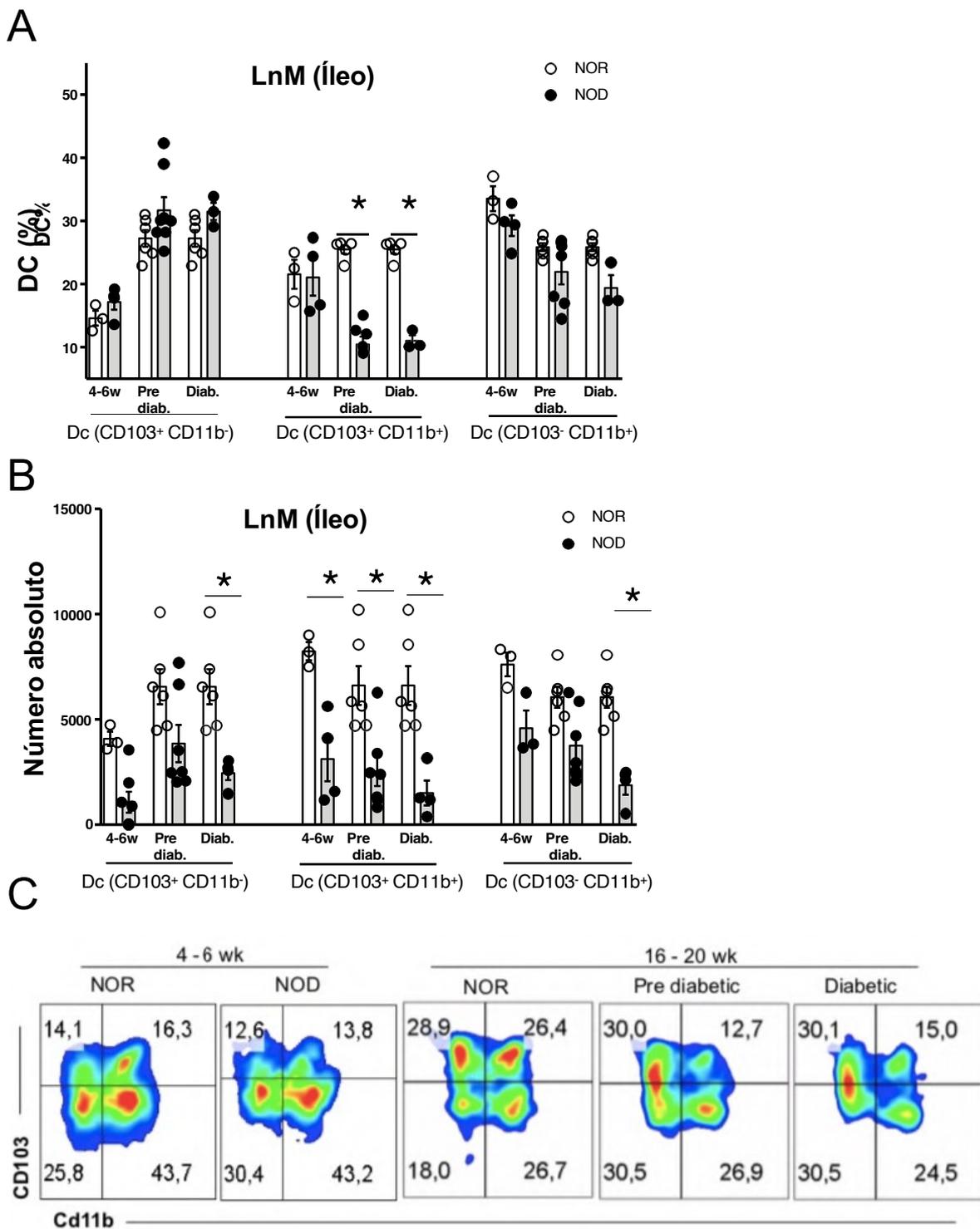


Figura 33 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o íleo de camundongos NOD e NOR.

A análise das frequências e números absolutos das DCs foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências e (B) números absolutos das células. (C) *Dot plots* representativos das análises. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * p < 0,05.

Por outro lado, o número absoluto de DC CD103⁻CD11b⁺ estava reduzido apenas nos camundongos NOD diabéticos (Figura 33). Essas diferenças nos números absolutos provavelmente se devem ao número reduzido de células nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD no órgão analisado (Figura 29).

Nos linfonodos cecais, encontramos redução na frequência de DCs CD103⁺CD11b⁻ apenas nos camundongos NOD pré-diabéticos. Por outro lado, a frequência de DCs CD103⁺CD11b⁺ estava reduzida em camundongos NOD de todas as idades e estágios da doença. A frequência de DCs CD103⁻CD11b⁺ estava aumentada nos camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos.

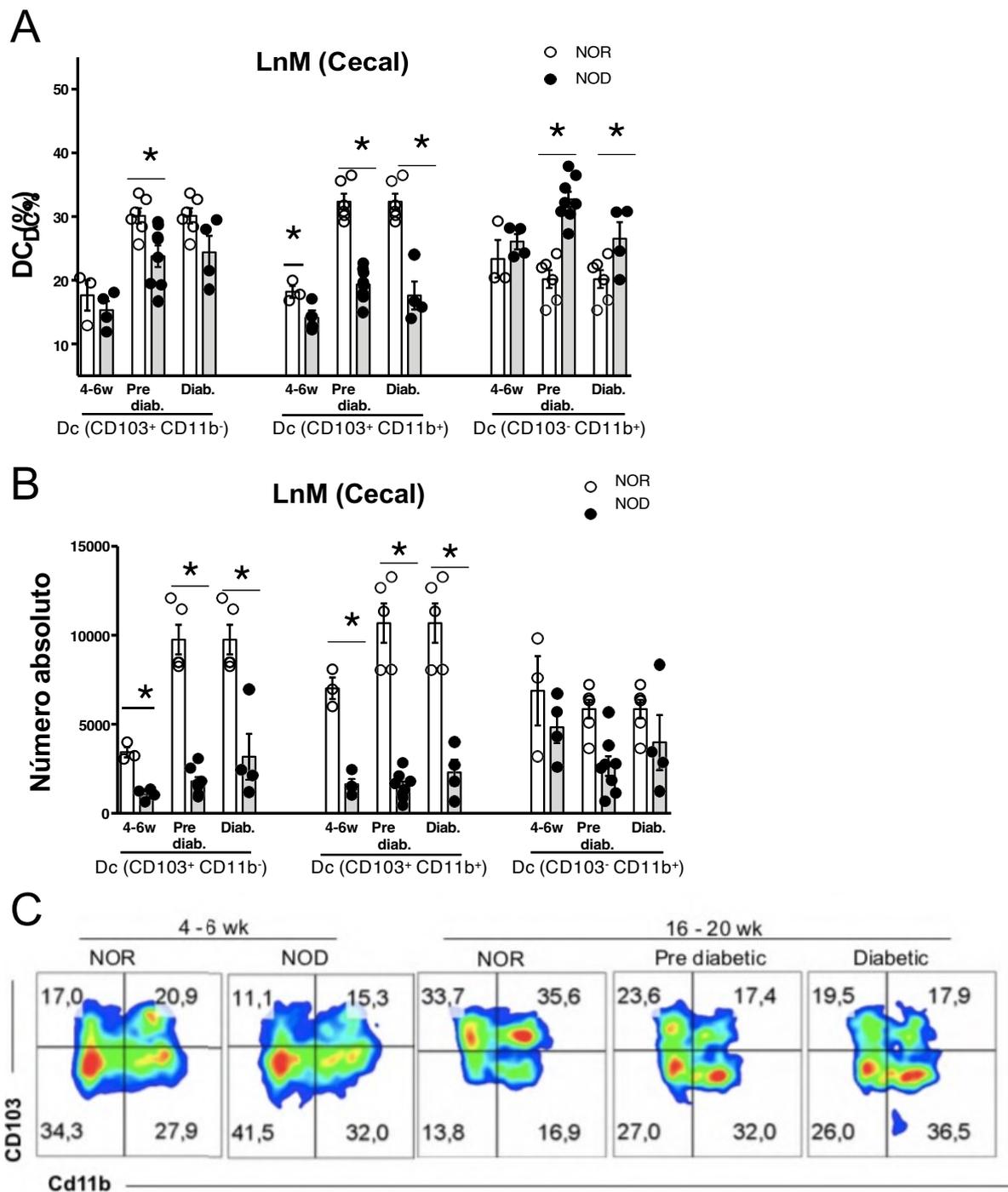


Figura 34 - Frequências e números absolutos de células dendríticas (DCs) nos linfonodos que drenam o cecum de camundongos NOD e NOR.

A análise das frequências e números absolutos das DCs foi feita pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências e (B) números absolutos das células. (C) *Dot plots* representativos das análises. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. $n = (5-8$ animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$.

Os números absolutos de DCs CD103⁺CD11b⁻ e de DCs CD103⁺CD11b⁺ estavam reduzidos em camundongos NOD em todas as condições analisadas, porém os números de DCs CD103⁻CD11b⁺ não se alteraram nesses linfonodos (Figura 34).

5.6. Camundongos NOD apresentavam redução na frequência de células T reguladoras e resistência à indução de tolerância oral a uma proteína da dieta antes do desenvolvimento da insulite

Vários mecanismos inatos e adaptativos altamente adaptados para a homeostase e prevenção de doenças estão prejudicados em camundongos NOD. Para investigar se a homeostase intestinal estava alterada em camundongos NOD, analisamos a frequência de células T reguladoras CD4⁺ FoxP3⁺ em linfonodos mesentéricos compartimentados e também a indução de tolerância oral nesses camundongos. Recentemente, foi demonstrado que a geração de células Treg no linfonodo que drena o duodeno é importante para a indução de tolerância oral (Esterhazy et al. 2019).

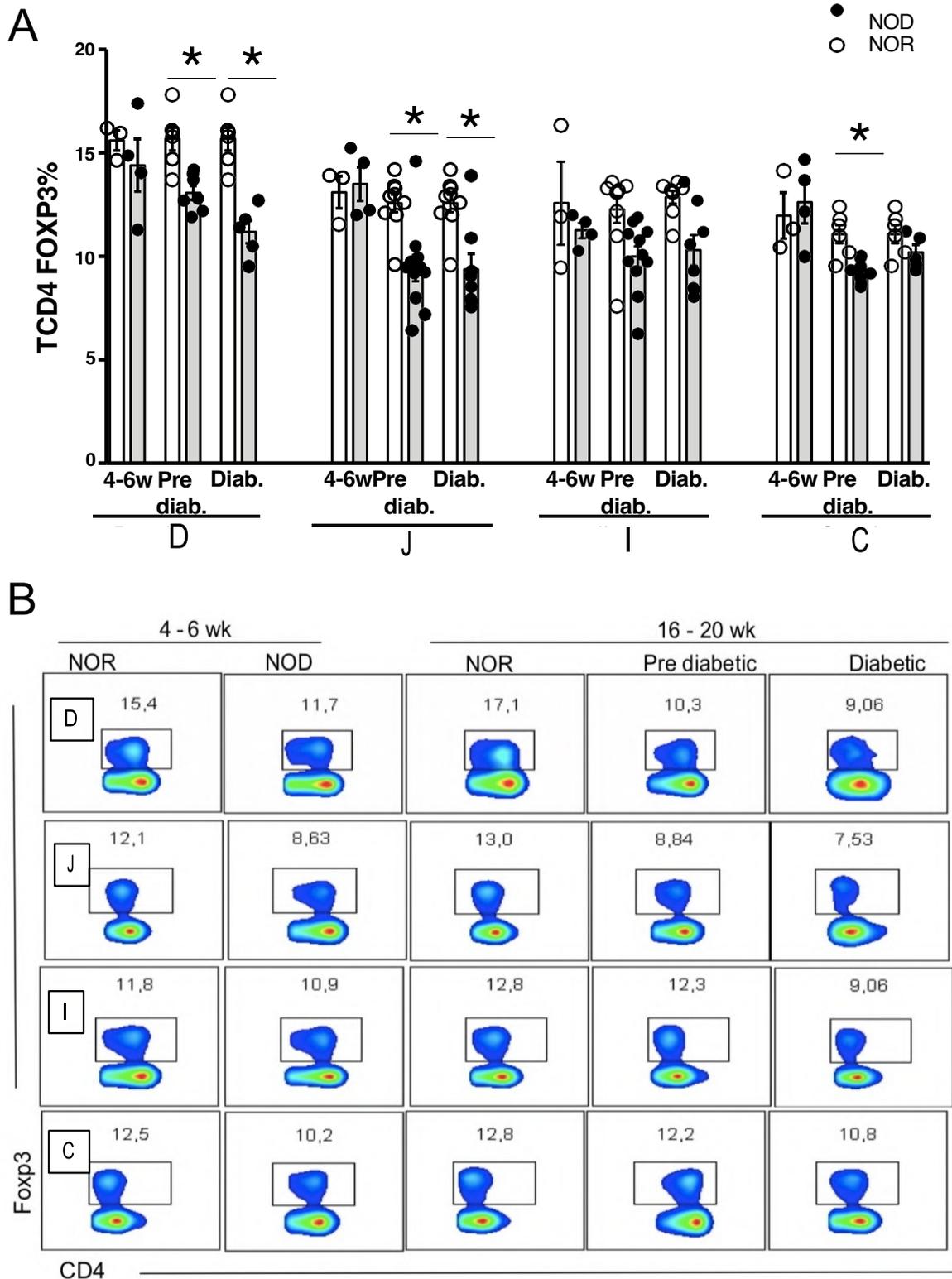


Figura 35: Análise da frequência de células T reguladoras CD4+ Foxp3+ nos linfonodos mesentéricos e cecal.

A análise da frequência de células Treg foi realizada pela técnica de citometria de fluxo (A) Frequências das células Treg nos diferentes linfonodos mesentéricos e no cecal. (C) *Dot plots* representativos das

análises. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada animal. n= (5-8 animais). O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. * $p < 0,05$.

Observamos que as frequências de células Tregs CD4 + FoxP3 + estavam reduzidas nos linfonodos que drenam o duodeno e nos linfonodos que drenam o jejuno de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos (Figura 35). Nos linfonodos cecais, houve redução na frequência dessas células apenas nos camundongos NOD pré-diabéticos. Não encontramos diferença nos linfonodos que drenam o íleo de camundongos NOD em nenhuma das idades analisadas e tampouco em camundongos NOD de 4 a 6 semanas de idade. Isto indica que a frequência de células Treg se alterou nos linfonodos que drenam as porções proximais do intestino e essas alterações precederam o início da insulite.

Em condições fisiológicas, o principal evento imune que ocorre na mucosa intestinal é o estabelecimento da tolerância oral, um importante fenômeno conhecido como o principal regulador das respostas inflamatórias contra os antígenos da dieta e da microbiota (PABST and MOWAT, 2012; REZENDE; WEINER, 2017).

Para investigar como as alterações nos componentes intestinais detectados em camundongos NOD desde a idade precoce teriam impacto na indução de tolerância oral, realizamos um protocolo de indução de administração oral de antígeno (Ovalbumina) já descrito como o mais eficiente para geração de células T reguladoras na mucosa e indução de tolerância oral. O protocolo consiste na ingestão contínua de solução contendo ovalbumina (OVA) na água que é oferecida como única fonte de líquido para o camundongo durante 24 horas. Após a ingestão, os camundongos foram imunizados com a mesma proteína na presença do adjuvante hidróxido de alumínio com o objetivo de induzir uma resposta inflamatória à OVA (Oliveira et al. 2015) (Figura 36 A). Como esperado, a imunização induziu uma resposta inflamatória com alta produção de IgG1 específica para OVA e a ingestão contínua de OVA levou a uma forte supressão na produção de anticorpos IgG1 anti-OVA em camundongos NOR. No entanto, os camundongos NOD que receberam OVA por via oral falharam em modular a resposta imune a OVA apresentaram níveis elevados de IgG1 anti-OVA (Figura 36). Esse resultado confirma que as alterações identificadas na mucosa intestinal de camundongos NOD levaram à quebra da homeostase e prejuízo na indução de tolerância oral.

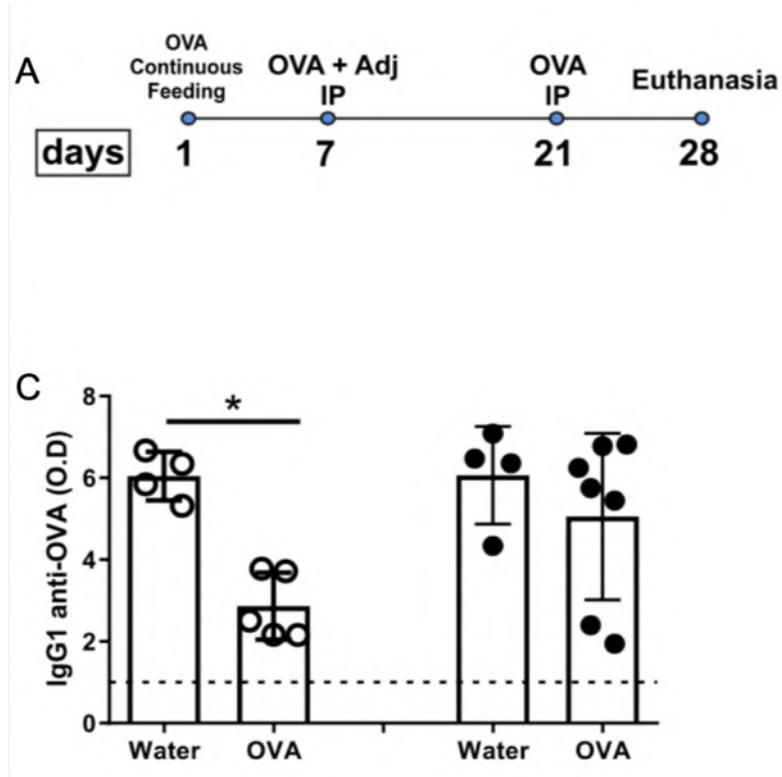


Figura 36: Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD.

(A) Camundongos NOD e NOR de 7 semanas de idade receberam solução contendo 4mg/ml de Ovalbumina (grupo OVA oral) ou apenas água (grupo água) por ingestão voluntária por 24 horas. Sete dias depois, os animais foram imunizados i.p. com 10 ug de OVA e 1mg de hidróxido de $Al(OH)_3$. Quatorze dias depois, os camundongos receberam um reforço de 10ug de ovalbumina (OVA) i.p. (B) Os anticorpos IgG1 anti-OVA no soro foram medidos por ELISA. As barras representam a média \pm SEM do somatório da absorbância de cada amostra. O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. $p < 0,05$.

6. Discussão

Neste trabalho, relatamos que camundongos NOD que desenvolvem espontaneamente o diabetes tipo 1, apresentam alterações na mucosa intestinal que precedem o início da insulite e se acumulam com o desenvolvimento da diabetes nesses animais. Tais defeitos incluem alterações na função da barreira intestinal, defeitos em mecanismos reguladores da mucosa, aumento de células inflamatórias e perda da capacidade de indução de tolerância oral. Essas alterações precoces que se agravam com o início da doença confirmam a existência de um eixo pâncreas intestino que pode interferir diretamente no desenvolvimento do diabetes.

A mucosa intestinal é cronicamente estimulada por uma grande quantidade de agentes externos, incluindo a microbiota, componentes dietéticos, substâncias ambientais nocivas e patógenos infecciosos. A abundante população de células imunes presentes no intestino em conjunto com os elementos da mucosa tem o papel crítico de desenvolver uma resposta imune protetora contra patógenos, mantendo, ao mesmo tempo, a tolerância a antígenos da dieta e da microbiota (A. M. C. Faria, Reis, and Mucida 2017). A compartimentalização das respostas imunes da mucosa em diferentes linfonodos mesentéricos (mLNs) que drenam segmentos distintos do intestino parece ser uma maneira eficiente de realizar essa tarefa (Esterhazy et al. 2019). A falha em manter tal equilíbrio pode levar a consequências deletérias para a homeostase intestinal e sistêmica. Entre os mLNs, o linfonodo duodenal foi caracterizado como o local privilegiado para onde as células dendríticas tolerogênicas migraram para induzir células T reguladoras e tolerância oral (Esterhazy et al. 2019). Curiosamente, o mLN duodenal também é identificado como linfonodo pancreático sugerindo que existe uma conexão linfática entre esses dois órgãos (Van den Broeck, Derore, and Simoens 2006). O pâncreas tem um papel único no metabolismo do corpo através de suas funções endócrinas e exócrinas. Como o linfonodo pancreático-duodenal drena o pâncreas e o duodeno (Van den Broeck, Derore, and Simoens 2006; Turley et al. 2005), ele é considerado, por alguns autores, como a porta de entrada onde os auto-antígenos próprios se encontram com os antígenos externos derivado do lúmen do intestino (Turley et al. 2005). Nossos experimentos usando azeite de oliva administrado por gavagem mostra que o azeite de oliva pode ser encontrado no linfonodo pancreático uma hora após o tratamento oral. Considerando que os linfonodos pancreáticos são capazes de drenar os antígenos intestinais absorvidos pelos quilomícrons, seria plausível supor que alterações no intestino podem funcionar como um gatilho para a inflamação inicial no pâncreas e interferir no desenvolvimento do diabetes tipo 1 (DM1).

De fato, foi demonstrado que o aumento da permeabilidade intestinal (Outi Vaarala 2011; O. Vaarala, Atkinson, and Neu 2008), intervenções dietéticas (Landin-Olsson, Hillman, and Erlanson-Albertsson 2013) e alterações na microbiota intestinal (K. Brown et al. 2015) regulam o desenvolvimento de diabetes auto-imune em modelos animais.

Foi demonstrado também que as células T ativadas no intestino de camundongos NOD podem se infiltrar nas ilhotas porque, durante a insulite, o endotélio vascular das ilhotas passa a expressar MadCAM-1, molécula que se liga à integrina $\alpha 4 \beta 7$ expressa por células imunes ativadas na mucosa intestinal (Turley et al. 2005). Em concordância com esses dados, o bloqueio da MadCAM1 em camundongos NOD com 3 semanas de idade foi capaz de reduzir drasticamente a incidência de diabetes sugerindo que os tecidos linfoides da mucosa estão envolvidos no início da resposta imune patológica em camundongos NOD (Hänninen, Jaakkola, and Jalkanen 1998). Outro estudo sugere ainda que a ativação inicial das células T diabetogênicas ocorre no intestino e que os linfonodos pancreáticos servem sítio de amplificação da autoimunidade. Nesse estudo, a transferência de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD de 3 semanas de idade apresentam um potencial diabetogênico maior que as células do linfonodo pancreático (Jaakkola, Jalkanen, and Hänninen 2003). Esses estudos indicam um papel do eixo pâncreas intestino no desenvolvimento de DM1 espontânea. No entanto, ainda é necessário um exame detalhado das possíveis alterações na mucosa intestinal de camundongos suscetíveis que poderiam estar associados ao desencadeamento da doença.

Para esclarecer essa provável conexão entre alterações na mucosa intestinal e o desenvolvimento da DMI, comparamos vários componentes relevantes na homeostase da mucosa intestinal de camundongos NOD com seu controle congênico NOR.

Avaliamos inicialmente a progressão do infiltrado inflamatório no pâncreas de camundongos NOD e identificamos o surgimento de insulite progressiva e hiperglicemia a partir de 12 semanas de idade. Sabemos que a insulite pode ter início no intervalo entre 6 e 12 semanas em alguns animais, mais esse intervalo não foi avaliado neste trabalho. Mostramos que, apesar de não ser detectada a insulite em camundongos NOD de 4-6 semanas, esses animais já apresentam um perfil pró-inflamatório com aumento nos níveis de IL-17 no pâncreas. Já foi descrito que uma série de eventos precedem o início da insulite em camundongos NOD, entre eles o estresse metabólico e um aumento local do infiltrado de macrófagos e monócitos (Lehuen et al. 2010; Pirot, Cardozo, and Eizirik 2008). Curiosamente, também identificamos várias anormalidades muito precoces na mucosa intestinal sugerindo um comprometimento da

função de barreira protetora e também uma mudança para um perfil inflamatório local e maior translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos (PLNs).

Um dos principais mecanismos que protegem a mucosa de substâncias tóxicas, agentes infecciosos e do contato direto com a microbiota é a camada de muco. Essa estrutura é mais que uma barreira física e seus componentes agem como uma interface imunológica entre as células da lâmina própria e os antígenos do lúmen intestinal. A mucina mais abundante no muco intestinal, MUC2, é um elemento chave pois fornece sinais reguladores às IECs e células dendríticas. A captação de MUC2 por células dendríticas suprime a ativação inflamatória dessas células, inibindo NF- κ B, mas não sua diferenciação em células com perfil tolerogênico (Shan et al. 2013). Por outro lado, a MUC1 é uma mucina expressa na membrana de células epiteliais e imunes, está envolvida na regulação da resposta inflamatória. No pulmão, a MUC1 é capaz de interagir competitivamente com TLR5 impedindo o recrutamento de MyD88, além disso, pode regular negativamente a sinalização de TLR3, receptor independente da sinalização de MyD88 modulando a inflamação pulmonar (Kato, Lillehoj, and Kim 2014). Outro trabalho mostrou que a MUC1 suprime a atividade de NF- κ B e modula a inflamação gástrica (Sheng et al. 2013). Observamos que camundongos NOD apresentaram uma produção deficiente de muco já com 4-6 semanas de idade. Além disso, esses animais apresentam menor número de células epiteliais MUC2+ nos intestinos delgado e grosso. Curiosamente, essa deficiência de MUC2 em camundongos NOD foi paralela a um aumento na expressão de MUC1 pelas células da lâmina própria do intestino delgado. MUC1) é uma molécula de superfície abundantemente expressa no epitélio das mucosas, mas ela está principalmente envolvida na proteção contra vírus e bactérias infecciosos (McAuley et al, 2007. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J.Clin.Invest.*, 117(8): 2313–2324). Embora a MUC1 tenha propriedades anti-adesivas e imunossupressoras, a expressão dessa molécula está aumentada durante a oncogênese e o surgimento de metástases (Agrawal, Gupta, and Konowalchuk 2018). O aumento da expressão de MUC1 em camundongos NOD pode ser um mecanismo compensatório desencadeado pela redução geral na produção de muco pelas células calciformes e do ambiente inflamatório encontrado nos intestinos destes animais. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para entender como a expressão aumentada de MUC1 pode afetar a resposta imune da mucosa intestinal de camundongos NOD.

O papel da SIgA é complementar ao da camada de muco, além disso, a IgA pode mediar a imunidade contra patógenos e contribuir para a homeostase intestinal. Assim como a produção de muco, a redução dos níveis de SIgA foi observada antes do início da insulite e se manteve em camundongos NOD pre-diabéticos. Camundongos NOD que receberam transplante fecal de

camundongos NOD geneticamente deficientes em MyD88, uma linhagem resistente a diabetes, apresentam maior produção de IgA e TGF- β na mucosa intestinal (Macpherson and Uhr 2004) indicando que o aumento da SIgA pode ser um fator protetor no desenvolvimento da diabetes tipo 1 em camundongos NOD.

Além disso, os camundongos NOD pré-diabéticos tiveram frequências significativamente menores de bactérias ligadas à IgA no intestino delgado. Tem sido sugerido que a SIgA se liga preferencialmente a bactérias imunogênicas ou invasivas (Palm et al. 2014; E. M. Brown et al. 2015) e que essas moléculas de IgA são polirreactivo sendo produzidas de forma independente da ação de linfócitos T (Bunker et al. 2017). Em contraste com as descobertas no intestino delgado, bactérias ligadas a IgA foram detectadas em frequências mais altas no cólon de camundongos NOD quando comparado a camundongos NOR. No entanto, as frequências colônicas de bactérias IgA⁺ foram muito inferiores àquelas encontradas no intestino delgado. Assim, pode ser que as bactérias IgA⁺ sejam contaminantes do intestino delgado e não componentes da microbiota do cólon revestidos localmente por IgA.

Como parte integral da barreira intestinal, os IELs são linfócitos localizados entre as células epiteliais do intestino e seu papel é manter a integridade da barreira intestinal prevenindo a entrada de patógenos para a lâmina própria abaixo do epitélio (Cheroutre, Lambolez, and Mucida 2011). Essas células estão presentes como subpopulações distintas e são classificadas de acordo com o receptor de linfócito T (TCR) que expressam podendo ser $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ e ainda com base na expressão da forma homodimérica ($\alpha\alpha$), ou heterodimérica ($\alpha\beta$) de CD8 ou ainda pela co-expressão ou não de CD4 (Cheroutre, Lambolez, and Mucida 2011).

Os IEL naturais possuem o fenótipo CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ e CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. Adicionalmente, linfócitos circulantes CD4⁺ and CD8 $\alpha\beta$ ⁺ que expressam TCR $\alpha\beta$ ⁺ podem adquirir características de IEL após a migração para o intestino, sendo classificados, dessa forma, como IEL induzidos (Cheroutre, Lambolez, and Mucida 2011). Os IEL naturais, (CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺) têm expressão aumentada de genes relacionados à função de regulação imunológica, incluindo TGF- β e o gene de ativação 3 dos linfócitos (LAG-3). A homeostase dessa população de IEL é influenciada pela microbiota intestinal, como mostrado em camundongos que não expressam o receptor de reconhecimento de padrões NOD2 e apresentam números reduzidos dessa população (Jiang et al. 2013). Observamos que os camundongos NOD apresentaram redução na frequência de IELs induzidos CD8 $\alpha\beta$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ e aumento no número absoluto de IELs naturais CD4TCR $\alpha\beta$ ⁺ sugerindo que esses camundongos apresentam um defeito adicional na função reguladora da barreira intestinal. Curiosamente, os camundongos

NOD apresentaram uma frequência reduzida de IELs naturais (CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR α ⁺) desde as 4-6 semanas de idade. A função específica dessa população de IELs ainda não é clara, mas um estudo recente mostrou que os IELs naturais CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR α ⁺ apresentam alta expressão de genes relacionados com a regulação da resposta imune (T. L. Denning et al. 2007).

A integridade da barreira intestinal é fundamental para garantir o funcionamento adequado do organismo como um todo. Defeitos nos elementos da barreira intestinal podem facilitar a entrada de microorganismos patogênicos causando distúrbios inflamatórios locais e sistêmicos. Camundongos com diabetes tipo 1 induzida por streptozotocina (STZ) apresentam aumento de translocação bacteriana da microbiota intestinal para os linfonodos pancreáticos. As bactérias translocadas ativam receptores NOD2 em células dendríticas nos linfonodos pancreáticos levando à diferenciação de células Th1 e Th17 patogênicas e contribuindo na patogênese da diabetes tipo 1 (Costa et al. 2016). Camundongos NOD com 4 semanas de idade já apresentavam translocação bacteriana aumentada indicando que esse evento ocorreu antes do infiltrado inflamatório no pâncreas. Nossos dados fundamentam a hipótese de que a translocação para o linfonodo pancreático pode ser um fator chave na ativação inicial que leva ao desencadeamento da reatividade autoimune que destrói as ilhotas pancreáticas. Além disso, com 4 semanas de idade, concomitantemente ao aumento da translocação, esses animais apresentaram um perfil pró-inflamatório no pâncreas com aumento da produção local de IL-17. Entre as bactérias translocadas, foi notável a presença do filo Proteobacteria, que engloba bactérias patogênicas associadas com a diabetes tipo 1 e outras doenças inflamatórias (Rizzatti et al. 2015) e inclui a bactéria *Escherichia coli*, detectada nos PLNs de camundongos NOD.

É importante ressaltar que os camundongos NOD apresentaram também disbiose da microbiota intestinal antes do início da insuíte com um aumento na abundância de bactérias que promovem um ambiente pro-inflamatório. Observamos, em camundongos NOD com 4 semanas de idade, o aumento de *Ruminococcus torques*, uma bactéria mucolítica associada com a maior incidência de diabetes em camundongos NOD. O tratamento com *Akkermansia muciniphila*, associada com a proteção do diabetes tipo 1, induz a redução de *Ruminococcus torques* (Sakai et al. 2014). Além disto, notamos a redução de bactérias produtoras de butirato nos camundongos NOD. A redução de bactérias produtoras de butirato já foi relatada em modelos animais e em humanos com diabetes tipo 1 (Knip and Honkanen 2017) e a suplementação dietética com esse ácido graxo de cadeia curta promove a expansão de células T reguladoras e a manutenção da integridade da barreira intestinal, protegendo camundongos NOD da diabetes tipo 1 (Mariño et al. 2017). A abundância da bactéria produtora de butirato *Lachnobacterium bovis* estava expressivamente reduzida antes e após o estabelecimento da

doença nos camundongos NOD. Observamos também redução na abundância da bactéria *Dorea formicigenerans*, (Firmicutes Clostridium) quando comparamos com os controles NOR, sugerindo que essa espécie pode ter um papel importante na patogênese da diabetes embora pouco se saiba sobre a função biológica dessa bactéria (Taras et al. 2002).

O aumento de *Eubacterium rectale*, antes do início da diabetes, desapareceu com a progressão da doença. Um estudo comparando a microbiota de crianças diabéticas com crianças saudáveis também observou alterações nessa espécie de Clostridium (Murri et al. 2013).

Observamos também uma maior abundância de *Lactobacillus crispatus* em comparação com camundongos NOR antes e após o estabelecimento da diabetes. Apesar das bactérias do gênero *Lactobacillus* estarem associadas a efeitos benéficos ao hospedeiro, o aumento de *Lactobacillus crispatus* foi relacionado com a exacerbação da colite experimental murina e indução de mediadores pro-inflamatórios (Zhou et al. 2012). Por outro lado, *Lactobacillus salivarius* estava reduzida de -0,3 (log10) em camundongos NOD com 4 semanas e chegando a -2 (log10) após o desenvolvimento da diabetes. Essa bactéria tem sido descrita como protetora na mucosa intestinal impedindo a penetração de bactérias patogênicas (Chung et al. 2016) sendo que a redução na sua abundância sugere um fator pró-inflamatório a mais na mucosa intestinal.

Observamos também um aumento na abundância de *Bifidobacterium longum* antes do início da diabetes tipo 1. O aumento dessa bactéria na microbiota intestinal tem sido relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal e com um estágio pré-patogênico em crianças com predisposição genética à diabetes tipo 1 (Maffeis et al. 2016).

As bactérias *Parabacteroidetes merdae*, do filo *Bacteroidetes*, e *Escherichia coli* do filo *Proteobacteria* estavam também em maior abundância na microbiota luminal de camundongos NOD pré-diabéticos. Outra bactéria do filo *Proteobacteria*, a *Haemophilus parainfluenzae* também mostrou uma abundância aumentada em camundongos NOD antes do início da diabetes. O filo *Proteobacteria* tem sido amplamente associado a doenças inflamatórias crônicas (Rizzatti et al. 2015).

Para avaliar a importância dessa disbiose nas alterações precoces encontradas na barreira intestinal de camundongos NOD, filhotes de NOD foram amamentados por mães adotivas NOR. Esses filhotes apresentam frequências normais de células caliciformes sugerindo que a composição da microbiota pode estar relacionada com a com as alterações de barreiras observadas nestes animais e também fundamentando a hipótese de que a microbiota molda o desenvolvimento da diabetes.

Várias outras alterações precoces na mucosa intestinal de camundongos NOD reforçaram a ideia de que a diabetes tipo 1 está associada a distúrbios inflamatórios nessa

mucosa. Camundongos NOD apresentaram redução na produção de IL-10 a partir de 4-6 semanas de idade e aumento na produção de IL-17 na mucosa intestinal quando comparados com camundongos NOR. Além disto, camundongos NOD apresentaram expressão aumentada de IL-12 nos intestinos delgado e grosso, e de IL-6 no intestino grosso (Oliveira 2014). Além do perfil de citocinas pró-inflamatórias, a análise de subgrupos de células T CD4⁺ e ILCs na lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD pré-diabéticos mostrou um claro desequilíbrio entre essas sub-populações com o aumento das frequências de células T ROR γ ⁺ e de ILC3, ambas produtoras de IL-17, enquanto as frequências de células produtoras de citocinas do tipo 2, como células T CD4⁺GATA3⁺ e ILC2 estavam significativamente reduzidas. IL-17 e IFN- γ são citocinas pró-inflamatórias ligadas à destruição das ilhotas pancreáticas e à progressão do diabetes tipo 1 (Honkanen et al. 2010). A inibição da resposta Th17 utilizando anticorpo neutralizante de IL-17 (anti-IL-17 mAb) previne a diabetes em camundongos NOD (Emamaullee et al. 2009). Por outro lado, estudos realizados em camundongos com diabetes induzida por STZ indicam que a resposta Th2 tem papel protetor no diabetes tipo 1 (Carlos et al. 2015).

O desequilíbrio nas frequências de ILCs ou a ativação inadequada dessas células na mucosa intestinal estão associados à patogênese de doenças inflamatórias crônicas do intestino (Xiong and Turner 2018), ao início da doença em pacientes diabéticos (Graves et al. 2017) e à alta suscetibilidade ao desenvolvimento de colite em camundongos (Canesso et al. 2018). Foi notável que as frequências de ILC1 e de células T CD4⁺T-bet⁺ permaneceram inalteradas apesar da alta expressão de IL-12 no intestino delgado desses camundongos sugerindo que a ação de reguladores negativos da imunidade do tipo 1, como as células produtoras de IL-17 predominaram nesse local (Guedes et al. 2010).

É importante ressaltar ainda que também essas alterações no perfil das citocinas em camundongos NOD ocorreram precocemente e antecederam o início da insulite.

Uma das alterações mais proeminentes encontradas em camundongos NOD foi a redução da IL-10. A produção dessa citocina estava reduzida no intestino delgado de camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes. A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que desempenha um papel regulador em muitos cenários patológicos diferentes. A IL-10 também desempenha um papel imunorregulador crítico na mucosa intestinal (Kole and Maloy 2014). Os camundongos com deficiência de IL-10 desenvolvem colite espontaneamente (Gomes-Santos et al. 2012) e sabe-se que a IL-10 está envolvida na indução da tolerância oral (Slavin, Maron, and Weiner 2001; A. M. C. Faria et al. 2003; Mucida et al. 2005). A deficiência na produção de IL-10 na mucosa intestinal pode impactar o eixo

pâncreas-intestino através de alterações na diferenciação e migração de células dendríticas tolerogênicas dessa mucosa para os linfonodos drenantes do intestino.

Assim como em outros órgãos linfóides, as células dendríticas direcionam a resposta imune no intestino. As células dendríticas intestinais α E integrina + (CD103+) são capazes de migrar para os linfonodos mesentéricos e iniciar respostas imunes adaptativas (Schulz et al. 2009). As células dendríticas CD103+ produzem grandes quantidades de ácido retinóico e TGF- β e podem induzir eficientemente a diferenciação de células T reguladoras induzidas (iTreg) ou periféricas (pTreg) CD4+Foxp3+ e a indução de tolerância oral (Coombes et al. 2007; Esterházy et al. 2016). Entre os principais subconjuntos de células dendríticas CD11c+, estão as subpopulações de DCs residentes (CD8 α +CD11b^{low}CD103+ e CD8 α -CD11b+CD103-) e de DCs migratórias convencionais (CD11b-CD103+, CD11b+CD103+, CD103-CD11b+). DCs CD103+ migratórias são particularmente responsáveis por induzir células pTreg e tolerância. As DCs CD11b- majoritariamente induzem a diferenciação de células pTreg enquanto as populações de DCs CD11b+ são mais plásticas e podem ter características tolerogênicas ou pró-inflamatórias dependendo dos estímulos teciduais que recebem (Esterházy et al. 2016).

Observamos que as DCs convencionais CD103+CD11b- (cDC1) estavam reduzidas em camundongos pré-diabéticos e diabéticos, mas não em camundongos de 4-6 semanas de idade. Além disso, as DCs convencionais CD103+CD11b+ (cDC2) estavam drasticamente reduzidas em todos os linfonodos avaliados de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos, bem como em camundongos NOD antes do início da doença (4-6 semanas de idade) no linfonodo que drena o jejuno. Esses resultados suportam a hipótese de que os camundongos NOD apresentam uma diferença fundamental no desenvolvimento de células dendríticas assim como no desenvolvimento de componentes básicos que garantem a homeostase intestinal.

Células apresentadoras de antígenos (principalmente DCs) direcionam a resposta Th17 e Th1 inflamatórias e contribuem para a patogenicidade da diabetes tipo 1 (Badami et al. 2011). Por outro lado, estudos explorando a manipulação de respostas imunes pela administração de antígenos pela via oral mostram que a apresentação de antígenos específicos do pâncreas (como insulina e GAD) via cDC2 (CD103+CD11b+) na mucosa intestinal é capaz de induzir a diferenciação de células pTreg e a tolerância imunológica a esses antígenos inibindo o desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD (PRICE *et al.*, 2015; FARIA and WEINER, 2006).

Como a mucosa intestinal está ligada ao pâncreas através de vasos linfáticos aferentes, existe uma via física para o tráfico de células dendríticas do intestino para o pâncreas (Esterházy

et al. 2019). Desta forma, as alterações nas populações de DCs na mucosa intestinal podem ter um impacto direto nos eventos inflamatórios que ocorrem no pâncreas.

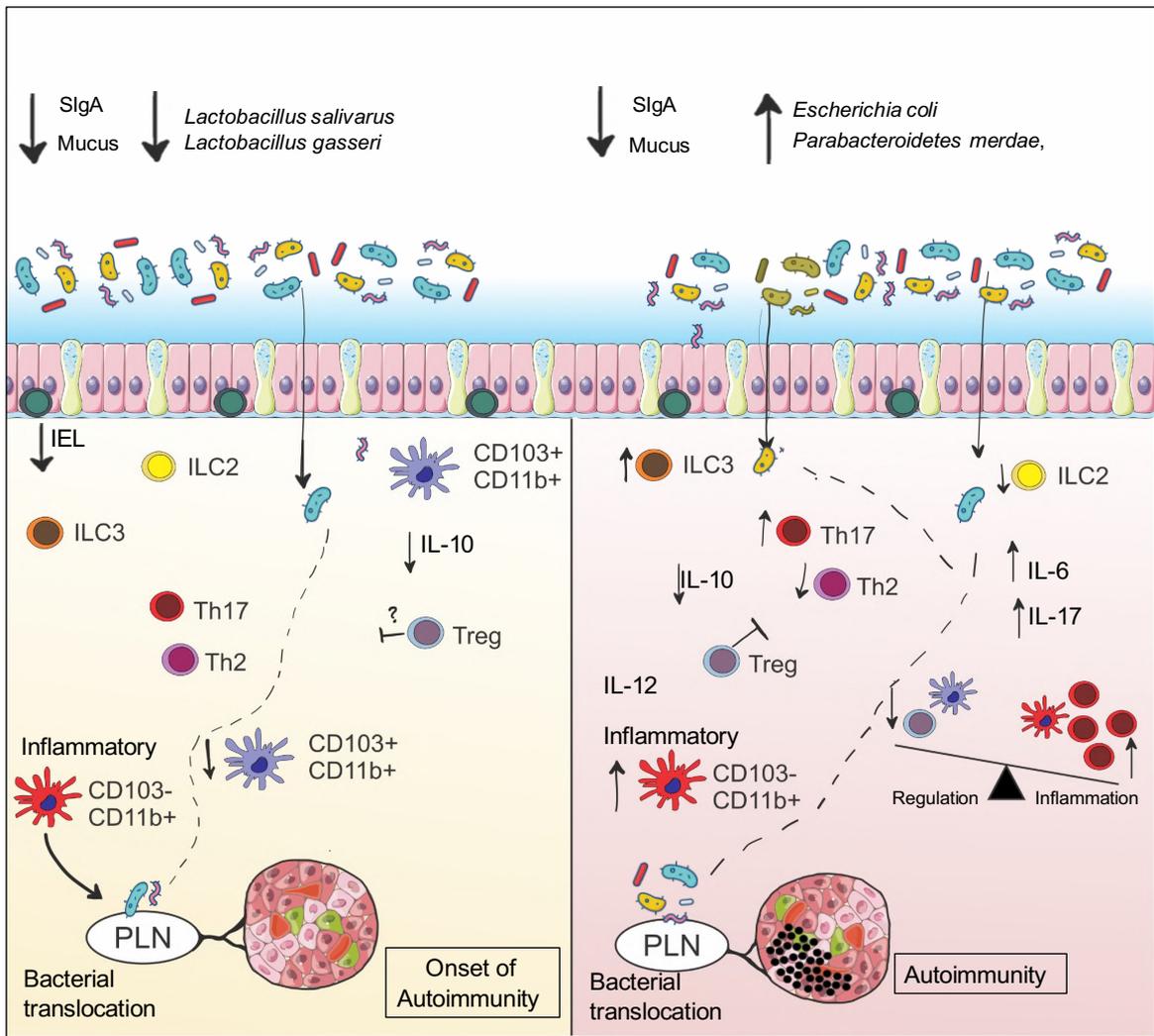
Em concordância com as alterações inflamatórias encontradas na mucosa intestinal e nos mLNs, as frequências de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ diminuíram nos linfonodos que drenam o duodeno e do jejuno de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos quando comparados com as frequências das mesmas células nos linfonodos de camundongos NOR. Além disso, os camundongos NOD se mostraram refratários à indução de tolerância oral, antes do início da insulite, mesmo sendo submetidos a um protocolo de ingestão contínua de antígeno, descrito como a melhor estratégia experimental para indução de tolerância oral (A. M. C. Faria et al. 2003; Oliveira et al. 2015). Esse defeito na indução de tolerância pela via oral não foi acompanhada de redução das frequências de células pTreg nos mLNs duodenais como esperado. Duas possibilidades não excludentes podem explicar a quebra observada na indução da tolerância oral em camundongos NOD. As células pTregs CD4⁺Foxp3⁺ podem ser menos funcionais desde a idade precoce nesses camundongos, ou outras células T reguladoras, como as células T CD4⁺ produtoras de TGF- β que expressam essa citocina na membrana (células T CD4⁺LAP⁺), podem ser defeituosas nesses camundongos (D'Alise et al. 2008; Oida and Weiner 2010). Outros grupos mostraram que é possível inibir o desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD utilizando a indução de tolerância oral. Entretanto, estratégias específicas tiveram que ser desenvolvidas para contornar o fato de que a indução de tolerância por via oral está prejudicada nesses animais. Alguns estudos utilizaram, por exemplo, peptídeos antigênicos (Gong et al. 2010), administração neonatal de insulina via oral (Maron et al. 2001), indução de pTreg pela administração de anticorpos anti-CD3 (Kuhn et al. 2017), ou a manipulação do repertório de células T dos camundongos NOD pelo retrocruzamento desses animais com camundongos de outras linhagens (Huibregtse et al. 2009) para induzir tolerância ou atrasar o desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD.

Nossos dados demonstram claramente que os camundongos NOD apresentaram vários defeitos nos componentes protetores e tolerogênicos da mucosa intestinal e dos mLNs antes do início do diabetes. Acima de tudo, a composição da microbiota, bem como os mecanismos imunes críticos de manutenção da homeostase intestinal, como a produção de SIgA e a indução da tolerância oral, estavam prejudicados em uma idade muito precoce nesses animais. Como os linfonodos pancreáticos /duodenais fornecem uma rota anatômica e funcional através da qual os antígenos e células intestinais podem trafegar e influenciar as respostas imunes no pâncreas, é possível que eventos inflamatórios iniciados na mucosa intestinal possam desencadear ou agravar a destruição autoimune do pâncreas durante o desenvolvimento do

diabetes tipo 1. A compreensão dos eventos inflamatórios que precedem o início da doença podem fornecer novas possibilidades de criação de estratégias terapêuticas para o diabetes tipo 1.

7. Conclusão

O desenvolvimento de diabetes tipo 1 em camundongos NOD é precedido por disbiose, alterações no microambiente intestinal, associado a redução de IL-10 e aumento de IL-17 e incapacidade de indução da tolerância oral além de defeitos na barreira intestinal como a redução na produção de muco e IgA secretória. Estas alterações foram associadas a um aumento expressivo da translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos. Em adição o progressivo processo inflamatório causado pela diabetes no pâncreas, impacta a homeostase intestinal alterando o eixo regulação/inflamação observado pelo aumento da população de células inflamatórias em detrimento da redução de células com perfil regulador.



8. REFERÊNCIAS

- A.M.C., Faria, and Weiner H.L. 2005. "Oral Tolerance." *Immunological Reviews* 206: 232–59. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x>.
- Afuwape, A. O., M. W. Turner, and S. Strobel. 2004. "Oral Administration of Bovine Whey Proteins to Mice Elicits Opposing Immunoregulatory Responses and Is Adjuvant Dependent." *Clinical and Experimental Immunology* 136 (1): 40–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02400.x>.
- Agrawal, Babita, Nancy Gupta, and Jeffrey D. Konowalchuk. 2018. "MUC1 Mucin: A Putative Regulatory (Checkpoint) Molecule of T Cells." *Frontiers in Immunology* 9 (OCT): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02391>.
- Ahmad, Rehan, Deepak Raina, Vishal Trivedi, Jian Ren, Hasan Rajabi, Surender Kharbanda, and Donald Kufe. 2007. "MUC1 Oncoprotein Activates the I κ B Kinase β Complex and Constitutive NF-KB Signalling." *Nature Cell Biology* 9 (12): 1419–27. <https://doi.org/10.1038/ncb1661>.
- Alam, Catharina, Suvi Valkonen, Vindhya Palagani, Jari Jalava, Erkki Eerola, and Arno Hänninen. 2010. "Inflammatory Tendencies and Overproduction of IL-17 in the Colon of Young NOD Mice Are Counteracted with Diet Change." *Diabetes* 59 (9): 2237–46. <https://doi.org/10.2337/db10-0147>.
- Alkanani, Aimon K., Naoko Hara, Peter A. Gottlieb, Diana Ir, Charles E. Robertson, Brandie D. Wagner, Daniel N. Frank, and Danny Zipris. 2015. "Alterations in Intestinal Microbiota Correlate with Susceptibility to Type 1 Diabetes." *Diabetes* 64 (10): 3510–20. <https://doi.org/10.2337/db14-1847>.
- Anderson, Mark S, and Jeffrey A Bluestone. 2005. "The NOD Mouse: A Model of Immune Dysregulation." *Annual Review of Immunology* 23 (1): 447–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643>.
- Atkinson, M A, and A Chervonsky. 2012. "Does the Gut Microbiota Have a Role in Type 1 Diabetes? Early Evidence from Humans and Animal Models of the Disease." *Diabetologia* 55 (11): 2868–77. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2672-4>.
- Badami, Ester, Chiara Sorini, Margherita Coccia, Vera Uselli, Laura Molteni, Andrea Mario Bolla, Marina Scavini, et al. 2011. "Defective Differentiation of Regulatory FoxP3⁺ T Cells by Small-Intestinal Dendritic Cells in Patients with Type 1 Diabetes." *Diabetes* 60 (8): 2120–24. <https://doi.org/10.2337/db10-1201>.
- Bain, Calum C., and Allan Mci Mowat. 2011. "Intestinal Macrophages - Specialised

- Adaptation to a Unique Environment.” *European Journal of Immunology* 41: 2494–98.
<https://doi.org/10.1002/eji.201141714>.
- Bluestone, Jeffrey A, and Qizhi Tang. 2005. “How Do CD4+CD25+ Regulatory T Cells Control Autoimmunity?” *Current Opinion in Immunology* 17 (6): 638–42.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.09.002>.
- Bonifacio, Ezio, Katharina Warncke, Christiane Winkler, Maike Wallner, and Anette-G Ziegler. 2011. “Cesarean Section and Interferon-Induced Helicase Gene Polymorphisms Combine to Increase Childhood Type 1 Diabetes Risk.” *Diabetes* 60 (12): 3300–3306.
<https://doi.org/10.2337/db11-0729>.
- Bouma, Gerd, and Warren Strober. 2003. “The Immunological and Genetic Basis of Inflammatory Bowel Disease.” *Nature Reviews. Immunology* 3 (7): 521–33.
<https://doi.org/10.1038/nri1132>.
- Brandtzaeg, P. 1998. “Development and Basic Mechanisms of Human Gut Immunity.” *Nutrition Reviews* 56 (I): S5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01645.x>.
- Brandtzaeg, P, H Kiyono, R Pabst, and M W Russell. 2008. “Terminology: Nomenclature of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue.” *Mucosal Immunology* 1 (1): 31–37.
<https://doi.org/10.1038/mi.2007.9>.
- Broeck, Wim Van den, Annie Derore, and Paul Simoens. 2006. “Anatomy and Nomenclature of Murine Lymph Nodes: Descriptive Study and Nomenclatory Standardization in BALB/CAnNCrI Mice.” *Journal of Immunological Methods* 312 (1–2): 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.01.022>.
- Brown, Eric M, Marta Wlodarska, Benjamin P Willing, Pascale Vonaesch, Jun Han, Lisa A Reynolds, Marie-Claire Arrieta, et al. 2015. “Functional Characterization of IgA-Targeted Bacterial Taxa from Undernourished Malawian Children That Produce Diet-Dependent Enteropathy.” *Science Translational Medicine* 7 (276): 276ra24.
- Brown, Kirsty, Artem Godovannyi, Caixia Ma, YiQun Zhang, Zahra Ahmadi-Vand, Chaunbin Dai, Monika A. Gorzelak, et al. 2015. “Prolonged Antibiotic Treatment Induces a Diabetogenic Intestinal Microbiome That Accelerates Diabetes in NOD Mice.” *The ISME Journal* 10 (2): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.114>.
- Bunker, Jeffrey J., and Albert Bendelac. 2018. “IgA Responses to Microbiota.” *Immunity* 49 (2): 211–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.011>.
- Bunker, Jeffrey J., Steven A. Erickson, Theodore M. Flynn, Carole Henry, Jason C. Koval, Marlies Meisel, Bana Jabri, Dionysios A. Antonopoulos, Patrick C. Wilson, and Albert Bendelac. 2017. “Natural Polyreactive IgA Antibodies Coat the Intestinal Microbiota.”

Science 358 (6361). <https://doi.org/10.1126/science.aan6619>.

- Bunker, Jeffrey J., Theodore M. Flynn, Jason C. Koval, Dustin G. Shaw, Marlies Meisel, Benjamin D. McDonald, Isabel E. Ishizuka, et al. 2015. "Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A." *Immunity* 43 (3): 541–53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.007>.
- Calcinaro, F., S. Dionisi, M. Marinaro, P. Candeloro, V. Bonato, S. Marzotti, R. B. Corneli, et al. 2005. "Oral Probiotic Administration Induces Interleukin-10 Production and Prevents Spontaneous Autoimmune Diabetes in the Non-Obese Diabetic Mouse." *Diabetologia* 48 (8): 1565–75. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1831-2>.
- Canesso, M. C.C., L. Lemos, T. C. Neves, F. M. Marim, T. B.R. Castro, És Veloso, C. P. Queiroz, et al. 2018. "The Cytosolic Sensor STING Is Required for Intestinal Homeostasis and Control of Inflammation." *Mucosal Immunology* 11 (3): 820–34. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.88>.
- Cario, E., G. Gerken, and D. K. Podolsky. 2007. "Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function." *Gastroenterology* 132 (4): 1359–74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.056>.
- Carlos, Daniela, Juliana N.U. Yaochite, Fernanda A. Rocha, Vanina D. Toso, Kelen C.R. Malmegrim, Simone G. Ramos, Maria C. Jamur, et al. 2015. "Mast Cells Control Insulinitis and Increase Treg Cells to Confer Protection against STZ-Induced Type 1 Diabetes in Mice." *European Journal of Immunology* 45 (10): 2873–85. <https://doi.org/10.1002/eji.201545498>.
- Carvalho, C R, and N M Vaz. 1996. "Indirect Effects Are Independent of the Way of Tolerance Induction." *Scandinavian Journal of Immunology* 43 (6): 613–18.
- Castro-Junior, Archimedes Barbosa, Bernardo Coelho Horta, Ana Cristina Gomes-Santos, Andre Pires Cunha, Raphael Silva Steinberg, Danielle Santiago Nascimento, Ana Maria Caetano Faria, and Nelson Monteiro Vaz. 2012. "Oral Tolerance Correlates with High Levels of Lymphocyte Activity." *Cellular Immunology* 280 (2): 171–81. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.004>.
- Castro-Sánchez, Patricia, and José M. Martín-Villa. 2013. "Gut Immune System and Oral Tolerance." *British Journal of Nutrition* 109 (S2): S3–11. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005223>.
- Cheroutre, Hilde, Florence Lambolez, and Daniel Mucida. 2011. "The Light and Dark Sides of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes." *Nature Reviews Immunology* 11 (7): 445–56. <https://doi.org/10.1038/nri3007>.

- Chung, Pei Hsuan, Ying Ying Wu, Pei Hsuan Chen, Chang Phone Fung, Ching Mei Hsu, and Lee Wei Chen. 2016. "Lactobacillus Salivarius Reverse Diabetes-Induced Intestinal Defense Impairment in Mice through Non-Defensin Protein." *Journal of Nutritional Biochemistry* 35: 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.05.013>.
- Coombes, Janine L., and Kevin J. Maloy. 2007. "Control of Intestinal Homeostasis by Regulatory T Cells and Dendritic Cells." *Seminars in Immunology* 19 (2): 116–26. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.01.001>.
- Coombes, Janine L., Karima R.R. Siddiqui, Carolina V. Arancibia-Cárcamo, Jason Hall, Cheng-Ming Sun, Yasmine Belkaid, and Fiona Powrie. 2007. "A Functionally Specialized Population of Mucosal CD103⁺ DCs Induces Foxp3⁺ Regulatory T Cells via a TGF- β - and Retinoic Acid-Dependent Mechanism." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8): 1757–64. <https://doi.org/10.1084/jem.20070590>.
- Coombes, Janine L, and Fiona Powrie. 2009. "Europe PMC Funders Group Dendritic Cells in Intestinal Immune Regulation" 8 (6): 435–46. <https://doi.org/10.1038/nri2335.Dendritic>.
- Costa, Frederico R.C., Marcela C.S. Françaço, Gabriela G. de Oliveira, Aline Ignacio, Angela Castoldi, Dario S. Zamboni, Simone G. Ramos, 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 (7): 1223–39. <https://doi.org/10.1084/jem.20150744>.
- Crosnier, Cécile, Despina Stamataki, and Julian Lewis. 2006. "Organizing Cell Renewal in the Intestine: Stem Cells, Signals and Combinatorial Control." *Nature Reviews. Genetics* 7 (5): 349–59. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>.
- Cunningham-Rundles, C. 2001. "Physiology of Iga and Iga Deficiency." *Journal of Clinical Immunology* 21 (5): 303–9. <https://doi.org/10.1023/A:1012241117984>.
- D'Alise, Anna Morena, Vincent Auyeung, Markus Feuerer, Junko Nishio, Jason Fontenot, Christophe Benoist, and Diane Mathis. 2008. "The Defect in T-Cell Regulation in NOD Mice Is an Effect on the T-Cell Effectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19857–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810713105>.
- Daft, Joseph G, Travis Ptacek, Ranjit Kumar, Casey Morrow, and Robin G Lorenz. 2015. "Cross-Fostering Immediately after Birth Induces a Permanent Microbiota Shift That Is Shaped by the Nursing Mother." *Microbiome* 3 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0080-y>.
- Daniels, Stephen R. 2011. "Natural History of Type 1 Diabetes." *Journal of Pediatrics* 158

(1): A2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.11.046>.

- Denning, T. L., S. Granger, D. Mucida, R. Graddy, G. Leclercq, W. Zhang, K. Honey, et al. 2007. "Mouse TCR +CD8 Intraepithelial Lymphocytes Express Genes That Down-Regulate Their Antigen Reactivity and Suppress Immune Responses." *The Journal of Immunology* 178 (7): 4230–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4230>.
- Denning, Timothy L, Yi-chong Wang, Seema R Patel, Ifor R Williams, and Bali Pulendran. 2007. "Lamina Propria Macrophages and Dendritic Cells Differentially Induce Regulatory and Interleukin 17–Producing T Cell Responses." *Nature Immunology* 8 (10): 1086–94. <https://doi.org/10.1038/ni1511>.
- Diefenbach, Andreas, Marco Colonna, and Shigeo Koyasu. 2014. "Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells." *Immunity* 41 (3): 354–65. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>.
- "Diretrizes-Sbd-2015." 2015.
- Dogra, Shaillay, Olga Sakwinska, Shu-E Soh, Catherine Ngom-Bru, Wolfram M Bruck, Bernard Berger, Harald Brussow, et al. 2015. "Dynamics of Infant Gut Microbiota Are Influenced by Delivery Mode and Gestational Duration and Are Associated with Subsequent Adiposity." *MBio* 6 (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02419-14>.
- Dolpady, Jayashree, Chiara Sorini, Caterina Di Pietro, Ilaria Cosorich, Roberto Ferrarese, Diego Saita, Massimo Clementi, Filippo Canducci, and Marika Falcone. 2016. "Oral Probiotic VSL#3 Prevents Autoimmune Diabetes by Modulating Microbiota and Promoting Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Enriched Tolerogenic Intestinal Environment." *Journal of Diabetes Research* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7569431>.
- Emamaullee, JA, Joy Davis, Shaheed Merani, and Christian Toso. 2009. "Inhibition of Th17 Cells Regulates Autoimmune Diabetes in NOD Mice." *Diabetes* 58 (June). <https://doi.org/10.2337/db08-1113>.
- Esterhazy, Daria, Maria CC Canesso, Paul A Muller, Ainsley Lockhart, Luka Mesin, Ana MC Faria, and Daniel Mucida. 2019. "Compartmentalized Lymph Node Drainage Dictates Intestinal Adaptive Immune Responses." *Nature*, January, 299628. <https://doi.org/10.1101/299628>.
- Esterházy, Daria, Jakob Loschko, Mariya London, Veronica Jove, Thiago Y. Oliveira, and Daniel Mucida. 2016. "Classical Dendritic Cells Are Required for Dietary Antigen-Mediated Induction of Peripheral T Reg Cells and Tolerance." *Nature Immunology* 17 (5): 545–55. <https://doi.org/10.1038/ni.3408>.
- Faria, AMC de, SM Ficker, E Speziali, JS Menezes, B Stransky, V Silva Rodrigues, and NM

- Vaz. 1998. "Aging Affects Oral Tolerance Induction but Not Its Maintenance in Mice." *Mechanisms of Ageing and Development* 102 (1): 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00024-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00024-4).
- Faria, Ana M.C., Bernardo S. Reis, and Daniel Mucida. 2017. "Tissue Adaptation: Implications for Gut Immunity and Tolerance." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1211–26. <https://doi.org/10.1084/jem.20162014>.
- Faria, Ana M C, Ruth Maron, Sabine M. Ficker, Anthony J. Slavin, Thomas Spahn, and Howard L. Weiner. 2003. "Oral Tolerance Induced by Continuous Feeding: Enhanced up-Regulation of Transforming Growth Factor-B/Interleukin-10 and Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Autoimmunity* 20 (2): 135–45. [https://doi.org/10.1016/S0896-8411\(02\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0896-8411(02)00112-9).
- Faria, Ana M C, and Howard L Weiner. 2006. "Oral Tolerance: Therapeutic Implications for Autoimmune Diseases." *Clinical & Developmental Immunology* 13 (2–4): 143–57. <https://doi.org/10.1080/17402520600876804>.
- Fontenot, Jason D., Marc A. Gavin, and Alexander Y. Rudensky. 2003. "Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Nature Immunology* 4 (4): 330–36. <https://doi.org/10.1038/ni904>.
- Gale, E. A. M. 2005. "Type 1 Diabetes in the Young: The Harvest of Sorrow Goes On." *Diabetologia* 48 (8): 1435–38. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1833-0>.
- Goffau, Marcus C. De, Susana Fuentes, Bartholomeus Van Den Bogert, Hanna Honkanen, Willem M. De Vos, Gjalte W. Welling, Heikki Hyöty, and Hermie J.M. Harmsen. 2014. "Aberrant Gut Microbiota Composition at the Onset of Type 1 Diabetes in Young Children." *Diabetologia* 57 (8): 1569–77. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3274-0>.
- Goll, Rasmus, and Atle van Beelen Granlund. 2015. "Intestinal Barrier Homeostasis in Inflammatory Bowel Disease." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 50 (1): 3–12. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.971425>.
- Gomes-Santos, Ana Cristina, Thais Garcias Moreira, Archimedes Barbosa Castro-Junior, Bernardo Coelho Horta, Luisa Lemos, Deborah Nogueira Cruz, Mauro Andrade Freitas Guimarães, Denise Carmona Cara, Donna-Marie Marie McCafferty, and Ana Maria Caetano Faria. 2012. "New Insights into the Immunological Changes in IL-10-Deficient Mice during the Course of Spontaneous Inflammation in the Gut Mucosa." *Clinical & Developmental Immunology* 2012: 560817. <https://doi.org/10.1155/2012/560817>.
- Gong, Zhaohui, Lin Pan, Yanping Le, Qiong Liu, Mi Zhou, Wenhua Xing, Renjie Zhuo, Shaomin Wang, and Junming Guo. 2010. "Glutamic Acid Decarboxylase Epitope

Protects against Autoimmune Diabetes through Activation of Th2 Immune Response and Induction of Possible Regulatory Mechanism.” *Vaccine* 28 (24): 4052–58.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.005>.

Graves, Christina L., Jian Li, Melissa LaPato, Melanie R. Shapiro, Sarah C. Glover, Mark A. Wallet, and Shannon M. Wallet. 2017. “Intestinal Epithelial Cell Regulation of Adaptive Immune Dysfunction in Human Type 1 Diabetes.” *Frontiers in Immunology* 7 (JAN): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00679>.

Guang, Wei, Hua Ding, Steven J. Czinn, K. Chul Kim, Thomas G. Blanchard, and Erik P. Lillehoj. 2010. “Muc1 Cell Surface Mucin Attenuates Epithelial Inflammation in Response to a Common Mucosal Pathogen.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (27): 20547–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121319>.

Guedes, Paulo Marcos Da Matta, Fredy R.S. Gutierrez, Flavia L. Maia, Cristiane M. Milanezi, Grace K. Silva, Wander R. Pavanelli, and João S. Silva. 2010. “IL-17 Produced during Trypanosoma Cruzi Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>.

“Gut Microbiota in Children with Type 1 Diabetes Differs from That in Healthy Children: A Case-Control Study.” 2013. *BMC Medicine* 11 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-46>.

Hänninen, a, I Jaakkola, and S Jalkanen. 1998. “Mucosal Addressin Is Required for the Development of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (12): 6018–25.

Haskins, Kathryn, and Anne Cooke. 2011. “CD4 T Cells and Their Antigens in the Pathogenesis of Autoimmune Diabetes.” *Current Opinion in Immunology* 23 (6): 739–45. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.004>.

He, Q., Y. M. Morillon, N. A. Spidale, C. J. Kroger, B. Liu, R. B. Sartor, B. Wang, and R. Tisch. 2013. “Thymic Development of Autoreactive T Cells in NOD Mice Is Regulated in an Age-Dependent Manner.” *The Journal of Immunology* 191 (12): 5858–66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302273>.

Herzenberg, Leonore A., James Tung, Wayne A. Moore, Leonard A. Herzenberg, and David R. Parks. 2006. “Interpreting Flow Cytometry Data: A Guide for the Perplexed.” *Nature Immunology* 7 (7): 681–85. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>.

Honkanen, J., J. K. Nieminen, R. Gao, K. Luopajarvi, H. M. Salo, J. Ilonen, M. Knip, T. Otonkoski, and O. Vaarala. 2010. “IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes.” *The*

- Journal of Immunology* 185 (3): 1959–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000788>.
- Hooper, Lora V., and Andrew J. MacPherson. 2010. “Immune Adaptations That Maintain Homeostasis with the Intestinal Microbiota.” *Nature Reviews Immunology* 10 (3): 159–69. <https://doi.org/10.1038/nri2710>.
- Hori, S. 2003. “Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3.” *Science* 299 (5609): 1057–61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
- Howitt, Michael R., Sydney Lavoie, Monia Michaud, Arthur M. Blum, Sara V. Tran, Joel V. Weinstock, Carey Ann Gallini, et al. 2016. “Tuft Cells, Taste-Chemosensory Cells, Orchestrate Parasite Type 2 Immunity in the Gut.” *Science* 351 (6279): 1329–33. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>.
- Huibregtse, I. L., E. V. Marietta, S. Rashtak, F. Koning, P. Rottiers, C. S. David, S. J. H. van Deventer, and J. A. Murray. 2009. “Induction of Antigen-Specific Tolerance by Oral Administration of Lactococcus Lactis Delivered Immunodominant DQ8-Restricted Gliadin Peptide in Sensitized Nonobese Diabetic Ab Dq8 Transgenic Mice.” *The Journal of Immunology* 183 (4): 2390–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802891>.
- Husby, S, J C Jensenius, and S E Svehag. 1985. “Passage of Undegraded Dietary Antigen into the Blood of Healthy Adults. Quantification, Estimation of Size Distribution, and Relation of Uptake to Levels of Specific Antibodies.” *Scandinavian Journal of Immunology* 22 (1): 83–92.
- Ivanov, Ivaylo I., Koji Atarashi, Nicolas Manel, Eoin L. Brodie, Tatsuichiro Shima, Ulas Karaoz, Dongguang Wei, et al. 2009. “Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria.” *Cell* 139 (3): 485–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>.
- Izcue, Ana, Janine L. Coombes, and Fiona Powrie. 2006. “Regulatory T Cells Suppress Systemic and Mucosal Immune Activation to Control Intestinal Inflammation.” *Immunological Reviews* 212 (1): 256–71. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00423.x>.
- Jaakkola, Ilkka, Sirpa Jalkanen, and Arno Hänninen. 2003. “Diabetogenic T Cells Are Primed Both in Pancreatic and Gut-Associated Lymph Nodes in NOD Mice.” *European Journal of Immunology* 33 (12): 3255–64. <https://doi.org/10.1002/eji.200324405>.
- Jain, Renu, Danielle M. Tartar, Randal K. Gregg, Rohit D. Divekar, J. Jeremiah Bell, Hyun-Hee Lee, Ping Yu, et al. 2008. “Innocuous IFN γ Induced by Adjuvant-Free Antigen Restores Normoglycemia in NOD Mice through Inhibition of IL-17 Production.” *The Journal of Experimental Medicine* 205 (1): 207–18. <https://doi.org/10.1084/jem.20071878>.

- Jansen, A, F Homo-Delarche, H Hooijkaas, P J Leenen, M Dardenne, and H A Drexhage. 1994. "Immunohistochemical Characterization of Monocytes-Macrophages and Dendritic Cells Involved in the Initiation of the Insulitis and Beta-Cell Destruction in NOD Mice." *Diabetes* 43 (5): 667–75. <https://doi.org/10.2337/diabetes.43.5.667>.
- Jiang, Wei, Xiqiong Wang, Benhua Zeng, Lei Liu, Aubry Tardivel, Hong Wei, Jiahuai Han, et al. 2013. "Recognition of Gut Microbiota by NOD2 Is Essential for the Homeostasis of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (11): 2465–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20122490>.
- Johansen, F. E., and C. S. Kaetzel. 2011. "Regulation of the Polymeric Immunoglobulin Receptor and IgA Transport: New Advances in Environmental Factors That Stimulate PIgR Expression and Its Role in Mucosal Immunity." *Mucosal Immunology* 4 (6): 598–602. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.37>.
- Kanagawa, O, S M Martin, B A Vaupel, E Carrasco-Marin, and E R Unanue. 1998. "Autoreactivity of T Cells from Nonobese Diabetic Mice: An I-Ag7-Dependent Reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (4): 1721–24.
- Kantárová, D, and M Buc. 2007. "Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans." *Physiological Research* 56 (3): 255–66.
- Kato, Kosuke, Erik P. Lillehoj, and Kwang Chul Kim. 2014. "MUC1 Regulates Epithelial Inflammation and Apoptosis by PolyI:C through Inhibition of Toll/IL-1 Receptor-Domain-Containing Adapter-Inducing IFN- β (TRIF) Recruitment to Toll-like Receptor 3." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51 (3): 446–54. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0018OC>.
- Katz, J D, C Benoist, and D Mathis. 1995. "T Helper Cell Subsets in Insulin-Dependent Diabetes." *Science* 268 (5214): 1185–88.
- Kelsall, B. 2008. "Recent Progress in Understanding the Phenotype and Function of Intestinal Dendritic Cells and Macrophages." *Mucosal Immunology* 1 (6): 460–69. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.61>.
- Khoury, S, W Hancock, and Howard L Weiner. 1992. "Oral Tolerance to Myelin Basic Protein and Natural Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Are Associated with Downregulation of Inflammatory Cytokines and Differential Upregulation of Transforming Growth Factor β , Interleukin 4, and Prost." *Journal of Experimental Medicine* 176 (November).
- King, Aileen, and James Bowe. 2015. "Animal Models for Diabetes: Understanding the

Pathogenesis and Finding New Treatments.” *Biochemical Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>.

Kishimoto, H, and J Sprent. 2001. “A Defect in Central Tolerance in NOD Mice.” *Nature Immunology* 2 (11): 1025–31. <https://doi.org/10.1038/ni726>.

Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M. Allen, and Kristin A. Hogquist. 2014. “Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don’t See).” *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 377–91. <https://doi.org/10.1038/nri3667>.

Klose, Christoph S.N., Melanie Flach, Luisa Möhle, Leif Rogell, Thomas Hoyler, Karolina Ebert, Carola Fabiunke, et al. 2014. “Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages.” *Cell* 157 (2): 340–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>.

Klose, Christoph S N, and David Artis. 2016. “Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis.” *Nature Immunology* 17 (7): 765–74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.

Knip, Mikael, and Jarno Honkanen. 2017. “Modulation of Type 1 Diabetes Risk by the Intestinal Microbiome.” *Current Diabetes Reports*. Current Diabetes Reports. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0933-9>.

Knip, Mikael, and Heli Siljander. 2016. “The Role of the Intestinal Microbiota in Type 1 Diabetes Mellitus.” *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.218>.

Knip, Mikael, Suvi M Virtanen, Karri Seppä, Jorma Ilonen, Erkki Savilahti, Outi Vaarala, Antti Reunanen, et al. 2010. “Dietary Intervention in Infancy and Later Signs of Beta-Cell Autoimmunity.” *The New England Journal of Medicine* 363 (20): 1900–1908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1004809>.

Kole, Abhisake, and Kevin J Maloy. 2014. “Interleukin-10 in Health and Disease” 380: 19–38. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5>.

Komano, H, Y Fujiura, M Kawaguchi, S Matsumoto, Y Hashimoto, S Obana, P Mombaerts, S Tonegawa, H Yamamoto, and S Itohara. 1995. “Homeostatic Regulation of Intestinal Epithelia by Intraepithelial Gamma Delta T Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (13): 6147–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6147>.

Kuhn, Chantal, Rafael M. Rezende, Andre Pires da Cunha, Fabrice Valette, Francisco J. Quintana, Lucienne Chatenoud, and Howard L. Weiner. 2017. “Mucosal Administration of CD3-Specific Monoclonal Antibody Inhibits Diabetes in NOD Mice and in a

- Preclinical Mouse Model Transgenic for the CD3 Epsilon Chain.” *Journal of Autoimmunity* 76: 115–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.10.001>.
- Landin-Olsson, Mona, Magnus Hillman, and Charlotte Erlanson-Albertsson. 2013. “Is Type 1 Diabetes a Food-Induced Disease?” *Medical Hypotheses* 81 (2): 338–42. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.03.046>.
- Lee, a. S., D. L. Gibson, Y. Zhang, H. P. Sham, B. a. Vallance, and J. P. Dutz. 2010. “Gut Barrier Disruption by an Enteric Bacterial Pathogen Accelerates Insulinitis in NOD Mice.” *Diabetologia* 53 (4): 741–48. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1626-y>.
- Lee, Y.K., and S.K. Mazmanian. 2010. “Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System?” *Science* 330 (6012): 1768. <https://doi.org/10.1126/science.1195568.Has>.
- Lehuen, Agnès, Julien Diana, Paola Zaccone, and Anne Cooke. 2010. “Immune Cell Crosstalk in Type 1 Diabetes.” *Nature Reviews Immunology* 10 (7): 501–13. <https://doi.org/10.1038/nri2787>.
- Lightfoot, Yaíma L., Jing Chen, and Clayton E. Mathews. 2012. “Immune-Mediated β -Cell Death in Type 1 Diabetes: Lessons from Human β -Cell Lines.” *European Journal of Clinical Investigation* 42 (11): 1244–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02711.x>.
- Macpherson, Andrew J., Dominique Gatto, Elizabeth Sainsbury, Gregory R. Harriman, Hans Hengartner, and Rolf M. Zinkernagel. 2000. “A Primitive T Cell-Independent Mechanism of Intestinal Mucosal IgA Responses to Commensal Bacteria.” *Science* 288 (5474): 2222–26. <https://doi.org/10.1126/science.288.5474.2222>.
- Macpherson, Andrew J., and Therese Uhr. 2004. “Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria.” *Science* 303 (5664): 1662–65. <https://doi.org/10.1126/science.1091334>.
- Macpherson, Andrew J, and Nicola L Harris. 2004. “Interactions between Commensal Intestinal Bacteria and the Immune System.” *Nature Reviews. Immunology* 4 (6): 478–85. <https://doi.org/10.1038/nri1373>.
- Maffei, Claudio, Alessia Martina, Massimiliano Corradi, Sara Quarella, Nicole Nori, Sandra Torriani, Mario Plebani, Giovanna Contreas, and Giovanna E. Felis. 2016. “Association between Intestinal Permeability and Faecal Microbiota Composition in Italian Children with Beta Cell Autoimmunity at Risk for Type 1 Diabetes.” *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 32 (7): 700–709. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2790>.
- Mariño, Eliana, James L. Richards, Keiran H. McLeod, Dragana Stanley, Yu Anne Yap,

- Jacinta Knight, Craig McKenzie, et al. 2017. "Gut Microbial Metabolites Limit the Frequency of Autoimmune T Cells and Protect against Type 1 Diabetes." *Nature Immunology* 18 (5): 552–62. <https://doi.org/10.1038/ni.3713>.
- Maron, R, M Guerau-de-Arellano, X Zhang, and H L Weiner. 2001. "Oral Administration of Insulin to Neonates Suppresses Spontaneous and Cyclophosphamide Induced Diabetes in the NOD Mouse." *Journal of Autoimmunity* 16 (1): 21–28. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0471>.
- Mathis, D, L Vence, and C Benoist. 2001. "B-Cell Death during Progression to Diabetes." *Nature* 414 (6865): 792–98. <https://doi.org/10.1038/414792a>.
- Mazzini, Elisa, Lucia Massimiliano, Giuseppe Penna, and Maria Rescigno. 2014. "Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells." *Immunity* 40 (2): 248–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>.
- McDonald, Benjamin D., Bana Jabri, and Albert Bendelac. 2018. "Diverse Developmental Pathways of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes." *Nature Reviews Immunology* 18 (August): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0013-7>.
- Melo-Gonzalez, Felipe, and Matthew R Hepworth. 2017. "Functional and Phenotypic Heterogeneity of Group 3 Innate Lymphoid Cells." *Immunology* 150 (3): 265–75. <https://doi.org/10.1111/imm.12697>.
- Mengel, José, Fabíola Cardillo, Luiz S. Aroeira, Owen Williams, Momtchilo Russo, and Nelson M. Vaz. 1995. "Anti- $\Gamma\delta$ T Cell Antibody Blocks the Induction and Maintenance of Oral Tolerance to Ovalbumin in Mice." *Immunology Letters* 48 (2): 97–102. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(95\)02451-4](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)02451-4).
- Mercadante, A. C. T., S. M. Perobelli, A. P. G. Alves, T. Goncalves-Silva, W. Mello, A. C. Gomes-Santos, A. Miyoshi, A. M. C. Faria, and A. Bonomo. 2014. "Oral Combined Therapy with Probiotics and Alloantigen Induces B Cell-Dependent Long-Lasting Specific Tolerance." *The Journal of Immunology* 192 (4): 1928–37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301034>.
- Mora, J. Rodrigo, and Ulrich H. von Andrian. 2009. "Role of Retinoic Acid in the Imprinting of Gut-Homing IgA-Secreting Cells." *Seminars in Immunology* 21 (1): 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.08.002>.
- Mowat, a M, S Strobel, H E Drummond, and a Ferguson. 1982. "Immunological Responses to Fed Protein Antigens in Mice. I. Reversal of Oral Tolerance to Ovalbumin by Cyclophosphamide." *Immunology* 45 (1): 105–13.

- Mowat, Allan M., and William W. Agace. 2014. "Regional Specialization within the Intestinal Immune System." *Nature Reviews Immunology* 14 (10): 667–85. <https://doi.org/10.1038/nri3738>.
- Mowat, Allan Mc I. 2003. "Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens." *Nature Reviews Immunology* 3 (4): 331–41. <https://doi.org/10.1038/nri1057>.
- Mowat, Allan McI, and Calum C Bain. 2011. "Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation." *Journal of Innate Immunity* 3 (6): 550–64. <https://doi.org/10.1159/000329099>.
- Mucida, Daniel, Nino Kutchukhidze, Agustin Erazo, Momtchilo Russo, Juan J. Lafaille, Maria A. Curotto de Lafaille, Daniel Mucida, et al. 2005. "Oral Tolerance in the Absence of Naturally Occurring Tregs" 115 (7): 1923–33. <https://doi.org/10.1172/JCI24487>.The.
- Murri, Mora, Isabel Leiva, Juan Miguel Gomez-Zumaquero, Francisco J. Tinahones, Fernando Cardona, Federico Soriguer, and María Isabel Queipo-Ortuño. 2013. "Gut Microbiota in Children with Type 1 Diabetes Differs from That in Healthy Children: A Case-Control Study." *BMC Medicine* 11 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-46>.
- Neu, Josef, Christopher M Reverte, Amy D Mackey, Kellym Liboni, Lauren M Tuhacek-Tenace, Marguerite Hatch, Nan Li, Ricardo A Caicedo, Desmond A Schatz, and Mark Atkinson. 2005. "Changes in Intestinal Morphology and Permeability in the Biobreeding Rat before the Onset of Type 1 Diabetes." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 40 (5): 589–95.
- Niess, J. H. 2005. "CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance." *Science* 307 (5707): 254–58. <https://doi.org/10.1126/science.1102901>.
- Nikolic, Tatjana, Sacha B Geutskens, Nico van Rooijen, Hemmo a Drexhage, and Pieter J M Leenen. 2005. "Dendritic Cells and Macrophages Are Essential for the Retention of Lymphocytes in (Peri)-Insulinitis of the Nonobese Diabetic Mouse: A Phagocyte Depletion Study." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 85 (4): 487–501. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700238>.
- Norris, Jill M. 2003. "Timing of Initial Cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity." *Jama* 290 (13): 1713. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1713>.
- Of, Ffect, Usceptibility To, Contrasting Epidemiologic Trends, I N Developed Countries, T H E Geographic, Distribution Of, and Autoimmune Diseases. 2005. "S Usceptibility To a Utoimmune and a Llergic D Iseases." *English Journal* 347 (12): 911–20.

- Ohnmacht, Caspar. 2016. "Tolerance to the Intestinal Microbiota Mediated by ROR(γ T)+ Cells." *Trends in Immunology* 37 (7): 477–86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.05.002>.
- Oida, Takatoku, and Howard L. Weiner. 2010. "TGF- β Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction." *PLoS ONE* 5 (11): 5–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015523>.
- Olivares-Villagómez, Danyvid, and Luc Van Kaer. 2018. "Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier." *Trends in Immunology* 39 (4): 264–75. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003>.
- Oliveira, Rafael Pires. 2014. "HSP65 e Imunorregulação Na Mucosa Intestinal Em Modelo Experimental de Diabetes Tipo 1 HSP65 e Imunorregulação Na Mucosa Intestinal Em Modelo Experimental de Diabetes Tipo 1 Orientadora : Ana Maria Caetano de Faria." *Universidade Federal de Minas Gerais Tese*: 1–115.
- Oliveira, Rafael Pires, Andrezza Fernanda Santiago, Sabine Madsen Ficker, Ana Cristina Gomes-Santos, and Ana Maria Caetano Faria. 2015. "Antigen Administration by Continuous Feeding Enhances Oral Tolerance and Leads to Long-Lasting Effects." *Journal of Immunological Methods* 421: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.02.005>.
- Oriá, Reinaldo Barreto, Gerly Anne de Castro Brito, renata F. C. Leitão, Eliane Oliveira, Ana Maria Leopércio Ponte, and Gerly A. C. Brito. 2016. "Desenvolvimento Do Tubo Digestório." *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*, 163–78. <https://doi.org/10.5151/9788580391893-06>.
- Pabst, O, and A M Mowat. 2012. "Oral Tolerance to Food Protein." *Mucosal Immunology* 5 (3): 232–39. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.4>.
- Pabst, Oliver. 2012. "New Concepts in the Generation and Functions of IgA." *Nature Reviews Immunology* 12 (12): 821–32. <https://doi.org/10.1038/nri3322>.
- Palm, Noah W., Marcel R. De Zoete, Thomas W. Cullen, Natasha A. Barry, Jonathan Stefanowski, Liming Hao, Patrick H. Degnan, et al. 2014. "Immunoglobulin A Coating Identifies Colitogenic Bacteria in Inflammatory Bowel Disease." *Cell* 158 (5): 1000–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.006>.
- Paula-Silva, Josiely, Andrezza Fernanda Santiago, Rafael Pires Oliveira, Magda Luciana Paula Rosa, Claudia Rocha Carvalho, Joana Ferreira Amaral, and Ana Maria Caetano Faria. 2015. "Effect of a Protein-Free Diet in the Development of Food Allergy and Oral Tolerance in BALB/c Mice." *The British Journal of Nutrition*, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000173>.

- Pearson, James A., F. Susan Wong, and Li Wen. 2016. "The Importance of the Non Obese Diabetic (NOD) Mouse Model in Autoimmune Diabetes." *Journal of Autoimmunity* 66: 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.019>.
- Pelaseyed, Thaher, Joakim H Bergström, Jenny K Gustafsson, Anna Ermund, George M H Birchenough, André Schütte, Sjoerd van der Post, et al. 2014. "The Mucus and Mucins of the Goblet Cells and Enterocytes Provide the First Defense Line of the Gastrointestinal Tract and Interact with the Immune System." *Immunological Reviews* 260 (1): 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>.
- Petersson, J., O. Schreiber, G. C. Hansson, S. J. Gendler, A. Velcich, J. O. Lundberg, S. Roos, L. Holm, and M. Phillipson. 2011. "Importance and Regulation of the Colonic Mucus Barrier in a Mouse Model of Colitis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (2): G327–33. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00422.2010>.
- Pirot, Pierre, Alessandra K Cardozo, and Décio L Eizirik. 2008. "Mediators and Mechanisms of Pancreatic Beta-Cell Death in Type 1 Diabetes." *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 52 (2): 156–65. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000200003>.
- Price, Jeffrey D., Chie Hotta-Iwamura, Yongge Zhao, Nicole M. Beauchamp, and Kristin V. Tarbell. 2015. "DCIR2+cDC2 DCs and Zbtb32 Restore CD4+T-Cell Tolerance and Inhibit Diabetes." *Diabetes* 64 (10): 3521–31. <https://doi.org/10.2337/db14-1880>.
- Prochazka, Michal, David V. Serreze, Wayne N. Frankel, and Edward H. Leiter. 1992. "NOR/Lt Mice: MHC-Matched Diabetes-Resistant Control Strain for NOD Mice." *Diabetes* 41 (1): 98–106. <https://doi.org/10.2337/diabetes.41.1.98>.
- Rabinovitch, A, and W L Suarez-Pinzon. 1998. "Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet Beta-Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus." *Biochemical Pharmacology* 55 (8): 1139–49. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00492-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00492-9).
- Rakoff-Nahoum, Seth, Justin Paglino, Fatima Eslami-Varzaneh, Stephen Edberg, and Ruslan Medzhitov. 2004. "Recognition of Commensal Microflora by Toll-like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis." *Cell* 118 (2): 229–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
- Reis, Bernardo Sgarbi, and Daniel Mucida. 2012. "The Role of the Intestinal Context in the Generation of Tolerance and Inflammation." *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/157948>.
- Rewers, Marian, and Johnny Ludvigsson. 2016. "Environmental Risk Factors for Type 1

Diabetes.” *The Lancet* 387 (10035): 2340–48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30507-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30507-4).

- Rezende, Rafael M., Rafael P. Oliveira, Samara R. Medeiros, Ana C. Gomes-Santos, Andrea C. Alves, Flávia G. Loli, Mauro A.F. Guimarães, et al. 2013. “Hsp65-Producing *Lactococcus Lactis* Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice by Inducing CD4⁺LAP⁺ Regulatory T Cells.” *Journal of Autoimmunity* 40: 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.012>.
- Rezende, Rafael M., and Howard L. Weiner. 2017. “History and Mechanisms of Oral Tolerance.” *Seminars in Immunology* 30: 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.004>.
- Rizzatti, G, L R Lopetuso, G Gibiino, C Binda, and A Gasbarrini. 2015. “X-Ray Reflectivity Study on Multilayer Film Structure with Delta Layer o” 2017: 20314. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>.
- Robert, Sofie, Conny Gysemans, Tatiana Takiishi, Hannelie Korf, Isabella Spagnuolo, Guido Sebastiani, Karolien Van Huynegem, et al. 2014. “Oral Delivery of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus Lactis* Reverses Diabetes in Recent-Onset NOD Mice.” *Diabetes* 63 (8): 2876–87. <https://doi.org/10.2337/db13-1236>.
- Rothe, H., R. M. O’Hara, S. Martin, and H. Kolb. 1997. “Suppression of Cyclophosphamide Induced Diabetes Development and Pancreatic Th1 Reactivity in NOD Mice Treated with the Interleukin (IL)-12 Antagonist IL-12[P40]2.” *Diabetologia* 40 (6): 641–46. <https://doi.org/10.1007/s001250050728>.
- Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. 2009. “The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease.” *Nature Reviews Immunology* 9 (5): 313–23. <https://doi.org/10.1038/nri2515>.
- Sakaguchi, S, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh, and M Toda. 1995. “Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (3): 1151–64. <https://doi.org/10.1093/imm/155.3.1151> [pii].
- Sakai, Fumihiko, Tomohiro Hosoya, Aiko Ono-Ohmachi, Ken Ukibe, Akihiro Ogawa, Tomohiro Moriya, Yukio Kadooka, et al. 2014. “*Lactobacillus Gasseri* SBT2055 Induces TGF- β Expression in Dendritic Cells and Activates TLR2 Signal to Produce IgA in the Small Intestine.” *PLoS ONE* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105370>.
- Savino, W., C. Carnaud, J. J. Luan, J. F. Bach, and M. Dardenne. 1993. “Characterization of

- the Extracellular Matrix-Containing Giant Perivascular Spaces in the NOD Mouse Thymus.” *Diabetes* 42 (1): 134–40. <https://doi.org/10.2337/diab.42.1.134>.
- Schulz, Olga, Elin Jaensson, Emma K. Persson, Xiaosun Liu, Tim Worbs, William W. Agace, and Oliver Pabst. 2009. “Intestinal CD103⁺, but Not CX3CR1⁺, Antigen Sampling Cells Migrate in Lymph and Serve Classical Dendritic Cell Functions.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3101–14. <https://doi.org/10.1084/jem.20091925>.
- Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. 2016. “Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans.” *Cell* 164 (3): 337–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>.
- Setoguchi, Ruka, Shohei Hori, Takeshi Takahashi, and Shimon Sakaguchi. 2005. “Homeostatic Maintenance of Natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) Regulatory T Cells by Interleukin (IL)-2 and Induction of Autoimmune Disease by IL-2 Neutralization.” *The Journal of Experimental Medicine* 201 (5): 723–35. <https://doi.org/10.1084/jem.20041982>.
- Sgouroudis, Evridiki, Mara Kornete, and Ciriaco a Piccirillo. 2011. “IL-2 Production by Dendritic Cells Promotes Foxp3(+) Regulatory T-Cell Expansion in Autoimmune-Resistant NOD Congenic Mice.” *Autoimmunity* 44 (August): 406–14. <https://doi.org/10.3109/08916934.2010.536795>.
- Shan, Meimei, Maurizio Gentile, John R Yeiser, a Cooper Walland, Victor U Bornstein, Kang Chen, Bing He, et al. 2013. “Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals.” *Science (New York, N.Y.)* 342 (6157): 447–53. <https://doi.org/10.1126/science.1237910>.
- Shao, Shiyong, Fan He, Yan Yang, Gang Yuan, Muxun Zhang, and Xuefeng Yu. 2012. “Th17 Cells in Type 1 Diabetes.” *Cellular Immunology* 280 (1): 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.001>.
- Sheng, Y. H., S. Triyana, R. Wang, I. Das, K. Gerloff, T. H. Florin, P. Sutton, and M. A. McGuckin. 2013. “MUC1 and MUC13 Differentially Regulate Epithelial Inflammation in Response to Inflammatory and Infectious Stimuli.” *Mucosal Immunology* 6 (3): 557–68. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.98>.
- Shires, John, Efsthios Theodoridis, and Adrian C. Hayday. 2001. “Biological Insights into TCR $\gamma\delta$ ⁺ and TCR $\alpha\beta$ ⁺ Intraepithelial Lymphocytes Provided by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE).” *Immunity* 15 (3): 419–34. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00192-3).
- Shull, Marcia M., Ilona Ormsby, Ann B. Kier, Sharon Pawlowski, Ronald J. Diebold, Moying

- Yin, Ruth Allen, et al. 1992. "Targeted Disruption of the Mouse Transforming Growth Factor-B1 Gene Results in Multifocal Inflammatory Disease." *Nature* 356: 133–35.
- Silva Menezes, Juscilene da, Daniel de Sousa Mucida, Denise Carmona Cara, Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, Momtchilo Russo, Nelson Monteiro Vaz, and Ana Maria Caetano de Faria. 2003. "Stimulation by Food Proteins Plays a Critical Role in the Maturation of the Immune System." *International Immunology* 15 (3): 447–55.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxg043>.
- Slavin, a J, R Maron, and H L Weiner. 2001. "Mucosal Administration of IL-10 Enhances Oral Tolerance in Autoimmune Encephalomyelitis and Diabetes." *International Immunology* 13 (6): 825–33.
- Sluis, Maria Van der, Barbara A.E. De Koning, Adrianus C.J.M. De Bruijn, Anna Velcich, Jules P.P. Meijerink, Johannes B. Van Goudoever, Hans A. Büller, et al. 2006. "Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection." *Gastroenterology* 131 (1): 117–29.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>.
- Smith, P D, L E Smythies, R Shen, T Greenwell-Wild, M Gliozzi, and S M Wahl. 2011. "Intestinal Macrophages and Response to Microbial Encroachment." *Mucosal Immunology* 4 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.66>.
- Spits, Hergen, and Tom Cupedo. 2012. "Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function." *Annual Review of Immunology* 30 (1): 647–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>.
- Spits, Hergen, and James P. Di Santo. 2011. "The Expanding Family of Innate Lymphoid Cells: Regulators and Effectors of Immunity and Tissue Remodeling." *Nature Immunology* 12 (1): 21–27. <https://doi.org/10.1038/ni.1962>.
- Sutherland, Duncan B, and Sidonia Fagarasan. 2012. "IgA Synthesis: A Form of Functional Immune Adaptation Extending beyond Gut." *Current Opinion in Immunology* 24 (3): 261–68. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.005>.
- Takada, Y., T. Hisamatsu, N. Kamada, M. T. Kitazume, H. Honda, Y. Oshima, R. Saito, et al. 2010. "Monocyte Chemoattractant Protein-1 Contributes to Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation by Composition of IL-10-Producing Regulatory Macrophage Subset." *The Journal of Immunology* 184 (5): 2671–76.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804012>.
- Taras, David, Rainer Simmering, Matthew D. Collins, Paul A Lawson, and Michael Blaut. 2002. "Reclassification of Eubacterium Formicigenerans Holdeman and Moore 1974 as

- Dorea Formicigenerans Gen. Nov., Comb. Nov., and Description of Dorea Longicatena Sp. Nov., Isolated from Human Faeces.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (2): 423–28. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-423>.
- Tooley, James E, Frank Waldron-Lynch, and Kevan C Herold. 2012. “New and Future Immunomodulatory Therapy in Type 1 Diabetes.” *Trends in Molecular Medicine* 18 (3): 173–81. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.001>.
- Tuomilehto, Jaakko. 2013. “The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes.” *Current Diabetes Reports* 13 (6): 795–804. <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0433-5>.
- Turley, Shannon J, Je-Wook Lee, Nick Dutton-Swain, Diane Mathis, and Christophe Benoist. 2005. “Endocrine Self and Gut Non-Self Intersect in the Pancreatic Lymph Nodes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49): 17729–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509006102>.
- Vaarala, O., M. a. Atkinson, and J. Neu. 2008. “The ‘Perfect Storm’ for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity.” *Diabetes* 57 (10): 2555–62. <https://doi.org/10.2337/db08-0331>.
- Vaarala, Outi. 2011. “The Gut as a Regulator of Early Inflammation in Type 1 Diabetes.” *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 18 (4): 241–47. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283488218>.
- Visser, J. T.J., K. Lammers, A. Hoogendijk, M. W. Boer, S. Brugman, S. Beijer-Liefers, A. Zandvoort, et al. 2010. “Restoration of Impaired Intestinal Barrier Function by the Hydrolysed Casein Diet Contributes to the Prevention of Type 1 Diabetes in the Diabetes-Prone BioBreeding Rat.” *Diabetologia* 53 (12): 2621–28. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1903-9>.
- Vivier, Eric, David Artis, Marco Colonna, Andreas Diefenbach, James P. Di Santo, Gérard Eberl, Shigeo Koyasu, et al. 2018. “Innate Lymphoid Cells: 10 Years On.” *Cell* 174 (5): 1054–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>.
- Wang, B, I André, A Gonzalez, J D Katz, M Aguet, C Benoist, and D Mathis. 1997. “Interferon-Gamma Impacts at Multiple Points during the Progression of Autoimmune Diabetes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 13844–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13844>.
- Weiner, H L. 2001. “Induction and Mechanism of Action of Transforming Growth Factor-Beta-Secreting Th3 Regulatory Cells.” *Immunological Reviews* 182: 207–14. <https://doi.org/1820117> [pii].
- Weiner, H L, A Friedman, A Miller, S J Khoury, A Al-Sabbagh, L Santos, M Sayegh, R B

- Nussenblatt, D E Trentham, and D A Hafler. 2003. “Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens.” *Annual Review of Immunology* 12 (1): 809–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.004113>.
- Weiner, Howard L, Andre Pires da Cunha, Francisco Quintana, and Henry Wu. 2011. “Oral Tolerance.” *Immunological Reviews* 241 (1): 241–59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x>.
- Weiner, Howard L, and Henry Yim Wu. 2011. “Oral Tolerance.” *Immunologic Research* 241 (3): 241–59. <https://doi.org/10.1385/IR:28:3:265>.
- Weiss, Jonathan M, Angelina M Bilate, Michael Gobert, Yi Ding, Maria a Curotto de Lafaille, Christopher N Parkhurst, Huizhong Xiong, et al. 2012. “Neuropilin 1 Is Expressed on Thymus-Derived Natural Regulatory T Cells, but Not Mucosa-Generated Induced Foxp3+ T Reg Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 209 (10): 1723–42, S1. <https://doi.org/10.1084/jem.20120914>.
- Wen, Li, Ruth E. Ley, Pavel Yu. Volchkov, Peter B. Stranges, Lia Avanesyan, Austin C. Stonebraker, Changyun Hu, et al. 2008. “Innate Immunity and Intestinal Microbiota in the Development of Type 1 Diabetes.” *Nature* 455 (7216): 1109–13. <https://doi.org/10.1038/nature07336>.
- Westwell-Roper, Clara, Dominika Nackiewicz, Meixia Dan, and Jan A Ehses. 2014. “Toll-like Receptors and NLRP3 as Central Regulators of Pancreatic Islet Inflammation in Type 2 Diabetes.” *Immunology and Cell Biology* 92 (4): 314–23. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.4>.
- Willcox, A., S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis, and N. G. Morgan. 2009. “Analysis of Islet Inflammation in Human Type 1 Diabetes.” *Clinical & Experimental Immunology* 155 (2): 173–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x>.
- Worbs, T. 2006. “Oral Tolerance Originates in the Intestinal Immune System and Relies on Antigen Carriage by Dendritic Cells.” *Journal of Experimental Medicine* 203 (3): 519–27. <https://doi.org/10.1084/jem.20052016>.
- Wu, Wei, Feidi Chen, Zhanju Liu, and Yingzi Cong. 2016. “Microbiota-Specific Th17 Cells.” *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (6): 1473–82. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000775>.
- Xiong, Tingting, and Jan Eric Turner. 2018. “Innate Lymphoid Cells in Autoimmunity and Chronic Inflammatory Diseases.” *Seminars in Immunopathology* 40 (4): 393–406. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0670-4>.

- Yadav, Deepak, Valeria Judkowski, Malin Flodstrom-Tullberg, Lori Sterling, William L Redmond, Linda Sherman, and Nora Sarvetnick. 2004. "B7-2 (CD86) Controls the Priming of Autoreactive CD4 T Cell Response against Pancreatic Islets." *Journal of Immunology* 173 (6): 3631–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3631>.
- Zhou, Fu Xi, Lu Chen, Xiao Wei Liu, Chun Hui Ouyang, Xiao Ping Wu, Xue Hong Wang, Chun Lian Wang, and Fang Gen Lu. 2012. "Lactobacillus Crispatus M206119 Exacerbates Murine DSScolitis by Interfering with Inflammatory Responses." *World Journal of Gastroenterology* 18 (19): 2344–56. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2344>.

ANEXOS

HIGHLIGHTED ARTICLE

Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes

Mariana Camila Gonçalves Miranda¹ | Rafael Pires Oliveira² | Lícia Torres¹ | Sarah Leão Fiorini Aguiar¹ | Natalia Pinheiro-Rosa¹ | Luísa Lemos¹ | Mauro Andrade Guimarães¹ | Daniela Reis¹ | Tatianny Silveira³ | Ênio Ferreira³ | Thaís Garcias Moreira¹ | Denise Carmona Cara⁴ | Tatiani Uceli Maioli⁵ | Brian L. Kelsall⁶ | Daniela Carlos⁷ | Ana Maria Caetano Faria^{1,8}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Instituto Federal do Paraná, Palmas, Paraná, Brazil

³Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁶Laboratory of Molecular Immunology, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

⁷Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁸Instituto de Investigação em Imunologia (iii), São Paulo, Brazil

Correspondence

Ana M.C. Faria, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil. Email: anacaetanofaria@gmail.com
Mariana C.G. Miranda, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil. Email: maricamilla1@gmail.com

Abstract

Alterations in the composition of the intestinal microbiota have been associated with development of type 1 diabetes (T1D), but little is known about changes in intestinal homeostasis that contribute to disease pathogenesis. Here, we analyzed oral tolerance induction, components of the intestinal barrier, fecal microbiota, and immune cell phenotypes in non-obese diabetic (NOD) mice during disease progression compared to non-obese diabetes resistant (NOR) mice. NOD mice failed to develop oral tolerance and had defective protective/regulatory mechanisms in the intestinal mucosa, including decreased numbers of goblet cells, diminished mucus production, and lower levels of total and bacteria-bound secretory IgA, as well as an altered IEL profile. These disturbances correlated with bacteria translocation to the pancreatic lymph node possibly contributing to T1D onset. The composition of the fecal microbiota was altered in pre-diabetic NOD mice, and cross-fostering of NOD mice by NOR mothers corrected their defect in mucus production, indicating a role for NOD microbiota in gut barrier dysfunction. NOD mice had a reduction of CD103⁺ dendritic cells (DCs) in the MLNs, together with an increase of effector Th17 cells and ILC3, as well as a decrease of Th2 cells, ILC2, and Treg cells in the small intestine. Importantly, most of these gut alterations precede the onset of insulinitis. Disorders in the intestinal mucosa of NOD mice can potentially interfere with the development of T1D due the close relationship between the gut and the pancreas. Understanding these early alterations is important for the design of novel therapeutic strategies for T1D prevention.

KEYWORDS

gut mucosa, ILCs, oral tolerance, secretory IgA, type-1 diabetes

Abbreviations: Ags, antigens; DC, dendritic cells; IEC, intestinal epithelial cell; IELs, intraepithelial lymphocytes; ILCs, innate lymphoid cells; mLNs, mesenteric lymph nodes; MUC2, mucin 2; NOD, non obese diabetic; NOR, nonobese diabetes-resistant; PLNs, pancreatic lymph nodes; SI, small intestine; SIgA, secretory IgA; T1D, type 1 diabetes; Treg, regulatory T cell.

Received: 20 January 2019 | Revised: 6 June 2019 | Accepted: 27 June 2019

J Leukoc Biol. 2019;106:513–529.

www.jleukbio.org

©2019 Society for Leukocyte Biology | 513

1 | INTRODUCTION

Type 1 Diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the activation of autoreactive T cells and the subsequent destruction of insulin-producing β pancreatic cells.^{1–4} Immune cell infiltration occurs prior to overt diabetes. Effector mechanisms of β -cell destruction include the action of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α , release of reactive oxygen species, action of granzyme and perforin, and induction of apoptosis via the Fas/Fas-L pathway.^{5,6} The continuous destruction of the islets and the significant reduction in cellular mass of the pancreas lead to progressive loss of its insulin producing capacity and eventually to a state of absolute deficiency of the hormone.⁷

T1D is a polygenic disease with over 50 loci linked to disease risk in humans.⁸ The most important loci for susceptibility are those coding for HLA. However, the rise in T1D seen in recent years indicates that nongenetic factors have a critical impact in disease development.¹

The gut microbiota has been extensively studied as an essential component that shapes the progression of T1D.^{9–11} However, the influence of immune and non-immune components of intestinal mucosa is poorly investigated. The surfaces of the body are the major sites where immune cells traffic and reside, and the intestinal mucosa alone harbors more lymphocytes than all lymphoid organs combined.¹² Gut homeostasis requires constant discrimination between natural harmless microbiota and food antigens from potential pathogenic agents. Therefore, immune cells at the intestinal mucosa must develop and maintain a tolerogenic response upon contact with these natural Ags through a physiological phenomenon called oral tolerance.¹³ It is known that tolerance initiated at the gut mucosa involves the development of regulatory T cells (Tregs) that mediate anti-inflammatory effects in the intestinal environment and also systemic inhibition of immune responses depending on the Ag that drove their differentiation.¹⁴

Although the pancreas is not part of the gastrointestinal tract, this endocrine-exocrine gland has a privileged localization throughout the mesentery, being adjacent to the duodenum and in intimate contact with the spleen, and attached to the stomach.¹⁵ Enzymes present in the pancreatic secretions released daily into the duodenum help break down fats, proteins, and carbohydrates. In addition, insulin produced by β pancreatic cells is critical for glucose uptake by all body cells. Thus, an axis between the intestine and pancreas is supported by anatomical and functional evidence.

The development of diabetes in NOD (non-obese diabetic) mice is an excellent model to investigate the mechanisms of T1D.¹⁶ These animals develop spontaneously T1D with genetic and environmental components that are similar and relevant to the human disease, including presence of autoantibodies¹⁷ and an increase in circulating T cells¹⁸ prior to diabetes onset. NOR (non-obese diabetes resistant) mice are the best control for studying immunological dysfunctions in NOD mice since these two strains share MHC and background genes with the exception of the few genes from C57BL/6 that seem to yield resistance to diabetes development.¹⁹

In this study, we investigated the alterations in the gut mucosa of NOD mice to understand the relationship between development of T1D and intestinal homeostasis. We found that NOD mice had defective protection mechanisms, alterations in microbiota composition with bacterial translocation to the pancreatic lymph node, and an imbalance of the inflammatory/regulatory immune axis in the intestinal mucosa that led to impaired oral tolerance. Moreover, these gut abnormalities preceded the onset of T1D measured as inflammatory infiltration of the pancreas islets (insulinitis) and hyperglycemia.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animals

Female NOD mice (non-obese diabetic from Jackson Laboratory), obtained from CEDEME (Center for the Development of Experimental Models for Medicine and Biology) of Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, São Paulo, SP) were used. As a control, we used NOR (non-obese diabetes resistant) and BALB/c female mice obtained from the Jackson Laboratory, USA. Colonies of these animals were kept in the Laboratory of Immunobiology of ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, under a 12-h light-dark cycle, fed standard mouse chow and water ad libitum. In order for NOD mice to spontaneously develop autoimmune diabetes, they were kept in extremely clean and well-cared conditions (microisolators, sterilized water, and chow and placed on ventilated shelves with air filtration). These conditions are essential for disease susceptibility, as reported in the literature.¹⁶ All experimental protocols were approved by the University Ethics Committee on Animal Care (CEUA-UFGM).

2.2 | Assessment of autoimmune diabetes incidence

Glycemic levels were monitored every 15 days by collecting a minimal sample of peripheral blood from the tail. Dosage tapes suitable for automatic glucose meter (Accu-Check Active, Roche, Basel, Switzerland) were used according to manufacturer's instructions.²⁰ Animals with 2 glucose measurements higher than 250 mg/dl were considered diabetic.

2.3 | Histology

Samples of small intestine, colon, and pancreas were fixed in 80% methanol solution with 20% DMSO. These tissues were dehydrated in solutions containing increasing concentrations of ethanol, clarified in xylol solution, and embedded in paraffin. Sections of 5 μ m were cut from paraffin blocks and stained with H&E or used nonstained for Immunohistochemistry. Stained sections were used for histopathological analysis of the small intestine, colon, and pancreas. Histological images were obtained using a camera coupled to the Olympus BX41 microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA).

2.4 | Histopathological analysis

All pancreatic islets of each animal were counted and evaluated for insulinitis progression. Each islet was scored according to the degree of inflammation being 0 for islets without insulinitis, 1 for islets with peri-insulinitis, 2 with invasive infiltrates affecting an area smaller than 50% of the islet, and 3 for islets with infiltration area >50% of the islet. After scoring, frequencies of islets at different stages in each organ were also evaluated. Images of small intestine and colon were taken to measure the size of the mucosal layer, villi, depth of the crypts, submucosa, and muscle layers. Measurements were performed using ImageJ with scale bars added to all images.

2.5 | Immunohistochemistry

Slides containing 4 μm slices were dewaxed in xylol and ethanol, then hydrated for immunolabeling according to instructions of Polymer Detection System (NovoLink, Leica), using specific Abs on separate slides. Antigenic recovery reactions were performed under pressurized wet heat (Pascal[®]) with citrate pH 6.0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) at 125°C for 2 min for MUC-2 (1:100) marker with cooling of 20 min after the withdrawal of the vats. Endogenous peroxidase activity was blocked with a 3% hydrogen peroxide solution in methyl alcohol. Sections were stained with anti-MUC2 mAb (1:300; Abcam), and immunoreactivity was visualized by incubating the slides with diaminobenzidine (DAB substrate system (Lab Vision, Fremont CA) for 10 min. Hematoxylin was used for counter staining. Ten images at 40 \times magnification were captured of each labeled intestinal fragment of MUC2 staining and the number of positive cells per field was counted. Results are shown as the mean of cell numbers per field.

2.6 | Oral tolerance induction

Female NOD and NOR mice at 7 weeks of age received 4 mg/ml OVA (grade 3, Sigma) (oral OVA group) in the drinking water for 24 h. As the average liquid consumption by mice at our facility is 5 ml/day,²¹ the final dose of OVA consumed was 20 mg. Control group received only water. Seven days later, animals were immunized i.p. with 0.2 ml saline solution containing 10 μg OVA and 1 mg aluminum hydroxide [Al(OH)₃]. Fourteen days later, mice received 10 μg OVA i.p., and 7 days thereafter, sera were collected for Ab measurement.

2.7 | ELISA assays

Anti-OVA IgG1 serum antibody and IgA from intestinal content were determined by ELISA. Measurement of anti-OVA IgG1 was performed using 96-well plates (Nunc) coated with 2 μg /well OVA solution in sodium carbonate buffer, pH 9.6, at 4°C overnight. Plates were washed with PBS with 0.05% Tween 20 and blocked with PBS casein (0.25%) for 1 h at room temperature. Serum samples (1:100) were added to the plate and incubated for 1 h at 37°C. Then, plates were washed and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:15,000; Southern Biotechnology Associate, Inc.)

for 1 h at 37°C. Later, the plates were incubated in the dark with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma, A1888-5G) and H₂O₂. Absorbance was measured at 405 nm by an ELISA reader (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

For measurement of secretory IgA, the small intestine lavage fluid was collected from mice using PBS. Fluid was vortexed and centrifuged 1200 $\times g$ for 30 min at 4°C. Afterward, the supernatant was transferred to Nunc MaxiSorp 96-well ELISA plates previously sensitized with purified anti-mouse IgA mAb UNLB (1:10000) overnight (BD Bioscience)²² and blocked with PBS casein (0.25%) for 1 h at room temperature. Then, biotinylated anti-IgA mAb (Southern Biotechnology; 0.5 mg/ml) was added and plates incubated for 1 h at 37°C, washed, and peroxidase-labeled streptavidin (Sigma; 1:10,000) was added to the wells. For color reaction, plates were incubated in the dark with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma, A1888-5G) and H₂O₂ substrate in sodium citrate buffer. Color development was measured by an ELISA reader (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) at 405 nm and results were given as concentration of sIgA (μg) per milliliter of intestinal fluid, according to the standard curve. Matched Ab pairs were used for measuring IL-17 by ELISA (DuoSets, R&D Systems), IL-10, and IFN- γ (ELISA Max Standard Set, BioLegend). Assays were performed according to manufacturer's protocol.

2.8 | Cell preparation for flow cytometry analysis

2.8.1 | Lymph nodes

RPMI 1640 medium (Life Technologies) enriched with 2 nM L-glutamine, 50 mM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 25 mM HEPES, and 10% inactivated FBS was used for cell extraction. Pancreatic and segmented mesenteric lymph nodes (mLNs) were obtained using a glass tissue grinder. After centrifugation at 12,000 $\times g$ for 10 min at 4°C, samples were resuspended in RPMI medium and viable cells counted using the Neubauer's chamber and the trypan blue dye. For experiments in which APCs were evaluated prior to grinding, tissues were digested for 1 h at 37°C with RPMI 1640 medium containing type 2 collagenase (Sigma-Aldrich) at 2 mg/ml.

2.8.2 | Isolation of cells from the intestinal lamina propria

Intestines were separated from mesentery and Peyer's Patches (small intestine) and feces were removed. Intestines were cut longitudinally and washed twice in PBS. Tissue was cut into 1 cm pieces, mucus was removed by incubating the tissue for 10 min in PBS and 1 μM DTT, and epithelium was removed by 2 incubation steps in 25 ml of HBSS + 2% FCS + 30 mM EDTA for 10 min at 37°C with vigorous shaking at 230 rpm after each incubation. Tissues were washed in PBS over a sieve. The remaining tissue was then incubated for 45 min at 37°C in IMDM medium (Life Technologies) containing 2% FBS, 0.17 mg/ml liberase TL (Roche), and 30 μg /ml DNase I (Roche). Digests were taken and resuspended 10 times, passed through a sieve and collagenase quenched by addition of 15 ml cold RPMI containing 2% FCS. Cell pellets were resuspended in 40% Percoll (BD Pharmigen) complemented

with RPMI, 2% FCS, passed through a 100 μ m mesh and separated by centrifugation in a discontinuous Percoll gradient (80%/40%) at 1000 \times g for 25 min at room temperature (RT). APCs and lymphocytes were isolated from the interphase, washed, and stained for flow cytometry analysis.

2.8.3 | Analysis of IgA coated bacteria

Contents of the small intestine and colon were collected shortly after removal of the organs and transferred to a plastic tube where they were diluted in sterile 1 \times PBS and frozen at 0.1 mg/ml. Each sample was vortexed for 5 min and then centrifuged at 4000 \times g for 5 min at 4°C. Supernatants were collected and filtered through a 70 μ m cell strainer. They were centrifuged at 8000 \times g to precipitate bacteria. The obtained pellets were resuspended in PBS-BSA and incubated for 30 min with biotin anti-IgA antibody, washed, centrifuged again at 8000 \times g and incubated for 20 min with streptavidin-APC. Samples were analyzed by flow cytometry for evaluation of IgA coated bacteria.

2.8.4 | Quantification of bacterial DNA by quantitative PCR

Fecal and pancreatic lymph node DNA were obtained using the DNeasy PowerSoil Kit or DNeasy Blood and Tissue Kits, respectively (Qiagen). Quantitative PCR of bacteria from Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria phyla was performed using universal ribosomal 16S (16S rRNA) or taxon-specific gene primers. Relative quantification of bacterial species of the gut microbiota was performed using PCR-Array plates (Microbial DNA qPCR Arrays). Differences (Δ CT) between cycle threshold (CT) values of eubacteria and specific bacterial groups were used to obtain normalized levels of each bacterial group ($2^{-\Delta$ CT). The relative abundance of each bacterial group was obtained after normalization with the control groups.

Primer sequences:

Actinobacteria :

F- TGTAGCGGTGGAATGCGC

R-AATTAAGCCACATGCTCCGCT

Bacteroidetes

F- GTTTAATTCGATGATACGCGAG

R- TTAASCCGACACCTCACGG

Firmicutes

F- ATGTGGTTTAATTCGAAGCA

R- AGCTGACGACAACCATGCAC

Proteobacteria

F- CATGACGTTACCCGAGAAGAAG

R- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC

Eubacteria universal

F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT

R- ATTACCGCGGCTGCTGGC

16S

F- AACAGGATTAGATACCCTGGTAG

R- GGTTCTTCGCGTTGCATC

2.9 | Flow cytometry analysis

Cells extracted from spleen, segmented mLNs, pancreatic lymph nodes, and gut lamina propria were evaluated by flow cytometry to identify CD4 T lymphocytes, innate lymphoid cells (ILC), intra-epithelial lymphocytes (IEL), IgA-producing plasma cells, and intestinal dendritic cells (DCs). Cells were incubated in polystyrene tubes with anti-CD16/CD32 mAb to block Fc γ RII/III receptors and stained on ice for 30 min and then for another 30 minutes at 4°C with mAbs conjugated with fluorochromes reactive for surface molecules and intracellular. For intracellular labeling of the Foxp3 transcription factor, after this first step, commercial fixation/ permeabilization kit (e-Bioscience) was used and then samples were incubated for another 30 min with mouse-labeled anti-foxp3 Abs. After washing with PBS-BSA (0.5% BSA), samples were fixed with 3% paraformaldehyde for 30 min, washed, and stored in PBS-BSA at 4°C before flow cytometry analysis. Samples were acquired at FACSCanto II or FACSFortessa (BD Biosciences) coupled to computers with Diva software. Populations of interest were delimited by size and granularity (Forward Scatter \times Side Scatter), and 100,000 events acquired for subsequent analysis using FlowJo software.

Fluorescent-dye-conjugated Abs were purchased from eBioscience (USA; Anti mouse CD8b, 48008380, eFluor 450; Anti mouse CD11b 47-0112-82, APC-eFluor 780; anti mouse FOXP3,56-573-82 AF700; anti-CD45, 25-0451-82, PE/Cy 7; CD19, 15-0.193-82 PerCP-Cy 5.5; Anti mouse CD127, 48-1271-80, eFluor 450; Anti mouse MHCII I-Ad, 17-5323-80 APC; Anti mouse T-bet, 644813, APC; anti- ROR γ t, 12-6988-82, Pe; anti-FOXP3, 12-5773-82, Pe; anti-CD11b, 47-0112-82, APC; anti-mouse CD11c, 49-0114-80, e-fluor 450; anti-mouse CD4, 17-0041-82, APC; LIVE/DeadTM Fixable Aqua Stain Kit, L34957); BD (USA; Rat anti-mouse Foxp3, 560403, Alexa Fluor 488; anti-mouse CD3, 555276, PE-cy5; anti-GATA 3, 580405, Pe-Cy7; rat anti-mouse CD11b, 550993; PerCP-Cy 5.5), or Biolegend (Anti-mouse CD4, 116015, PE/Cy7; anti-mouse CD45 103108, FITC; anti-mouse TCR γ/δ , 118107, PE; CD103 anti-mouse, 121419, FITC, F4/80 anti-mouse, 123113, PE/Cy7).

We have used the FMO control (Fluorescence minus 1) to set all channels positivity and then gate cells, as largely adopted by Herzenberg's group and other cytometry experts.²³

2.10 | Analysis of cytokine expression by real-time PCR

Samples of the small intestine and colon were extracted and stored immediately in microtubes containing the RNAlater reagent (Life Technologies, USA) overnight at 4°C to preserve the integrity of the tissue RNA. Subsequently, samples were lysed in a Precellys (Bertin, USA) homogenizer using tubes containing latex beads for disruption of cells and release of nucleic acids. Total RNA was extracted following the instructions of the RNeasy kit (Qiagen, Germany) and after dosing it in a spectrophotometer (Nanodrop, ThermoFisher, USA) and confirmation of the absorbance ratio A260/A280 between 1.8 and 2.0, RNA was used for cDNA synthesis by reverse transcriptase

using the qScript synthesis (Quanta Biosciences). The cDNA was used for real time PCR by the TaqMan method. Commercial primers bound to fluorophores and quenchers (Applied Biosystems, USA) for each gene of interest were used: IL-6 (Mm00446190_m1; IL-12 (Mm00434174_m1; IL-10 (Mm00439614_m1); TGF- β 1 (Mm99999_g1); IFN- γ (Mm01168134_m1). The PCR reactions were performed in 96-well plates (MicroAmp optical, Applied Biosystems) using the PerfeCTa FastMix II reagent (Quanta Biosciences, USA) in the 7900HT Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems). The amplification conditions used consisted of heating at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. Results were expressed from the cycle threshold of each gene evaluated in relation to the amplification of the endogenous control GAPDH, according to the formula $2^{-\Delta ct}$.

2.11 | Cross-fostering model

Only pups born to NOD and NOR breeding pairs within 48 h of each other were used for cross-fostering. After birth, NOD litters were removed and put with the NOR mother. The NOR litter remained with the birth mother (Fig. 3G). Fostered pups were marked daily with a sharpie on the back of the neck until their ears were able to be clipped (~7 days). Pups were nursed until weaning. After weaning, all pups were euthanized and the small intestines and colons were collected for mucus analyze.

2.12 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 software. Differences between NOD and NOR at matching ages were analyzed by either Student's *t*-test or ANOVA and Tukey's posttest for the experiment on oral tolerance induction. The *P*-value of less than 0.05 was considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Spontaneous diabetes development in NOD mice was preceded by proinflammatory cytokine production in the pancreas

NOD mice are reported to develop T1D spontaneously. Mice are considered diabetic when they have 2 consecutive blood glucose measurements above 250 mg/dL, and pre-diabetic when there are no alteration in glycemia but histologically detectable insulinitis is present.¹⁶ Incidence of diabetes in our colony was ~60% when NOD mice were at 16–20 weeks of age. As expected, NOR mice did not develop diabetes (Fig. 1A). To verify insulinitis progression, we examined histological sections of pancreas from 4- to 6-week-old as well as diabetic and prediabetic 16–20-week-old NOD and NOR mice stained with H&E (Fig. 1B). As expected, 4–6-week-old NOR and NOD mice showed no insulinitis. When animals were at 16–20 weeks of age, NOR mice developed insulinitis in few β pancreatic islets as already reported.¹⁹ On the

other hand, 16–20-week-old prediabetic NOD mice showed a high frequency of β pancreatic islets with insulinitis. In diabetic NOD mice, signs of inflammatory infiltration in the pancreatic islets were more prominent, and tissue destruction was also observed (Fig. 1C).

Prior to onset of insulinitis there is a local release of proinflammatory cytokines, such as IL-6, IL-17, and IFN- γ .^{24–27} We analyzed cytokine production in pancreas tissues of NOD mice and found increased levels of IL-17 and IFN- γ in prediabetic and diabetic mice (Fig. 1D–F). Despite the absence of histological signs of insulinitis in NOD mice at 4–6 weeks of age, these mice already had augmented levels of IL-17 and IFN- γ in their pancreatic tissue.

3.2 | NOD mice developed impaired gut barrier function at an early age

Pancreatic lymph nodes are associated with the gastrointestinal tract since they drain both the pancreas and the duodenum.^{15,28} To explore a putative communication between the intestinal mucosa and the pancreas in a pathological scenario, we evaluated alterations in the gut mucosa of NOD mice during diabetes development. First, we examined barrier components involved in gut mucosa protection such as mucus and secretory IgA production. Mucus secretion by goblet cells is essential to protect the gut mucosa from invasion by bacteria and from other stressors that may cause tissue damage and inflammation.²⁹ NOD mice had a diminished frequency of goblet cells in the small intestine (Fig. 2A and B), and a reduced production of mucus in the colon (Fig. 2C and D) when compared to NOR mice beginning at an early age (4–6 weeks). Quantification of mucin 2 (MUC 2), a major component of the intestinal mucus,³⁰ was also performed by immunohistochemistry. MUC2 was significantly reduced in goblet cells from the small intestine and colon of prediabetic NOD mice (Figure 2E–G).

Intraepithelial lymphocytes (IELs) are in direct contact with enterocytes and in immediate proximity to Ags in the gut lumen forming the front line of immune defense against invading pathogens. IELs essentially comprise Ag-experienced T cells belonging to both the T cell receptor- $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$)⁺ and TCR $\alpha\beta$ ⁺ lineage.³¹ We next assessed whether the onset of T1D could be related to alterations on IEL populations (Supplementary Fig. 1A). Frequencies and absolute numbers of natural CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\gamma\delta$ IEL were comparable between NOD and NOR mice, but the frequencies of natural CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ and CD8 $\alpha\beta$ TCR $\alpha\beta$ IEL were significantly reduced in NOD mice before the onset of disease (Fig. 2H–I). There was no difference in the frequencies of subsets of induced TCR $\alpha\beta$ ⁺ IEL in NOD mice, and we observed an increase in absolute numbers of induced CD4⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ IEL population in these mice (Fig. 2I).

Secretory IgA (SIgA) is an Ig involved in gut homeostasis by reducing penetration of commensal bacteria and pathogens through the intestinal epithelium.³² Levels of SIgA were decreased in 4–6-week-old and prediabetic NOD mice (Fig. 2K). Interestingly, the frequency of IgA-coated bacteria was reduced in the fecal contents of small intestine but slightly increased in the colon of prediabetic NOD mice (Fig. 2L and M). Thus, NOD mice at 4–6 weeks of age already showed defects in gut barrier function.

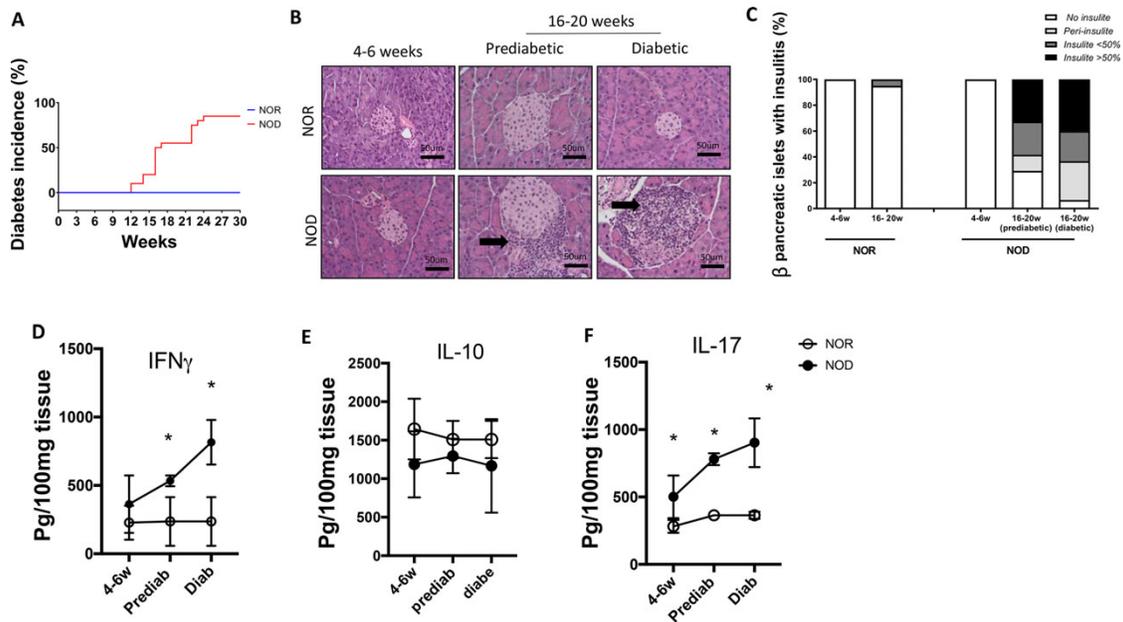


FIGURE 1 Insulinitis progression, pancreas alterations and tissue cytokine levels in NOD mice. (A) Diabetes incidence in NOD and NOR mice. (B) Representative images of histological sections of pancreas of NOD and NOR mice at 4–6 weeks of age, 16–20 weeks of age (prediabetic or diabetic) stained by H&E and examined under a light microscope at 100 \times magnification. (C) Insulinitis progression in pancreatic β islets of animals was evaluated and scored as no insulinitis = 0, periinsulinitis = 1, invasive insulinitis < 50% = 2, invasive insulinitis > 50% = 3. Graph represents the percentage of each stage identified ($n = 4$ animals per group). (D) Concentration of IFN- γ in pancreas extracts of 4–6-week-old, 16–20-week-old prediabetic, 16–20-week-old diabetic NOD mice, and age-matched NOR mice ($n = 4$ –5 animals per group). (E) IL-10 cytokine concentration in pancreas extracts of 4–6-week-old, 16–20-week-old prediabetic, 16–20-week-old diabetic NOD mice, and age-matched NOR mice ($n = 4$ –5 animals per group). (F) IL-17 cytokine concentration in pancreas extracts of 4–6-week-old, 16–20-week-old prediabetic, and 16–20-week-old diabetic mice ($n = 4$ –5 animals per group). These data are representative of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed between groups using Student's t -test. * $P < 0.05$

3.3 | Gut microbiota translocation to the PLNs occurred prior the onset of diabetes

Diabetes development in NOD mice depends on gut microbiota composition and intestinal activation of TLR4 and MyD88.⁸ Furthermore, transplantation of microbiota from NOD mice induces insulinitis in NOR mice, suggesting that NOD microbiota may contribute directly to diabetes development.³³ However, it is still unclear how the intestinal microbiota can affect autoimmune processes at sites distal from the intestine, such as the pancreas.³⁴ To address whether alterations in mucosal barrier in NOD mice before onset of diabetes enhances the translocation of bacteria from gut to PLN, we performed 16S rRNA quantification by qPCR of the PLN tissue (Figure 3A). Surprisingly, was almost three-fold increased in PLNs of NOD mice at 4 weeks of age, indicating that translocation of the gut microbiota to the PLNs occurred before the onset of T1D and the difference became more prominent with disease progression reaching a 4-fold increase (Fig. 3A). All microbiota phyla were equally increased in PLNs of NOD mice when compared to NOR mice, but the abundance of Proteobacteria were increased 200-fold (Fig. 3B and C). There is an increase in the abundance of *Akkermansia muciniphila* (Verrucomicrobia phylum) in NOD mice. We next analyzed the composition of microbiota in the small intestine fecal content (Fig. 3B and

C). Before disease onset, we observed an increased abundance of Firmicutes and reduced abundance of Actinobacteria in the small intestine fecal content compared to NOR mice. After the establishment of diabetes, all phyla showed increased abundance, especially Firmicutes that were increased more than 10-fold. In 4-week-old NOD mice, the abundance of some bacterial species from the Firmicutes phylum (*Lachnobacterium bovis* and *Dorea formicigenerans*) was reduced, whereas *Lactobacillus crispatus*, *Ruminococcus torques*, and in particular *Eubacterium rectale* were increased (2-fold). In addition, the abundance of *Parabacteroides merdae* from Bacteroidetes, and *Escherichia coli/fergusonii* from Proteobacteria phyla were decreased when compared to NOR mice. Moreover, Actinobacteria (*Bifidobacterium longum*), and Proteobacteria (*Haemophilus parainfluenzae*) were increased when compared to NOR mice. (Fig. 3D). The disease onset, was associated to decrease in the abundance of several bacterial species such as *Lactobacillus salivarius*, *Lachnobacterium bovis*, *Dorea formicigenerans*, and *Streptococcus thermophilus/salivarius* from Firmicutes, and Actinobacteria (*Bifidobacterium breve*) when compared to NOR mice. Of note, the abundance of *E. coli* was increased while *P. merdae* showed decreased during the development of diabetes (Fig. 3E).

Maternal transmission of the microbiota of NOR mice to newborn pups from NOD mice are reported to induce an early and sustained shift in the commensal microbiota composition that confer

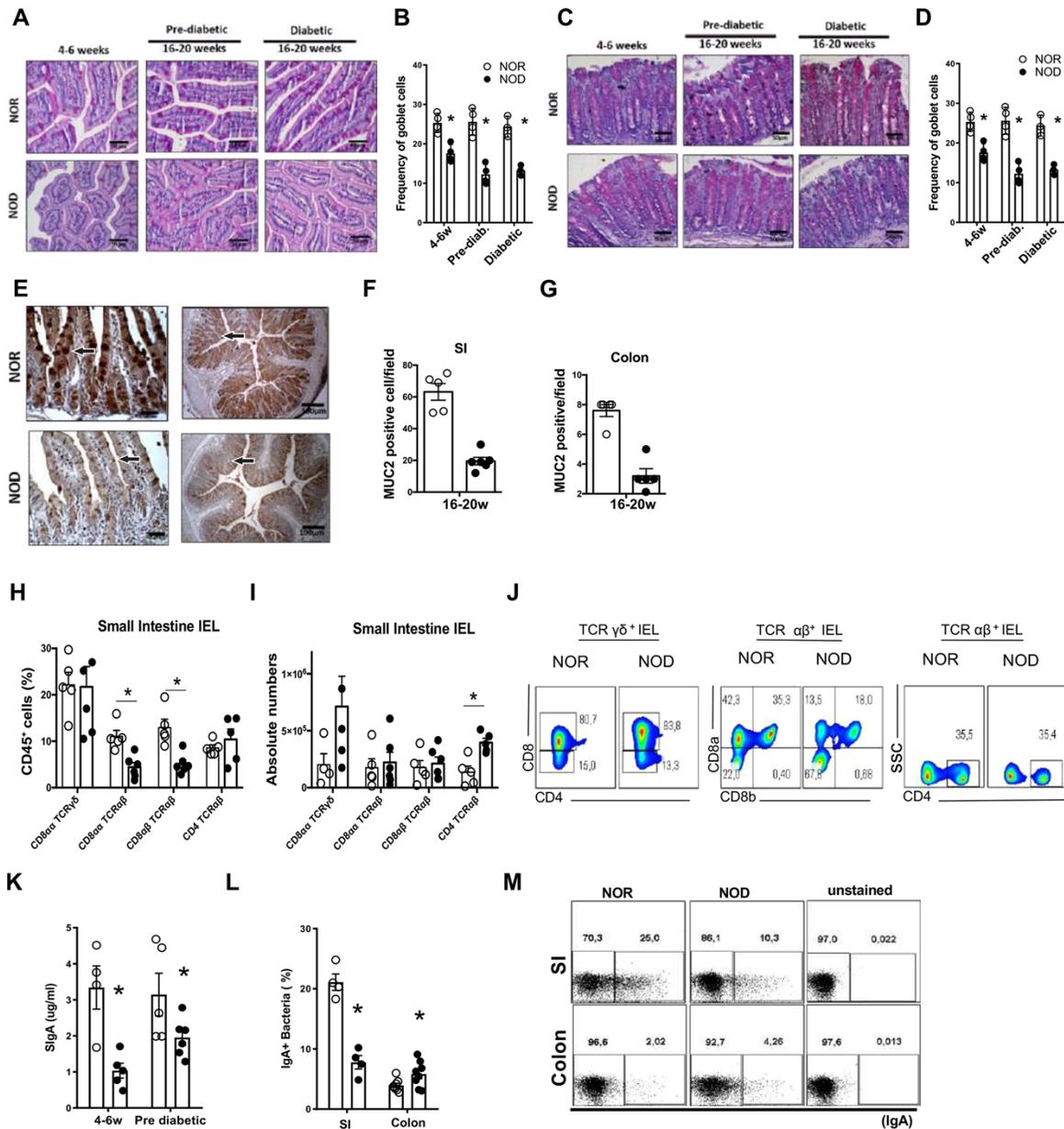


FIGURE 2 Changes in mucus production in the gut of NOD and NOR mice. Histological sections of small intestine stained by PAS and examined under a light microscope at 100 \times magnification (A). Frequency of goblet cells in small intestines (B). Histological sections of large intestine stained by PAS and examined under a light microscope at 100 \times magnification (C). Frequency of goblet cells in large intestine (D). Histological sections of small intestines and colons from NOD or NOR mice stained by immunohistochemistry for MUC2 (E). Small intestine MUC2 positive cells (F). Quantitative analysis of MUC2 positive cells in colons of NOD and NOR mice (G). Phenotypic characterization of small intestine IELs, (H) frequencies, (I) absolute numbers, and (J) representative plots from TCR $\gamma\delta$ and TCR $\alpha\beta$ IEL. Secretory IgA (SigA) levels from small intestines of NOD and NOR mice at 4–6 and 16–20 weeks of age (K). IgA-bound bacteria recovered from small and large intestines of 4–6-week-old NOD and NOR mice (L) with representative plots from flow cytometry (M). Statistical analysis was performed between groups using Student's *t*-test. **P* < 0.05

protection to diabetes.³⁵ To assess whether this shift was able to restore changes on mucosal barrier function of NOD mice, we performed cross-fostering experiments with newborn pups from NOD mothers and NOR mothers (Fig. 3F). Mucus production in 4-week-old

NOD mice fostered on NOR mothers was examined as a measurement of mucosal barrier function since this is one of the early signs of a defective mucosal barrier in NOD mice. Interestingly, cross-fostering was effective in normalizing the frequency of goblet cells in the small and

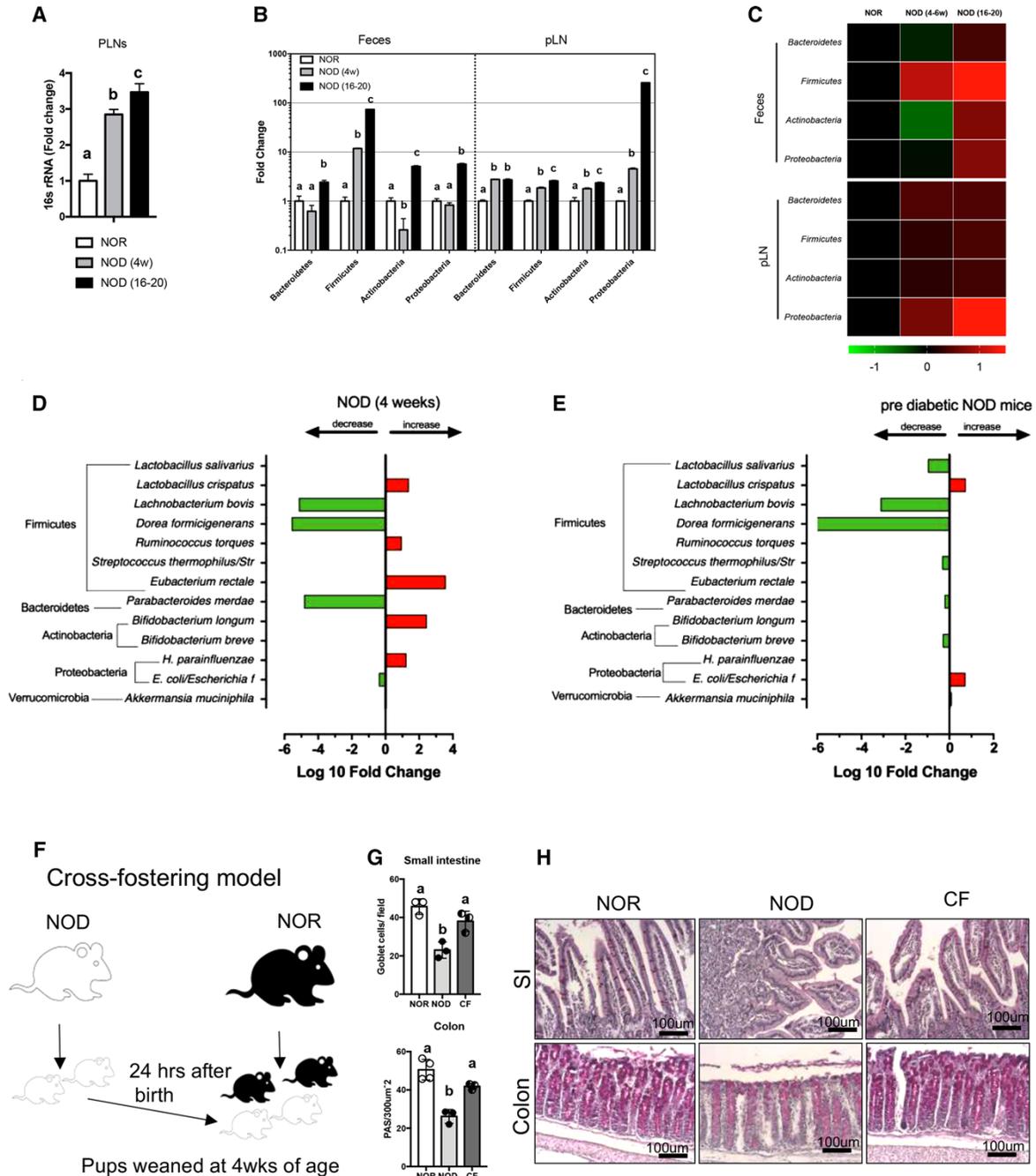


FIGURE 3 Intestinal dysbiosis and bacterial translocation to pancreatic lymph nodes before and during onset of T1D in NOD mice. (A) Bacterial quantification in PLNs from NOD and NOR mice were evaluated by qPCR analysis. (B) Relative abundance of Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, and Actinobacteria on feces and PLNs from NOD and NOR mice at 4- and 16-weeks of age. (C) Heat map representing relative abundance of gut microbiota phyla from feces (top panel) and PLNs (bottom panel). Bacteria species of the gut microbiota by PCR-Array plates (Microbial DNA qPCR Arrays). (D) Relative abundance of bacterial species in 4-week-old NOD mice compared to NOR mice, and (E) Relative abundance of bacterial species in 16-week-old NOD mice to NOR mice ($n = 5$). (F) Cross-fostering experimental design. (G) Frequency of goblet cells in small intestine (top graph), representative area (μm^2) stained by PAS in colons (bottom graph) of NOD, NOR, and NOD cross-fostered mice ($n = 4-5$). (H) Histological sections of small intestines and colons stained by PAS and examined under a light microscope at a 100 \times magnification. Statistical analysis was performed among groups using ANOVA Tukey's posttest. The letters indicate statistical significances. $P < 0.05$

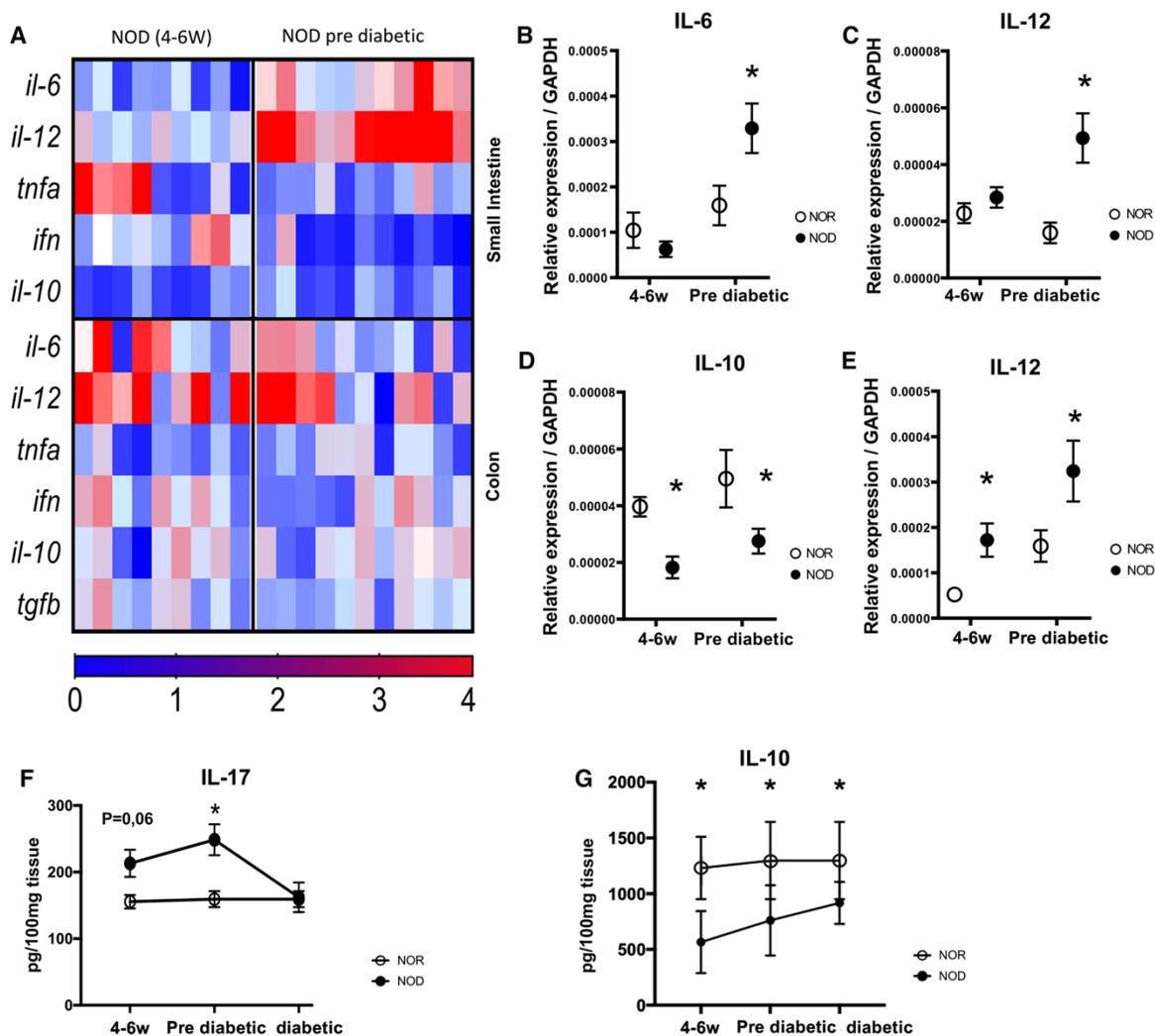


FIGURE 4 Cytokine expression in small intestine and colon of NOD and NOR mice. (A) Heat map of cytokine expression constructed based on mRNA for IL-6, IL-12, TNF- α , INF- γ , and IL-10 extracted from colon (top panel) and small intestine (bottom panel) of NOD and NOR mice ($N = 5-12$). Dark blue represents lowest expression, and dark red highest expression levels relative to values obtained in control NOR mice. Values for each row were normalized. Expression of (B) IL-6, (C) IL-12, and (D) IL-10 mRNA relative to GAPDH expression in small intestines of NOD and NOR mice. (E) Expression of IL-12 relative to GAPDH expression in colon of NOD and NOR mice. Levels of (F) IL-17 and (G) IL-10 in duodenum extracts of 4–6 weeks old and 16–20 weeks old NOD and NOR mice were measured by ELISA. Statistical analysis was performed between groups using Student's t -test. * $P < 0.05$

large intestines of NOD mice (Fig. 3G and H) suggesting that microbiota could be related to barrier alterations observed in the gut mucosa NOD mice.

3.4 | Gut mucosa of NOD mice had a proinflammatory cytokine profile before insulinitis development

To further explore putative alterations in the gut mucosa, we performed qRT-PCR to analyze cytokine expression in the small intestine and colon (Fig. 4A). Expression of both IL-6 and IL-12 was increased

in the small intestines of pre-diabetic NOD mice when compared to NOR mice (Fig. 4B and C). IL-10 expression was decreased in the small intestines of both 4–6-week-old and 16–20-week-old NOD mice (Fig. 4D). In the colons, we found alteration only in IL-12 expression, which was increased in both 4–6-week-old and 16–20-week-old NOD mice (Fig. 4E). IL-17 levels were increased (Fig. 4F), and IL-10 levels were decreased (Fig. 4G) in tissue extracts from the duodenum of prediabetic NOD mice. Therefore, NOD mice had an altered expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in their small and large intestines as early as 4 weeks of age.

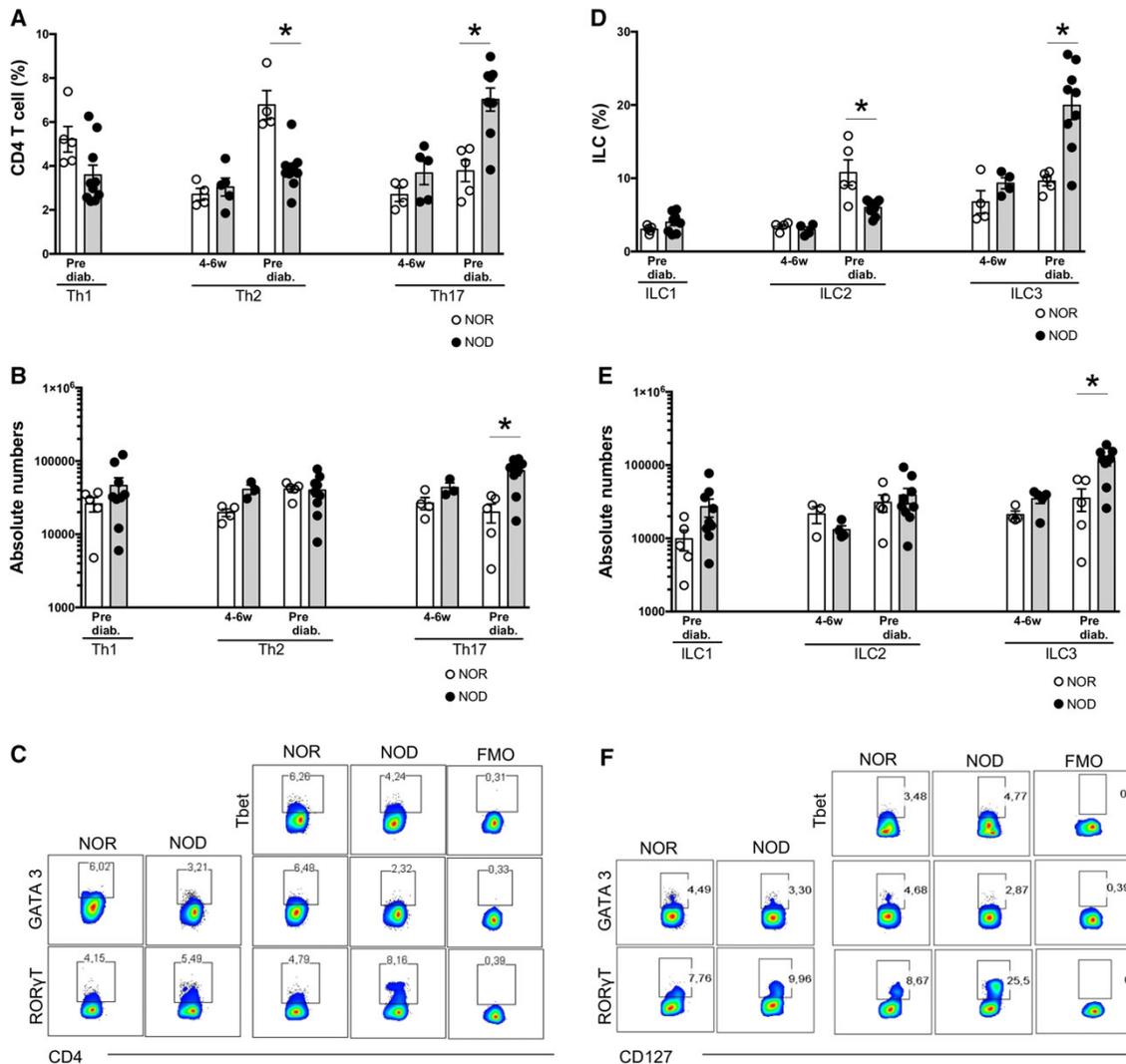


FIGURE 5 Frequency of T cells and ILCs in small intestinal lamina propria (sLP) of NOD and NOR mice. Flow cytometry was used to phenotypical identification of innate lymphoid cell (ILC) and T effector cells (Th) in the small intestine lamina propria (sLP) of NOD and NOR mice. CD4 T cell subsets including Tbet⁺CD4⁺ (Th1) cells, GATA3⁺CD4⁺ (Th2) cells, and RORγT⁺CD4⁺ (Th17) cells (A) frequencies, (B) absolute numbers, and (C) representative plots from NOD and NOR mice. Type 1 innate lymphoid cells (ILC1), type 2 innate lymphoid cells (ILC2), and type 3 innate lymphoid cells (ILC3) (D) frequencies, (E) absolute numbers, and (F) representative plots from NOD and NOR mice. Statistical analysis was performed between groups using Student's *t*-test. **P* < 0.05

3.5 | Alterations in the profile of gut lamina propria cells in NOD was associated with the progression of T1D

All alterations in the intestinal mucosa presented above suggest that NOD mice are deficient in mechanisms to prevent direct contact of Ags with epithelial cells. We next addressed the consequences of this impairment in the lamina propria cells of small intestine, by performing immunophenotyping of lamina propria effector T cells and ILCs from NOD and NOR mice (Supplementary Fig. 1C).

The frequency and absolute numbers of CD4⁺GATA3⁺ cells and CD4⁺RORγT⁺ (Th17) cells were comparable in 4–6-week-old NOD

and NOR mice (Fig. 5A and B). In addition, there was no difference in populations of Tbet⁺CD4⁺ (Th1) cells between prediabetic NOD mice and NOR mice. In contrast, however, the frequency, but not absolute numbers, of CD4⁺GATA3⁺ (Th2) cells were decreased, while frequency and absolute numbers of CD4⁺RORγT⁺ (Th17) cells were increased in prediabetic NOD mice when compared to its control NOR mice (Fig. 5A and B).

Innate lymphoid cells (ILCs) are substantially enriched in mucosal surfaces, they mirror the CD4⁺ T lymphocyte cytokine production, and seem to be particularly important regulators of epithelial barriers in the intestine.^{36,37} There was no difference in the frequencies or absolute numbers of ILC2 and ILC3 (Fig. 5D and E). However, prediabetic

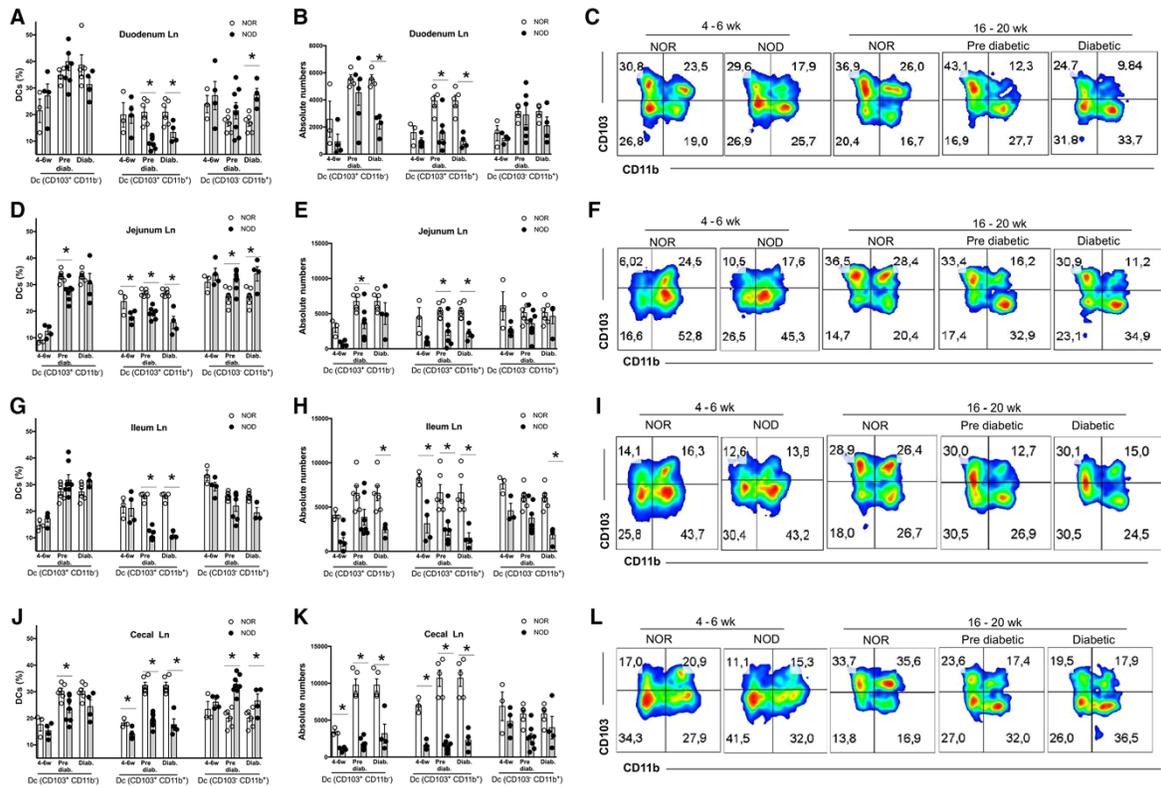


FIGURE 6 Frequencies of subsets of mucosal DCs in distinct mLNs. mLNs draining different intestinal segments were determined anatomically by the tracking of lymphatic vessels connecting colon, ileum, jejunum, and duodenum to their lymph nodes in NOD or NOR mice. Cells were isolated, labeled using appropriate mAbs and analyzed by flow cytometry. Frequencies, absolute numbers, and representative dot plots of dendritic cells (DC) CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺, and CD103⁻CD11b⁺ from duodenum draining lymph node (A–C), jejunum draining lymph node (D–F), ileum draining lymph node (G–I), and cecal draining lymph nodes (J–L). Statistical analysis was performed between groups using Student's *t*-test. **P* < 0,05

NOD mice had a lower frequency of ILC2 and increased frequency and absolute numbers of ILC3 (Fig. 5D and E). There was no difference in the frequencies of ILC1 between prediabetic NOD and control NOR mice (Fig. 5D and E).

Therefore, NOD mice had an imbalance in the frequency of ILCs and Th cells in the intestinal mucosa that was associated with progression of insulinitis.

3.6 | Alterations in frequencies of mucosal DCs were detected in mLNs of NOD mice at early age

Distinct populations of DCs with a unique ability to induce tolerance and inflammation are present in the lamina propria of gut mucosa and mLNs.^{38,39} The local gut lymphatics are linked via afferent lymphatics in the mesentery to the mLNs, which provide a physical route for immune cells that support simultaneously tolerance and protective immune responses through compartmentalization of mLN drainage of the gut segments.⁴⁰ To investigate a putative alteration in mucosal DCs in NOD mice, we examined the major DC populations in the mLNs, that include the 2 major populations of migratory

mucosal DCs CD103⁺CD11b⁻ and CD103⁺CD11b⁺ DCs, as well as CD103⁺CD11b⁻ resident DCs, and CD103⁻CD11b⁺ cells that contain both migratory and resident DC populations, as well as possibly CD11c⁺ inflammatory Mφs derived from the blood monocytes in the mLN, as occurs in models of experimental colitis. The 2 major migratory CD103⁺ DC populations are highly represented in mLNs, and have been shown to generate Tregs in the steady-state.⁴¹ Proportions of CD103⁺CD11b⁻ cells in the duodenum draining lymph nodes were similar between NOD and NOR mice at all ages analyzed (Fig. 6A), but the proportion of this population was decreased in the jejunum and cecum draining lymph nodes of prediabetic NOD mice (Fig. 6D and J). Furthermore, the proportions of CD103⁺ CD11b⁺ cells were drastically decreased in all gut draining lymph nodes of prediabetic and diabetic NOD mice (Fig. 6A, D, G, and J), and reduced in both jejunum and cecum draining lymph nodes of NOD mice already at 4–6 weeks of age (Fig. 6D and J). More important, the absolute numbers of CD103⁺CD11b⁻ DC were reduced in duodenum, jejunum, and ileum draining lymph nodes after the onset of diabetes (Fig. 6B, E, and H), and decreased in cecal lymph node of NOD mice at all ages analyzed (Fig. 6K); and the numbers of CD103⁺ CD11b⁺ cells

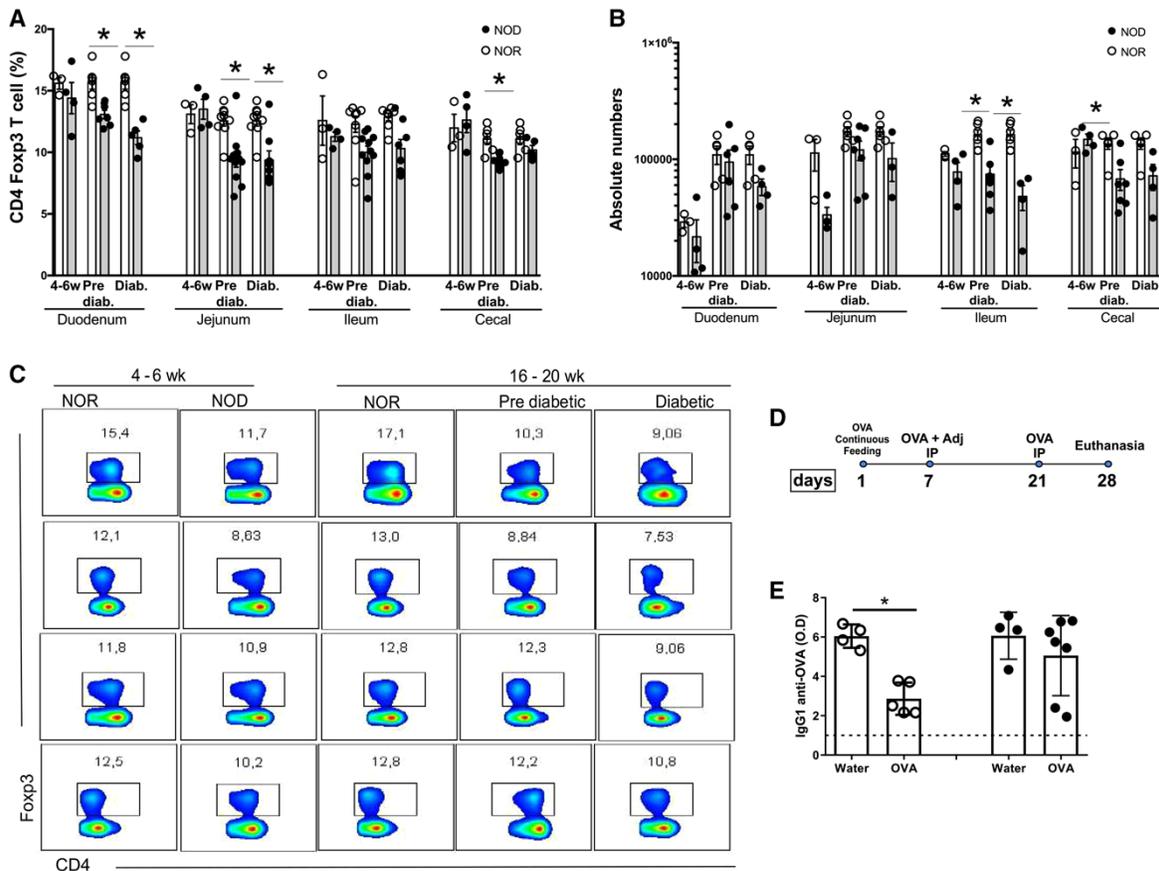


FIGURE 7 Frequencies of regulatory CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells and oral tolerance induction in NOD and NOR mice. After isolation and labeling, frequencies of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells were analyzed by flow cytometry in duodenum, jejunum, ileum, and cecum draining lymph nodes (A) frequencies, (B) absolute numbers, and representative dot plots (C). Experimental design for oral tolerance induction (D). Specific anti-Ova IgG1 in sera of NOD and NOR mice after feeding and immunization with OVA. (E). Statistical analysis was performed between groups using Student's *t*-test or ANOVA and Tukey's posttest. **P* < 0.05

were reduced in duodenum and jejunum draining lymph nodes after diabetes onset in NOD mice (Fig. 6B and E), and in ileal and cecal lymph nodes since early age (Fig. 6H and K). In contrast, the frequency of CD103⁻CD11b⁺ cells were increased in jejunum and cecum draining lymph nodes in prediabetic and diabetic NOD mice (Fig. 6D and J), and in the duodenum draining lymph nodes of diabetic NOD mice (Fig. 6A). There was no difference between NOD and NOR mice in frequency of CD103⁻CD11b⁺ cells in the ileum draining lymph nodes at any age analyzed (Fig. 6G). Furthermore, the absolute numbers of these cells were either unchanged in all mLNs before diabetes onset, or decreased in the ileum draining lymph nodes of diabetic NOD mice (Fig. 6H). Of note, mLNs of NOD mice were smaller and had a reduced number of cells when compared to lymph nodes of NOR mice (data not shown), and this explains why we observed a decreased absolute number of all DC subsets in mLNs of diabetic NOD mice, although the frequencies of CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻ DCs were unchanged or higher. Our results suggest that NOD mice have fundamental alterations in DC populations in compartmentalized lymph nodes that may lead to a loss of gut immune homeostasis since early age.

3.7 | Oral tolerance was abrogated in NOD mice at early age

To further investigate whether gut immune homeostasis was altered in NOD mice, we analyzed the frequency of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in compartmentalized mLNs and also induction of oral tolerance in these mice. Recently it has been demonstrated that generation of Treg cells in the duodenum draining lymph node is important for oral tolerance induction.⁴⁰ We found that frequencies of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells were reduced in duodenum and jejunum draining lymph nodes in prediabetic and diabetic NOD mice and in cecal lymph node of prediabetic mice (Fig. 7A). There was no difference in ileum draining lymph node between NOD and NOR mice at any age analyzed (4–6 weeks of age, prediabetic or diabetic). The number of Treg cells was decreased in ileum and cecum draining lymph nodes after onset of diabetes in NOD mice (Figure 7B). At physiological conditions, the main immune event taking place in the gut mucosa is the establishment of oral tolerance, an important phenomenon known as the key regulator of inflammatory responses against dietary and microbiota Ags.^{13,14} To investigate how

these early alterations in gut components detected in NOD mice would impact in the induction of oral tolerance, we continuously fed NOR and NOD mice ovalbumin (OVA) in the drinking water for 24 h before immunization with the Ag. Continuous feeding has been described as the best protocol for generation of mucosal Tregs and oral tolerance induction^{21,42} (Fig. 7D). As expected, continuous feeding resulted in a strong suppression of specific IgG1 Abs in immunized NOR mice. However, NOD mice failed to modulate immune response to OVA after feeding, shown by the high levels of anti-OVA IgG1 observed in both OVA fed and control NOD mice (Fig. 7E). A similar result was found when we compared oral tolerance induction to OVA in NOD mice and in susceptible BALB/c mice (Supplementary Fig. 1D).

4 | DISCUSSION

In this study, we report that NOD mice presented several alterations in barrier function, microbiota composition, IgA production, and oral tolerance induction since early age and some of the defects detected were aggravated as T1D progresses.

The intestinal mucosa is chronically stimulated by a plethora of external agents, including microbiota, dietary components, environmental noxious substances, and infectious pathogens. The abundant population immune intestinal cells at the gut surface must faithfully develop a protective immune response against pathogens while maintaining tolerance toward innocuous antigens from diet and microbiota.¹² Compartmentalization of mucosal immune responses at distinct mLN's draining different segments of the intestine seem to be an efficient way to achieve this task.⁴⁰ Failure to maintain such equilibrium may lead to deleterious consequences for intestinal and systemic homeostasis. Among the mLN's, the duodenal lymph node has been characterized as the privileged site to where tolerogenic DCs migrated to induce Tregs and oral tolerance.⁴⁰ Interestingly, the duodenal mLN is also identified as pancreatic lymph node suggesting that a lymphatic connection exists between these 2 sites. The pancreas has a unique role in body metabolism through its endocrine and exocrine functions. Since the duodenal/pancreatic lymph node drains the pancreas and the duodenum,^{15,28} it is considered, by some authors, as the gateway where the endocrine self meets the peripheral gut-derived non-self.¹⁵ Considering that pancreatic lymph nodes are able to drain gut Ags absorbed within chylomicrons, alterations in the intestine could function as a trigger for initial inflammation in the pancreas starting T1D development. Indeed, it has been demonstrated that increased intestinal permeability,^{43,44} dietary interventions,⁴⁵ infiltration of $\alpha 4\beta 7$ + gut-derived T cells in the pancreatic islets, and alterations in the intestinal microbiota³³ regulate the development of autoimmune diabetes in animal models. Moreover, transfer of cells from gut-associated lymph nodes of 3-week-old NOD mice has diabetogenic potential,⁴⁶ and blockade of the $\alpha 4\beta 7$ receptor MadCAM1 started at 3 weeks of age dramatically reduced the incidence of diabetes.⁴⁷ Thus, it has been proposed that the initial priming of diabetogenic cells would take place in the gut and the pancreatic lymph nodes might serve as an amplification stage of autoimmunity.

Although these studies indicate a role for the gut-pancreatic axis in the development of spontaneous T1D, a detailed examination of putative defects in the gut mucosa that could be associated with triggering the onset of the disease is still missing. We have identified the hyperglycemia in NOD mice at 12 weeks of age. Nevertheless, a proinflammatory profile with increase in IL-17 levels was detectable in pancreas of NOD mice as early as 4–6 weeks of age. At this time point or earlier, we also identified several abnormalities in the gut mucosa of NOD mice that suggest an impairment in the protective barrier function, a shift toward a local proinflammatory profile of cells and cytokines alterations in microbiota composition, and detectable bacteria translocation to the pLN. These bacteria could explain the production of IL-17 in the pancreas before insulinitis.

One of the main mechanisms protecting the mucosa from infectious and noxious substances is the mucus layer. However, this structure is more than a physical barrier. The most abundant mucin on the intestinal mucus, MUC2, is also able to enhance gut homeostasis and oral tolerance by delivering regulatory signals to intestinal dendritic and epithelial cells. Uptake of MUC2 by Ag-sampling DCs suppresses inflammatory but not tolerogenic DC responses by inhibiting NF- κ B.⁴⁸ We observed that NOD mice presented a deficient production of mucus already at 4–6 weeks of age, and lower numbers of MUC2+ epithelial cells in small and large intestines when they were 16–20 weeks old.

The role of SIgA is complementary to the mucus layer. SIgA limits the penetration of commensal bacteria through the epithelium and plays an important role in shaping the density of different bacterial species in the intestinal lumen. NOD mice transferred with the MyD88^{-/-}-NOD microbiota, a diabetes resistant strain, expressed regulatory immune responses in the gut, with increased production of IgA and TGF- β .⁴⁹ Decreased levels of SIgA in NOD mice were also detected as early as 4–6 weeks of age.

In addition, we showed that prediabetic NOD mice had significantly lower frequencies of IgA coated bacteria in the small intestine. Part of the secretory IgA produced in the gut mucosa is polyreactive and is produced in a T-independent fashion.⁵⁰ It has been suggested that these polyreactive SIgA targets particularly immunogenic or invasive bacteria.^{51,52} In contrast to the findings in the small intestine, IgA bound bacteria were detected at higher frequencies in the colons of NOD mice. However, colonic frequencies of IgA+ bacteria were much lower than the ones found in the small intestine. Since under homeostatic conditions most small intestinal bacteria are IgA+, it is possible that colonic IgA+ bacteria represent small intestinal contaminants rather than local coated microbiota.

As an integral part of the epithelial barrier, IELs are T lymphocytes interspersed in the gut epithelium and their role is preserving the integrity of this barrier as well as preventing pathogen entry and spreading.³¹ They are present as distinct subpopulations depending on the T-cell receptor (TCR) rearrangement they show ($\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$) and on the expression of either homodimeric ($\alpha\alpha$) or heterodimeric ($\alpha\beta$) form of CD8 as well as co-expression of CD4.⁵⁶ The main populations of natural IELs are CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\gamma\delta$ + and CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ + cells. Additionally, circulating mature CD4+ and CD8 $\alpha\beta$ +TCR $\alpha\beta$ + T cells

can acquire IEL features upon migration to the intestine becoming peripheral or induced IELs.³¹ Natural CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ IELs have increased expression of genes that are related to immune regulatory function including TGF- β 3 as well as lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), and homeostasis of this IEL population is influenced by the gut microbiota, as shown in mice lacking the NOD2 pattern recognition receptor that present reduced numbers of these cells.⁵⁷ Interestingly, NOD mice showed reduced frequency of CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ IEL as early as at 4–6 weeks of age suggesting these mice bear an additional defect in the regulatory function of the gut barrier.

Although several studies have indicated that gut microbiota modifications can affect T1D pathogenesis,^{9–11} the mechanism underlying this modulatory effect remains unclear. Wen and co-workers showed progressive changes in oral and fecal microbiota of NOD mice and 8 weeks of age seems to be also a critical window when the composition of gut microbiota is closely associated with disease triggering.⁵³ In the streptozotocin (STZ)-induced diabetes model, translocation of commensal bacteria from the intestinal tract to the PLNs is responsible for the activation of the NOD2 receptor in myeloid cells driving the differentiation of pathogenic Th1 and Th17 cells, which in turn contributes to the pathogenesis of the disease.⁵⁴ In addition, previous studies have shown that the numbers of *Clostridium*, *Bacteroides*, and *Veillonella* are increased in the microbiota of children affected by T1D whereas species known for their anti-inflammatory effect such as *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium rectale*, and *Prevotella* are decreased.⁵⁵

In this study, we showed that NOD mice presented both dysbiosis and bacterial translocation to the PLNs before the onset of diabetes. We observed an increased abundance *Ruminococcus torques* before onset of diabetes while of *Akkermansia muciniphila* after the disease onset. There is competition between these two species and the early presence of *R. torques* on NOD microbiota is associated to increase the diabetes incidence.⁵⁶ *Lactobacillus salivarius* have a wide spectrum of coverage against pathogenic organisms that translocate from the gastrointestinal tract.⁵⁷ We also observed reduction on *Lachnobacterium bovis* before and after the onset of the disease and a switch on the abundance of *Eubacterium rectale* that was increased before and decrease after the onset of disease in NOD mice. These two bacteria are butyrate producers and T1D has been associated to decrease numbers of butyrate producer bacteria on microbiota.⁵⁵ *Dorea formicigenerans*, from Firmicutes phylum, was impressively reduced in the gut microbiota of NOD mice before and after onset of diabetes suggesting a role for this bacterium on T1D, although little is known about the biological function of this species on the gut microbiota.⁵⁸ At the same time, abundance of *Parabacteroides merdae* from *Bacteroidetes* phylum, and of *Escherichia coli/fergusonii* from the Proteobacteria phylum was decreased before disease onset, but *E. coli* abundance was increased in diabetic mice. Interestingly, *Haemophilus parainfluenzae* abundance was increase before T1D onset. It is important to mention that the augment in the number of Proteobacteria have been related to chronic inflammatory diseases.⁵⁹

Interestingly, NOD pups fostered by NOR mothers had the frequency of goblet cells restored suggesting that microbiota composi-

tion could be related to barrier alterations observed in the gut mucosa NOD mice.

The disruption of the intestinal epithelial barrier can lead to infiltration of microbial products and bacteria translocation to the pancreatic lymph nodes contributing to T1D onset in STZ-treated mice.⁵⁴ Bacteria translocation to PLN was also observed in NOD mice as early as 4–6 weeks of age and it was concomitant to several defects in barrier function such as decrease in mucus and SIgA production.

In addition to the defects on barrier function, microbiota composition and to their translocation to the PLNs, NOD mice presented proinflammatory alterations in their gut mucosa as early as 4–6 weeks of age. We detected by qPCR an increase in expression of IL-12 and decrease in IL-10 expression and secretion in tissue extracts of small intestines of these 4–6-week-old NOD mice when compared to NOR mice. Prediabetic NOD mice had a more prominent proinflammatory profile with higher expression of IL-12 in both small and large intestines, increased IL-6 expression in large intestine accompanied by higher levels of IL-17 production. In addition to the proinflammatory cytokine profile, analysis of CD4⁺ T cells subsets and ILCs in small intestine lamina propria of prediabetic NOD mice showed a clear imbalance with increased frequencies of IL-17-producing ROR γ t⁺ T cells and ILC3 whereas frequencies of type-2-cytokine-producing cells such as GATA3⁺ Th2 cells and ILC2 were significantly decreased. Imbalance ILC frequencies or inappropriate activation of these cells in the gut mucosa have associated to the pathogenesis of inflammatory disorders,⁶⁰ to disease onset in diabetic patients,⁶¹ and to high susceptibility to colitis development in mice.⁶² Of note, ILC1 and T-bet⁺ T cells were unaltered in spite of the high expression of IL-12 in the small intestine of these mice suggesting that negative regulators of type 1 immunity such as IL-17-producing cells⁶³ predominated at this site.

It is known that both IL-17 and IFN- γ are linked to pancreatic islet destruction and T1D progression.⁶⁴ Inhibition of Th17 cells by anti-IL-17 mAb neutralization, recombinant IL-25 treatment, or use of Lactobacillaceae-enriched probiotics prevent the development of T1D in NOD mice.^{26,65} In the STZ-induced diabetes model, Th2 immunity has been shown to be protective of insulinitis development.⁶⁶ In concert with these results, levels of IL-17 were increased in pancreatic tissues of NOD mice already at 4–6 weeks of age, much before diabetes onset. Moreover, our data clearly shows that a proinflammatory environment in the gut mucosa precedes insulinitis and hyperglycemia in NOD mice.

One of the most prominent alterations found in NOD mice was the reduction of IL-10. Production of this cytokine was diminished in gut extracts of NOD mice prior and during diabetes development. IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that play a regulatory role in many different pathological scenarios. IL-10 also plays a critical immunoregulatory role in the gut mucosa.⁶⁷ IL-10-deficient mice spontaneously develop colitis,⁶⁸ and IL-10 is known to be involved in oral tolerance induction.^{42,69,70} It is plausible that deficient production of IL-10 in the gut mucosa had an impact in the gut-pancreas axis through alterations in the differentiation and migration of tolerogenic DCs.

As in other lymphoid organs, DCs drive distinct immune responses in the gut. Intestinal α E integrin⁺ (CD103⁺) DCs are able to migrate

to the mLNs and initiate adaptive immune responses.⁷¹ Both lamina propria and mLN-derived DCs, particularly CD103⁺ or DEC205⁺ DCs, produce high amounts of retinoic acid (RA) and TGF- β and efficiently induce peripheral Treg (pTreg) cells and oral tolerance.^{39,72} Among the main CD11c⁺ DC subsets present in the mLNs, resident (CD8 α ⁺CD11b^{low}CD103⁺ and CD8 α ⁻CD11b⁺CD103⁻) and migratory conventional (CD11b⁻CD103⁺, CD11b⁺CD103⁺, CD103-CD11b⁺) DC subpopulations, migratory CD103⁺ DCs are particularly responsible for inducing pTreg cells and participate in tolerance induction, although CD11b⁻ DC subsets provide superior pTreg cell differentiation and inferior proinflammatory signals over the CD11b⁺ subsets.³⁹

We found decreased numbers of CD103⁺CD11b⁻ (cDC1) populations in prediabetic and diabetic, but not 4–6-week-old NOD mice; and importantly, CD103⁺CD11b⁺ (cDC2) were drastically reduced in all mLNs of prediabetic and diabetic NOD mice, as well as in NOD mice before disease onset (at 4–6 weeks of age) in jejunum and colon draining lymph nodes. Therefore, the current data support the hypothesis that NOD mice have a fundamental difference in DC development and/or homeostasis that is present early in life.

APCs (mainly DCs) contribute to autoimmune diabetes by releasing pro-inflammatory mediators, and by driving pathogenic Th17 and Th1 responses.⁷³ Interestingly, targeting Ag to CD103⁺CD11b⁺ cDC2s induce Treg cells in vivo, restore tolerance, and inhibit diabetes development in NOD mice.⁷⁴

Since the gut mucosa is linked to the pancreas via afferent lymphatics, a physical route for trafficking CD11c⁺ Ag-presenting DCs (DCs),⁴⁰ alterations in DC populations at the intestinal mucosa may have a direct impact in the inflammatory events taking place at the pancreatic islets.

In concert with the inflammatory changes found in the gut mucosa and mLNs, frequencies of regulatory CD4⁺Foxp3⁺ T cells were decreased in the duodenum and jejunum draining lymph nodes of prediabetic and diabetic NOD mice. Moreover, NOD mice were refractory to oral tolerance induction as early as 4–6 weeks of age even under a continuous feeding protocol.^{21,42} This defective tolerance induction was not accompanied by reduced frequencies of pTreg cells in duodenal mLNs as expected. Two non-excluding possibilities may explain the observed breakdown in oral tolerance induction in NOD mice. Either gut-induced CD4⁺Foxp3⁺ pTregs are less functional since early age in these mice, or other Tregs, such as TGF- β -producing LAP⁺CD4⁺ T cells⁷⁴ are also defective in these mice.

Other groups have shown suppression of diabetes in NOD mice by the oral tolerance approach, but specific strategies had to be developed to circumvent the fact that tolerance induction by antigen feeding is impaired in these animals. Some studies reported that antigenic peptides,⁷⁶ neonatal administration of insulin via the oral route,⁷⁷ oral CD3-specific mAb treatment,⁷⁸ or repertoire manipulation by backcrossing to other strains of mice⁷⁹ were used to delay onset and reduce incidence of diabetes in these mice.

Our data clearly demonstrated that NOD mice presented several defects in protective and tolerogenic components of the gut mucosa and mLNs prior to the onset of diabetes. Most of all, microbiota

composition as well as critical immune mechanisms of gut homeostasis such as SIgA production, and induction of oral tolerance were impaired at a very early age in these mice. The fact that only 60% of the animals develop T1D at 16 weeks of age in spite of their genetically identical background and similar living conditions (co-housed in a cage) is striking. Our data on intestinal barrier function (mucus, SIgA) are also very homogeneous. However, other relevant parameters that are changed at early age such as microbiota composition and frequencies of DC populations vary considerably among NOD mice. It is plausible that one or more unidentified factors at early stage are generating this variation at later stages of disease development. Since the pancreatic/duodenal lymph nodes provide an anatomical and functional route through which gut antigens and cells can traffic and influence immune responses in the pancreas, it is plausible that inflammatory events initiated at the gut mucosal surfaces can either trigger or aggravate the autoimmune destruction of pancreatic islets during T1D. A better understanding of the inflammatory events that precede disease onset will help to design novel therapeutic strategies for T1D.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Ilda Marçal and Hermes dos Reis for their excellent work at the experimental animal facility. The authors are also thankful to Jacqueline Alvarez-Leite and Leda Quercia Vieira for the laboratory support during the development of this study, to Tácio Augusto Waldetário for helping to create the graphical abstract and to Maria Cecília Campos Canesso for helpful suggestions during the discussion of our results. This study was financially supported by grants from FAPEMIG, CNPq (Brazil) and PRPq-UFMG, Brazil. Some of the authors are recipients of scholarships and fellowships from CAPES (M.C.G.M.) and CNPq (A.M.C.F., D.C.C., T.U.M., and R.P.O.), Brazil. M.C.G.M. and R.P.O. contributed equally to the work.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet*. 2004;364(9446):1699-1700.
- Harjutsalo V, Sjöberg G, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*. 2008;371(9626):1777-1782.
- Evertsen J, Alemzadeh R, Wang X. Increasing incidence of pediatric type 1 diabetes mellitus in Southeastern Wisconsin: relationship with body weight at diagnosis. *PLoS One*. 2009;4(9):1-5.
- Ehehalt S, Dietz K, Willasch AM, Neu A. Epidemiological perspectives on type 1 diabetes in childhood and adolescence in Germany. *Diabetes Care*. 2010;33(2):338-340.
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 1998;55(8):1139-1149.
- Mathis D, Vence L, Benoist C. B-cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001;414(6865):792-798.

7. Tooley JE, Waldron-Lynch F, Herold KC. New and future immunomodulatory therapy in type 1 diabetes. *Trends Mol Med.* 2012;18(3):173-781.
8. Driver JP, Chen YG, Mathews CE. Comparative genetics. Synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2012;9(4):169-187.
9. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature.* 2008;455:1109-1113.
10. Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science.* 2013;339(6123):1084-1088.
11. Alkanani AK, Hara N, Gottlieb PA, et al. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015;64(10):3510-3520.
12. Faria AMC, Reis BS, Mucida D. Tissue adaptation: implications for gut immunity and tolerance. *J Exp Med.* 2017;214(5):1211-1226.
13. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol.* 2017;30:3-11.
14. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):232-239.
15. Turley SJ, Lee JW, Dutton-Swain N, Mathis D, Benoist C. Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(49):17729-17733.
16. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-485.
17. Wicker LS, Clark J, Fraser HI, et al. Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun.* 2005;25:29-33.
18. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Adorini L. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol.* 2003;171(8):4040-4047.
19. Prochazka M, Serreze DV, Frankel WN, Leiter EH. NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes.* 1992;41(1):98-106.
20. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70(1):5.47.1-5.47.20.
21. Oliveira RP, Santiago AF, Ficker SM, Gomes-Santos AC, Faria AMC. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *J Immunol Methods.* 2015;421:36-43.
22. Rocha CS, Gomes-Santos AC, Moreira TG, et al. Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. *PLoS One.* 2014;9:1-8.
23. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunol.* 2006;7(7):681-685.
24. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):501-513.
25. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, et al. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med.* 2008;205:207-218.
26. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2009;58(6):1302-1311.
27. Rothe H, O'Hara Jr RM, Martin S, Kolb H. Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. *Diabetologia.* 1997;40(6):641-646.
28. Van den Broeck W, Derore A, Simoons P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods.* 2006;312:12-19.
29. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(2):G327-G333.
30. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014;260:8-20.
31. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(7):445-456.
32. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313-323.
33. Brown K, Godovanyi A, Ma C, et al. Prolonged antibiotic treatment induces a diabetogenic intestinal microbiome that accelerates diabetes in NOD mice. *ISME J.* 2016;10(2):321-332.
34. Sorini C, Falcone M. Shaping the (auto)immune response in the gut: the role of intestinal immune regulation in the prevention of type 1 diabetes. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013;2(2):156-171.
35. Daft JG, Ptacek T, Kumar R, Morrow C, Lorenz RG. Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. *Microbiome.* 2015;3:17.
36. Klose CSN, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol.* 2016;17:765-774.
37. Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2014;41:354-365.
38. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6C^{hi} monocytes from anti-inflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med.* 2012;209:139-155.
39. Esterházy D, Loschko J, London M, Jove V, Oliveira TY, Mucida D. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T reg cells and tolerance. *Nat Immunol.* 2016;17:545-555.
40. Esterházy D, Canesso MCC, Mesin L, et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature.* 2019;569:126-130.
41. Persson EK, Scott CL, Mowat AM, Agace WW. Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol.* 2013;43:3098-3107.
42. Faria AM, Maron R, Ficker SM, Slavin AJ, Spahn T, Weiner HL. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-B/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 2003;20:135-145.
43. Vaarala O. The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18:241-247.
44. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes.* 2008;57:2555-2562.
45. Landin-Olsson M, Hillman M, Erlanson-Albertsson C. Is type 1 diabetes a food-induced disease. *Med Hypotheses.* 2013;81:338-342.
46. Jaakkola I, Jalkanen S, Hänninen A. Diabetogenic T cells are primed both in pancreatic and gut-associated lymph nodes in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2003;33:3255-3264.
47. Hänninen A, Jaakkola I, Jalkanen S. Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1998;160:6018-6025.
48. Shan M, Gentile M, Yeiser JR, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science.* 2013;342:447-453.
49. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 2004;303:1662-1665. 80-
50. Bunker JJ, Erickson SA, Flynn TM, et al. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science.* 2017;358(6361). pii: eaan6619.
51. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2014;158:1000-1010.

52. Kau AL, Planer JD, Liu J, et al. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci Transl Med*. 2015;7:276ra24.
53. Hu Y, Peng J, Li F, Wong FS, Wen L. Evaluation of different mucosal microbiota leads to gut microbiota-based prediction of type 1 diabetes in NOD mice. *Sci Rep*. 2018;8:1-13.
54. Costa FR, Françoço MC, de Oliveira GG, et al. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. *J Exp Med*. 2016:1223-1239.
55. Knip M, Honkanen J. Modulation of type 1 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Current Diabetes Reports*. 2017;17:1-8.
56. Hänninen A, Toivonen R, Pöysti S, et al. *Akkermansia muciniphila* induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut*. 2018;67(8):1445-1453.
57. Chung PH, Wu YY, Chen PH, Fung CP, Hsu CM, Chen LW. *Lactobacillus salivarius* reverse diabetes-induced intestinal defense impairment in mice through non-defensin protein. *J Nutr Biochem*. 2016;35:48-57.
58. Taras D, Simmering R, Collins MD, Lawson PA, Blaut M. Reclassification of *Eubacterium formicigenerans* Holdeman and Moore 1974 as *Dorea formicigenerans* gen. nov., comb. nov., and description of *Dorea longicatena* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52:423-428.
59. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9351507.
60. Xiong T, Turner JE. Innate lymphoid cells in autoimmunity and chronic inflammatory diseases. *Semin Immunopathol*. 2018;40:393-406.
61. Graves CL, Li J, LaPato M, et al. Intestinal epithelial cell regulation of adaptive immune dysfunction in human type 1 diabetes. *Front Immunol*. 2017;7:1-11.
62. Canesso MCC, Lemos L, Neves TC, et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunol*. 2018;11:820-834.
63. Guedes PMDM, Gutierrez FRS, Maia FL, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2):604-616.
64. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010;185(3):1959-1967.
65. Dolpady J, Sorini C, Di Pietro C, et al. Oral probiotic VSL#3 prevents autoimmune diabetes by modulating microbiota and promoting indoleamine 2,3-dioxygenase-enriched tolerogenic intestinal environment. *J Diabetes Res*. 2016;2016:7569431.
66. Carlos D, Yaochite JN, Rocha FA, et al. Mast cells control insulinitis and increase Treg cells to confer protection against STZ-induced type 1 diabetes in mice. *Eur J Immunol*. 2015;45:2873-2885.
67. Kole A, Maloy KJ. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. In: Fillatreau S, O'Garra A, eds. *Interleukin-10 in Health and Disease*. Berlin, Germany: Springer; 2014:19-38.
68. Gomes-Santos AC, Moreira TG, Castro-Junior AB, et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:560817.
69. Slavin AJ, Maron R, Weiner HL. Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Int Immunol*. 2001;13(6):825-833.
70. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1923-1933.
71. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009;206(13):3101-3114.
72. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(8):1757-1764.
73. Badami E, Sorini C, Coccia M, et al. Defective differentiation of regulatory Foxp3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:2120-2124.
74. Price JD, Hotta-Iwamura C, Zhao Y, Beauchamp NM, Tarbell KV. DCIR2+cDC2 DCs and Zbtb32 restore CD4+T-cell tolerance and inhibit diabetes. *Diabetes*. 2015;64(10):3521-3531.
75. Oida T, Weiner HL. TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One*. 2010;5(11):5-12.
76. Gong Z, Pan L, Le Y, et al. Glutamic acid decarboxylase epitope protects against autoimmune diabetes through activation of Th2 immune response and induction of possible regulatory mechanism. *Vaccine*. 2010;28(24):4052-4058.
77. Maron R, Guerau-de-Arellano M, Zhang X, Weiner HL. Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun*. 2001;16(1):21-28.
78. Kuhn C, Rezende RM, da Cunha AP, et al. Mucosal administration of CD3-specific monoclonal antibody inhibits diabetes in NOD mice and in a preclinical mouse model transgenic for the CD3 epsilon chain. *J Autoimmun*. 2017;76:115-122.
79. Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, et al. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Ab Dq8 transgenic mice. *J Immunol*. 2009;183(4):2390-2396.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Miranda MCG, Oliveira RP, Torres L, et al. Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol*. 2019;106:513-529. <https://doi.org/10.1002/JLB.3HI0119-024RR>