

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA**

**Rafael Pires de Oliveira**

**HSP65 e imunorregulação na mucosa intestinal  
em modelo experimental de diabetes tipo 1**

**Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria**

**Belo Horizonte  
2014**

**Rafael Pires de Oliveira**

**HSP65 e imunorregulação na mucosa intestinal  
em modelo experimental de diabetes tipo 1**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Belo Horizonte

2014



# Agradecimentos

Aos meus pais, Ronald e Édila, por todos os ensinamentos, pelo apoio, amor e carinho e pela dedicação total a nossa família.

Aos meus amados irmãos, Lud e Felipe, pelo companheirismo.

À minha linda Lorena, pela doçura e por me fazer feliz, amado e completo.

À Ana, pela confiança, pela maneira sábia e aplicada de conduzir a pesquisa, e por ser extraordinária professora e orientadora. Obrigado pelo empenho e exemplo.

Ao André, pelo seu alto-astral e pelos seus valiosos ensinamentos científicos e de generosidade.

A todos os companheiros do LIB, por tantos momentos de trabalho, aprendizado e descontração juntos. Obrigado Thaís e Mauro por serem amigos tão prestativos e responsáveis. Agradeço ao Rafael e à Ana Cristina, pelo companheirismo e grande exemplo de pesquisadores. Obrigado Flávia e Natália, por serem dedicadas e terem contribuído tanto com o trabalho no laboratório.

Ao Brian Kelsall, pela excelente oportunidade de trabalhar no seu laboratório no NIH, por sua cordialidade e por compartilhar comigo seu vasto conhecimento.

Aos Professores Thomaz, Nelson e Claudia, por sempre motivarem tão interessantes questionamentos sobre a ciência.

À Ildinha, por sua dedicação e seu sorriso sincero de todos os dias. Obrigado também Hermes, por sua eficiência no trabalho do biotério.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia por contribuíram para a minha formação e estão empenhados em manter a qualidade da nossa Pós-Graduação.

A todos os membros do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pela prestatividade e pelo convívio amigável.

Aos velhos amigos da Biologia, por me darem mais um bom motivo para vir todos os dias ao ICB.

Às agências financiadoras de pesquisa CAPES e CNPq que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

À UFMG, que me fez sentir em casa durante esses vários anos de estudo. Obrigado, professores, funcionários e alunos que fazem parte desta adorável comunidade.

À vida, em todas as suas formas, por me trazer fascínio, curiosidade e entusiasmo.

À Ciência, por me fazer acreditar na evolução da humanidade.

E finalmente, a Deus, por proporcionar tantos motivos de sublime felicidade em minha vida.

# Sumário

<b>Lista de figuras</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	IV
<b>Abstract</b> .....	VI
<b>Introdução</b> .....	8
1. Tolerância imunológica.....	8
1.1 <i>Células T reguladoras</i> .....	9
2. Tecido linfoide associado à mucosa e a tolerância oral.....	13
2.1 <i>Mecanismos e fatores envolvidos na tolerância oral</i> .....	15
2.2 <i>Efeitos indiretos da tolerância oral e sua aplicação</i> .....	17
3. Células apresentadoras de antígeno na mucosa intestinal.....	18
3.1 <i>Macrófagos residentes na mucosa intestinal</i> .....	18
3.2 <i>Células dendríticas na mucosa intestinal</i> .....	20
4. Proteínas de Choque térmico (HSPs).....	22
4.1 <i>Lactococcus lactis produtores de Hsp65</i> .....	23
5. Autoimunidade e imunorregulação.....	25
6. Diabetes Mellitus.....	26
6.1 <i>O modelo experimental de diabetes tipo 1</i> .....	27
6.2 <i>Componente genético e patogênese da diabetes tipo 1</i> .....	28
6.3 <i>Tratamento disponível e novas perspectivas</i> .....	31
6.4 <i>Dieta, microbiota e células apresentadoras de antígeno na diabetes tipo 1</i> .....	32
6.5 <i>Desenvolvimento e função neuroendócrina na diabetes tipo 1</i> .....	34
<b>Justificativa</b> .....	37
<b>Objetivos</b> .....	39

<b>Metodologia.....</b>	<b>41</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>55</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>83</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>96</b>
<b>Pesrspectivas.....</b>	<b>98</b>
<b>Referências.....</b>	<b>100</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>116</b>

*Anexo 1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em experimentação animal  
(CETEA-UFMG)*

# Lista de Figuras

<b>FIGURA 1</b> – Vetor de expressão de <i>Hsp65</i> .....	42
<b>FIGURA 2</b> – Protocolos de tratamento de camundongos NOD com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	44
<b>FIGURA 3</b> – Estratégias de determinação das populações de interesse por citometria de fluxo.....	49
<b>FIGURA 4</b> – Sobrenadante de LL-Hsp65 induz a expressão de NF-kB via TLR2 e TLR4 <i>in vitro</i> .....	55
<b>FIGURA 5</b> – Frequência de células Tregs após tratamento com LL-HSP65 em camundongos C57BL/6.....	56
<b>FIGURA 6</b> – Frequência de células Tregs após tratamento com LL-HSP65 em camundongos C57BL/6 TLR2 <sup>-/-</sup> .....	57
<b>FIGURA 7</b> – Frequência de células T $\gamma\delta$ expressando LAP no baço, linfonodos, lâmina própria do intestino e placas de Peyer do intestino de camundongos C57BL/6.....	58
<b>FIGURA 8</b> – Sobrevivência de camundongos C57BL/6 após desafio com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	59
<b>FIGURA 9</b> – Perda de peso após infecção com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	59
<b>FIGURA 10</b> – Índice inflamatório intestinal sete dias após desafio com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	60
<b>FIGURA 11</b> – Resposta humoral sete dias após desafio com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	61
<b>FIGURA 12</b> – Frequência de células Tregs após tratamento com LL-HSP65 em camundongos NOD.....	62

<b>FIGURA 13</b> – Glicemia após a injeção de ciclofosfamida em camundongos NOD tratados com LL-HSP65.....	63
<b>FIGURA 14</b> – Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com um ciclo de LL-HSP65.....	63
<b>FIGURA 15</b> – Produção de citocinas após estímulo <i>in vitro</i> de esplenócitos de camundongos NOD tratados com LL-HSP65.....	64
<b>FIGURA 16</b> – Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com três ciclos de LL-HSP65.....	64
<b>FIGURA 17</b> – Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com LL-IL-10 + LL-HSP65.....	65
<b>FIGURA 18</b> – Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD.....	66
<b>FIGURA 19</b> – Avaliação da capacidade de indução de Tregs por DCs de camundongos NOD.....	68
<b>FIGURA 20</b> – Frequência de DCs CD11b <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> obtidas durante a separação celular ( <i>cell sorting</i> ) nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOR e NOD.....	69
<b>FIGURA 21</b> – Avaliação da permeabilidade intestinal em camundongos NOD.....	70
<b>FIGURA 22</b> – Contagem total de células extraídas em camundongos NOD e NOR.....	70
<b>FIGURA 23</b> – Frequência de células Treg, Th1 e Th17 nos linfonodos e lâmina própria do intestino em camundongos NOD e NOR.....	72
<b>FIGURA 24</b> – Número absoluto de células Th17 em camundongos NOD e NOR nos linfonodos e lâmina própria do intestino em camundongos NOD e NOR.....	73
<b>FIGURA 25</b> – Número absoluto de células Th1 na lâmina própria do intestino delgado em camundongos NOD e NOR.....	74
<b>FIGURA 26</b> – Proporção entre células Treg e Th17 nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos e na lâmina própria do intestino de camundongos NOR e NOD.....	75

<b>FIGURA 27</b> – Populações de macrófagos e células dendríticas determinadas através de citometria de fluxo utilizando-se marcadores F4/80, CD11c, CD11b e CD103.....	76
<b>FIGURA 28</b> – Quadro esquemático com características das células apresentadoras de antígeno da lâmina própria de camundongos.....	77
<b>FIGURA 29</b> – Proporção entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) na lâmina própria do intestino de camundongos NOR e NOD pré-diabéticos.....	78
<b>FIGURA 30</b> – Proporção entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos de camundongos NOR e NOD diabéticos.....	79
<b>FIGURA 31</b> – Quantificação da expressão de citocinas no intestino de camundongos NOD e NOR.....	80

# Resumo

A administração oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 tem se mostrado, em trabalhos anteriores do nosso grupo, uma estratégia muito eficaz na prevenção de modelos experimentais de doenças inflamatórias crônicas como a colite ulcerativa e a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Esse tratamento foi capaz de induzir tolerância oral à proteína de choque térmico Hsp65, geralmente expressa em tecidos inflamados, gerando células T reguladoras no intestino que interferem na patogênese dessas doenças. Verificamos, neste estudo, que o tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 levou a uma expansão de células T reguladoras CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+ de maneira dependente do receptor do tipo toll-2 (TLR2). Também observamos que os efeitos imunorreguladores do *L.lactis*-Hsp65 ocorreram sem prejuízo à imunidade anti-infecciosa em camundongos C57BL/6. Camundongos tratados com *L.lactis*-Hsp65 conseguiram manter a resposta imune anti-infecciosa na infecção por *Salmonella thyphimurim*. Além disto, ocorreu uma melhora da inflamação intestinal associada a essa infecção sugerindo que o tratamento com o *L.lactis*-Hsp65 potencializou os mecanismos imunorreguladores presentes na mucosa intestinal. Observamos que células T  $\gamma\delta$ , principalmente nas placas Peyer, expressam TGF- $\beta$  de superfície (associado ao peptídeo LAP), o que pode se constituir em outro importante mecanismo de regulação na mucosa intestinal. Embora o tratamento com *L.lactis*-Hsp65 tenha sido bem sucedido nos modelos experimentais de colite e EAE, ele não teve efeito benéfico no desenvolvimento da diabetes espontânea em camundongos NOD mesmo quando associado ao *L. lactis* produtor de IL-10. Nossa hipótese para explicar essa falha foi que a suscetibilidade à diabetes tipo 1 nesses animais envolve defeitos não somente na geração de células T reguladoras autorreativas na timo, mas também alterações importantes nos elementos imunorreguladores da mucosa intestinal. De fato, observamos que não foi possível induzir tolerância oral a ovalbumina em camundongos NOD utilizando a ingestão contínua de antígeno, regime ótimo de indução de tolerância pela via oral. Além disto, demonstramos que o desenvolvimento da patogênese da diabetes nesses animais está associado a uma redução de fatores de regulação da mucosa e desequilíbrio entre células T efectoras e reguladoras no intestino, com resposta Th17 aumentada e predominância de células apresentadoras de antígeno com perfil inflamatório. Já é amplamente reconhecido que tolerância em nível sistêmico pode ser alcançada pela exposição de antígenos pela mucosa, significando que a atividade imunológica no intestino pode afetar o funcionamento global do sistema imune,

mesmo em órgãos não diretamente relacionados. Se o pâncreas e o intestino são imunologicamente conectados através dos linfonodos pancreáticos, não causa espanto que a perda ou redução de fatores de regulação na mucosa possam contribuir para os eventos patogênicos da diabetes autoimune. Entender os fatores e mecanismos que contribuem para o funcionamento das atividades imunológicas no intestino assim como as perturbações nessas atividades é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas via mucosa que sejam seguras e bem sucedidas.

## Abstract

In previous studies by our group, we have shown that oral administration of Hsp65-producing *Lactococcus lactis* is a successful strategy to prevent the development of chronic inflammatory disease models such as ulcerative colitis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). This treatment was able to induce oral tolerance to Hsp65, a protein usually expressed in inflamed tissues, generating regulatory T cells that interfere in the pathogenesis of these diseases. Herein, we show that oral treatment with Hsp65-producing *Lactococcus lactis* triggers an expansion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells in a toll-like-receptor-2(TLR2)-dependent fashion, without disturbing the immunity to pathogens in C57BL/6 mice. Mice treated with *L. Lactis*-Hsp65 were able to maintain the protective immune response during *Salmonella typhimurium* infection. Moreover, there was a reduction in the intestinal inflammatory reaction suggesting that the treatment boosted the Immunoregulatory axis of gut mucosa. We also observed that  $\gamma\delta$  T cells in Peyer's patches express membrane TGF- $\beta$  (associated with the peptide LAP), which may represent another important mechanism for gut immune regulation. Although treatment with *L.lactis*-Hsp65 has been very successful in experimental models of colitis and EAE, it showed no beneficial effect in the spontaneous diabetes in NOD mice even when associated with the administration of IL-10 producing *L.lactis*. Our hypothesis to explain these results was that NOD mice present defects on Immunoregulatory elements at the gut mucosa. Indeed, oral tolerance to ovalbumin could not be induced in this strain of mice even when a continuous regimen of feeding was used. In addition, we also found a link between diabetes development and a reduction in several gut regulatory elements. NOD mice showed imbalance between effector and regulatory T cells in the intestine, with increased Th17 response as well as a predominance of inflammatory antigen-presenting cells. It is widely recognized that systemic tolerance can be achieved by antigenic stimulus in the gut meaning that the immune activity in the intestine can affect the overall activity of the immune system, even in unrelated organs. If there is an immunological link between the pancreas and the intestine through the pancreatic lymph nodes, it is not surprising that the loss or reduction of regulatory components in the gut mucosa may contribute to the pathogenic events in autoimmune diabetes. Given the relevance of mucosal immune activity to the organism, it is important to understand the factors and mechanisms that contribute to its balanced function as well as the disturbances that may alter this balance in order to develop safe and successful mucosal strategies for immunomodulatory therapies.

# Introdução



## Introdução

### 1. Tolerância imunológica

A concepção de que o sistema imune deve ser capaz de responder aos antígenos exógenos e aceitar os antígenos próprios do organismo é um dos conceitos-chave da Imunologia. Essa capacidade de aceitar o próprio faz parte da definição de tolerância imunológica. Porém, ao confrontarmos as teorias fundadoras desse conceito e os últimos achados da ciência percebemos que esclarecer e explorar os mecanismos responsáveis pela aquisição e manutenção dessa capacidade auto-instrutiva ainda constitui um dos grandes desafios da Imunologia.

O conceito clássico de tolerância imunológica se origina de estudos com transplantes de pele nas pessoas que sofreram graves queimaduras na Segunda Guerra Mundial. Nessa época, Medawar comprovou a existência de genes de histocompatibilidade (Medawar, 1944). Nos anos subsequentes, novos estudos mostraram que camundongos que recebiam misturas de células de outra linhagem durante o período embrionário tornavam-se tolerantes a enxertos de pele de animais dessa mesma linhagem (Billingham et al., 1953). Posteriormente, foi demonstrado que camundongos antes tolerantes rejeitavam o enxerto alguns dias após a transfusão de linfócitos de doadores que haviam rejeitado um enxerto idêntico. Concluiu-se, portanto, que a tolerância se devia especificamente à ausência de linfócitos capazes de rejeitar o transplante (Billingham et al., 1955).

Baseando-se nesses dados, nos estudos sobre quimerismo de células hematopoiéticas em bovinos (Owen, 1945) e sobre transferência adotiva de competência imunológica com linfócitos (Gowans, 1959), Burnet elaborou o conceito de tolerância imunológica presente na Teoria da Seleção Clonal (Burnet, 1959) que ainda hoje é tida por muitos como base central da Imunologia. A proposta foi que a autotolerância se estabelecia graças à eliminação de linfócitos reativos aos antígenos próprios durante o desenvolvimento embrionário e neonatal. Após essa etapa de controle, restariam apenas linfócitos reativos a antígenos estranhos e esses seriam capazes de proliferar e gerar respostas imunes após o estímulo específico. Entretanto, avanços metodológicos e novos achados experimentais mostraram que somente essa explicação não seria suficiente para que o sistema imune não destruísse o próprio organismo.

Em concordância com a Teoria de Burnet, durante o processo de maturação linfocitária no timo, ocorre uma intensa morte de células com eliminação de linfócitos T com alta avides por antígenos próprios. Entretanto, a eliminação completa da autorreatividade constitui uma

explicação certamente incompleta e questionável. A eliminação dos clones autorreativos pode ser parcialmente explicada graças à expressão do gene AIRE no timo (autoimmune regulator), que possibilita a expressão antigênica ectópica de diversos auto-antígenos por células tímicas especializadas (APECED consortium 1997; Mathis e Benoist, 2009). Porém, o sistema imune deve tolerar o repertório completo de auto-antígenos e nem todos estão presentes no timo para serem apresentados aos linfócitos em desenvolvimento. Sabe-se que para que um timócito se torne um linfócito T maduro é necessário que o seu receptor TCR se ligue a um complexo peptídeo-MHC com avidéz suficiente para promover a sinalização e a passagem para etapas posteriores do processo de diferenciação celular. Esse sinal, no contexto do timo, leva a célula à sobrevivência caso ele seja de avidéz intermediária, possibilitando a seleção positiva do linfócito. Portanto, somente os linfócitos T com algum grau de reatividade com o MHC próprio são selecionados no timo (Modigliani et al., 1996; Faria, 2008). Além disso, estudos em humanos saudáveis demonstraram que anticorpos e linfócitos T autorreativos para vários auto-antígenos são comumente encontrados e normalmente isso não determina o desenvolvimento de doenças autoimunes (Dighiero et al., 1982; Dighiero et al., 1985; Hooijkaas et al., 1984). Ainda, animais tolerantes, portadores de um transplante de pele, possuem muitos linfócitos autorreativos ativados (Bandeira et al., 1989) e portanto, tais linfócitos não são eliminados, como originalmente proposto. A ideia de que a tolerância a antígenos externos só pode ser induzida em animais imunologicamente imaturos também é refutada pela constatação de que animais adultos se tornam tolerantes a antígenos presentes na dieta, fenômeno este conhecido como tolerância oral (Hanson et al., 1977). A tolerância na idade adulta ainda é observada normalmente durante a gravidez vivípara quando a mãe não rejeita o feto semi-alogênico (Gobert e Lafaille, 2012).

Portanto, para que a autoimunidade patológica não se desenvolva, além da seleção negativa no timo, outros mecanismos de controle são essenciais. A compreensão dessas vias imunorreguladoras é imprescindível para possíveis intervenções que visem restaurar a atividade equilibrada do sistema imune.

### **1.1 Células T reguladoras**

A partir dos anos 70, vários autores demonstraram que a manutenção da tolerância aos auto-componentes era dependente de mecanismos ativos e periféricos. Utilizando a transferência adotiva de células de um animal tolerante para animais virgens, Gershon demonstrou a existência de linfócitos capazes de inibir a atividade de outras células e cunhou

o termo célula T supressora (Gershon et al., 1972). Na década de 90, uma nova onda de pesquisas permitiu uma melhor caracterização de células com capacidade supressora - então rebatizadas de T reguladoras (Treg) - e resgatou a supressão ativa como mecanismo primordial de tolerância imunológica.

A redescoberta das células reguladoras foi possível graças a importantes estudos envolvendo a timectomia neonatal. Sabia-se que, em camundongos, a timectomia antes do terceiro dia de vida levava à imunodeficiência, enquanto que a remoção entre o terceiro e sexto dias causava patologia autoimune (Nishizuka et al., 1973). Em 1995, Bonomo e colaboradores mostraram que a timectomia aos 3 dias de nascimento resultava no desenvolvimento de gastrite autoimune e no aparecimento concomitante de uma população de linfócitos duplo positivos ( $CD4^+CD8^+$ ) com fenótipo ativado na periferia e uma frequência baixa de linfócitos T expressando CD69 e a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) (Bonomo et al., 1994). Em experimentos com camundongos *nude*, esses autores também mostraram que o implante de timos adultos contendo células apresentadoras de antígenos (APCs) era capaz de reverter a doença autoimune sugerindo que a seleção tímica de linfócitos por APCs competentes determinava a tolerância imunológica a antígenos próprios (Bonomo et al., 1995). Essa janela temporal imunológica foi posteriormente brilhantemente estudada pelo grupo de Sakaguchi que demonstrou que a emergência de doenças autoimunes após a timectomia neonatal resultava da eliminação de uma subpopulação de células T que surgiriam nessa fase do desenvolvimento. Essas células T reguladoras foram, portanto, descritas como essenciais na tolerância imunológica aos auto-componentes e caracterizadas como linfócitos T  $CD4^+$  que expressam a cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) (Sakaguchi et al., 1995). A presença de moléculas como o receptor de glicocorticoide induzido por TNF (GITR), CTLA-4 e do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3) foi definida posteriormente como característica das Tregs (Hori et al., 2003).

Nos últimos anos, o conhecimento sobre as Tregs evoluiu enormemente e a atividade dessas células é o centro da atenção de boa parte dos pesquisadores em diversas áreas da Imunologia. Vários trabalhos têm demonstrado que as células Treg estão envolvidas na regulação da reatividade aos auto-componentes e no controle de doenças autoimunes, alérgicas e inflamatórias tanto em animais experimentais como em humanos. Elas também têm sido demonstradas na imuno-modulação de respostas imunes a patógenos e tumores (Nomura e Sakaguchi, 2005; Sakaguchi, 2005).

Alguns mecanismos de supressão exercidos pelas células Treg já estão elucidados, principalmente em estudos *in vitro*, mas o tema ainda é foco de intenso debate e pesquisa. De forma geral, podemos descrever que as Tregs agem inibindo outras células T diretamente ou indiretamente através das APCs.

As Tregs possuem alta expressão da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), e assim competem e sequestram essa citocina que é um importante fator para a sobrevivência do linfócito T, impedindo, portanto, a proliferação de outros linfócitos (Thornton et al., 2004). Além disso, as Treg produzem quimiocinas que atraem outras células T para sua proximidade, facilitando a sua ação supressora direta. Os efeitos supressivos das células Treg podem também envolver a indução de morte celular nas células alvo pela liberação de granzima e perforina (Cao et al., 2007). As Treg podem ainda atuar por meio de TGF- $\beta$  presente na membrana (Nakamura et al., 2001) ou de citocinas imunorreguladoras (IL-10 e TGF-beta) secretadas.

A expressão constitutiva de CTLA-4, molécula homóloga ao CD28 e que se liga ao CD80 e CD86 das APCs, é outra característica das Tregs (Takahashi et al., 2000). O contato por essa via exerce um efeito inibidor na APC, através da transdução de sinais negativos ou ainda através de trocicitose, processo em que as moléculas de superfície das APCs são extraídas e degradadas pela Treg durante a sinapse imunológica (Qureshi, 2011). Foi observada uma diminuição da expressão de moléculas de MHC de classe II nas células dendríticas, além das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, quando em contato com células de propriedades supressoras (Vendetti et al., 2000). Portanto, a inibição da capacidade funcional das APCs é uma das formas das Tregs de impedir a ativação de outras células T. Outra possibilidade que envolve as células apresentadoras é a co-apresentação de diferentes peptídeos pela mesma APC para Tregs e linfócitos T virgens, o que, juntamente com a produção de citocinas anti-inflamatórias, leva a inibição de linfócitos convencionais ou até mesmo a sua diferenciação em novas células reguladoras (Taams et al. 2000; Cederbom et al. 2000).

De fato, além das células que emergem do timo como Treg e são denominadas T reguladoras naturais (nTreg), tem sido descrita a aquisição de capacidade supressora por linfócitos nos órgãos linfoides periféricos (Bluestone e Abbas, 2003). Essas células são induzidas ao longo da vida pelo contato com antígenos externos por vias tolerogênicas ou em eventos inflamatórios crônicos e estão claramente envolvidas na assimilação fisiológica de novos antígenos e também na resolução ou controle de respostas inflamatórias. Tais

populações de células reguladoras medeiam sua atividade por citocinas anti-inflamatórias secretadas ou expressas na superfície (TGF- $\beta$ /LAP) e são conhecidas como células reguladoras induzidas (iTreg). As citocinas secretadas IL-10 e TGF- $\beta$  têm uma ação supressora importante sobre a atividade de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. Assim, elas podem inibir a ação de outras células T e também de células não linfoides que participam da atividade imunológica. A avaliação do transcriptoma e a caracterização molecular e funcional mostra certo grau de similaridade entre as Treg induzidas e as células Treg naturais, mas o tema ainda é amplamente debatido na literatura (Bilate e Lafaille, ; Feuerer et al.). Alguns experimentos demonstram a indução de células iTreg *in vivo* e *in vitro* e fatores como o TGF- $\beta$ , ácido retinóico e anti-CD3 podem atuar na conversão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> em CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com capacidade reguladora pela indução do fator de transcrição FoxP3. Recentemente, o grupo de Lafaille demonstrou que a geração de células reguladoras na periferia é suficiente para o controle da autoimunidade patológica. A partir de estudos inovadores, esse grupo busca identificar moléculas capazes de diferenciar as nTreg das iTreg e assim melhor compreender a participação desses subtipos celulares em diversos eventos imunológicos (Weiss et al., 2012).

Dentre as iTregs, podemos destacar as que expressam TGF- $\beta$  na superfície (CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>), estão presentes em camundongos saudáveis e podem ser expandidas após estimulação pela via mucosa. O LAP (*latency associated peptide*) é um propeptídeo que está associado ao domínio amino terminal do TGF- $\beta$ , formando um complexo latente dessa citocina. Quando essa forma precursora é liberada da célula, ela é clivada pela enzima trombospondina 1 e o TGF- $\beta$  ativo é liberado. Esses linfócitos T LAP<sup>+</sup> foram descritos há alguns anos como moduladores da atividade de células T inflamatórias em modelos experimentais de colite e autoimunidade (Nakamura et al., 2001; Ochi et al., 2006; Oida et al., 2003). Em um recente trabalho publicado pelo nosso grupo, mostramos a importância das células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, induzidas pela administração oral do antígeno HSP65, no controle da encefalomielite autoimune experimental, um modelo murino de esclerose múltipla (Rezende et al., 2012).

A geração e participação das iTreg, mas não das nTreg, no fenômeno da tolerância oral foi experimentalmente demonstrado pelo grupo de Juan Lafaille, trazendo novo impulso para exploração desse efeito que representa a consequência mais comum do contato com antígenos da dieta e da microbiota intestinal e constitui uma promissora abordagem para intervenções imunorreguladoras (Mucida et al., 2005; Curotto de Lafaille et al., 2008).

## 2. O tecido linfoide associado à mucosa e a tolerância oral

As superfícies mucosas do organismo recobrem uma área cem vezes maior do que a área da pele e somente no intestino delgado há uma superfície de aproximadamente 300m<sup>2</sup> em humanos (Moog, 1981). Além disso, diferentemente da pele, que é coberta por queratina e um epitélio estratificado, a superfície do intestino é composta de uma única camada de células epiteliais com propriedades absorptivas. Portanto, as mucosas são o principal sítio de estímulo antigênico exógeno do organismo, e não é surpreendente que estejam associadas a um extenso, complexo e diferenciado tecido denominado de tecido linfoide associado à mucosa (MALT). O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) é o componente mais bem estudado do MALT e constitui-se de uma extensa e complexa rede de células e folículos linfoides distribuídas ao longo do intestino em organizações estruturais como as placas de Peyer e a lâmina própria e tem sido o principal foco do nosso grupo de pesquisa. Existem cerca de 10<sup>10</sup> células linfoides por metro no intestino delgado humano (Mestecky, 1987). Além disso, a mucosa intestinal abriga, em condições fisiológicas, a maior parte das células secretoras de imunoglobulinas do organismo, tanto em humanos como em camundongos (Brandtzaeg et al., 1989; van der Heijden et al., 1987). A mucosa intestinal está constantemente exposta a uma grande variedade de materiais antigênicos sendo estimulada por aproximadamente 130 a 190 gramas de proteínas alimentares absorvidas diariamente no intestino (Brandtzaeg et al., 1998) e que são importantes para a maturação imunológica. Animais adultos mantidos sob dieta balanceada contendo apenas aminoácidos livres (substituindo as proteínas inteiras) desde o desmame apresentam perfil imune semelhante ao de neonatos, apresentando níveis mais baixos de IgG e IgA séricas e atrofia de órgãos e tecidos linfoides, principalmente os associados ao intestino delgado (Menezes et al., 2003). A microbiota autóctone também é outra fonte de estimulação antigênica natural no intestino e o número de bactérias presentes no intestino humano (10<sup>14</sup>) ultrapassa o número total de células de todo o organismo humano (10<sup>13</sup>), havendo uma diversidade estimada entre trezentas e quinhentas espécies (Guarner e Malagelada, 2003). Por todos esses motivos, a mucosa intestinal é o principal local de estimulação do sistema imune, e conseqüentemente a dieta e a microbiota tornam-se fontes de interferência muito relevantes para a atividade imunológica.

A absorção do antígeno pela mucosa intestinal pode se dar através de células M (*microfold cells*), que o conduzem às placas de Peyer, pela passagem do antígeno através do epitélio e também pela captação por prolongamentos citoplasmáticos transepiteliais de células

dendríticas. Adicionalmente, as DCs intestinais podem captar antígenos por fagocitose de enterócitos apoptóticos. O contato antigênico pela mucosa pode levar a três principais consequências, sendo elas: 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 (Faria e Weiner, 1999).

A tolerância oral constitui um evento imunológico que leva à geração de tolerância aos antígenos ingeridos e, apesar de ser um mecanismo que se origina no trato gastrointestinal, apresenta repercussões sistêmicas, ocasionando diminuição da produção de anticorpos e da proliferação celular (Faria e Weiner, 2006). O primeiro relato relacionado a esse fenômeno foi realizado no início do século XX por dois grupos independentes da França e dos Estados Unidos. Esses pesquisadores demonstraram que cobaias tratadas com leite pela via oral se tornavam refratárias à reação de anafilaxia induzida por injeção intracerebral de leite (Besredka, 1909) e que a anafilaxia para proteínas de ovo de galinha (Wells, 1911) e do milho (Wells e Osborne, 1911) poderia ser prevenida pela ingestão prévia dessas proteínas. Porém, a natureza imunológica da tolerância oral foi melhor caracterizada apenas em 1946 quando demonstrou-se que a dermatite de contato induzida por dinitroclorobenzeno (DNCB) era evitada pelo contato prévio com essa substância por via oral (Chase, 1946).

As consequências da administração de antígenos por via digestiva foram sistematicamente estudada a partir da década de 70 (Hanson et al., 1977; Kagnoff, 1982; Thomas e Parrott, 1974; Tomasi, 1980; Vaz et al., 1977) quando o fenômeno passou a se chamar tolerância oral. Esta foi definida, então, como um estado imunológico no qual o animal torna-se especificamente refratário à imunização parenteral com um antígeno previamente administrado por via oral. Vários parâmetros da reatividade imunológica estão suprimidos pela tolerância oral, tais como os níveis de anticorpos séricos de diversos isotipos (Vaz et al., 1977), as reações de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) (Miller e Hanson, 1979; Titus e Chiller, 1981), o número de células secretoras de anticorpos (Richman et al., 1978; Titus e Chiller, 1981), o ritmo de clareamento de antígenos da circulação (Hanson et al., 1979a), a proliferação de linfócitos T em cultura (Richman et al., 1978; Titus e Chiller, 1981) e a secreção de diversas citocinas (Fishman-Lobell et al., 1994; Faria et al., 2003; Peron et al., 2010).

Portanto, após a ingestão de um antígeno proteico e da ação de enzimas digestivas, o mesmo é absorvido e, depois de seu processamento por células apresentadoras com a produção e apresentação de epítomos em contexto fisiológico, ocorre a indução de tolerância oral. Entretanto, trata-se de um fenômeno complexo e, mesmo após cem anos de sua descrição e da realização de centenas de estudos, um mecanismo explicativo definitivo e que consiga correlacionar todos os aspectos já observados na indução e manutenção da tolerância oral ainda não foi estabelecido. Esse interessante efeito imunológico é foco de investigação do nosso grupo.

## 2.1 Mecanismos e fatores envolvidos na tolerância oral

A indução e manutenção da tolerância oral envolve a cooperação de uma complexa rede de interações celulares no ambiente da mucosa e sabe-se que as células T CD4<sup>+</sup> são essenciais para o seu desenvolvimento. Inicialmente, a atividade dessas células foi ligada à produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) em associação à supressão da produção de citocinas Th1 (IL-2 e INF- $\gamma$ ) (Khoury et al., 1992; Weiner et al., 1994; Chen et al., 1994). De fato, a inibição de IL-2 e INF- $\gamma$  foi um parâmetro amplamente utilizado para medir indução de tolerância oral em muitos sistemas (Faria et al., 2003; Alpan et al., 2004). Entretanto, atualmente buscam-se outros mecanismos explicativos que fujam do obsoleto paradigma Th1 x Th2 com destaque para a participação de células dendríticas tolerogênicas e células T reguladoras (da Cunha e Weiner, 2011). A demonstração de que o tratamento de camundongos com Flt3L, um fator de estímulo para as células dendríticas *in vivo*, melhora a indução de tolerância oral (Viney et al., 1998), sugere um papel importante das DCs no estabelecimento do fenômeno da tolerância oral. A supressão ativa é um mecanismo importante para a indução de tolerância oral (Weiner et al., 1994) e é possível transferir o efeito utilizando células das placas de Peyer, do baço ou dos linfonodos mesentéricos de animais tolerantes para outros que não receberam o antígeno por via oral (Miller e Hanson, 1979; Ngan e Kind, 1978; Richman et al., 1978). A importância de células reguladoras na tolerância oral foi descrita há mais de uma década (Garside e Mowat, 2001), mas estudos orientados para se caracterizar o papel das Tregs nesse processo ainda são intensos.

A citocina TGF- $\beta$  é um dos mediadores mais estudados já que está presente em abundância no intestino, sendo importante para regular a homeostase epitelial e a troca de isotipo para IgA. A produção aumentada dessa citocina foi detectada em diversos estudos

sobre tolerância oral (Chen et al., 1997; Faria et al., 2003; Miller et al., 1992; Weiner, 2001), demonstrando sua importância para o desenvolvimento desse fenômeno.

Outra abordagem para se explicar o fenômeno da tolerância oral envolve estudos de ativação e de ciclo celular. Verificou-se que, nos primeiros momentos após a administração do antígeno por via oral, ocorre uma ativação inicial dos linfócitos T e que essa ativação envolve a produção inicial de IFN- $\gamma$  seguida de uma produção prolongada de citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) e de TGF- $\beta$  (Chen et al., 1997). A cinética de ativação dos linfócitos T antígeno-específicos é similar quando o antígeno é administrado por via oral na forma tolerogênica ou imunogênica. No entanto, o número de divisões observadas nos linfonodos mesentéricos é menor quando o antígeno é administrado na forma tolerogênica (Smith et al., 2002). Foi sugerido que esse menor número de divisões após a indução de tolerância oral é devido a um bloqueio do ciclo celular nessas células, implicando num papel fundamental de elementos limitadores da progressão do ciclo celular para o estabelecimento da tolerância oral (Sun et al., 2003).

É importante salientar que alguns fatores relacionados ao antígeno, ao método e ao animal influenciam a indução e manutenção da tolerância oral. Sabe-se, por exemplo, que um regime de administração do antígeno de forma contínua é mais efetivo do que uma única administração para a indução da tolerância oral (Saklayen et al., 1984; Faria et al., 2003). Trabalhos com camundongos transgênicos, com TCR específico para um peptídeo da Ova, demonstram que a ingestão voluntária de ovalbumina induz um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10, em comparação com os níveis produzidos por camundongos que receberam a mesma dose por gavagem (Marth et al., 2000; Faria et al., 2003). A idade e o *status* imunológico também são relevantes para o fenômeno. A administração oral de antígenos a animais neonatos não leva a indução de tolerância oral podendo; pelo contrário, sensibilizar o animal para futuros contatos com o antígeno (Hanson, 1981; Miller et al., 1994; Strobel e Ferguson, 1984). A senescência também afeta a indução de tolerância oral e uma diminuição na capacidade de supressão induzida pela tolerância oral é observada em camundongos a partir de 25 semanas de idade (Faria et al., 1993), sendo praticamente ausente em animais idosos (Faria et al., 1998). Sugere-se que essa dificuldade se deva a várias alterações que ocorrem no sistema imune com a senescência, levando a uma rigidez das interações celulares, cuja plasticidade é necessária para o funcionamento do sistema imune e conseqüentemente para a indução de tolerância oral (Faria et al., 1993). Além disto, o envelhecimento se relaciona a uma redução em vários elementos

imunorreguladores normalmente presentes na mucosa intestinal tais como IL-10, TGF- $\beta$  e células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Santiago et al., 2011). No entanto, a administração do antígeno de forma contínua por ingestão voluntária é capaz de superar essa dificuldade e induzir tolerância oral em animais idosos (Faria et al., 1998). A tolerância oral é facilmente induzida em animais que ainda não entraram em contato com o antígeno, mas, em animais previamente imunizados, a indução de tolerância é mais difícil. Em animais imunes, a administração oral do antígeno pode resultar em respostas imunes secundárias (Conde et al., 1998; Hanson et al., 1979b). Quanto ao *background* genético, sabe-se que a maioria das linhagens de camundongo é susceptível à indução de tolerância oral, sendo que o grau de susceptibilidade parece estar parcialmente associada ao haplótipo do MHC (Mowat et al., 1987), mas outros genes também parecem estar envolvidos (Rios et al., 1988; Vaz et al., 1987). Há de se notar que todos esses experimentos foram realizados utilizando-se o protocolo de gavagem para a indução de tolerância oral. Quando utilizamos a ingestão contínua, notamos que todas as linhagens até hoje já testadas pelo nosso grupo são igualmente suscetíveis à indução de tolerância oral para todos os antígenos testados (dados não publicados do Laboratório de Imunobiologia).

## **2.2 Efeitos indiretos da tolerância oral e sua aplicação**

Um dos grandes desafios para a utilização da tolerância oral no desenvolvimento de tratamentos para doenças autoimunes está na identificação do antígeno responsável pela indução da autoimunidade patológica e na existência de múltiplos auto-antígenos nos tecidos alvo (Faria e Weiner, 1999).

Vaz e colaboradores demonstraram que camundongos previamente tratados com ovalbumina por via oral se tornavam também refratários à imunização com um segundo antígeno não relacionado (DNP-KLH) se eles fossem imunizados com DNP-OVA concomitantemente com esse segundo antígeno. Tal fenômeno foi denominado de “supressão cruzada” (Vaz et al., 1981). Posteriormente, Miller e colaboradores, utilizando um modelo experimental da esclerose múltipla humana, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), demonstraram que ratos tratados por via oral com ovalbumina eram capazes de suprimir o desenvolvimento da EAE induzida pela imunização com a proteína básica de mielina (MBP), quando os dois antígenos (ovalbumina + MBP) eram injetados concomitantemente (Miller, 1991). O mecanismo proposto baseava-se na ação de citocinas supressoras secretadas por linfócitos específicos, principalmente TGF- $\beta$ , que agiriam sobre linfócitos não relacionados. O emprego da supressão da resposta a antígenos não relacionados

como efeito secundário da tolerância oral seria, portanto, uma alternativa de grande importância.

Entretanto, vários resultados são incompatíveis com a explicação deste fenômeno somente pela secreção de citocinas supressoras inespecíficas. A supressão da resposta imune ao antígeno não relacionado é observada mesmo quando o segundo antígeno é injetado por via diferente; até 72 h após o antígeno tolerado; e em contatos secundários e terciários, mesmo quando o antígeno tolerado foi adicionado somente na imunização primária. Portanto, foi proposta a denominação de “efeitos indiretos da tolerância oral” para enfatizar seu caráter sistêmico e marcar a identidade diferenciada desse fenômeno em oposição aos conceitos anteriores de “supressão cruzada” e de “*bystander suppression*” (Carvalho et al., 2002; Carvalho e Vaz, 1996; Carvalho et al., 1994; Carvalho et al., 1997; Vaz e Carvalho, 1994). Esses autores demonstraram que os efeitos indiretos da tolerância oral afetam a formação do granuloma em volta dos ovos de *Schistosoma mansoni* no pulmão, diminuindo significativamente seu tamanho (Carvalho et al., 2002) e também melhora os sintomas da reação de enxerto versus hospedeiro (GvH) letal (Vaz e Carvalho, 1994).

### **3. Células apresentadoras de antígeno na mucosa intestinal**

Apesar do reconhecido papel da imunidade adaptativa para manutenção da tolerância aos antígenos próprios, cada vez mais percebe-se que macrófagos residentes e células dendríticas desempenham funções primordiais nesse processo de manutenção de equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias, principalmente quando se estuda o tecido linfóide associado à mucosa intestinal. O interesse em esclarecer as propriedades únicas desses fagócitos mononucleares relacionadas à adaptação a esse microambiente especializado da mucosa tem crescido enormemente nos últimos anos.

Devido ao fato de que a expressão de MHC-II, CD11c e F4/80 pode ser compartilhada entre alguns macrófagos e células dendríticas na mucosa, muitos trabalhos identificaram e descreveram de maneira equivocada essas APCs, mas hoje temos ferramentas multi-paramétricas que permitiram melhor compreensão não só de suas características fenotípicas mas também origem, distribuição e função.

#### **3.1 Macrófagos residentes na mucosa intestinal**

Apesar de compartilharem muitas propriedades, macrófagos de diferentes tecidos adquirem fenótipo específico e especialização dependendo do microambiente tecidual. A mucosa

intestinal contem a mais abundante população de macrófagos do organismo e essas células representam grande parte dos leucócitos do intestino, ultrapassando em grande proporção as células dendríticas (Bar-On et al., 2011; Platt et al., 2010). Os macrófagos na lamina própria do intestino ou aderidos ao epitélio emitindo dendritos transepiteliais são bem adaptados ao microambiente rico em comensais e com alta drenagem antigênica. São células com alta capacidade fagocítica e bactericida, entretanto normalmente não produzem mediadores pró-inflamatórios, mesmo quando estimulados por ligantes de receptores do tipo Toll (TLR), por IFN- $\gamma$  ou por mitógenos como fitohemoaglutinina (PMA), como é o caso de macrófagos extraídos de outros tecidos (Smythies et al., 2005, Smith, 2010) Essa capacidade de atuar de maneira não inflamatória é essencial para manter a homeostase num tecido com rápida taxa de renovação de seus componentes. Além de essenciais pela sua ação fagocítica, os macrófagos intestinais são também importantes pela produção de prostaglandina E2 (PGE2) que estimula a renovação e mantém a integridade da barreira epitelial (Pull et al., 2005) e a depleção dessas células causa intensa inflamação intestinal (Qualls et al., 2006). Outro papel extremamente relevante dos macrófagos é a produção constitutiva de IL-10 (Takada et al., 2010; Murai et al., 2009; Denning et al., 2007), citocina essencial para o funcionamento equilibrado do tecido linfóide associado ao intestino. A produção de IL-10 pelos macrófagos intestinais parece ser responsável pela diferenciação final e manutenção de Tregs na lâmina própria (Murai et al., 2009; Hadis et al., 2011). Portanto, os macrófagos residentes contribuem para o equilíbrio na mucosa através da produção de fatores imunorreguladores e, sem desencadear respostas inflamatórias, eliminam bactérias comensais que ultrapassam a barreira epitelial.

Essa atividade inflamatória relativamente reduzida tem sido alvo de muitos estudos que visam entender processos patológicos na mucosa. Parece haver mecanismos adicionais de controle da transdução de sinais ou na execução de respostas inflamatórias nessas células, porém pouco ainda se sabe a respeito.

Os macrófagos intestinais são derivados e repostos por monócitos circulantes, mas a taxa de renovação desses fagócitos residentes em condições normais é muito reduzida. Entretanto, durante processos inflamatórios e infecciosos a composição de macrófagos pode mudar muito, com grande migração de monócitos e geração de células mais responsivas a ligantes de TLR, produtoras de citocinas e de quimiocinas pró-inflamatórias (Platt et al., 2010; Weber et al., 2011).

### 3.2 Células dendríticas na mucosa intestinal

Desde a sua descrição nos anos 70 (Steinaman e Cohn, 1973) características funcionais únicas vem sido descritas para as células dendríticas. Devemos destacar particularmente o papel na indução e regulação da resposta imune nas superfícies mucosas. Enquanto possuem um perfil imaturo na mucosa e estão posicionadas para captar antígenos externos, após sua ativação por estímulos microbianos, essas células sofrem um processo de maturação e expressam altos níveis de complexos MHC-antígeno, produzem inúmeras citocinas, expressam moléculas de adesão e de co-estimulação e adquirem alta capacidade migratória para zonas ricas em células T. Essas características justificam seu reconhecido papel de células apresentadoras profissionais que direcionam a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> efectoras, incluindo Th1, Th2, Th17, mas também células T reguladoras e células T CD8<sup>+</sup> (Coombes e Powrie, 2008).

A ativação de células T por DCs se dá através da combinação da coestimulação via CD80 e CD86, da interação MHC-TCR e das citocinas produzidas como IL-12, IL-23 e IL-6. Entretanto, essas células são também capazes de inibir a ativação e expansão de linfócitos ou ainda induzir respostas anti-inflamatórias e este parece ser o seu perfil padrão em tecidos saudáveis sem a presença de inflamação patológica. Desta forma, a constante captação de corpos apoptóticos, proteínas solúveis exógenas como componentes alimentares e bactérias comensais permitem que DCs sob condições não inflamatórias contribuam para a tolerância periférica. A participação das DCs nesse processo ativo de manutenção da homeostase intestinal se dá, por exemplo, através de eliminação de células T específicas, indução de Tregs e na participação de resposta de IgA secretória que controla a exposição a antígenos e comensais. Os mecanismos para desempenharem tais funções estão relacionados à capacidade de produzir IL-10, TGF- $\beta$ , ácido retinóico e expressar moléculas tolerogênicas como CTLA-4 e PDL-1 observada em alguns subtipos de DCs (Kelsall, 2008; Tezuka e Ohteki, 2010).

Contudo, para realmente entendermos as diversas ações desempenhadas pelas células dendríticas, é importante reconhecê-las como uma família de células composta por diferentes subpopulações que foram definidas baseando-se em origem ontogenética, fenótipo, localização, expressão gênica e função (Kelsall, 2008).

Em termos de origem, basicamente as células dendríticas, em camundongos, são derivadas de precursores circulantes como monócitos, pré cDCs (precursor de células dendríticas convencionais) e pDCs (plasmacitóide) que se originaram de células

hematopoiéticas primordiais da medula óssea e dependem de fatores de crescimento como ligante de Flt3, GM-CSF e G-CSF. Os monócitos podem originar além de macrófagos, DCs F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> na mucosa e, em condições inflamatórias, a participação de monócitos na diferenciação de DC pró-inflamatórias pode se alterar significativamente (Rivollier et al., 2012). Pré-cDC podem originar diversos subtipos de células dendríticas dependendo do tecido, incluindo as que são CD103<sup>+</sup> e se distribuem nas placas de Peyer e na lâmina própria. A distribuição nos diversos compartimentos da mucosa também demonstra o grau de especialização das células dendríticas. As placas de Peyer e os folículos linfoides isolados recebem antígenos e bactérias que ganham acesso através de células M. DCs nesses sítios participam da indução de células B produtoras de IgA e também migram para áreas ricas em células T após ativação via receptores da imunidade inata. DCs expressando ou não CD11b e CD103 estão distribuídas pela lâmina própria do intestino. Células dendríticas e macrófagos especializados na captação de partículas através da extensão de prolongamentos citoplasmáticos por entre as células epiteliais são CX3CR1<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> e representam um mecanismo adicional de interação antigênica com os componentes em trânsito intestinal. Em contraste com essas APCs intimamente associadas ao epitélio, DCs CD103<sup>+</sup> presentes em regiões mais profundas na lâmina própria possuem alta taxa de reposição e migram para os linfonodos mesentéricos num mecanismo dependente de CCR7, onde ativam células T e podem induzir moléculas que facilitam a migração de linfócitos para a mucosa intestinal pela indução de CCR9 e  $\alpha 4\beta 7$  nos mesmos (Coombes et al., 2007). Células CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> são particularmente capazes de induzir a diferenciação de Tregs graças a sua capacidade de produzir ácido retinóico e TGF- $\beta$  e estão envolvidas no desenvolvimento de tolerância aos antígenos ingeridos (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007; Mucida et al., 2007). Entretanto, em condições inflamatórias, as DCs nos linfonodos drenantes também contribuem para gerar respostas do tipo Th1 ou Th17 (Cerovic et al., 2012)

É importante também considerar a contribuição significativa do microambiente para a diferenciação das células dendríticas. No intestino particularmente, sinais provindos da microbiota, do epitélio, de fibroblastos, de macrófagos e de células T são fontes importantes para o condicionamento das DCs. A ativação anormal de células dendríticas e distúrbios nos sinais tolerogênicos da mucosa estão intimamente relacionados ao desenvolvimento de inflamação patológica, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais (Strober et al., 2002; Coombes and Powrie, 2008)

#### 4. Proteínas de Choque térmico (HSPs)

O resultado da administração de antígenos por via oral é dependente de vários fatores, dentre eles o antígeno utilizado. Uma grande variedade de antígenos já foi usada para a indução de tolerância oral e atualmente nosso grupo tem investido na utilização da proteína de choque térmico de 65kd (HSP65).

As HSPs (heat shock proteins) constituem uma classe de proteínas evolutivamente conservadas encontradas desde bactérias até mamíferos. Diversas famílias de HSP podem ser distinguidas de acordo com seu peso molecular: HSP10, HSP40, HSP70, etc (Lindquist, 1986). Em condições fisiológicas, as HSPs funcionam como chaperonas moleculares, participando do metabolismo proteico desde a formação de novas cadeias, enovelamento e a montagem de subunidades, durante a translocação proteica para diversos compartimentos celulares e na remoção de proteínas desnaturadas. Algumas HSPs são hiperexpressas após situações de stress celular, como exposição a temperaturas elevadas, patógenos, deficiências nutricionais, fatores pró-inflamatórios e radicais oxidativos (Lindquist, 1986; Ellis, 1990, Santoro, 2000).

Além de sua função no “controle de qualidade” celular, essas proteínas ganham ainda mais importância pela sua peculiar capacidade de interferir na atividade do sistema imune (Walter e Buchner, 2002; Quintana e Cohen, 2011). Por serem hiperexpressas no timo, ubiquamente presentes no organismo, altamente produzidas em situações inflamatórias e por existirem naturalmente clones de linfócitos T e B autorreativos que reagem com elas (Birk et al., 1996; Feige e Cohen, 1991; Caldas et al., 2006), podemos incluir as proteínas de choque térmico (HSPs) num grupo de antígenos considerados imunodominantes. Essa definição busca explicar que para a tolerância e a homeostase imunológicas haveria um conjunto de antígenos principais para os quais a atividade da rede linfocitária estaria centrada (Coutinho e Haas, 2001). Dessa forma, a geração de células T reguladoras específicas para HSPs e para outros antígenos imunodominantes, seria uma maneira do sistema imune criar uma hierarquia de reatividades como mecanismo de se manter a capacidade de reparo de tecidos, mas também o controle da expansão clonal e da inflamação. A HSP60, por exemplo, umas das HSPs mais estudadas quanto à sua capacidade imunoestimuladora, pode sensibilizar o sistema imune como um auto-antígeno, um antígeno exógeno, um carreador de outras moléculas funcionais e um ligante de TLRs. Podemos considerar que a HSP60 constitui uma via de interação e comunicação entre os componentes do sistema imune e desses componentes com os tecidos do organismo (Quintana e Cohen, 2011; Coelho e Faria, 2012)

A administração de HSP60 e de seus peptídeos pelas vias oral, nasal, intraperitoneal e subcutânea tem sido testada com sucesso em modelos experimentais de artrite em ratos (van Eden et al., 2005) e clones de linfócitos T reativos com HSP60 isolados de pacientes com artrite reumatoide juvenil apresentam um fenótipo de células reguladoras e secretam predominantemente IL-10 e TGF- $\beta$  (de Kleer et al., 2003). A administração por via oral de HSP65 em camundongos LDL<sup>-/-</sup> e alimentados por dieta hipercolesterolêmica, levou a uma redução da lesão aterosclerótica e uma diminuição da resposta inflamatória. Essa melhora foi acompanhada de diminuição de macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> infiltrantes na lesão, redução dos anticorpos séricos anti-HSP e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  (Maron, 2002). Em camundongos NOD (non obese diabetic), um modelo murino de diabetes autoimune, o tratamento sistêmico com Hsp65 desencadeia mecanismos imunorreguladores que melhoram o curso da doença (Elias et al., 1991; Birk et al., 1996). Além disto, estudos clínicos usando o peptídeo DiaPep277 em pacientes recentemente diagnosticados com diabetes tipo 1 foram parcialmente bem sucedidos na preservação da função das ilhotas pancreáticas (Raz et al., 2001, 2007; Schloot e Cohen 2013).

Como o aumento da expressão de HSP60 ocorre em virtualmente qualquer condição inflamatória, células T com perfil regulador e específicas para HSP60 poderiam ser parte do mecanismo de controle fisiológico e terminação da resposta inflamatória (van Eden et al., 2005). Valendo-se desse cenário poderíamos utilizar esse imunorregulador natural do organismo terapêuticamente para impedir ou controlar inflamações patogênicas originadas e mantidas pela ativação inadequada de linfócitos T. Esta poderia ser a chave para o desenvolvimento e aprimoramento de agentes imuno-moduladores para doenças autoimunes.

#### **4.1 *Lactococcus lactis* produtores de HSP65**

Embora a tolerância oral seja eficiente no tratamento de várias doenças em modelos animais, os ensaios clínicos em humanos não tiveram o mesmo sucesso (Faria e Weiner, 2006). Portanto, um constante aprimoramento no entendimento e uso desse fenômeno é necessário. Uma estratégia promissora é a entrega de antígenos por via oral utilizando bactérias lácticas geneticamente modificadas. Essa nova alternativa mostra-se segura para uso na modulação de respostas imunes, inclusive em humanos, visto que bactérias como *Lactococcus lactis* não são invasivas, tem sido relacionados com ações anti-inflamatórias na mucosa intestinal e são rotineiramente utilizadas pela indústria alimentícia em processos de fermentação (Maillard e Snapper, 2007).

As bactérias lácteas compõem um grupo de microrganismos gram-positivos que incluem espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, dentre outras. Algumas espécies são também importantes membros da microbiota humana (Steidler e Rottiers, 2006; Wells e Mercenier, 2008). Recentemente esses microrganismos passaram a ser utilizados como veículo para a entrega de antígenos exógenos nas superfícies mucosas. Além do status GRAS (generally recognized as safe) algumas espécies desse grupo são consideradas probióticas (Tsai et al., 2012) e são capazes de aumentar a produção de IgA secretória e estimular células fagocitárias (Neutra e Kozlowski, 2006). Outra importante característica dessas bactérias é o fato de não possuírem LPS na constituição de sua parede celular, o que elimina os riscos de choque por endotoxina e efeitos pró-inflamatórios indesejados (Mercenier et al., 2000). Nesse contexto, vários grupos de pesquisa utilizaram a engenharia genética para a produção de proteínas de interesse como citocinas, enzimas, alérgenos e diversos antígenos utilizando essas bactérias (Nouaille et al., 2003; Bermúdez-Humarán, 2004).

Não só pela sua importância econômica e por ser inócua ao ser humano, o *Lactococcus lactis* constitui o organismo modelo no estudo das bactérias lácticas. Trata-se da espécie melhor caracterizada e ideal para a produção de moléculas heterólogas por apresentar poucas proteínas secretadas (Van Asseldonk et al., 1990), ser um microrganismo de fácil manipulação, ter sido a primeira bactéria láctica cujo genoma foi sequenciado e contar com um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (De Vos, 1994; Duwat et al., 2000; Bolotin et al., 2001).

A possibilidade de se potencializar os efeitos da tolerância oral utilizando-se essa estratégia de entrega de antígenos foi demonstrada pela administração de *L. lactis* capacitada a produzir ovalbumina (Ova). A indução de tolerância específica para ova utilizando a bactéria *L. lactis*-Ova se mostrou eficaz para o controle da proliferação celular antígeno específica e gerou maior produção da citocinas IL-10 e formação de iTregs quando comparada a administração solúvel da proteína (Huibregtse et al., 2007). O mecanismo pelo qual *L. lactis* é capaz de expandir a capacidade tolerogênica da mucosa ainda não está esclarecido, mas podemos propor que haja uma imunomodulação das APCs, maximizando a manutenção do ambiente propício a geração de Tregs. (Huibregtse et al., 2007). Em estudo clínico com pacientes com doença de Crohn, a administração de *L. lactis* capaz de produzir a citocina anti-inflamatória IL-10 mostrou-se uma estratégia segura e capaz de melhorar o quadro clínico da doença (Braat et al., 2006). Portanto, a associação de *L. lactis* e a proteína

de interesse pode ser uma importante ferramenta para aumentarmos os mecanismos regulatórios na mucosa, e que trarão efeitos sistêmicos para o controle de inflamações patológicas.

Com a finalidade de implementar novas utilizações biotecnológicas e terapêuticas para as bactérias lácticas, o grupo de Miyoshi e Azevedo desenvolveu um novo sistema de expressão e endereçamento protéico para uso em *L. lactis*: XIES (*Xylose-Inducible Expression System*) (Miyoshi et al., 2004). Esse eficiente sistema foi utilizado com sucesso para gerar *L. lactis* capazes de produzir e secretar o antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (de Azevedo et al., 2012). Diante da já comprovada segurança na administração de *L. lactis* e dos efeitos imunomoduladores desempenhado pelas HSPs, essa ferramenta se mostrou bastante atrativa para uso como alternativa terapêutica para as doenças inflamatórias.

## 5. Autoimunidade e imunorregulação

Já é amplamente reconhecido que as doenças autoimunes são causadas por distúrbios em mecanismos de geração ou manutenção da tolerância imunológica. Devido a falhas na regulação das células efetoras pelos mecanismos normais de seu funcionamento, o sistema imune, principalmente por meio dos linfócitos, passa a ativar respostas inflamatórias destrutivas para autocomponentes. Quando as lesões acometem tecidos de difícil regeneração provocam um dano ainda maior. Este é o caso da esclerose múltipla, na qual as principais células atingidas são neurônios e, como estes não regeneram, ocorrem perdas permanentes em funções primordiais do sistema nervoso central (Ellwardt e Zipp, 2014). Como outro exemplo a diabetes tipo 1, na qual as células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina são alvo de destruição levando à deficiência progressiva desse hormônio (Eisenbarth, 1986).

A partir da concepção de que a tolerância imunológica constitui um mecanismo ativo e que a participação de células reguladoras é fundamental nesse processo, torna-se interessante explorar vias imunorreguladoras capazes de restaurar e expandir a atuação desses linfócitos em condições de desordens autoimunes. Com a descrição da geração de Tregs na periferia, abre-se uma tentadora janela para se alcançar esse objetivo. Conforme discutido anteriormente, o tecido linfóide associado à mucosa é particularmente um importante sítio de desenvolvimento de Tregs e que DCs intestinais especializadas (CD103<sup>+</sup>) promovem nas células T a expressão do fator de transcrição Foxp3 através de um mecanismo dependente de TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador- $\beta$ ) e ácido retinóico, um metabólito da vitamina A (Coombes, 2007; Mucida et al., 2007).

Portanto, a caracterização e estímulo dos mecanismos de atuação desses linfócitos reguladores durante as respostas imunológicas, principalmente no contexto de doenças inflamatórias, permitiria o desenvolvimento de intervenções seguras, personalizadas e duradouras através do aumento do *pool* das Tregs específicas para antígenos relevantes.

Assim, utilizar a via oral para administração de auto-antígenos, já que a mucosa intestinal é comprovadamente um sítio privilegiado para a indução de tolerância e células T reguladoras, é uma abordagem promissora no tratamento de doenças autoimunes.

A metodologia de se evitar doenças inflamatórias e autoimunes por meio de *L. lactis* produtor de HSP65 (HSP65-LL) foi utilizada recentemente em nosso laboratório e se mostrou eficiente no controle da encefalomielite autoimune experimental (EAE - um modelo murino de esclerose múltipla) (Rezende et. al., 2012) e da colite experimental (Gomes-Santos, 2014). No caso da EAE, utilizamos a imunização com a glicoproteína associada à mielina (MOG) juntamente com o adjuvante completo de Freund (CFA) e uma imunização adicional com toxina pertussis, um agente que perturba a barreira hematoencefálica e possibilita o ataque ao SNC. A colite é induzida pela administração oral de DSS (Dextrano sulfato de sódio), um agente irritante e que tem efeitos tóxicos no epitélio gerando um quadro similar a colite ulcerativa.

Entretanto, tanto a EAE quanto a colite são modelos induzidos em camundongos C57BL/6. Portanto, nosso próximo desafio seria para avaliar o efeito imunomodulador do LL-HSP65 em um modelo crônico e espontâneo de doença autoimune, e devido a sua relevância clínica, complexidade e ausência de tratamentos definitivos no controle da patogênese, passamos a investigar a diabetes autoimune.

## 6. Diabetes Mellitus

A Diabetes é uma doença crônica cujo caráter principal é a hiperglicemia. Pode ocorrer devido à produção deficiente de insulina pelo pâncreas ou quando o organismo não consegue utilizar perfeitamente a insulina que produz. A insulina é um hormônio produzido pelas células- $\beta$  das ilhotas pancreáticas e é responsável por regular o nível de glicose na circulação sanguínea. A alta concentração de glicose na circulação (hiperglicemia) é o efeito comum da diabetes não controlada e pode levar a sérios danos ao organismo. Dentre os sintomas característicos da doença estão a grande excreção de urina, sede excessiva e sensação constante de insaciedade (Eisenbarth, 1986; Srikanta et al., 1986).

A diabetes está se tornando a epidemia do século e já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2025, a previsão é de que esse número chegue a 380 milhões. Estima-se que boa parte das pessoas que tem diabetes desconhece a sua própria condição. Estima-se que em 2004 cerca de 3,5 milhões de pessoas tenham morrido por consequência de altos níveis sanguíneos de glicose. O gasto mundial para o tratamento da diabetes também é um fator crescente. Estima-se que em 2007 gastou-se 232 bilhões de dólares no tratamento e prevenção da doença e suas complicações. (WHO, 2011)

A Diabetes Mellitus pode ser classificada em tipo 1 e tipo 2 e ambas tem como característica principal a hiperglicemia, o que pode causar sérias complicações para a saúde, incluindo cetoacidose, falência renal, doenças cardíacas, derrame cerebral e cegueira. A diabetes do tipo 2 é normalmente associada com obesidade ou a idades mais avançadas, e é principalmente resultado da resistência a insulina, quando as células musculares ou adiposas não respondem adequadamente a insulina produzida. Por outro lado, a diabetes tipo 1 (também referida como diabetes autoimune ou insulino-dependente) se inicia antes dos 30 anos de idade e é, portanto, também chamada de diabetes juvenil, mesmo sabendo-se que ela pode ocorrer em qualquer idade. A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune crônica que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis e que pode também ser desencadeada por fatores ambientais, como infecções virais. Células do sistema imune causam o dano e destruição das ilhotas de Langerhans no pâncreas, o que reduz ou elimina totalmente a produção de insulina. A incidência dessa doença tem aumentado em todo o mundo nas últimas décadas e a uma taxa de 5,3% nos Estados Unidos, por exemplo (van Belle et al., 2011). Apesar da diabetes tipo 1 ser responsável por apenas 5 a 10% de todos os casos de diabetes, ela constitui uma doença grave e crônica, se iniciando mais cedo que a diabetes do tipo 2 e com importantes consequências a curto e longo prazo. Trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Gale, 2005) e este constitui um de seus principais agravantes visto que um contínuo monitoramento e imediata e permanente reposição exógena de insulina se fazem necessários.

### **6.1 O modelo experimental de diabetes tipo 1**

Devido à complexidade da etiologia, patogênese e morbidade da diabetes tipo 1 e à limitação dos estudos clínicos, os modelos animais se tornaram de fundamental importância. Muitos aspectos da doença foram elucidados principalmente após o desenvolvimento do camundongo NOD (*non obese diabetic*) a partir de intercruzamentos da linhagem propensa a

catarata Jcl:ICR na década de 80 (Makino et al., 1980). O camundongo NOD é um excelente modelo de doença autoimune e uma importante ferramenta para se entender e explorar os mecanismos de tolerância. O valor dessa linhagem animal deve-se ao fato de desenvolverem espontaneamente a diabetes autoimune, a qual compartilha muitas similaridades a doença em humanos, incluindo a presença de autoanticorpos específicos para antígenos do pâncreas, células T autorreativas e a participação do componente genético na suscetibilidade à doença. Durante os últimos anos, pesquisadores utilizaram uma variedade de ferramentas para estudar esse camundongo, incluindo modelos transgênicos e geneticamente deficientes (*knockouts*) para determinados genes de interesse. Essas ferramentas melhoraram profundamente o estudo e o conhecimento acerca dos mecanismos fundamentais da doença (Anderson e Bluestone, 2005; Makino et al., 1980).

## 6.2 Componente genético e patogênese da diabetes tipo 1

A definição clínica da diabetes do tipo 1 é baseada no nível elevado de glicose, mas para explicar essa condição é importante entendermos o processo patológico que leva à perda das células- $\beta$ . O acometimento é precedido por uma fase denominada insulite na qual macrófagos, células dendríticas, células NK e células T se infiltram e posteriormente iniciam o ataque às ilhotas pancreáticas. Falhas nos mecanismos de tolerância imunológica e a ativação anormal de linfócitos T em indivíduos suscetíveis leva a uma resposta inflamatória contra antígenos expressos pelas células- $\beta$  e uma resposta imune humoral com produção de auto-anticorpos. Acredita-se que essa resposta patológica inicia-se dirigida a um repertório limitado de antígenos e expande-se para alvos adicionais, o que acentua o estado inflamatório e patogênico.

Defeitos na seleção negativa de timócitos ou na geração de Treg no timo já foram propostos como eventos causais da autoimunidade na diabetes (Bluestone et al., 2010). Eles poderiam estar relacionados a mutações no gene *AIRE* ou a uma ligação ineficiente de epítomos próprios ao MHC (Stadinski et al., 2010). Contudo, utilizando o camundongo NOD, relatos mostram que não há diferença na frequência de células T reguladoras (Mellanby et al., 2007) e que a seleção negativa está funcional (Mingueneau et al., 2012) nesses animais. A tendência mais recente é investigar defeitos intrínsecos no controle da sinalização após a ligação do TCR ao antígeno ou em fatores de sobrevivência para Tregs, como um possível decréscimo na produção de IL-2 ou em moléculas inibidoras como CTLA-4 e PD1,

responsáveis pelo controle de respostas efetoras (Fife et al., 2006; You et al., 2008; Shieh et al., 2009; Grinberg-Bleyer et al., 2010; Johnson et al., 2013).

Células T patogênicas que invadem as ilhotas reconhecem especificamente epítomos da insulina. Já foi demonstrado que linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> autorreativos destroem as células produtoras de insulina e são suficientes para transferir a patologia para camundongos NOD neonatos (Miller et al., 1988; Haskins e Wegmann, 1996). Os linfonodos pancreáticos são considerados o local de ativação de células T por DCs carreando antígenos pancreáticos e os principais e primeiros auto-antígenos identificados são a insulina e a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Posteriormente, foram também descritos o transportador de zinco 8 (ZnT8), proteína relacionada à subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase (IGRP), proteína de choque térmico de 60kd (Hsp60) e cromogranina A (Haskins e Wegmann, 1996; Roep e Peakman, 2012). Essa última é a fonte do epítopo reconhecido pelo clone autorreativo BDC2.5 isolado do camundongo NOD e muito utilizado em modelos de transferência de diabetes.

Os mecanismos efetores de destruição das células-beta pancreáticas envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , a liberação de radicais livres, a ação de granzima e perforina e a indução de apoptose via Fas/Fas-L (Mathis et al., 2001; Rabinovitch, 1992; Rabinovitch e Suarez-Pinzon, 1998). A contínua destruição das ilhotas e a redução significativa da massa de células- $\beta$  (entre 70 a 90%) ocasiona a perda progressiva da capacidade secretória de insulina e possivelmente a um estado de deficiência absoluta desse hormônio (Tooley et al., 2012).

Polimorfismos em muitos *loci* gênicos já foram identificados e associados à suscetibilidade à doença em humanos e em animais diabéticos (denominados *loci idd*, de *insulin dependent diabetes*). Destacam-se genes de *MHC* de classe I e II e também genes associados à imunorregulação, como *AIRE*, *IL-2r*, *CTLA-4*, *PD-1*. Interessantemente muitas alterações são compartilhadas entre os camundongos NOD e os pacientes, o que reforça a importância desse modelo animal (Concannon et al., 2009; Wicker et al., 2005; Bluestone et al., 2010). As proteínas codificadas por esses genes estão envolvidas na regulação da ativação de linfócitos durante o reconhecimento do antígeno pelo TCR.

Evidências mais recentes indicam que alterações epigenéticas induzidas pelo ambiente, como padrões alterados de metilação de DNA, contribuem para a expressão gênica anormal em células específicas, contribuindo para a perda da tolerância e acometimento pela autoimunidade em indivíduos geneticamente pré-dispostos (Hewagama e Richardson, 2009).

Portanto, a avaliação de fatores genéticos e epigenéticos é importante para o completo entendimento da instalação da diabetes.

Apesar da importância do componente genético, fatores ambientais contribuem para o desencadeamento da diabetes autoimune. De certa forma, a exposição a patógenos se relaciona inversamente à incidência e à gravidade da doença. Em camundongos NOD, a incidência da doença aumenta à medida que os animais são mantidos em condições de maior controle sanitário e da microbiota (Okada et al., 2010). Os mecanismos envolvidos nessa relação entre o estímulo microbiano e autoimunidade não são totalmente esclarecidos, mas as vias de reconhecimento de padrões moleculares (PAMPs), principalmente os TLR desempenham papel fundamental (Wen et al., 2008). Particularmente a microbiota intestinal e a dieta parecem ser relevantes para o contexto da doença. O reconhecido papel da mucosa intestinal para a tolerância imunológica, a complexa e dinâmica rede de interações celulares e moleculares nesse microambiente e a drenagem de antígenos para o linfonodo pancreático (Turley et al., 2005) reforçam a importância do intestino no desenvolvimento da diabetes. De fato, permeabilidade aumentada, inflamação subclínica e defeitos no funcionamento de APCs e na geração de Tregs são comumente observados no intestino de animais e também em pacientes diabéticos (Alam et al., 2010; Badami et al., 2011; Malaisse et al., 2004; Vaarala, 2011).

Vários subtipos celulares estão presentes no infiltrado inflamatório e estão envolvidos no desencadeamento e progressão da patologia. Um acúmulo de APCs em torno das ilhotas coincide com a lesão inicial, precedendo um progressivo infiltrado linfocitário e destruição das células beta. Defeitos na ontogênese pancreática (Lonyai et al., 2008) e falhas no mecanismo de *clearance* apoptótico por macrófagos (Maree et al., 2008; O'Brien et al., 2002) são descritos em camundongos NOD e podem contribuir para a ativação de células T autorreativas por DCs que apresentam antígenos das ilhotas no linfonodo pancreático após uma onda de morte descontrolada de células beta (Turley et al., 2003). Alguns grupos apontam defeitos funcionais e fenotípicos nas células dendríticas de camundongos NOD e pacientes de diabetes tipo 1 que poderiam justificar a ativação anormal de linfócitos pela ação imunogênica dessas APCs.

Portanto, uma análise ampla e minuciosa dos fatores e mecanismos envolvidos na diabetes autoimune permite concluir que fatores genéticos e de desenvolvimento, a qualidade da estimulação antigênica – principalmente via mucosa – e a falha em mecanismos de regulação contribuem para o seu desenvolvimento e sua patogênese.

### 6.3 Tratamento disponível e novas perspectivas

O tratamento atual para a diabetes do 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 uma necessidade crescente de cuidados médicos à medida que a doença progride. Além disso, a manutenção de uma taxa normal de glicose circulante requer o seu monitoramento constante fazendo necessária a perfuração capilar e injeções de insulina que chegam a cerca de mil por ano. Esse fato demonstra o impacto do cuidado com o controle da doença nos pacientes afetados, principalmente quando consideramos que mais da metade dos pacientes diagnosticados são crianças e salienta a necessidade de novas estratégias terapêuticas para a diabetes o tipo 1 (Phillips et al., 2011).

Algumas estratégias experimentais e ensaios clínicos tentaram corrigir prováveis defeitos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da diabetes. Desde o uso da ciclosporina para o tratamento de pacientes (Stiller et al., 1984), muitos tratamentos imunologicamente direcionados foram desenvolvidos visando antígenos específicos ou imunomodulação global. Esses tratamentos baseiam-se na ideia de eliminar ou inativar células patogênicas ou potencializar células reguladoras. O objetivo geral é restabelecer a auto-tolerância e prevenir a destruição das células- $\beta$  pancreáticas. Nas últimas duas décadas, a grande evolução do conhecimento sobre a patogênese da diabetes permitiu o desenvolvimento de novos tratamentos imunomoduladores. Algumas intervenções terapêuticas foram desenvolvidas em camundongos NOD visando uma possível tradução em evolução de tratamentos clínicos. Nesse modelo animal, o tratamento preventivo oral com anti-CD3 (Ishikawa et al., 2007), a administração nasal ou subcutânea de insulina (Daniel e Wegmann, 1996) e o tratamento subcutâneo com HSP60 (Elias et al., 1997) foram eficientes na diminuição da incidência da doença. Ensaios clínicos usando anti-CD3, anti-CD20 ou agonistas de CTLA-4 resultaram na manutenção transiente da produção de insulina, mas, após o tratamento, muitos indivíduos reverteram para a progressiva destruição das células beta pancreáticas. (Herold et al., 2005; Pescovitz et al., 2009; Keymeulen et al., 2010; Orban et al., 2011). A administração subcutânea de um peptídeo da HSP60 foi utilizada em ensaio clínico e mostrou efeitos positivos em pacientes recentemente diagnosticados (Elias et al., 2006). Portanto, também para a diabetes autoimune, as HSPs se mostram como componentes-chave de imunorregulação.

Entretanto, apesar de muitos estudos mostrarem inicialmente resultados promissores, até agora nenhuma estratégia se mostrou eficaz o suficiente para aprovação definitiva para uso clínico (Tooley et al., 2012).

Um fator complicador na pesquisa da diabetes autoimune é a escolha dos controles saudáveis. Para estudos clínicos, a tarefa já é difícil diante da variabilidade de fatores ambientais e genéticos entre indivíduos saudáveis e também os pacientes. A diabetes tem se mostrado com uma patologia heterogênea com múltiplas características fenotípicas e variação nos processos patogênicos em humanos. Nos modelos animais, muitos estudos utilizaram linhagens controle não diretamente relacionada aos camundongos NOD (como BALB/c e C57BL/6) na tentativa de revelar correlações positivas entre diferenças no sistema imune e o seu papel no desenvolvimento da doença. Um dos camundongos mais intimamente relacionados são os NOR (NOR/LtJ – *non obese resistant*), uma linhagem congênica recombinante em que limitadas regiões do genoma de NOD/LtJ foram substituídas por porções do C57BLKS/J. Apesar de compartilhar a maior parte do genoma com o NOD, incluindo o típico haplótipo de MHC-II H2<sup>g7</sup> e muitos outros loci idd, camundongos NOR são resistentes à insulite e não desenvolvem diabetes. Alelos de resistência nas regiões residuais derivadas da linhagem C57BLKS e localizadas nos cromossomos 1, 2 e 4 podem favorecer o estado de resistência à autoimunidade (Serreze et al., 1994). Apesar de muitas importantes observações terem permitido avanços na área, mesmo quando linhagens congênicas livre de diabetes e que compartilham o MHC do NOD (NOR), ou propensas a insulite (camundongo NON) são usadas, tem sido difícil traduzir as diferenças genéticas e os fenótipos imunológicos distintos em entendimento conclusivo sobre a história natural da doença.

#### **6.4 Dieta, microbiota e células apresentadoras de antígeno na diabetes tipo 1**

Na última década o interesse sobre o microbioma tem crescido enormemente e há um convincente conjunto de dados mostrando o papel fundamental da microbiota na homeostase ou na inflamação intestinal. Dado o íntimo intercâmbio entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro, não é surpresa que vejamos frequentemente correlações entre indivíduos doentes e alterações na composição dos comensais. Sabemos que sinais desencadeados pelos microrganismos são relevantes para o tecido linfóide associado a mucosa e que mecanismos da imunidade inata e adaptativa são importantes para determinar a composição dos simbioses (Maynard et al., 2012).

Essa relação de mão-dupla pode ser exemplificada pela demonstração de que camundongos NOD deficientes na proteína adaptadora Myd88, crítica para a transdução de sinais da imunidade inata, apresentam mudanças na composição da microbiota no cólon e não desenvolvem diabetes. Entretanto, em condições isentas de germes, os mesmos animais desenvolvem diabetes de forma ainda mais severa. A doença é inibida nos camundongos isentos de germes (*germ free*) após a exposição à microbiota de camundongos Myd88<sup>-/-</sup> mantidos em condição livre de patógenos específicos (SPF), que apresenta uma proporção aumentada de *Bacteroidetes*. Dessa forma, conclui-se que a qualidade específica de estimulação inata contribui para o acometimento pela diabetes autoimune (Wen et al., 2008).

Do mesmo modo, o tratamento com *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* probióticos previne a autoimunidade em NOD e induz imunomodulação pela produção de IL-10 reduzindo a gravidade da insulite e a taxa de destruição de células- $\beta$  (Calcinaro et al., 2005).

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 falhas em tolerar os comensais poderiam se relacionar à diabetes autoimune (Alam et al., 2010).

Além da microbiota, o estímulo antigênico diário pelas refeições e qualidade das mesmas são também reconhecidos como fatores de influência na atividade imune no intestino e podem estar envolvidos no contexto da doença. Estudos epidemiológicos sugerem que o aleitamento materno de curta duração e a introdução de proteínas do leite de vaca na infância aumentam o risco de diabetes (Vaarala et al., 2008). Em outro modelo de diabetes tipo 1, o rato *bio-breeding*, a alimentação prolongada e exclusiva pela amamentação protege parcialmente do desenvolvimento da doença (Brugman et al., 2009). Além disso, exposição a antígenos alimentares constituintes do trigo poderiam desencadear autoimunidade a células- $\beta$  em crianças com predisposição genética (Norris et al., 2003; Ziegler et al., 2003). A estimulação de células extraídas de biópsias de intestino *in vitro* com gliadina causou aumento da expressão de marcadores de ativação CD25 e ICAM-1 nas células T de pacientes diabéticos (Auricchio et al., 2004). Estudos em animais também sugerem que proteínas do trigo modulam a ativação imune no intestino e contribui para os mecanismos autoimunes que levam a diabetes (Chakir et al., 2005; Maurano et al., 2005; Funda et al., 2008). Um trabalho utilizando uma dieta anti-diabetogênica mostrou uma redução na polarização Th17 no intestino e na inflamação intestinal que estariam relacionadas à diabetes em camundongos NOD (Alam et al., 2010).

Outros componentes alimentares que já foram mostrados como redutores da incidência de diabetes em camundongos são a Capsaicina - presente na pimenta malagueta (Nevius et al., 2011), e epigallocatequina galato – composto polifenólico do chá verde (Fu et al., 2010).

Entretanto, a dieta é apenas mais um fator intestinal potencialmente associado à doença e devemos considerar outros mecanismos envolvidos na desregulação da homeostase intestinal, como provavelmente as células que inicialmente contatam todos esses antígenos e estímulos inatos. Muitas alterações nas APCs de camundongos NOD e pacientes diabéticos já foram descritas, porém pouco se sabe do comportamento e anomalias dessas células na mucosa intestinal, onde assumem características diferenciais e desempenham funções especializadas.

### **6.5 Desenvolvimento e função neuroendócrina na diabetes tipo 1**

O papel essencial das células T para o desenvolvimento da diabetes é inquestionável, visto que a doença não se desenvolve em camundongos NOD atímicos ou linfopênicos. Do mesmo modo, diversas interferências no funcionamento dos linfócitos T são suficientes para impedir o estabelecimento da patogênese e a injeção de células T originadas de doadores diabéticos desencadeia e acelera a patologia em camundongos NOD saudáveis (Anderson e Bluestone, 2005). Entretanto, o papel da imunidade adaptativa poderia ser apenas o estágio efetor e final de um processo de várias etapas que se inicia desde a ontogenia. Estudos relacionando a biologia do desenvolvimento e a imunidade descrevem que tecidos que expressam embriologicamente o fator de transcrição Hox11 apresentam anormalidades estruturais nos camundongos NOD. Essa observação poderia explicar alterações morfofisiológicas nas glândulas salivares, cóclea e pâncreas desses animais. Os defeitos estruturais na cóclea do NOD estão relacionados à completa perda de audição que ocorre anteriormente ao aparecimento da diabetes. Já o pâncreas e as glândulas salivares são, a princípio, funcionalmente normais, mas apresentam alterações estruturais também vistas em camundongos NOD-SCID. Essas anomalias são apenas reveladas após o ataque autoimune a esses órgãos. Camundongos NOD contém ilhotas imaturas e mal formadas antes do desmame e elas se tornam grandes e de formato irregular durante o desenvolvimento do animal. A partir dessas observações, os investigadores concluíram que o desenvolvimento alterado de uma linhagem de células prediz a resposta autoimune a tecidos estruturalmente afetados (Robinson et al., 1996; Rosmalen et al., 2000; Homo-Delarche, 2001; Pelegri et al., 2001).

Muitos pesquisadores também associam alterações nos sistemas endócrino e nervoso à diabetes. Há evidências de que a inervação nas ilhotas pancreáticas são alvos iniciais durante a patogênese, e, de fato, os primeiros auto-anticorpos indicativos de dano tecidual são específicos para GAD, um antígeno endócrino compartilhado entre ilhotas pancreáticas e neurônios (Saravia e Homo-Delarche, 2001; Hamilton-Williams et al., 2003; Winer et al., 2003). De acordo com esse ponto de vista, um desenvolvimento defeituoso somado a uma função anormal de macrófagos durante o posterior remodelamento tecidual favoreceria a liberação de fatores de estresse e posteriormente o condicionamento de linfócitos auto-reativos.

Essa ideia de uma perturbação fisiológica das células- $\beta$  foi recentemente reforçada por um estudo de associação genômica ampla (GWAS) que permitiu concluir que tais células poderiam desempenhar função ativa na patogênese e não apenas serem o alvo da destruição. Novos *loci* portando prováveis genes de suscetibilidade a diabetes foram descritos e estão envolvidos com o crescimento da célula beta, com a regulação do desenvolvimento embrionário do pâncreas, com a via endolisossomal, com as vias de transdução de sinal e com a resposta de citocinas (Kutlu et al., 2009; Eizirik et al., 2012; Soleimanpour e Stoffers, 2013).

Portanto para se alcançar o objetivo de claramente entender a diabetes autoimune devemos considerar os recentes relatos de alterações na mucosa e no tecido pancreático para elucidar de que forma o componente genético, a organização do tecido pancreático, o estresse metabólico durante o desenvolvimento e o desafio constante de regulação no intestino podem se relacionar ao quadro patológico.

# Justificativa e Objetivo



## Justificativa

O sistema imune, através da ação coordenada de seus componentes, dinamicamente assimila ou elimina antígenos de diversas origens e naturezas. Distúrbios nesse fino balanço de reconhecimento, ativação e regulação podem gerar efeitos deletérios ao organismo, como as doenças autoimunes. Nesse contexto, algumas células passam a ativar respostas inflamatórias destrutivas para autocomponentes devido, provavelmente, a uma falha na regulação das células efetoras pelos mecanismos normais de tolerância imunológica. Entender e explorar as vias imunorreguladoras intrínsecas do organismo é uma promissora e desafiadora estratégia para resgatar o funcionamento fisiológico do sistema imune e impedir a destruição de componentes essenciais ao perfeito funcionamento do organismo.

Muitos auto-antígenos estão associados às doenças inflamatórias e autoimunes, porém dentre eles destacam-se as HSPs, que constituem um grupo de proteínas com função de chaperonas, mas que também exercem grande influência sobre a atividade do sistema imune. Como o aumento da expressão de HSP60 ocorre em virtualmente qualquer condição inflamatória, células T com perfil regulador e específicas para HSP60 poderiam ser parte do mecanismo de controle fisiológico e terminação da resposta inflamatória. Assim, saber explorar a capacidade imunoestimuladora das HSPs é um desafio promissor para os imunologistas.

A Diabetes Mellitus do tipo 1 é uma doença autoimune onde também existe uma participação das HSP como mecanismo de adjuvante natural do organismo. Nessa doença, ocorrem distúrbios da fisiologia metabólica devido à destruição das células- $\beta$  pancreáticas pela atividade desregulada de linfócitos autorreativos em indivíduos geneticamente suscetíveis. A perda gradual das células produtoras de insulina acarreta concentrações circulantes de glicose elevadas com sérias consequências metabólicas patológicas. A diabetes constitui a principal causa de amputação de membros inferiores, insuficiência renal e cegueira entre adultos, assim como de doenças cardiovasculares, morte prematura e mortalidade perinatal. Com isso, sobrevém um grande impacto negativo para a sociedade e para a saúde pública. As consequências do diabetes nos sistemas de saúde, considerando-se tão somente seus aspectos clínicos, refletem apenas uma fração dos prejuízos causados aos indivíduos, suas famílias e à sociedade. Além dos custos diretos da doença, devem ser observados os custos indiretos para a sociedade e para o indivíduo, tais como: morte prematura, incapacidade, absenteísmo, a diminuição do retorno da educação oferecida ao

indivíduo, diminuição da renda do chefe de uma família, aumento de aposentadorias precoces e desemprego. O tratamento atual para a diabetes do 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 uma necessidade constante e crescente de monitoramento da glicemia e de cuidados médicos à medida que a doença progride.

Diante da importância clínica da diabetes e da necessidade de um tratamento alternativo com mínimos efeitos colaterais, torna-se importante a busca por novas estratégias experimentais que permitam reequilibrar os fenômenos imunológicos envolvidos na sua origem e fisiopatologia. A partir da recente caracterização de subpopulações de células T com atividades reguladoras, cada vez mais tem sido propostas novas abordagens imunoterapêuticas com enfoque em doenças inflamatórias crônicas e autoimunes. Nessa perspectiva, a utilização do fenômeno da tolerância oral como ferramenta para suprimir a ativação e proliferação de linfócitos envolvidos na patogênese da diabetes autoimune experimental constitui um aliado fundamental na tentativa de se desenvolver métodos profiláticos ou medicamentos que sejam mais eficazes para o tratamento dessa enfermidade.

A ideia fundamental desse estudo é explorar uma das propriedades importantes da tolerância oral: é possível induzir supressão para antígenos específicos pela via oral, mas essa supressão atinge também antígenos que se encontram na vizinhança do evento inflamatório suprimido. Esse efeito, conhecido como efeito indireto, nos permite induzir supressão para doenças inflamatórias com múltiplos antígenos alvo. Além disto, o tratamento proposto nesse trabalho é baseado na administração de bactérias lácticas, uma vez que a HSP65 será produzida e liberada no trato gastrintestinal dos animais via *Lactococcus lactis*. O uso de bactérias lácticas e probióticas é isento de efeitos colaterais para a saúde do organismo e este constitui mais um ponto positivo da alternativa terapêutica proposta. Devido à complexidade da etiologia, patogênese e morbidade da diabetes autoimune e da impossibilidade de estudos mais detalhados em humanos, o uso do modelo animal é de fundamental importância.

## Objetivo geral

Avaliar as vias imunorreguladoras desencadeadas pelo tratamento oral com Hsp65 e correlacionar a atuação dos componentes imunológicos da mucosa intestinal de camundongos NOD à diabetes autoimune experimental.

## Objetivos específicos

- Comparar os efeitos imunológicos do tratamento com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 em linhagens de camundongos normais (C57BL/6) e suscetíveis à diabetes autoimune (NOD).
- Determinar o envolvimento de subpopulações linfocitárias e de receptores da imunidade inata no efeito imunomodulador do tratamento oral com LL-Hsp65.
- Avaliar o efeito da administração oral de *Lactococcus lactis* produtores de Hsp65 na incidência de diabetes autoimune em camundongos NOD.
- Estudar os componentes e mecanismos imunológicos na mucosa intestinal de camundongos NOD e correlacioná-los ao processo patológico da diabetes tipo 1.

# **Materiais e Métodos**



## Materiais e Métodos

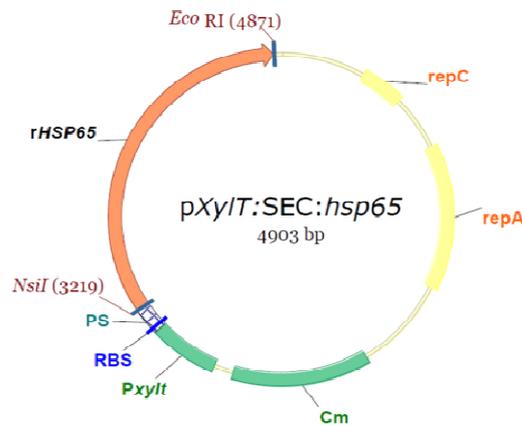
### 1. Camundongos utilizados

Foram utilizadas várias linhagens de camundongos fêmeas de diferentes origens nos experimentos. Os camundongos das linhagens C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO) e os C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelo professor Sérgio Costa Oliveira do Departamento de Bioquímica, ICB, UFMG. Os camundongos NOD (non-obese diabetic) foram obtidos do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da UNIFESP sendo sua origem o *Jackson Laboratory* nos Estados Unidos. Colônias desses animais foram geradas e mantidas no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB, UFMG. Os camundongos NOR (*non obese resistant*) foram obtidos diretamente do Jackson Laboratory e utilizados nos experimentos realizados no *Laboratory of Molecular Immunology* do *National Institutes of Health* em Bethesda, EUA. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia, sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*. Para que os camundongos NOD desenvolvessem a diabetes autoimune espontaneamente e em alta taxa, estes foram mantidos em condições de extrema limpeza e cuidado (microisoladores, água e ração esterilizados e dispostos em estantes ventiladas com filtração de ar). Essa condição é essencial para a suscetibilidade à doença, como bem relatado pela literatura (Bluestone, 2004). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA, protocolo número 117/2010) da UFMG.

### 2. *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65

Em colaboração com os professores Anderson Miyoshi e Vasco Azevedo (Departamento de Biologia Geral do ICB), utilizamos a linhagem recombinante de *L. lactis* NCDO2118 portadora do plasmídeo pXylT:SEC:hsp65/Cmr (Fig. 1) produzida pelo Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da UFMG. Esta linhagem é, portanto capaz de produzir e secretar no meio de cultura a proteína de choque térmico de 65kd de *Mycobacterium leprae*. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco) suplementado com 0,5% de glicose (GM17) ou 1% de xilose (XM17). Para o cultivo das bactérias, 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado. As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio sólido por um período de 18 horas *overnight*. Em seguida, colônias

isoladas foram individualmente coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável e inoculadas em meio líquido. Depois de cultivadas, as culturas foram diluídas (4:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em freezer -80 °C.



**Figura 1. Vetor de expressão de hsp65.** Vetor de expressão *pXylT:SEC:hsp65/Cmr* contendo a sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) de *L. lactis* fusionada à ORF *hsp65* de *M. leprae* sob o controle do promotor *PxyIT*.

## 2.1 Indução da produção de HSP65 por *L. lactis*

Para indução da produção de HSP65, foi utilizado o protocolo descrito por Miyoshi e colaboradores (Miyoshi et al., 2004). No primeiro dia colônias isoladas de *L. lactis* recombinantes foram individualmente inoculadas em meio GM17 suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol e mantidas em estufa a 30°C por 18 horas, sem agitação. As culturas crescidas *overnight* foram diluídas (1:10.000) em XM17 suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 30°C, sem agitação, por mais 18 horas. Após as culturas terem alcançado uma densidade óptica (OD600nm) de 2.0, foram acondicionadas em mamadeiras de vidro estéreis para tratamento dos camundongos. Esses procedimentos de crescimento bacteriano foram realizados para cada dia de tratamento a fim de limitar a perda de viabilidade da cultura e a degradação proteica das amostras.

## 2.2 Administração oral das linhagens de *L. lactis* produtoras de HSP65

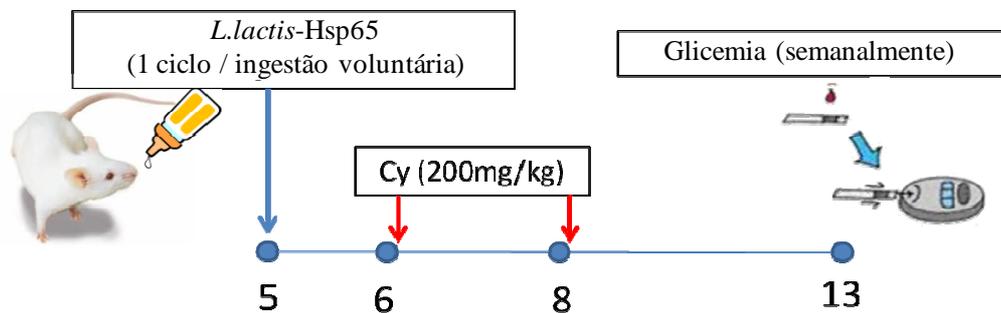
Camundongos receberam por via oral através da mamadeira o meio de cultura contendo cerca de  $5 \times 10^8$  UFC/mL. Como o consumo diário de líquido na mamadeira por animal é de cerca de 5ml e a concentração de HSP65 no meio de cultura foi estimando em 7µg/ml (de Azevedo et al., 2012), a dose diária por animal foi de  $2.5 \times 10^9$  UFC de *L. lactis* e 35µg de HSP65. De acordo com cada desenho experimental, os animais receberam um

ou mais ciclos de tratamentos consistindo de quatro doses diárias seguidas ofertadas pela mamadeira.

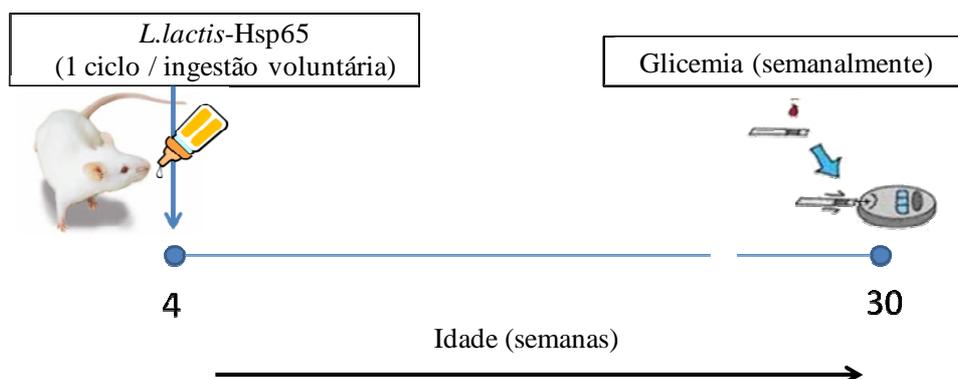
### 2.3 Protocolos experimentais para prevenção da diabetes em camundongos NOD

Utilizamos quatro protocolos experimentais para tentar prevenir o acometimento pela diabetes (Fig 2). No primeiro, uma e três semana após o tratamento de 4 dias consecutivos com LL-HSP65, injetamos 200mg/kg de ciclofosfamida (Cy) i.p. (Sigma) para assegurar a suscetibilidade dos camundongos à diabetes, visto que apenas 80 a 90% dos camundongos NOD (fêmeas) desenvolvem a doença espontaneamente. No segundo, terceiro e quarto protocolos, avaliamos a incidência espontânea da diabetes. No segundo, os animais receberam um ciclo de tratamento com LL-HSP65; no terceiro protocolo, eles receberam 3 ciclos de tratamento de LL-HSP65 e, no quarto protocolo, alternamos um ciclo de LL-IL-10 (*L.lactis* produtor de IL-10) e um ciclo de LL-HSP65 em cada semana, durante 6 semanas

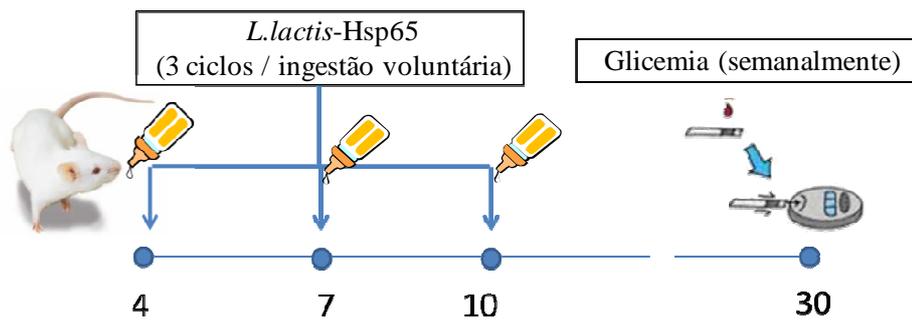
#### Protocolo nº 1 – Diabetes acelerada com ciclofosfamida



#### Protocolo nº 2 – Diabetes espontânea – 1 ciclo LL-HSP65



### Protocolo nº 3 – Diabetes espontânea – 3 ciclos LL-HSP65



### Protocolo nº 4 – Diabetes espontânea – Ciclos intercalados de LL-HSP65 e LL-IL-10

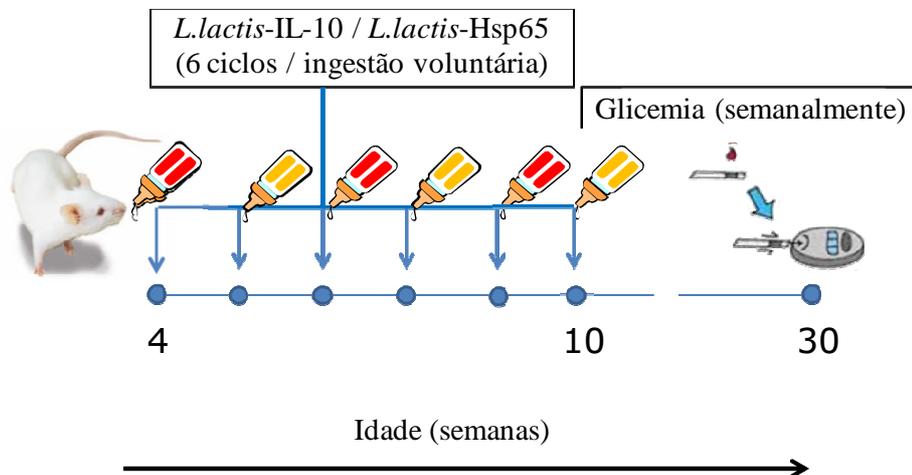


Figura 2. Protocolos de tratamento de camundongos NOD com *L. lactis produtor de Hsp65*

### 3. Avaliação da incidência de diabetes autoimune

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

### 4. Obtenção das amostras

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados e sacrificados para retirada do baço, linfonodos mesentéricos e pancreáticos, pâncreas, placas de Peyer e intestinos.

#### 4.1 Obtenção de suspensões celulares dos órgãos linfóides

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

#### 4.2 Obtenção de células da lâmina própria intestinal

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

### 4.3 Cultura de células com estímulo antigênico e coleta do sobrenadante da cultura

Foram adicionados 100 µl/ poço da suspensão de células na concentração de  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  células/ mL em uma placa de 96 poços. Foram utilizados 100 µl/ poço da solução contendo anti-CD3ε purificado (BD Pharmingen) como controle positivo, solução de peptídeo SHLVEALYLVCGERG (Proteimax) da cadeia β da insulina bovina (125 µl/ poço) e de meio (125 µl/ poço) para controle negativo de ativação. As células foram mantidas em cultura em uma estufa umidificada com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 48h, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas.

## 5. Ensaio imunoenzimáticos

### 5.1 ELISA para medida dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura celular

As placas de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais purificados (BD Pharmingen) reativos contra as citocinas IFN-γ e IL-10 de camundongo (segundo as concentrações recomendadas pelo fabricante) diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% Tween-20 (Sigma), e bloqueadas com caseína diluída em PBS (PBS-caseína), por no mínimo 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes coletados após 48 horas de cultura e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foi adicionada solução contendo anticorpos monoclonais marcados com biotina (BD Pharmingen) específicos para as citocinas IFN-γ e IL-10 de camundongo e as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology), em uma diluição de 1/15000, foi adicionada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A reação nas placas foi revelada pela incubação com o substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Orto fenildiamina, OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 10 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e lida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm. O cálculo da concentração de cada citocina foi realizado com base nos dados obtidos por uma curva padrão utilizando-se as citocinas recombinantes IFN-γ e IL-10 de camundongo (BD Pharmingen).

### 5.2. Ensaio de tolerância oral e Elisa para detectar anticorpos anti-ovalbumina

Camundongos NOD ou BALB/c fêmeas de 6 semanas de idade receberam tratamento oral com 20mg de ovalbumina (grau 3, Sigma) diluída em água (Grupo OVA oral) ou água (Grupo Água) por ingestão voluntária por 24 horas. Sete dias depois, os animais foram

imunizados com uma injeção i.p. de 0.2ml de solução salina contendo 10µg de OVA contendo 1mg de hidróxido de alumínio. Quatorze dias depois, os camundongos receberam a mesma dose de OVA solúvel em salina, i.p. Sete dias depois o soro foi coletado.

Placas de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com 2µg 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-caseína e foram distribuídas as amostras de soro de camundongos diluídos a partir de 1:200. Foram feitas diluições seriadas e utilizado soro de animal não imunizado como controle negativo da reação. As placas foram incubadas a 37°C por 1h e então lavadas com salina-tween e expostas a solução contendo anticorpos anti-IgG1 de camundongos ligados a peroxidase (*goat anti-mouse* IgG1-HRP, Southern Bioetch). Após uma hora de incubação a 37°C as placas foram novamente lavadas e então cobertas com solução reveladora contendo o substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 10 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e lida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm. Foi utilizado o método do somatório das absorbâncias em 8 diluições distintas para se comparar os valores de absorbância obtidos para cada animal.

### 5.3 Elisa para avaliar resposta imune humoral anti-*Salmonella*

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 semanas de idade receberam tratamento oral com LL-HSP65 e sete dias após foram infectados por gavagem com 10<sup>5</sup> CFU de *Salmonella typhimurium* em PBS. Sete dias depois os animais foram sacrificados e o soro foi colhido para análise da resposta humoral.

Placas de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com extrato de *Salmonella* (cultura inativada 3 vezes a 70°C) em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia posterior as placas foram bloqueadas com PBS-caseína e foram distribuídas as amostras de soro de camundongos controle infectados e tratados com LL-HSP65 sete dias antes da infecção. Foram feitas diluições seriadas e utilizado soro de animal não infectado como controle negativo da reação. As placas foram incubadas a 37°C por 1h e então lavadas com salina-tween e expostas a solução contendo anticorpos anti-IgG de camundongos ligados a peroxidase (*goat anti-mouse* IgG-HRP, Southern Bioetch). Após uma hora de incubação a 37°C as placas foram novamente lavadas e então cobertas com solução reveladora contendo o substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 10 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e

lida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm. Foi utilizado o método do somatório das absorbâncias em 4 diluições distintas para se comparar os valores de absorbância obtidos para cada animal.

## 6. Análise histopatológica do intestino após infecção por *Salmonella*

Amostras do íleo de camundongos foram colhidas sete dias após a infecção por *Salmonella* e foram armazenado em formalina tamponada a 10%. Após, o material foi desidratado em soluções crescentes de alcoóis, clarificado em xilol e incluído em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos e, após coloração por Hematoxilina e Eosina, foram avaliados qualitativamente e quantitativamente quanto ao infiltrado inflamatório e grau de destruição da arquitetura intestinal em microscópio óptico (Olympus BX41) conectado a câmera para registro fotográfico (Moticam 2500).

## 7. Citometria de Fluxo

### 7.1 Imunofenotipagem de linfócitos e células dendríticas

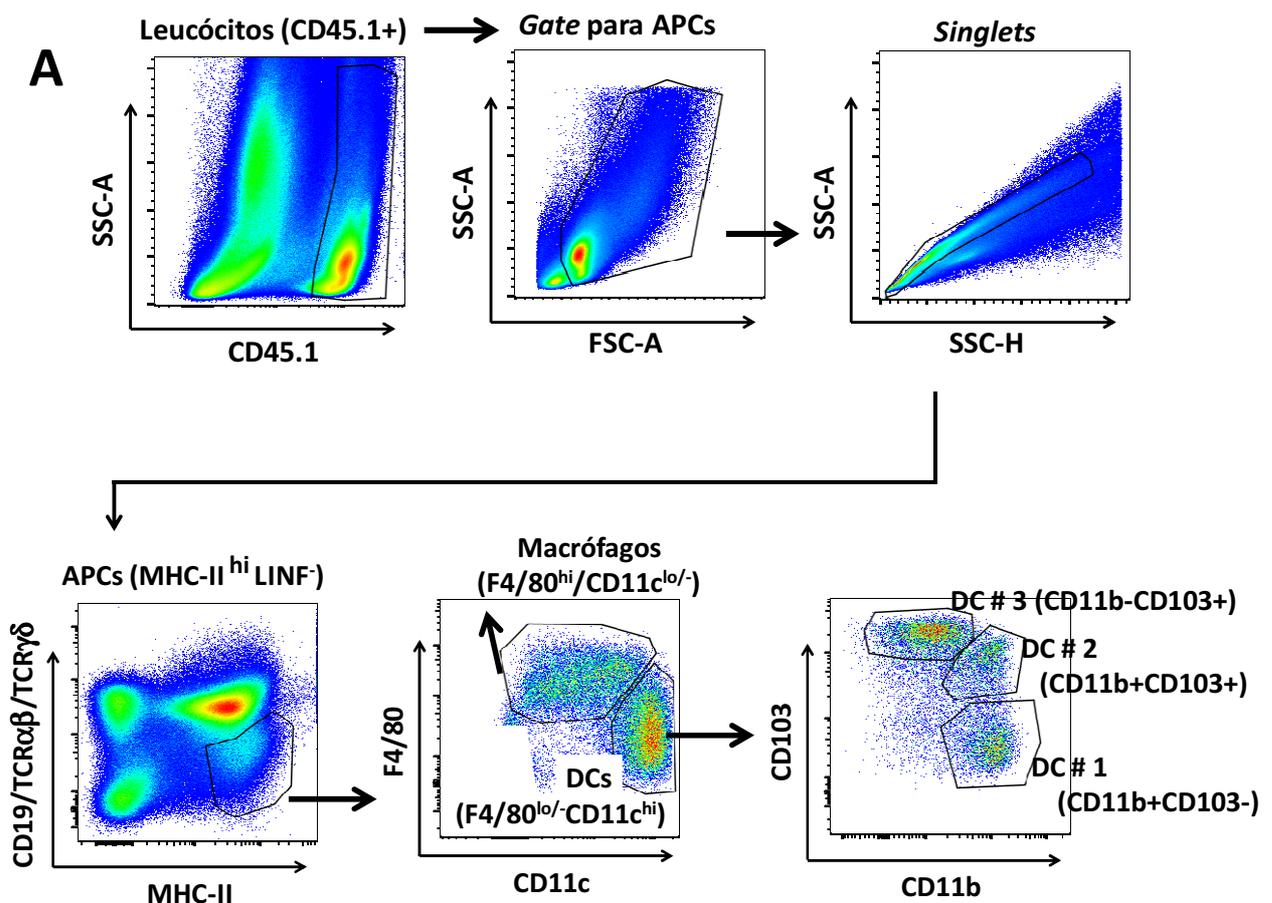
Depois de isoladas dos órgãos linfoides, as células foram incubadas em tubos de poliestireno por 10min com anticorpo *Fc-block* (BD Pharmingen) e então por mais 20 minutos a 4°C com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos FITC, PE, PE-Cy5.5, APC, PE-Cy7, APC-Cy7, e BV421 reativos para moléculas de superfície. Para a marcação intracelular do fator de transcrição foxp3 e de citocinas, após essa primeira etapa, foi utilizado *kit* de fixação/permeabilização comercial (e-Bioscience) e em seguida as amostras foram incubadas por mais trinta minutos com anticorpos anti-foxp3-PE ou anti-IFN-γ APC e anti-IL-17 PE de camundongo. Após as lavagens com PBS-BSA (albumina sérica bovina 0.5%), as amostras foram fixadas com paraformaldeído 3% durante 30 minutos, lavadas e armazenadas em PBS-BSA a 4°C para leitura no citômetro. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura de seis parâmetros FACScalibur (Becton Dickinson) acoplado a um computador com o software *Cell Quest* (Becton Dickinson), ou em FACScanto (Becton Dickinson), ou no FACS LSRII (Becton Dickinson) acoplados a um computador com o software Diva (Becton Dickinson). 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 linfócitos ou células dendríticas e, a partir destas, foram gravados 50 mil eventos para análise de linfócitos e 300 mil eventos para APCs para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra. Análises posteriores

foram feitas utilizando o software *FlowJo* (Tree Star) para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. A estratégia para determinação de cada população de interesse está esquematizada na Figura 3.

### 7.2 Estímulo *in vitro* para avaliar a produção de citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$

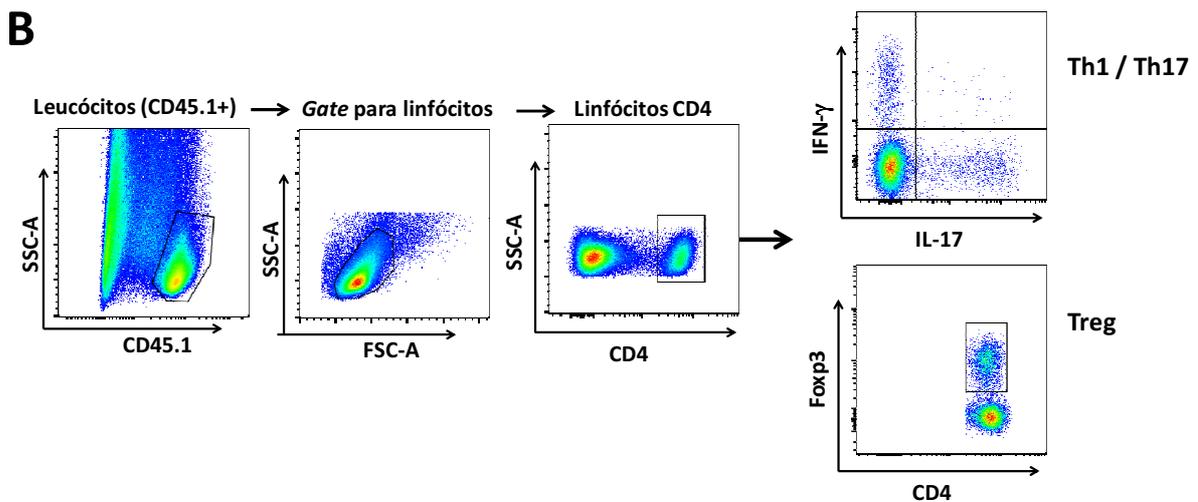
Para estimular a síntese de citocinas as células isoladas foram mantidas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, 50ng/ml PMA (Sigma) e 500ng/ml de ionomicina (Sigma) por 4h, após tal período foi adicionado 0.66 $\mu$ l de monensina para cada ml de meio (Golgi Stop, BD) e após mais 2h de incubação as células foram colhidas, centrifugadas, lavadas e utilizadas para as marcações de superfície e intracelulares.

### 7.3 Estratégias de determinação das populações de interesse por citometria de fluxo

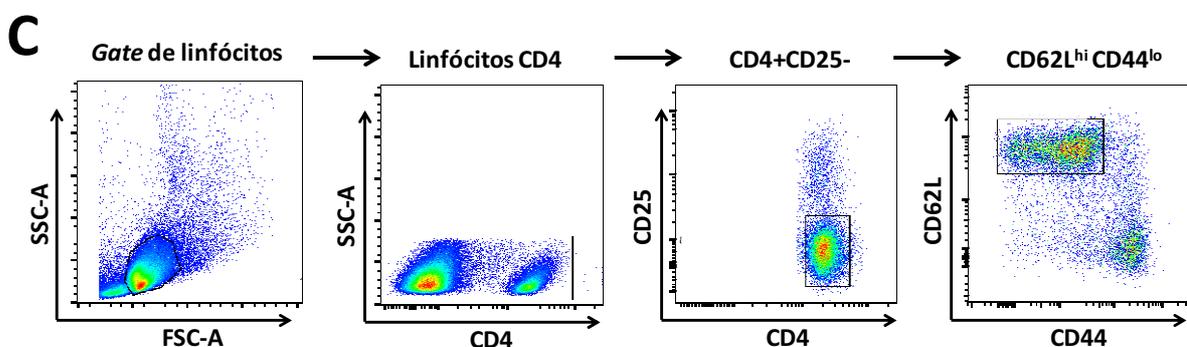


**Figura 3A. Imunofenotipagem de células apresentadoras de antígenos (APCs).** As células extraídas dos linfonodos mesentéricos, pancreáticos e da lâmina própria do intestino delgado e do cólon foram avaliadas por citometria de fluxo. Primeiro foram selecionadas células expressando CD45.1 (leucócitos totais), com tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC-A) padrão (*gate*

para APCs), e não agregadas entre si (*singlets*). Em seguida foram selecionadas as APCs após exclusão de linfócitos B e linfócitos T (CD19/TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ ) e inclusão de células com alta expressão de MHC-II. Destas células, as que possuíam expressão elevada de F4/80 (hi) e média ou baixa expressão de CD11c foram consideradas macrófagos. As células restantes (CD11c<sup>hi</sup>) foram consideradas DCs. Dentre as DCs foram identificados 3 subtipos de acordo com a expressão de CD11b e CD103. Os *dot plots* acima representam células extraídas da lâmina própria do Cólon, mas a mesma estratégia foi utilizada para os demais órgãos.



**Figura 3B. Imunofenotipagem de células Treg, Th1 e Th17.** As células extraídas dos linfonodos mesentéricos, pancreáticos e da lâmina própria do intestino delgado e do cólon foram avaliadas por citometria de fluxo. Linfócitos T *helper* foram identificados através da seleção de células expressando CD45.1 (leucócitos totais), com tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC-A) padrão (gate para linfócitos), e CD4 (linfócitos). Em seguida foram selecionadas células IL-17<sup>+</sup> (Th17) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Th1) ou Foxp3<sup>+</sup> (Treg). Os *dot plots* acima representam células extraídas da lâmina própria do Cólon, mas a mesma estratégia foi utilizada para os demais órgãos.



**Figura 3C. Estratégia para separação de linfócitos T *naive* utilizados para co-cultura com células dendríticas *in vitro*.** Esplenócitos foram submetidos a *cell sorting* para isolamento de

linfócitos T *naive*. Foram selecionadas células de tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC-A) padrão (*gate* para linfócitos), e que apresentavam o fenótipo: CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD62L<sup>hi</sup> e CD44<sup>lo</sup>. As células obtidas foram incubadas *in vitro* com células dendríticas do subtipo 2 selecionadas conforme esquematizado na figura 3A.

#### 7.4 Separação de células por cell sorting e co-cultura de células T e DCs

Após a marcação das células com anticorpos ligados a fluorocromos, as amostras foram submetidas a cell sorting em equipamento FACSaria (BD) mantido em cabine de segurança biológica. Foram obtidas as populações de interesse (linfócitos T *naive* - CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup> - do baço e células dendríticas (DCs) do subtipo 2 - CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> - dos linfonodos mesentéricos) conforme a Figura 3. Foram utilizadas para o ensaio de co-cultura 3x10<sup>5</sup> DCs para 9x10<sup>5</sup> linfócitos T CD4 *naive* (proporção 1:3). As células foram mantidas por 72h em cultura a 37°C/5%CO<sub>2</sub> com ou sem estímulo de anti-CD3e a 0.1µg/ml. Após este período as células foram colhidas e utilizadas para identificação de frequência de células CD4<sup>+</sup> que passaram a expressar o fator de transcrição foxp3 por citometria de fluxo

### 8. PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica de citocinas

Amostras do intestino delgado e do cólon foram extraídas e imediatamente armazenadas em microtubos contendo o reagente RNeasy (Life Technologies) *overnight* a 4°C com o objetivo de preservar a integridade do RNA tecidual. Posteriormente, as amostras foram lisadas em homogeneizador Precellys (Bertin) em tubos contendo esferas de látex para rompimento das células e liberação dos ácidos nucleicos. O RNA total foi extraído seguindo-se as recomendações do kit RNeasy (QIAGEN) e após dosagem em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo) e confirmação da razão de absorbância A260/A280 entre 1.8 e 2.0, 1µg de RNA foi utilizado para síntese de cDNA pela transcriptase reversa utilizando-se o kit de síntese qScript (Quanta Biosciences). O cDNA foi utilizado para reação de PCR em tempo real pelo método TaqMan. Foram utilizados *primers* comerciais ligados a fluoróforos e *quenchers* (Applied Biosystems) para cada gene de interesse (IL-6 Mm00446190\_m1; IL-12 Mm00434174\_m1; IL-10 Mm00439614\_m1). As reações de PCR foram realizadas em volume de 20µl em placas de 96 poços (MicroAmp optical, Applied Biosystems) utilizando-se o reagente PerfeCTa FastMix II (Quanta Biosciences) (no equipamento 7900HT Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems). As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 95°C por dois minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 10 segundos e 60°C por trinta segundos. Os resultados foram expressos a partir da medida do

ciclo *threshold* de cada gene avaliado em relação à amplificação do controle endógeno GAPDH, de acordo com a fórmula  $2^{-\Delta ct}$ .

### 9. Determinação da ativação de NF-κB via TLR por HSP65

Utilizamos o ensaio de gene repórter luciferase para determinação da capacidade do sobrenadante de LL-Hsp65 em ativar a transcrição de NF-κB.  $10^6$  Células HEK293 (ATCC) foram cultivadas em placas de 24 poços por 24h em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram transfectadas utilizando polyethylenimine (PEI) com 1 μg de pcDNA3-TLR, cDNA correspondente ou vetor DNA (pcDNA3, Invitrogen) e 200ng de plasmídeo NF-κB-Luc contendo o gene sintético de vaga-lume *luc2* sob controle de NF-κB control. Todas as células foram também transfectadas com 50ng do plasmídeo controle pRL-TK contendo o gene luciferase de *Renilla reniformis* (*hRluc*) para normalizar a eficiência da transfecção. Após a transfecção, as células foram mantidas *overnight* em DMEM contendo 1% de soro fetal bovino. No dia seguinte as células foram tratadas com os agonistas de TLR2 e TLR4 (PAMCSK4 – 1μg/ml, LPS - 1μg/ml e Zymozan - 1μg/ml) ou com 100 μL do sobrenadante de cultura de *L. lactis* ou *L. lactis*-Hsp65 por 24 horas a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. As células foram então tratadas com tampão de lise e após incubação do lisado com o substrato da luciferase, como determinado pelo protocolo do fabricante (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Pomega), a atividade da luciferase foi quantificada em luminômetro (LumiCount, Packard) através da normalização da atividade de *luc2* de acordo com o controle *hRluc* e os valores obtidos foram utilizados para comparar a transcrição de NF-κB em cada condição de estímulo.

### 10. Avaliação da permeabilidade intestinal em camundongos NOD.

Camundongos NOD ou BALB/c foram mantidos em jejum por 4h e então receberam gavagem de 200μl de solução de FITC-dextrano a 8mg/ml em PBS. Quatro horas mais tarde o soro foi coletado para dosagem da concentração do composto em cada amostra, baseando-se na leitura de fluorescência e numa curva padrão, em espectrofotômetro a 520nm.

### 11. Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do Teste t ou análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de Tukey para computar diferenças ente os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os resultados serão expressos

por meio da média  $\pm$  SEM (erro padrão) e foram gerados a partir do software GraphPad Prism 5.

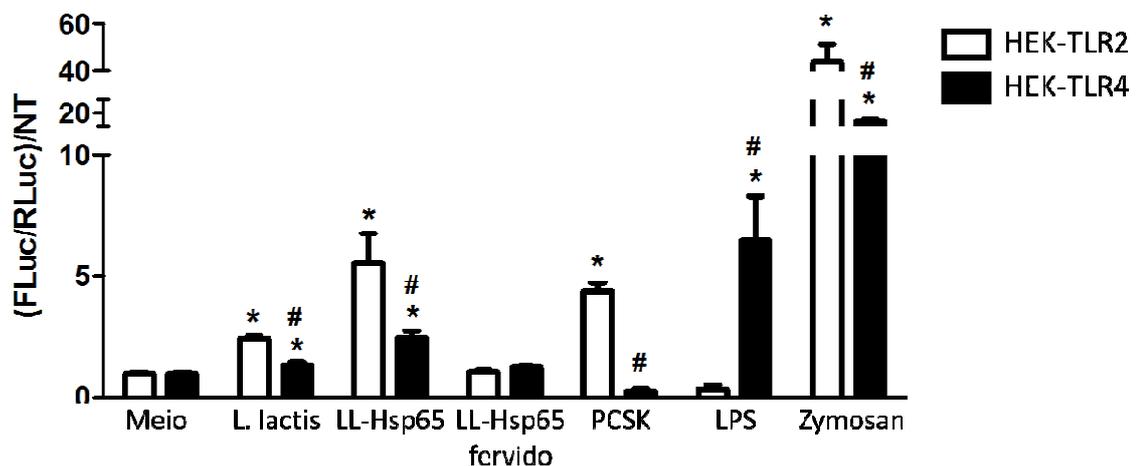
# Resultados



## Resultados

Os efeitos positivos obtidos na prevenção da EAE (Rezende et al., 2012) e da colite experimental (Gomes-Santos et al., 2014) suscitaram o interesse inicial deste trabalho em investigar os componentes envolvidos e os possíveis mecanismos imunorreguladores desencadeados pelo tratamento com *L.lactis* produtor de Hsp65.

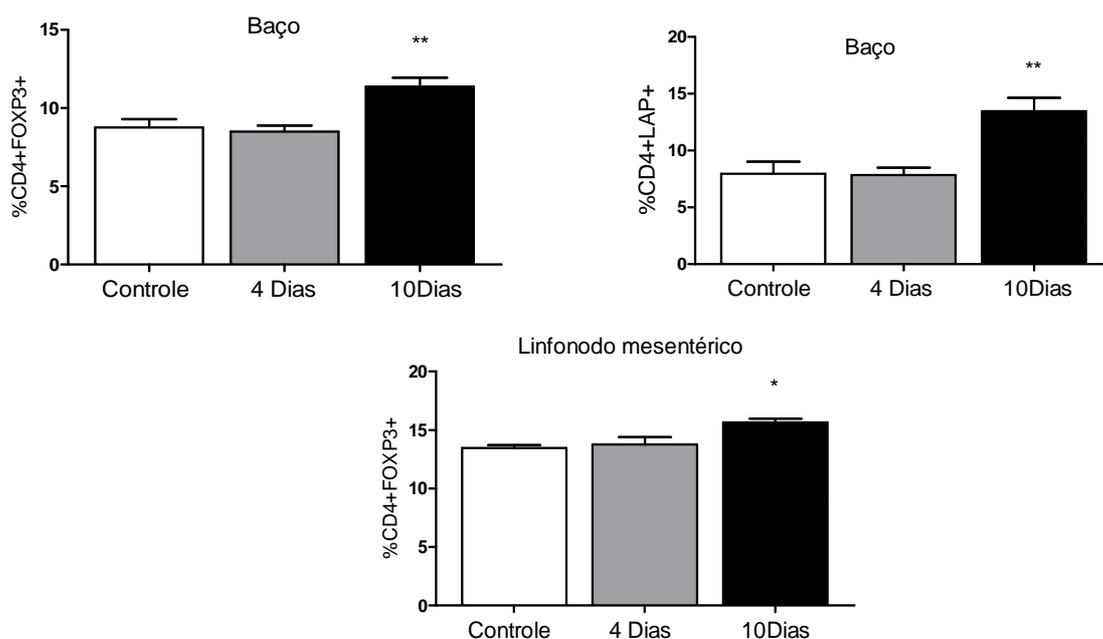
Supondo que a HSP65, ao entrar em contato com a mucosa intestinal, poderia estimular inúmeros tipos celulares através de receptores da imunidade inata, avaliamos os efeitos da estimulação *in vitro* com HSP65 em células HEK e utilizando um ensaio de transfecção verificamos que essa proteína, presente no sobrenadante da cultura de LL-Hsp65, é capaz de ativar a transcrição de NF-kB, em grau similar ao induzido por um outro ligante de TLR2, o PAM3CSk4. Essa ação estimuladora da HSP65 em células HEK ocorreu via TLR2, mas também em menor grau através de TLR4 (Fig.4). Para eliminar a possibilidade dos resultados estarem influenciados por contaminação por LPS, fervemos o sobrenadante de LL-Hsp65 (a fim de desnaturar a proteína e manter qualquer traço de LPS) antes de aplicar na cultura de células. Esse procedimento eliminou o efeito induzido somente por Hsp65, permitindo concluir que de fato o sobrenadante da cultura de *L. lactis* produtor de Hsp65 é capaz de ativar o fator de transcrição NF-kB através da estimulação de receptores TLR2.



**Figura 4. Sobrenadante de LL-Hsp65 induz a expressão de NF-kB via TLR2 e TLR4 *in vitro*.** Células HEK293-TLR2 (barras brancas) ou HEK293-TLR4 (barras pretas) foram transfectadas com o plasmídeo NF-kB - reporter luciferase e foram estimuladas por 24h com 100  $\mu$ L de sobrenadante de LL-Hsp65, sobrenadante de LL-Hsp65 fervido (100°C por 20 minutos), sobrenadante de *L. lactis* e os controles positivos PCSK e LPS e Zymosan (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). A determinação da atividade da luciferase foi determinada nos extratos celulares, e indiretamente indicou a ativação de NF-kB. Estão indicados os valores de leituras em luminômetro após a normalização com a razão entre a atividade de luciferase sobre os controles de transfecções. As

barras representam a média de dois experimentos constituídos de triplicatas  $\pm$  erro padrão. \* indica  $p < 0,05$  comparado ao meio, e # indica  $p < 0,05$  comparado a HEK293-TLR2 utilizando-se ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

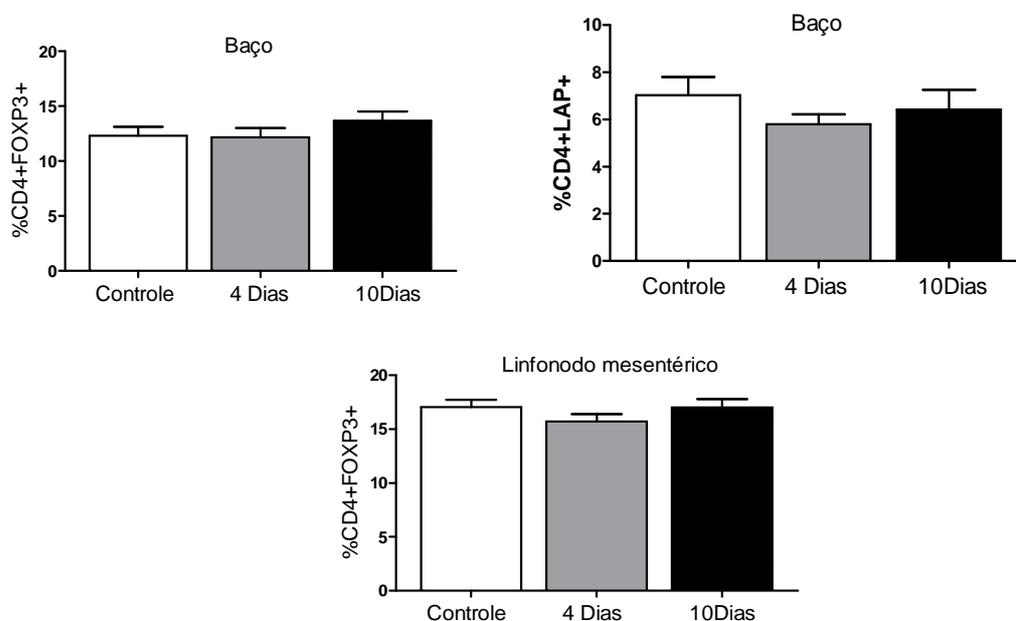
A partir do comprovado efeito estimulador da HSP65 *in vitro*, iniciamos a caracterização das alterações induzidas pelo tratamento nas subpopulações celulares *in vivo*. A indução de células Treg é um dos mecanismos propostos para o fenômeno da tolerância oral e, um dos efeitos descritos para as Hsps é induzirem a expansão de Tregs. De fato verificamos que camundongos C57BL/6 tiveram um aumento da frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no baço e nos linfonodos mesentéricos e de CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> no baço dez dias após o término o tratamento oral com *L. lactis* produtor de HSP65 (Fig. 5). Esse momento (10 dias após o tratamento) é exatamente quando as condições inflamatórias são induzidas nos modelos experimentais de EAE e de colite ulcerativa.



**Figura 5. Frequência de células Tregs após tratamento com LL-HSP65 em camundongos C57BL/6.** Animais receberam por quatro dias seguidos LL-HSP65 administrado por via oral e após 4 ou 10 dias foram sacrificados para avaliação por citometria de fluxo da frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> no baço e nos linfonodos mesentéricos. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \*\*( $p < 0.01$ ), \*( $p < 0.05$ ) teste ANOVA e pós-teste Tukey (n=4).

Para tentarmos correlacionar a ativação via TLR2 com os efeitos imuno protetores do LL-HSP65, verificamos se o aumento na frequência de Tregs também se reproduziria em camundongos deficientes em TLR2. Mais uma vez, a interação das HSPs com células do

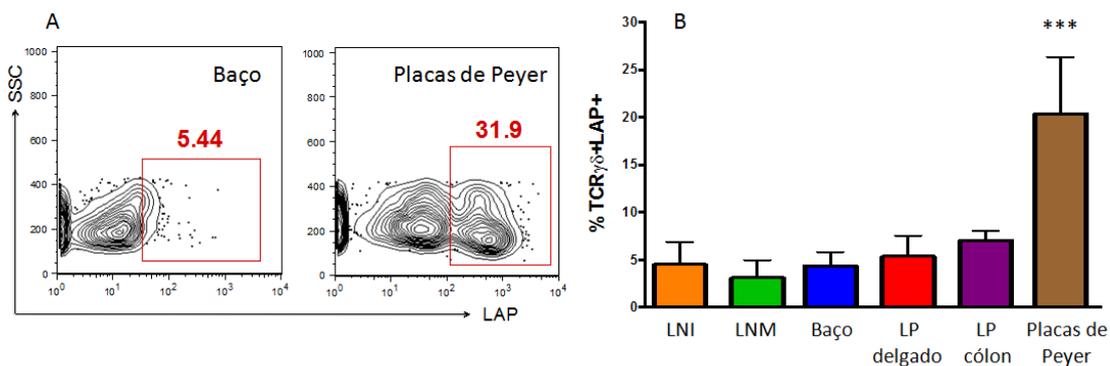
sistema imune via receptores do tipo toll se mostra importante, visto que em camundongos  $TLR2^{-/-}$ , o tratamento com *L.lactis*-HSP65 não alterou a frequência de células T reguladoras  $LAP^+$  (expressando  $TGF-\beta$  de membrana associado ao peptídeo LAP) ou  $Foxp3$  no baço e nos linfonodos mesentéricos (Fig. 6).



**Figura 6. Frequência de células Tregs após tratamento com LL-HSP65 em camundongos C57BL/6  $TLR2^{-/-}$ .** Os animais receberam, por quatro dias seguidos, LL-HSP65 administrado por via oral e, após 4 ou 10 dias, foram sacrificados para avaliação por citometria de fluxo da frequência de células  $CD4^+Foxp3^+$  e  $CD4^+LAP^+$  no baço e nos linfonodos mesentéricos. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. teste ANOVA e pós-teste Tukey (n=4).

No modelo experimental de EAE, concluímos que o efeito protetor do tratamento com LL-HSP65 foi dependente de células  $LAP^+$  visto que, após a sua depleção *in vivo* com anticorpos monoclonais anti-LAP, a inibição da autoimunidade não ocorreu (Rezende et al., 2012). Apesar do reconhecido papel de linfócitos T  $CD4^+LAP^+$ , sabemos que outras células do sistema imune podem também exercer papel supressor. Visto que o nosso tratamento envolve mecanismo inatos, a via de mucosa e um componente com efeitos pleiotrópicos como a HSP65, avaliamos também se células T expressando TCR gama delta ( $\gamma\delta$ ), que já foram descritas como importantes para o fenômeno da tolerância oral (Mengel et al., 1995; Fujihashi et al., 1999) e para o reconhecimento de *heat shock proteins* (Champagne, 2011) também poderiam participar do *pool* de células  $LAP^+$  com capacidade reguladora. De fato, verificamos que das células T  $\gamma\delta$  do baço, cerca de 5% expressavam LAP. Posteriormente, após uma

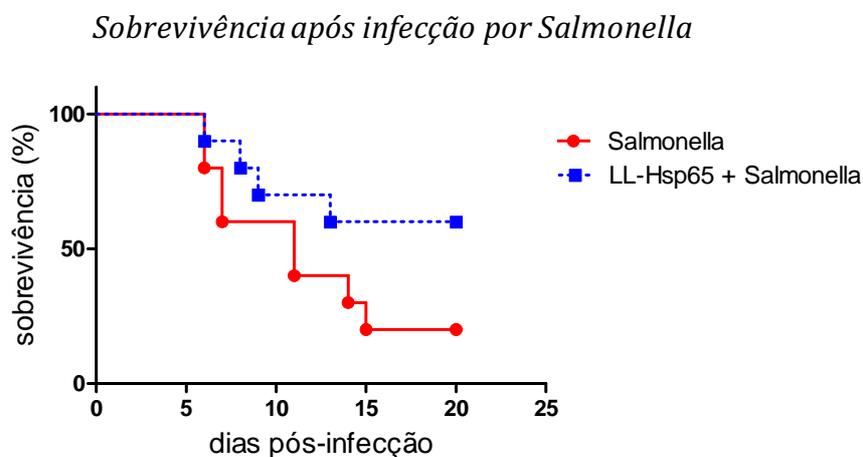
análise criteriosa de outros compartimentos linfóides, identificamos as placas de Peyer como o principal nicho desses linfócitos, onde elas estavam presentes em uma frequência cerca de cinco vezes maior (Fig. 7). Após essa descrição inicial, essa intrigante subpopulação de células  $\gamma\delta$ -LAP<sup>+</sup> foi completamente caracterizada e, seus efeitos imunorreguladores agindo como uma célula apresentadora de antígenos capaz de induzir a expressão de Foxp3 em linfócitos T via MHC-II foram demonstrados tanto *in vitro* como *in vivo* no trabalho desenvolvido por Rezende e colaboradores e recentemente submetido para publicação (Rezende et al., 2014 - Anexo 2).



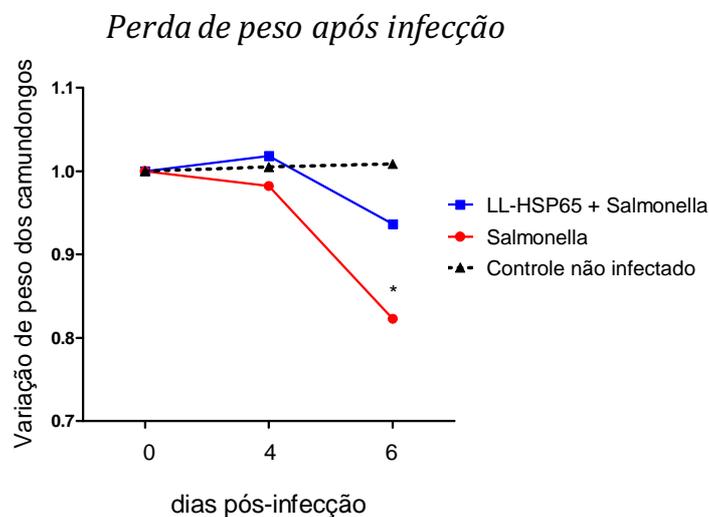
**Figura 7.** Frequência de células T  $\gamma\delta$  expressando LAP no baço, linfonodos inguinais e mesentéricos, lâmina própria e placas de Peyer do intestino de camundongos C57BL/6. Os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e processados para isolamento de células e sua avaliação por citometria de fluxo. (A) Plots representativos de FACS do baço e placas de Peyer. (B) Frequência de células CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> no baço, placas de Peyer, linfonodos inguinais (LNI), linfonodos mesentéricos (LNM), lamina própria (LP) do intestino delgado e do cólon. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos de três experimentos com um *pool* de 4 camundongos cada. Teste ANOVA e pós-teste Tukey.\*\*\*p<0.001

Entretanto, apesar da expansão de células reguladoras estar associado à modulação de doenças inflamatórias, um dos possíveis questionamentos sobre o valor clínico da tolerância induzida para Hsp65 é a possibilidade de tal efeito regulador gerar imunossupressão generalizada e, assim, aumentar a suscetibilidade do animal ou indivíduo tratado a infecções ou ao desenvolvimento de tumores. Para avaliar se o nosso tratamento seria seguro nesse sentido investigamos o efeito da administração de *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 na infecção pela bactéria entérica *Salmonella typhimurium*. Para nossa surpresa, além de não aumentar a taxa de mortalidade dos animais após a infecção (Fig. 8), o tratamento com HSP65 reduziu a perda de peso (Fig. 9), preservou a integridade do intestino (Fig. 10), e aumentou a concentração sérica de anticorpos anti-Salmonella (Fig. 11). Esse intrigante

resultado suscitou um novo interesse no uso dessa metodologia no estudo de infecções e dos danos teciduais causados pela inflamação que acompanha as doenças infecciosas.

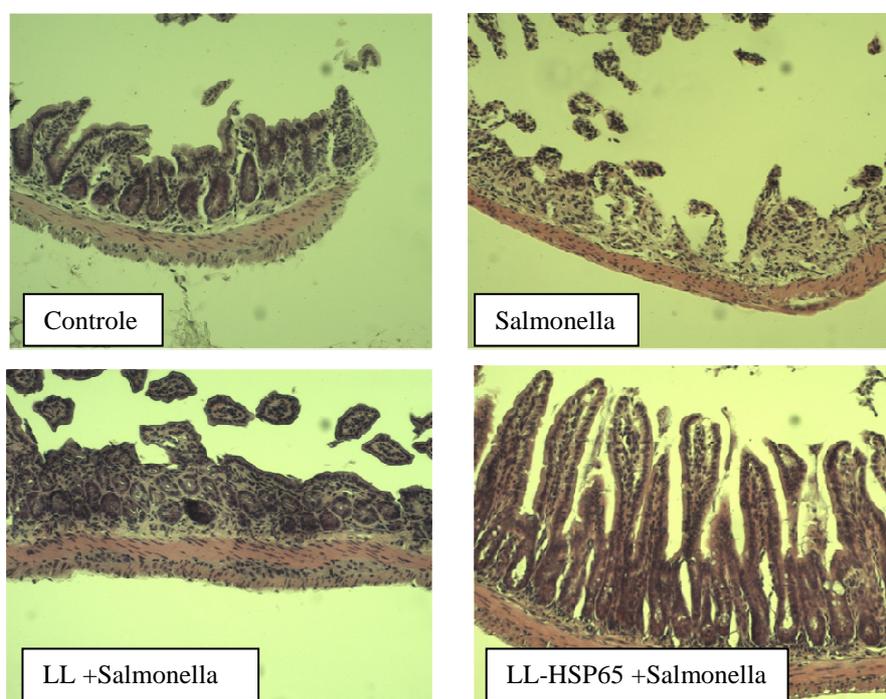
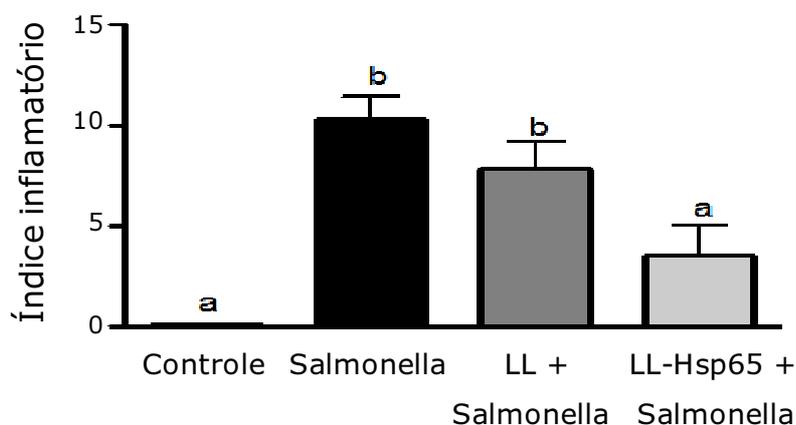


**Figura 8. Sobrevivência de camundongos C57BL/6 após desafio com *Salmonella typhimurium*.** Os animais receberam por quatro dias seguidos LL-HSP65 administrado por via oral e, após 7 dias, foram desafiados com gavagem de  $10^5$ CFU de *Salmonella typhimurium*. A mortalidade foi acompanhada e camundongos com perda de peso acima de 30% foram sacrificados (n=9).



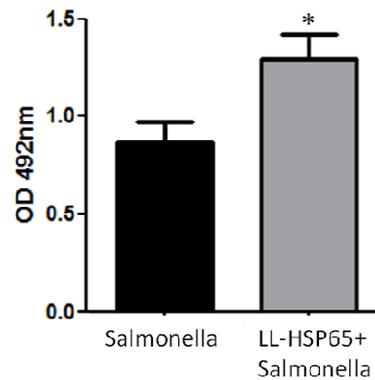
**Figura 9. Perda de peso após infecção com *Salmonella typhimurium*.** Os animais receberam por quatro dias seguidos LL-HSP65 administrado por via oral e após 7 dias foram desafiados com  $10^5$ CFU de *Salmonella typhimurium* e o peso dos camundongos ao longo da infecção foi comparado em relação ao peso inicial. (n=6)

### Índice inflamatório intestinal



**Figura 10. Índice inflamatório intestinal sete dias após desafio com *Salmonella typhimurium*.**

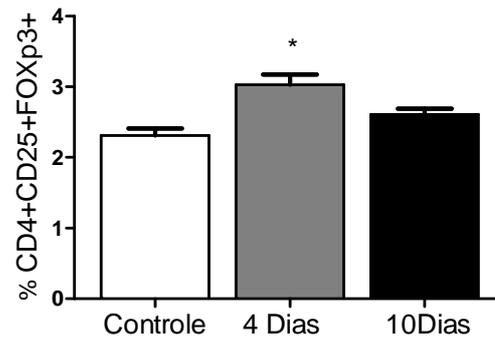
Os animais receberam por quatro dias seguidos LL-HSP65 administrado por via oral e, após 7 dias, foram desafiados com  $10^5$ CFU de *Salmonella typhimurium*. Sete dias depois, foram sacrificados e o íleo foi retirado para análise histológica. As barras representam o índice inflamatório que é uma composição do cálculo da perda da arquitetura intestinal e da presença de infiltrado inflamatório. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. (n=6).



**Figura 11. Resposta humoral sete dias após desafio com *Salmonella typhimurium*.** Os animais receberam por quatro dias seguidos LL-HSP65 administrado por via oral e, após 7 dias, foram desafiados com  $10^5$ CFU de *Salmonella typhimurium*. Sete dias depois, foram sacrificados e o soro foi coletado para análise de IgG específica anti-Salmonella por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. (n=6)

Portanto, a administração de LL-HSP65 por via oral se mostrou capaz de atenuar doenças inflamatórias em camundongos C57BL/6 que possuem mecanismos de geração e manutenção de tolerância preservados. Esse efeito parece se estender a processos inflamatórios induzidos por agentes infecciosos como a *Salmonella typhimurium*, mas não afeta negativamente a imunidade a esses agentes.

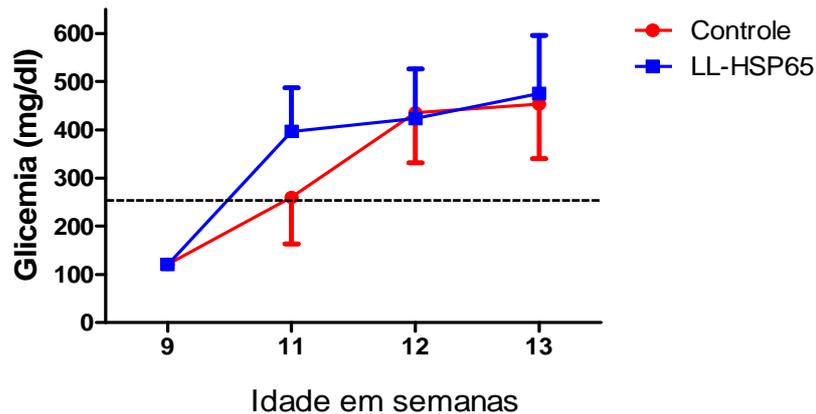
Passamos a avaliar se o mesmo procedimento seria também bem sucedido em camundongos NOD, animais que naturalmente desenvolvem diabetes autoimune e possuem diversas alterações no funcionamento do sistema imune. Apesar de também apresentarem aumento na frequência de células Treg no baço após o tratamento com *L. lactis*-HSP65, a cinética do aparecimento dessas células se mostra diferente entre a linhagem convencional C57BL/6 e os camundongos NOD. Nos camundongos NOD, houve um aumento rápido e transitório da frequência de Tregs que, após dez dias, retornou ao nível basal (Fig. 12).



**Figura 12 .** Frequência de células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> após tratamento com LL-HSP65 em camundongos NOD. Os animais receberam, por 4 dias seguidos, LL-HSP65 por via oral e, após 4 ou 10 dias, foram sacrificados para avaliação por citometria de fluxo da frequência de células Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) no baço. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. \* Indica diferença significativa no teste ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ) ( $n=4$ ).

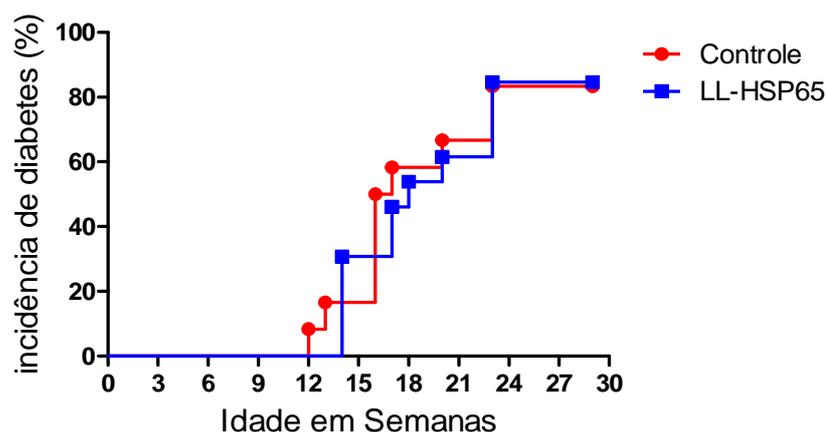
Visto que o *L. lactis*-HSP65 é capaz de aumentar a frequência de células Tregs em camundongos NOD, passamos então a avaliar o efeito desse tratamento oral na prevenção da diabetes autoimune. A primeira estratégia envolveu o uso de ciclofosfamida, um agente alquilante de DNA e que comprovadamente acelera o desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD (Harada and Makino, 1984). Essa estratégia é interessante já que naturalmente o quadro patológico demoraria cerca de 3 a 4 meses para se instalar. Tratamos os animais com *L.lactis*-HSP65 durante quatro dias por via oral e, após um intervalo de sete dias, a ciclofosfamida foi inoculada para desencadeamento da diabetes (protocolo nº1, Fig. 2). A glicemia foi avaliada semanalmente como parâmetro do desenvolvimento da doença autoimune, visto que, com a destruição das células beta do pâncreas, há uma progressiva redução na produção de insulina e a perda da capacidade de regulação do índice glicêmico. O tratamento não foi capaz de impedir a elevação da taxa sanguínea de glicose e cerca de quinze dias após a indução, ambos os grupos apresentavam hiperglicemia (Fig. 13).

Diante de achados da literatura demonstrando um efeito particular na eliminação das células T reguladoras pela ciclofosfamida, principalmente em camundongos NOD (Brode et al., 2006), entendemos que esse agente poderia interferir num possível efeito protetor da Hsp65. Passamos, então, a utilizar o modelo espontâneo de diabetes em NOD.



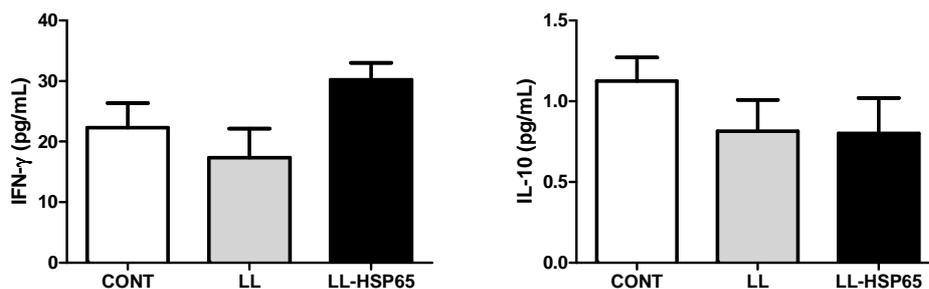
**Figura 13. Glicemia após a injeção de ciclofosfamida em camundongos NOD tratados com LL-HSP65.** Os animais receberam meio (controle) ou *L.lactis*-HSP65 (LL-HSP65) por via oral durante 4 dias consecutivos e, após 7 dias, receberam 2 doses de ciclofosfamida com intervalo de 2 semanas entre elas. A glicemia foi medida semanalmente. (n=5). O protocolo de tratamento está esquematizado na figura 2.

Inicialmente, mantivemos o protocolo de um ciclo de tratamento (4 administrações seguidas) de *L.lactis*-Hsp65 (protocolo nº2, Fig. 2), mas, devido ao insucesso (Fig. 14) desse regime, testamos, a seguir, três ciclos com *L.lactis*-Hsp65 com intervalos de 3 semanas entre os ciclos (protocolo nº3, Fig. 2).

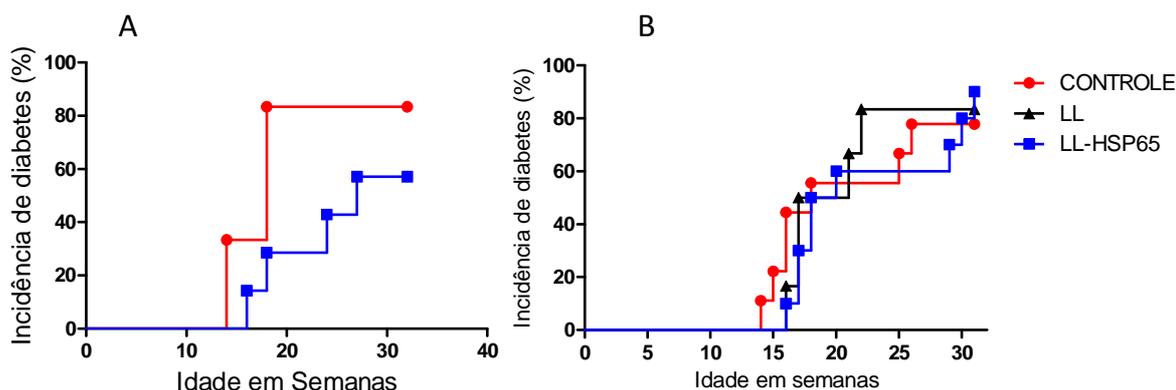


**Figura 14. Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com um ciclo de LL-HSP65.** Os animais receberam meio (controle) ou *L.lactis*-HSP65 (LL-HSP65) por via oral durante 4 dias consecutivos e a glicemia foi medida semanalmente. (n=8). O protocolo de tratamento está esquematizado na figura 2.

Nesse terceiro protocolo de tratamento foi incluído um grupo tratado com *L. lactis* controle contendo o vetor utilizado no *L.lactis* recombinante, porém vazio (grupo LL). Sacrificamos parte dos animais na 12<sup>a</sup> semana de vida e avaliamos a produção de citocinas *in vitro* após estímulo. O padrão de citocinas produzidas, IL-10 e IFN- $\gamma$ , não se alterou (Fig. 15). Não houve alterações na incidência de diabetes quando os animais foram acompanhados até a 30<sup>a</sup> semana de idade (Fig. 16A e B).



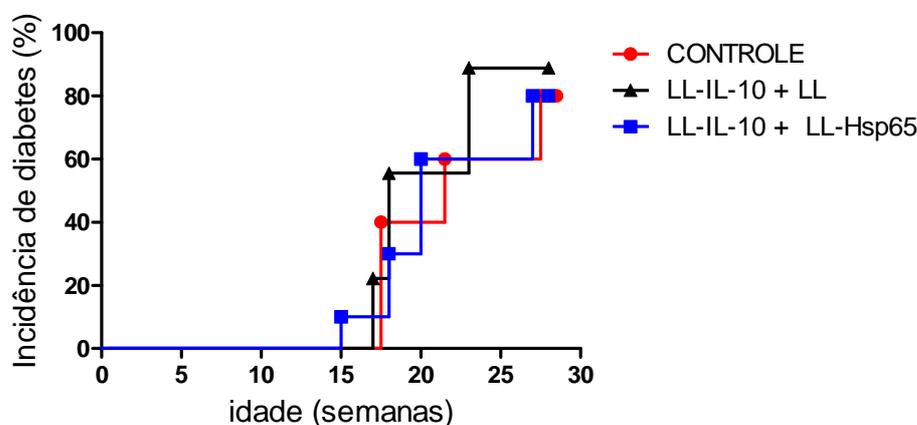
**Figura 15 . Produção de citocinas após estímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos NOD tratados com LL-HSP65.** Os animais receberam três ciclos de tratamento com meio (controle), *L. lactis* (LL) ou *L.lactis*-HSP65 (LL-HSP65) por via oral. Na 12<sup>a</sup> semana, os animais foram sacrificados e as células esplênicas incubadas por 48h a 37°C com 10 $\mu$ g/ml de peptídeo da cadeia beta da insulina. Foram medidos, nos sobrenadantes de cultura, as concentrações de IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA. As barras representam a média da concentração  $\pm$  erro padrão de cada grupo. ( $n = 8$ ).



**Figura 16. Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com três ciclos de LL-HSP65.** Os animais receberam três ciclos de meio (controle), LL-HSP65 ou LL (contendo o vetor vazio) por via oral e a glicemia foi medida semanalmente ( $n=8$ ). Cada ciclo equivale a 4 dias

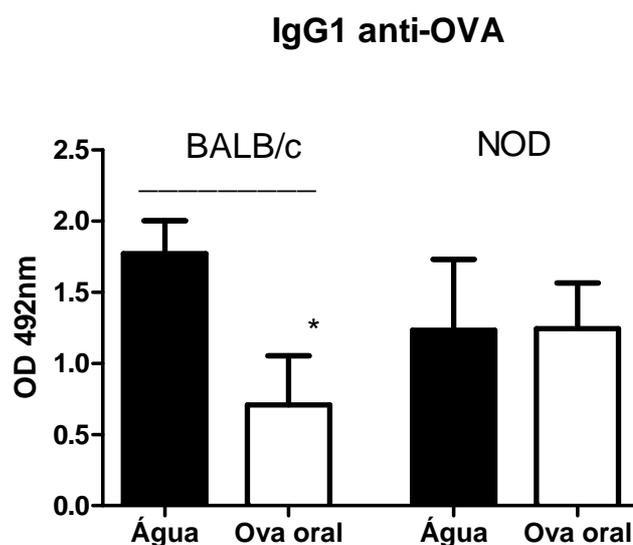
seguidos de tratamento por via oral. Dois experimentos diferentes foram conduzidos utilizando-se o mesmo protocolo (A e B). O protocolo de tratamento está esquematizado na figura 2.

Como o tratamento com *L.lactis*-HSP65 não foi suficiente para impedir o desenvolvimento da diabetes autoimune, levantamos a hipótese de que os camundongos NOD poderiam ser portadores de defeitos imunológicos também no tecido linfoide associado à mucosa intestinal. De fato, outros estudos na literatura relatam alterações funcionais de APCs, déficit de Tregs e um quadro inflamatório na mucosa de animais e pacientes diabéticos (Alam et al., 2010; Badami et al., 2011; Malaisse et al., 2004; Vaarala, 2011). Decidimos, a partir dessa constatação, associar à nossa estratégia de tratamento a administração de uma outra bactéria recombinante capaz de secretar a citocina anti-inflamatória IL-10 (protocolo nº4, Fig.2). A administração oral de IL-10 já foi demonstrada como uma maneira eficiente de reforçar a indução de tolerância oral (Slavin et. al., 2001), e em condições em que o tecido linfoide associado à mucosa não se apresenta no seu estado normal de funcionamento, os efeitos reguladores dessa citocina poderiam ser benéficos. Entretanto, nem mesmo a co-administração de *L.lactis*-HSP65 e *L.lactis*-IL-10 impediu a instalação do quadro diabético nos camundongos NOD (Fig. 17).



**Figura 17. Incidência de diabetes em camundongos NOD tratados com LL-IL-10 + LL-HSP65.** O grupo LL-IL-10+LL-Hsp65 recebeu de forma alternada três ciclos de LL-IL-10 e 3 ciclos de LL-HSP65. O grupo LL-IL-10+ LL recebeu de forma alternada três ciclos de LL-IL-10 e 3 ciclos de LL (contendo o vetor vazio) desde a quarta semana de vida. O grupo Controle recebeu apenas meio. A glicemia foi medida semanalmente (n=8). Cada ciclo equivale a 4 dias seguidos de tratamento por via oral. O protocolo de tratamento está esquematizado na figura 2.

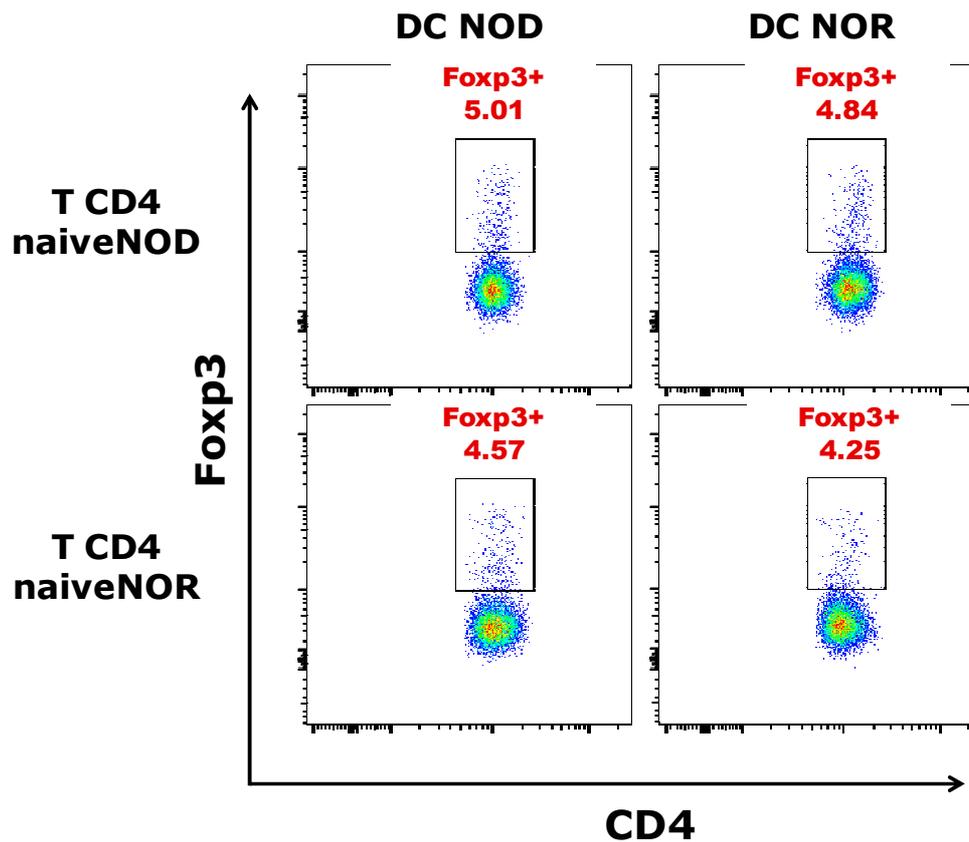
Os achados experimentais dos estudos de administração oral de *L.lactis*-HSP65 nos modelos de EAE e colite ulcerativa mostravam que o mecanismo de proteção alcançado pelo LL-HSP65 se relacionam com o fenômeno da tolerância oral. Assim, diante desses sucessivos resultados negativos no modelo de diabetes espontânea, nossa hipótese principal era de uma falha importante nos mecanismos de indução de tolerância oral e de células Treg na mucosa intestinal dos camundongos NOD. O próximo passo foi, então, investigar se esse processo fisiológico de incorporação antigênica (a tolerância oral) estaria preservado na linhagem de camundongos NOD. Em geral, todas as linhagens de camundongos selvagens e imunocompetentes até então testadas desenvolvem tolerância a antígenos previamente contatados pela mucosa intestinal quando utilizamos o protocolo de ingestão contínua (Faria et al., 2003). Para nossa surpresa, camundongos NOD se mostraram resistentes à indução de tolerância oral (identificada como supressão da produção de anticorpos séricos anti-OVA) e ambos os grupos de camundongos NOD produziram resposta imune similar (Fig. 18).



**Figura 18. Avaliação da indução de tolerância oral em camundongos NOD.** Camundongos NOD ou BALB/c fêmeas receberam 20mg de solução contendo 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 OVA e hidróxido de alumínio – Al(OH)<sub>3</sub>. Quatorze dias depois, os camundongos receberam um *booster* de OVA solúvel. Os anticorpos IgG1 anti-Ova foram medidos por ELISA. As barras representam a média ± SEM de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatística entre os grupos, utilizando o teste T ( $P < 0.05$ ).

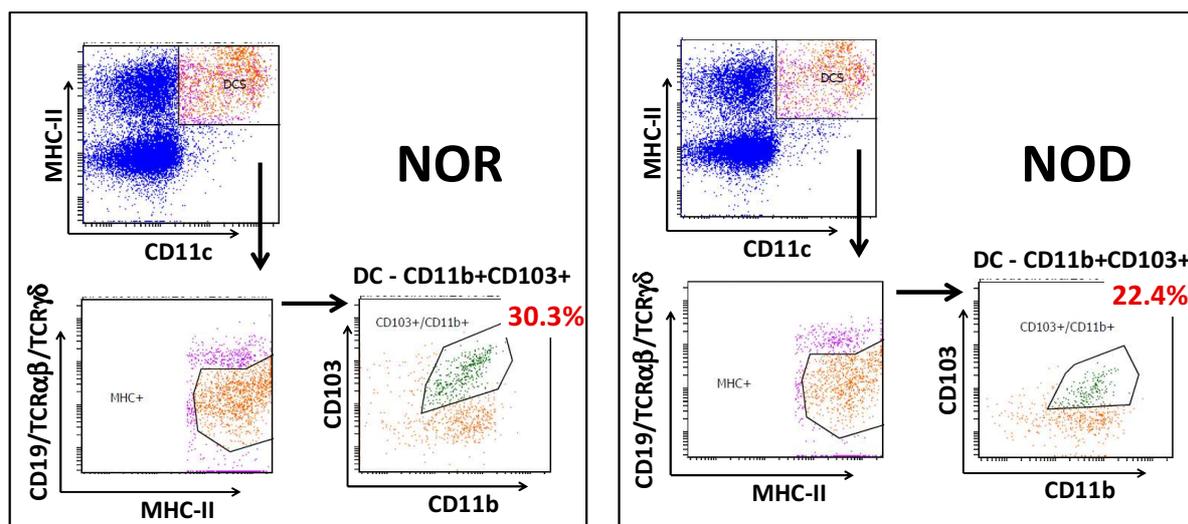
A partir dessa confirmação da falha na indução de tolerância oral nos camundongos NOD, o objetivo do nosso estudo passou a ser identificar e entender as possíveis alterações na fisiologia intestinal e funcionamento do tecido linfóide associado à mucosa nos camundongos NOD.

A participação de células T reguladoras induzidas na periferia (iTregs) já foi demonstrada como um dos mecanismos para o estabelecimento da tolerância oral (Mucida et al., 2005; Curotto de Lafaille et al., 2008) e um possível defeito na geração desses linfócitos T sempre foi grande alvo de debate na literatura envolvendo doenças autoimunes, principalmente na diabetes tipo 1. Sabe-se que células dendríticas  $CD11c^+CD11b^+CD103^+$  são capazes de produzir ácido retinóico e TGF- $\beta$ , migram da lâmina própria do intestino delgado para os linfonodos mesentéricos onde induzem a diferenciação de células T CD4 expressando Foxp3 a partir de linfócitos naive (Mucida et al., 2007; Coombes et al., 2007). Uma forma de reproduzir esse processo *in vitro* é isolando-se, por *cell sorting*, células dendríticas e células T *naive* de camundongos e, através de co-cultura das mesmas, avaliar a expressão do fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos inicialmente negativos para tal. Visto que os camundongos NOD e NOR compartilham o mesmo haplótipo de MHC, pudemos realizar co-culturas utilizando diferentes combinações de DCs e células T *naive*, como esquematizado na figura 19. Entretanto, utilizando como estímulo DCs originadas da linhagem NOD ou NOR, não houve diferença na indução de Foxp3 nas células T *naive* de ambas as linhagens de camundongo (Fig. 19).



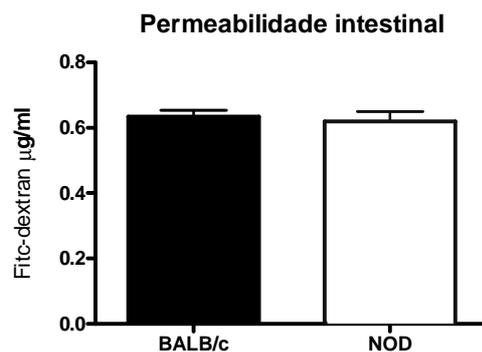
**Figura 19. Avaliação da capacidade de indução de Tregs por DCs de camundongos NOD.** Células dendríticas (DCs -  $CD11b^+CD103^+$ ) foram isoladas por *cell sorting* como demonstrado na figura 20. Linfócitos T *naive* ( $CD4^+CD25^-CD62L^{hi}CD44^{lo}$ ) foram isolados por *cell sorting* conforme demonstrado na figura 3C. DCs de camundongos NOD e NOR foram cultivadas com células T *naive* de camundongos NOD e NOR em combinações alternadas na presença de estimulação por anticorpos monoclonais anti-CD3 $\epsilon$ . Setenta e duas horas depois, as células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação da frequência de células T  $CD4^+$  expressando o fator de transcrição Foxp3. Os *dot plots* e as frequências de células  $CD4^+Foxp3^+$  acima representam o resultado de um experimento com um *pool* de 7 animais..

Entretanto, apesar de não ter havido diferença na capacidade de indução de Tregs por DCs de camundongos NOD e NOR, quando analisados os perfis celulares obtidos durante o procedimento de separação das células dos linfonodos mesentéricos desses animais, nota-se uma menor frequência de células  $CD11c^+CD11b^+CD103^+$  em camundongos NOD quando comparados com os camundongos NOR (Fig 20).



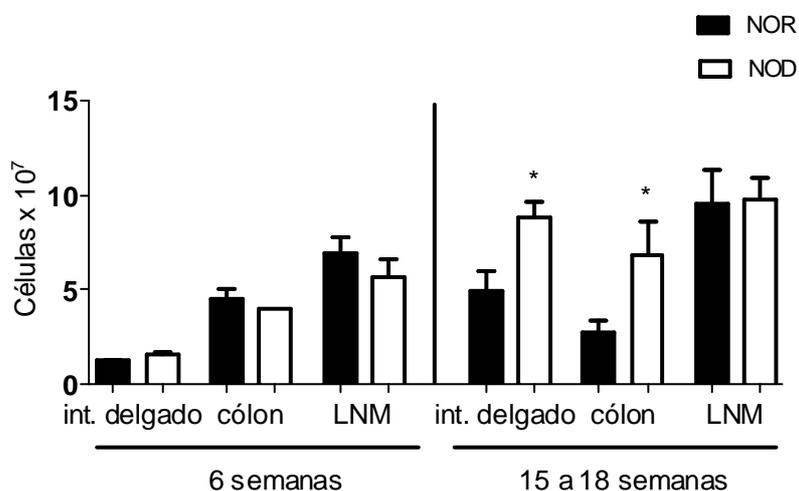
**Figura 20.** Frequência de DCs  $CD11b^+CD103^+$  obtidas durante a separação celular (*cell sorting*) nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOR e NOD utilizando-se a expressão das moléculas de MHCII, CD11c, CD11b e CD103. Células dendríticas (DCs) foram selecionadas obtendo-se a população  $CD11c^+MHC-II^{hi}CD11b^+CD103^+$ . Um canal de fluorescência foi utilizado para exclusão de linfócitos B e linfócitos T ( $CD19/TCR\alpha\beta/TCR\gamma\delta$ ), e através dos marcadores MHCII, CD11c, CD11b e CD103 foram selecionadas as DCs do subtipo 2 ( $CD11b^+CD103^+$ ), seguindo a classificação esquemática adotada neste trabalho. Os gráficos representam os perfis celulares obtidos pelo programa Diva (BD) durante a separação de DCs dos linfonodos mesentéricos. Foi utilizado um *pool* de 7 camundongos de cada uma das linhagens (NOD e NOR). Em vermelho encontra-se a frequência de DCs  $CD11b^+CD103^+$  em cada amostra.

Avaliamos em seguida a permeabilidade intestinal nesses animais em período anterior ao acometimento pela diabetes, uma vez que em muitas doenças inflamatórias do intestino, ocorre um aumento da translocação microbiana e antigênica. Entretanto, não houve diferença na concentração do composto conjugado FITC-dextrano no soro de camundongos NOD e BALB/c quatro horas após a administração intragástrica deste (Fig. 21). Isto sugere que a permeabilidade intestinal, medida por esse método, não está alterada na linhagem NOD na idade de seis semanas.



**Figura 21. Avaliação da permeabilidade intestinal em camundongos NOD.** Camundongos NOD ou BALB/c receberam gavagem de 200µl de solução de FITC-dextrano a 8mg/ml em PBS. Quatro horas mais tarde, o soro foi coletado para dosagem, em espectrofotômetro, da concentração do composto em cada amostra, baseando-se numa curva padrão. As barras indicam a média  $\pm$  SEM de 5 animais por grupo.

Partimos então para a caracterização das subpopulações de células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos Th1, Th17 e Treg na lâmina própria da mucosa intestinal e nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos.

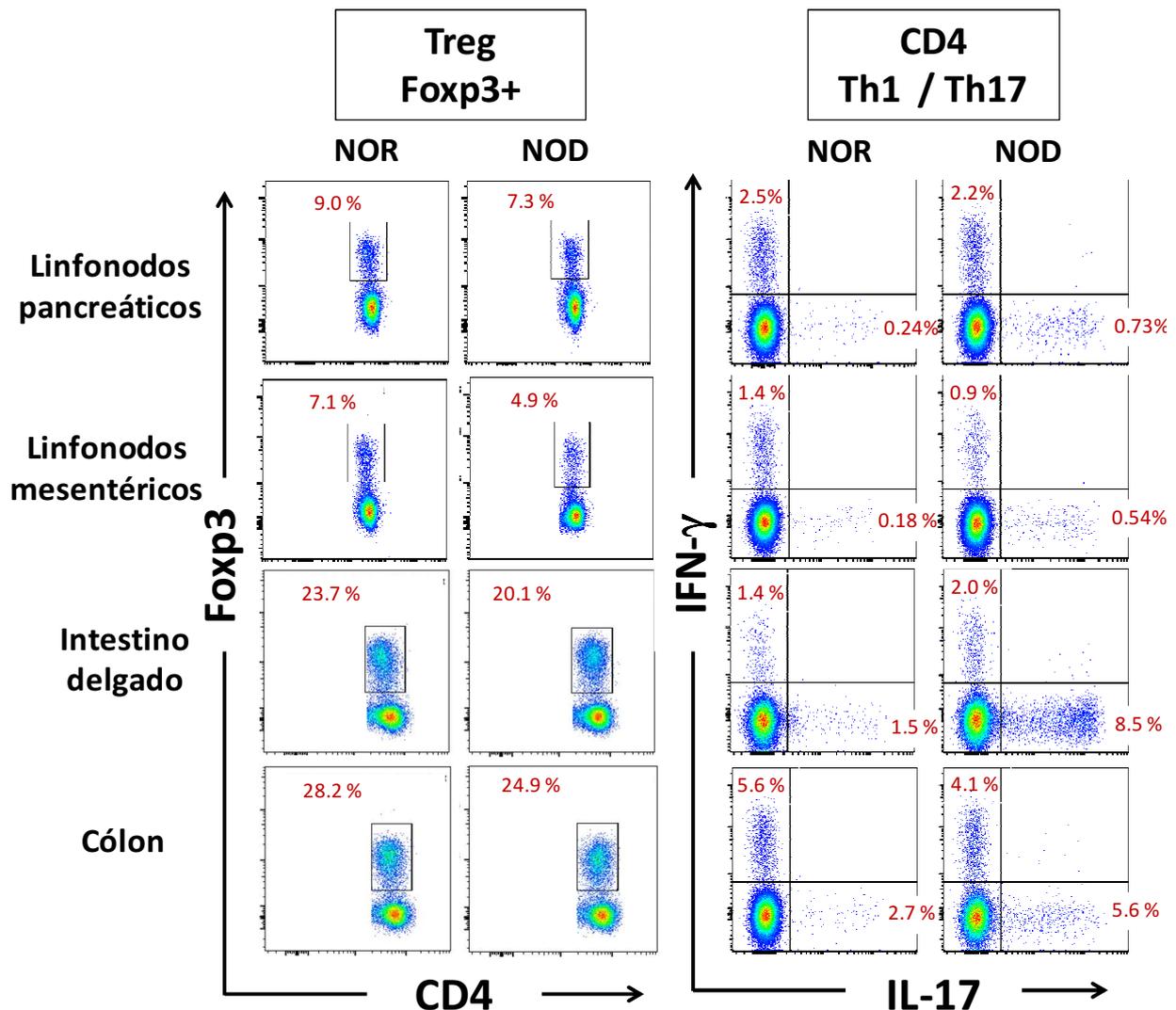


**Figura 22. Contagem total de células extraídas em camundongos NOD e NOR.** Os linfonodos mesentéricos (LNM) e intestinos foram removidos e após processamento as células foram extraídas e contadas. As barras representam a média  $\pm$  SEM do número total de leucócitos viáveis por animal obtidos em três experimentos (6 semanas) e quatro experimentos (15 a 18 semanas) distintos compostos por um *pool* de 4 animais em cada.\*indica diferença estatística  $p < 0.05$  utilizando-se teste t.

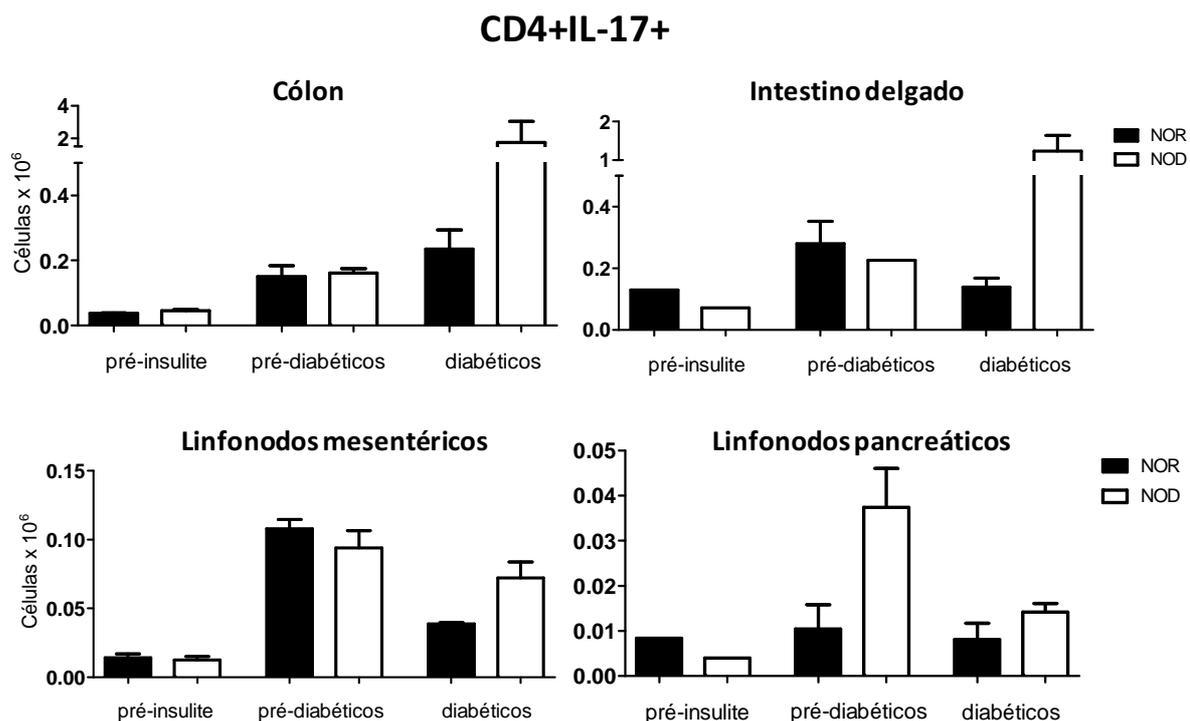
---

Observamos um aumento evidente do número de células totais presentes tanto no cólon, quanto no intestino delgado de camundongos NOD com relação aos camundongos NOR na idade de 15 a 18 semanas (Fig. 22). Nessa idade, os camundongos NOD já apresentam insulite e alguns animais têm a glicemia elevada

Camundongos NOD de 15 a 18 semanas apresentaram discreta redução na frequência de células T  $CD4^+$   $Foxp3^+$  nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos assim como na lâmina própria do intestino. Esses animais apresentaram ainda maior frequência de linfócitos  $CD4$  produzindo IL-17 (Th17) quando comparados aos camundongos NOR de idade correspondente (Fig. 23). Porém, somente quando as análises foram ajustadas quanto ao número absoluto de células, o aumento de linfócitos Th17 se torna significativo. Desse modo, camundongos NOD pré-diabéticos mostraram aumento no número de linfócitos Th17 nos linfonodos pancreáticos. Já na lâmina própria do intestino delgado e do cólon e nos linfonodos mesentéricos só há aumento do número absoluto de células Th17 em camundongos NOD diabéticos (Fig 24).

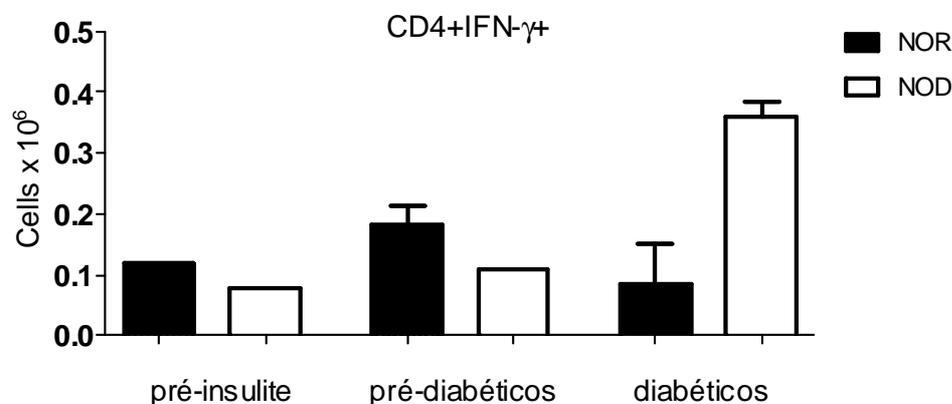


**Figura 23.** Frequência de células Treg, Th1 e Th17 nos linfonodos e lâmina própria do intestino em camundongos NOD e NOR. *Dot Plots* representativos da frequência de células Treg (CD4<sup>+</sup> foxp3<sup>+</sup>), Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN-g<sup>+</sup>) e Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) nos linfonodos mesentéricos, pancreáticos e na lâmina própria do intestino delgado e do cólon. Cada *plot* representa um *pool* de células de 4 camundongos NOD diabéticos ou 4 camundongos NOR controle avaliados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas no programa FlowJo (TreeStar), de acordo com a estratégia de análise exemplificada na Figura 3B.



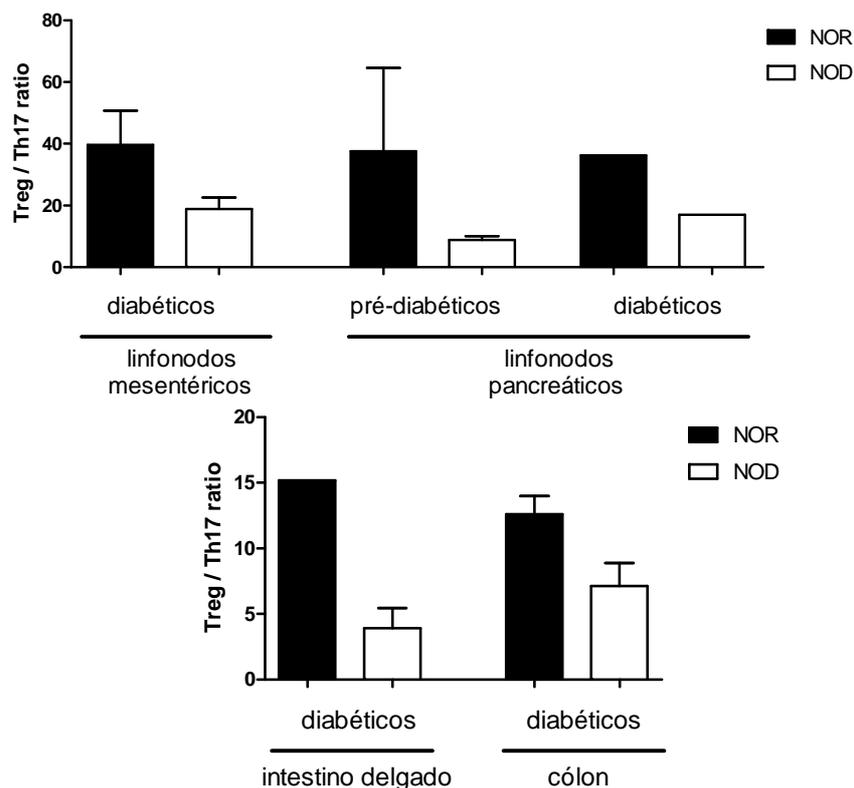
**Figura 24. Número absoluto de células Th17 nos linfonodos e na lâmina própria do intestino em camundongos NOD e NOR.** A frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 e a contagem total de células foram utilizadas para se determinar o número absoluto células Th17 em cada órgão em diferentes estágios da evolução de diabetes: pré-insulite (6 semanas), pré-diabéticos (15 semanas e sem glicemia elevada) e diabéticos (15 a 18 semanas e com alta glicemia). As barras representam a média  $\pm$  SEM do número total de células T CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> de 2 experimentos consistindo de um *pool* de 4 animais cada (pré-diabéticos e diabéticos) e de 3 experimentos constituídos de um *pool* de 3 animais cada (pré-insulite).

Também observamos um aumento no número de células produtoras de IFN- $\gamma$  (Th1) na lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD que já apresentam hiperglicemia (Fig 25).



**Figura 25. Número de células Th1 na lâmina própria do intestino delgado de camundongos NOD e NOR.** A frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e a contagem de células foram utilizadas para se determinar o número absoluto de células Th1 na lâmina própria do intestino delgado em animais pré-insulite (6 semanas), pré-diabéticos (15 semanas e sem glicemia elevada) e diabéticos (15 a 18 semanas e com alta glicemia). As barras representam a média  $\pm$  SEM do número total de células T CD4<sup>+</sup>IL-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> de 2 experimentos consistindo de um *pool* de 4 animais cada (pré-diabéticos e diabéticos) e de 3 experimentos constituídos de um *pool* de 3 animais cada (pré-insulite).)

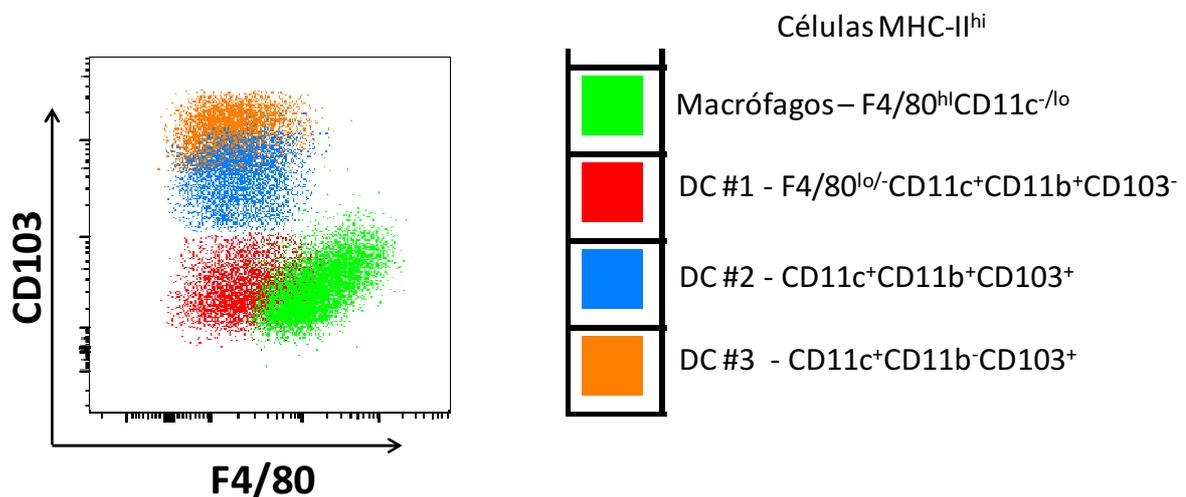
A presença de um estado pró-inflamatório e a perda do equilíbrio entre ativação e regulação nos camundongos NOD podem ser constatadas mais claramente quando os resultados são dispostos em relação proporcional (*ratio*) entre células Treg e células Th17. Essa razão estava alterada em todos os órgãos analisados nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD diabéticos e pré-diabéticos (Fig. 26).



**Figura 26. Proporção entre células Treg e Th17 nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos e na lâmina própria do intestino de camundongos NOR e NOD.** Após a determinação dos números absolutos de células CD4 Foxp3<sup>+</sup> e Th17, foi calculada a razão entre as mesmas e os valores obtidos foram indicados de acordo com os órgãos e o estágio de evolução da doença. As barras representam a média  $\pm$  SEM das razões Treg/Th17.

Sabendo-se que as células apresentadoras de antígenos (APCs) são cruciais na definição da polarização da resposta imune e participam da diferenciação de linfócitos para células Th1, Th17 e Treg, avaliamos a composição de macrófagos e células dendríticas de acordo com as mais recentes estratégias de caracterização fenotípica. A figura 27 mostra as subpopulações de APCs predominantes na mucosa intestinal e as expressões fenotípicas correspondentes. A figura 28 lista as características já descritas para cada uma dessas APCs. Como esperado, na lâmina própria do intestino predominam macrófagos (F4/80<sup>hi</sup>CD11c<sup>-/lo</sup>) enquanto que, nos linfonodos mesentéricos, as células dendríticas são preponderantes (F4/80<sup>-/lo</sup>CD11c<sup>+</sup>) (Fig. 29 e 30). Usando o perfil de camundongos NOR como controle, observamos que houve redução da frequência de macrófagos tanto no cólon quanto no intestino delgado de camundongos NOD pouco antes da manifestação clínica da diabetes (Fig. 29). Por outro lado, nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos de animais diabéticos, houve uma alteração

na composição de células dendríticas com uma aumento na representação do subtipo # 1 (CD11b+CD103-) e uma redução no subtipo # 2 (CD11b+CD103+) (Fig. 30).



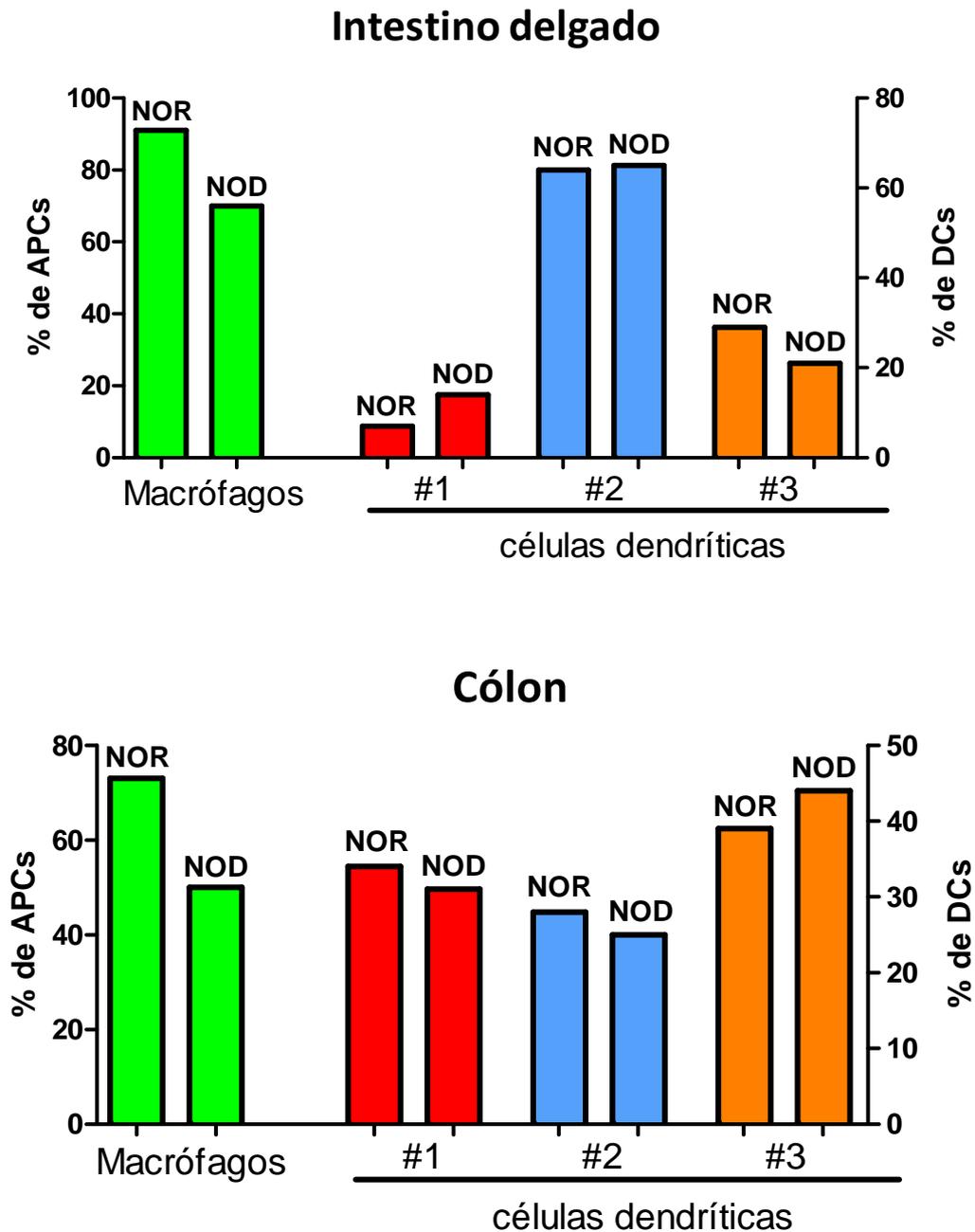
**Figura 27 . Populações de macrófagos e células dendríticas determinadas através de citometria de fluxo utilizando-se marcadores MHC-II, F4/80, CD11c, CD11b e CD103.** Gráfico representativo de uma amostra de células da lâmina própria do cólon. Em destaque as distintas subpopulações de APCs definidas neste trabalho como macrófagos e DCs subtipos 1,2 e 3. A amostra foi analisada conforme estratégia demonstrada na figura 3A e as subpopulações de APCs obtidas foram plotadas em um gráfico demonstrando a expressão das moléculas F4/80 e CD103. Macrófagos residentes são ainda CX3CR1<sup>hi</sup> e CD64+. Essas moléculas não foram marcadas neste estudo.

	Origem	Funções já demonstradas	Produzem	Distribuição
<b>MAC</b>	Monócitos (Ly6C <sup>hi</sup> )	Captação de comensais e antígenos solúveis luminais; alta capacidade fagocítica; contribuem para a manutenção e expansão de Tregs no intestino; não migram para LnM	IL-10 em elevados níveis e de forma constitutiva	Representam a grande maioria das APCs na lâmina própria
<b>DC # 1</b>	Monócitos (Ly6C <sup>hi</sup> ) (?)	Perfil pró-inflamatório; imunogênica Diferenciação de células efectoras Th1 e Th17;	IL-6, IL-23, IL-12 iNOS, TNF- $\alpha$ Ácido retinóico	Mais frequentes no cólon. Expandem e acumulam na LP do cólon e nos LnM durante colite.
<b>DC # 2</b>	Pre-DCs	Induzem Tregs e Th17 nos LnM ativação de células T CD4+	Ácido retinóico, TGF- $\beta$ IL-6	Predominam entre as DCs no intestino delgado
<b>DC # 3</b>	Pre-DCs	Induzem Tregs (?) e Th17 nos LnM ativação de células T CD8+	Ácido retinóico	Predominam entre as DCs no cólon

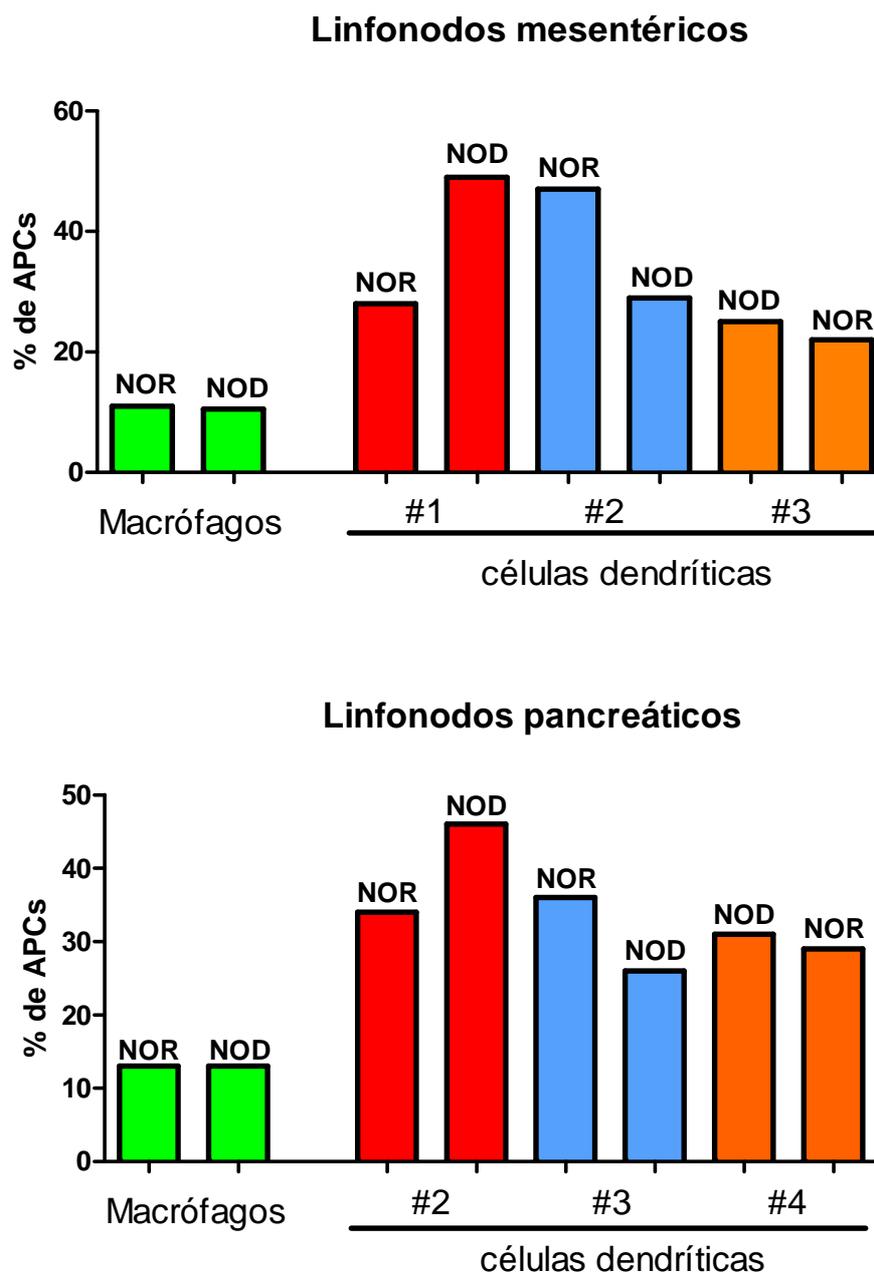
DCs #1 #2 #3

Migram para LnM via CCR7; Induzem a expressão de  $\alpha 4\beta 7$  e CCR9 em células T

**Figura 28 . Quadro esquemático com características das células apresentadoras de antígeno da lâmina própria de camundongos.** As informações aqui contidas foram sistematizadas a partir da análise dos estudos mais recentes dos grupos de Brian Kelsall e de Alan Mowat. Esses pesquisadores avaliaram características fenotípicas, morfológicas, moleculares e funcionais das APCs na lâmina própria de camundongos e fizeram também revisões detalhadas da literatura sobre o tema (Rivollier et al., 2012; Persson et al., 2013; Cerovic et al., 2013) . (?) indica que não há dados conclusivos na literatura. Os termos subtipos 1, 2 e 3 foram utilizados neste trabalho apenas para simplificar a nomenclatura.

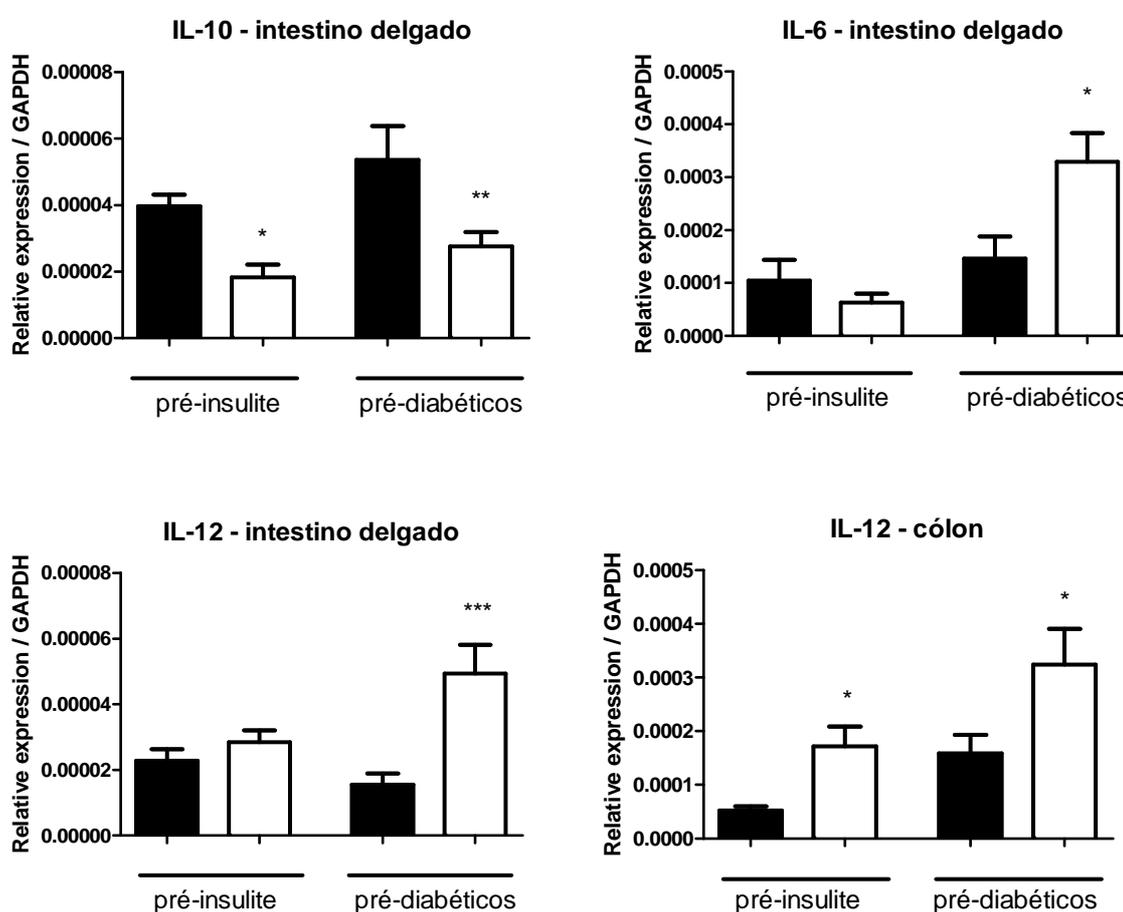


**Figura 29. Proporção entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) na lâmina própria do intestino de camundongos NOR e NOD pré-diabéticos.** Após a identificação de cada subtipo de célula dendrítica (DC) e de macrófago, os valores foram inseridos em forma de gráfico para avaliar possíveis alterações nessas populações entre camundongos NOR e NOD. A proporção de macrófagos dentre as células CD19<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup> está demonstrada no eixo y à esquerda, enquanto que as proporções de cada subtipo de DC dentre as células CD19<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup> estão demonstrada no eixo y à direita. Os resultados apresentados representam um *pool* de 4 camundongos em cada grupo.



**Figura 30.** Proporção entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos de camundongos NOR e NOD diabéticos. Após a identificação de cada subtipo de célula dendrítica e de macrófago, os valores foram inseridos em forma de gráfico para avaliar possíveis alterações entre camundongos NOR e NOD. As proporções de cada tipo de APC dentre as células CD19<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>MHC-II<sup>hi</sup> estão demonstradas. As barras representam *pools* de 4 camundongos em cada grupo.:

Sabemos que cada uma dessas subpopulações de APCs está envolvida em atividades especializadas no sistema imune, particularmente na mucosa intestinal. Portanto, na tentativa de relacionar as alterações proporcionais de células Th17 e Tregs e a atividade das células apresentadoras de antígenos, quantificamos a expressão gênica, por PCR quantitativo, de citocinas envolvidas nesse processo de diferenciação e essenciais para a atividade imune no intestino. Verificamos que camundongos NOD apresentaram menor expressão de IL-10 já na fase pré-insulite e mantiveram esse nível menor na fase pré-diabética. Houve aumento de expressão de IL-6 e IL-12 no intestino delgado de camundongos NOD pré-diabéticos e de IL-12 tanto em camundongos NOD pré-insulite e pré-diabéticos quando comparados com camundongos controle NOR (Fig. 31).



**Figura 31. Quantificação da expressão de citocinas no intestino de camundongos NOD e NOR.** O RNA de amostras de tecido do intestino delgado e do cólon de 9 camundongos NOR e 9 camundongos NOD na fase pré-insulite e pré-diabetes foi purificado. Após a obtenção de cDNA e amplificação dos genes de citocinas com *primers* pelo método *TaqMan*, foi detectada a expressão

---

gênica das citocinas IL-6, IL-10, IL-12. As barras representam a média da expressão relativa de cada gene avaliada em relação a amplificação do controle endógeno GAPDH.

# Discussão



## Discussão

Para que uma rede biológica tão diversa de células, mecanismos de ativação e vias efetoras atue de forma coordenada e em equilíbrio com seus próprios componentes e ainda se adapte aos estímulos externos são precisos refinados mecanismos internos de comunicação celular e molecular. Esse é o caso do sistema imune, e cada vez mais tentamos entender as vias intrínsecas de regulação de sua atividade.

Um dos eventos biológicos que desafia essa capacidade adaptativa do sistema imune é a inflamação, seja ela causada por processos de desenvolvimento e remodelamento tecidual, respostas imunes a infecções ou em sítios de contínua estimulação antigênica e microbiana, como o intestino. Nesses casos, se acentuam processos como produção e secreção de quimiocinas e citocinas, vias de sinalização da imunidade inata, alterações no endotélio vascular, apresentação de antígenos, ativação, diferenciação, migração e proliferação celular. Esses processos normalmente são desencadeados de acordo com uma cinética adequada de estímulo e regulação. Mas, em situações de infecções crônicas, ou devido a falhas nos processos de indução de tolerância central ou periférica, como doenças autoimunes e alérgicas, a capacidade de regular os mecanismos inflamatórios se mostra comprometida podendo causar dano tecidual e importantes sequelas ao organismo.

Nosso grupo de pesquisa há muito tempo tem investido em reforçar e explorar esses mecanismos de controle inflamatório e incorporação fisiológica de antígenos, como é o caso da tolerância oral. Esse fenômeno constitui uma forma eficaz e duradoura de expandir ou reforçar a tolerância imunológica e é comprovadamente capaz de impedir a instalação de doenças inflamatórias. Com o intuito de potencializar os efeitos da tolerância oral em situações em que os agentes desencadeadores de inflamação são indefinidos ou múltiplos, passamos a utilizar a proteína bacteriana Hsp65 que é homóloga a um antígeno de mamíferos ubiquamente expresso em sítios inflamatórios (Hsp60) e que possui profundo impacto na atividade imunológica.

Os estudos pioneiros do nosso grupo de pesquisa utilizando a bactéria *Lactococcus lactis* modificada para produzir e secretar a proteína de choque térmico de 65 kd (de Azevedo et al., 2012) envolveram os modelos experimentais de encefalomielite (EAE) (Rezende et al., 2012) e colite ulcerativa (Gomes-Santos et al., 2014). Ambos os modelos possuem um importante componente inflamatório, autoimune, comprovado envolvimento da microbiota e da atividade imunológica na mucosa intestinal e de fato a administração oral de LL-HSP65 nessas condições patológicas se mostrou uma promissora estratégia de imunorregulação.

Entretanto, devido aos múltiplos papéis descritos das Hsps sobre a atividade imunológica, buscamos, a partir deste trabalho, melhor esclarecer os mecanismos responsáveis pelo seu efeito e determinar o envolvimento de subpopulações linfocitárias e de receptores da imunidade inata no efeito imunomodulador do tratamento oral com LL-Hsp65.

Uma das formas de interação das Hsps com o sistema imune é através de receptores do tipo toll (TLR) e muitos trabalhos já demonstraram a ação de Hsp60 por essa via de reconhecimento e sinalização inata. Essa família de proteínas estruturalmente relacionadas e envolvidas com o reconhecimento de padrões moleculares é tipicamente relacionada à resposta imune contra patógenos e à consequente proteção do hospedeiro. Entretanto, apesar de seu comprovado papel no reconhecimento de diversos ligantes microbianos e da ativação de diferentes cascatas de sinalização intracelular que levam a respostas inflamatórias e contribuem para eliminação de patógenos (Akira e Takeda, 2004), esses receptores podem também estar associados a mecanismos endógenos de ativação do sistema imune.

Os resultados apresentados na figura 4 deste trabalho confirmam a capacidade do produto da bactéria LL-Hsp65 em estimular via receptores TLR2 e TLR4 levando à ativação da transcrição de NFκB. A verificação de que até 72h após o tratamento oral são encontradas LL-Hsp65 viáveis no intestino delgado e cólon de camundongos (Rezende et al., 2012) e a confirmação do efeito agonista do Hsp65 principalmente em TLR2 permite inferir que o tratamento oral com LL-HSP65 potencialmente pode desencadear sinais em células expressando TLR2 na mucosa intestinal. Esse é o caso de enterócitos, colonócitos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos B, células T e ainda outros tipos celulares amplamente distribuídos na lâmina própria do intestino e nos folículos linfoides isolados.

Neste trabalho, verificamos especificamente que o tratamento oral com LL-Hsp65 induz um aumento de células T reguladoras dependente da presença de receptores TLR2 (Figs. 5 e 6). Em acordo com os resultados mostrando o envolvimento de TLR2 para os efeitos de LL-Hsp65 (Fig.4 a 6), a presença dessa via de sinalização foi necessária para a manutenção dos níveis normais de IL-10 e da integridade intestinal relacionados à prevenção de colite por DSS nos camundongos tratados com LL-Hsp65 (Gomes-Santos et al., 2014).

Dados da literatura também mostram que efeitos da ativação via TLR2 potencializa a atividade supressora de linfócitos T  $CD4^+CD25^{high}$  humanos e estimula a proliferação de células T reguladoras ( $Foxp3^+$ ) *in vitro*, bem como sua sobrevivência sem afetar a capacidade supressora dessas células. Os efeitos co-estimuladores de Hsp60 em Tregs via TLR2 foram relacionados ao aumento de PKC, quinase PI-3 e p38 e são potencializados pela inibição de

ERK (Zanin-Zhorov et al., 2006). Esse poderia ser um dos mecanismos de proteção alcançados pelo LL-Hsp65 nos modelos de colite e EAE. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a Hsp60 poderia também maneiras afetar a atividade de células T efetoras pela ligação a TLR2 de outras maneiras: a) inibindo a migração e a entrada em sítios inflamados; b) reduzindo a expressão de fatores de transcrição como o T-bet, NF- $\kappa$ B e NFAT; c) induzindo redução da liberação de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e aumento da produção de IL-10 (Zanin-Zhorov et al., 2003, 2005). De fato, observamos um menor infiltrado inflamatório no sistema nervoso central de animais tratados com LL-Hsp65 após a indução de EAE (Rezende et al., 2012).

Contudo, não podemos eliminar a hipótese de que o aumento observado na frequência de células CD4 LAP<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> poderia ser um efeito secundário da ação do Hsp65 sobre células dendríticas, macrófagos e até mesmo sobre o epitélio intestinal.

Sabemos que o microambiente da mucosa intestinal possui características únicas que permitem que vários subtipos celulares adquiram características distintas e especializadas. Macrófagos presentes no cólon, por exemplo, expressam uniformemente TLR2. No entanto, essas células normalmente não ativam respostas inflamatórias, mesmo estando diretamente em contato com inúmeros estímulos microbianos (Bain e Mowat, 2011). Parece haver, nessas células, algum bloqueio na sinalização posterior à sinalização via TLRs que resulta na falha em translocar NF- $\kappa$ B para o núcleo ou a pelo impedimento desse fator de transcrição em se ligar ao DNA e ativar a transcrição gênica. Esse bloqueio se relaciona a uma reduzida expressão de moléculas sinalizadoras como MyD88, IRAK e TRAF6 e a expressão constitutiva do inibidor I $\kappa$ B $\alpha$  (Smythies et al., 2010). Os macrófagos na mucosa expressam receptores inibitórios como CD172a (SIRPa), CD200R1 e receptores para as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  que são conhecidas como os principais fatores responsáveis por esse estado refratário dos fagócitos residentes (Smith et al., 2010; Smythies et al., 2005). Como já discutido, essas células são consideradas importantes para a diferenciação final e manutenção de Tregs na lâmina própria devido à sua produção constitutiva de IL-10 (Murai et al., 2009; Hadis et al., 2011).

Com relação às células epiteliais do intestino, a ativação de NF $\kappa$ B resulta na produção de fatores como TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), que pode inibir a produção de IL-12 por DCs e favorecer que essas células contribuam para a diferenciação de Th2 e Treg em detrimento de Th1 (Rimoldi et al., 2005). A produção de TGF- $\beta$  e ácido retinóico pelas

células epiteliais, do mesmo modo, pode favorecer o desenvolvimento de DCs CD103<sup>+</sup> capazes de induzir Tregs (Peterson e Artis, 2014)

Portanto, apesar de verificarmos o efeito de expansão de Tregs, não podemos ainda determinar todos os tipos celulares afetados pelo tratamento com LL-HSP65 nem de que forma a interação de HSP65 via TLR2 poderia interferir nas vias de sinalização e ativação particulares dessas células adaptadas ao microambiente diferenciado do intestino.

Mesmo tendo observado que há aumento de células T CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> após tratamento oral com LL-Hsp65, e que a eliminação de células expressando LAP abole o efeito protetor no modelo experimental de EAE (Rezende et al., 2012), não descartamos a possibilidade de outros tipos celulares expressando LAP participarem desse efeito imunorregulador.

As células T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) são consideradas a primeira linha de defesa contra patógenos devido a sua maior presença em tecidos epiteliais e no intestino e por responderem a sinais via TLR, e via TCR de forma independente de MHC (Vantourout e Hayday 2013; Wesch et al., 2011). Entretanto, funções imunorreguladoras já foram descritas para essas células. Camundongos deficientes em linfócitos T  $\gamma\delta$  desenvolvem colite espontaneamente e a transferência de linfócitos  $\gamma\delta$  intraepiteliais melhora a patologia nesse modelo (Inagaki-Ohara et al., 2004). Além disso, a indução de tolerância oral é comprometida pela ausência de células T  $\gamma\delta$  (Mengel et al., 1995; Fujihashi et al., 1999). As *heat shock proteins* (HSPs) tem sido descritas também como ligantes importantes do TCR $\gamma\delta$ , sendo que essa ligação pode ocorrer sem a necessidade de processamento por APCs (Champagne, 2011).

Inicialmente encontramos uma pequena frequência de células T  $\gamma\delta$  expressando LAP no baço de camundongos C57BL/6 (Fig.7). Após uma análise criteriosa de outros compartimentos linfóides, identificamos as placas de Peyer como o principal sítio ocupado por esses linfócitos, onde elas representam cerca de 30% de todas as células T  $\gamma\delta$  (Fig. 7). Posteriormente, os efeitos supressores dessa subpopulação de linfócitos T  $\gamma\delta^+$ LAP<sup>+</sup> foram demonstrados e os resultados foram recentemente submetidos para publicação (Rezende et al., 2014 - Anexo 4). Ainda não foi possível avaliar se essa população de linfócitos exerce papel no efeito imunorregulador de LL-Hsp65, assim com as células T CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>.

Apesar do efeito positivo observado pelo uso de *L. lactis* produtor de Hsp65, qualquer abordagem terapêutica que acentua a ação de células reguladoras e reduz a produção de resposta inflamatória deve também se mostrar segura quanto a não induzir imunossupressão e déficit na imunidade anti-infecciosa. Esse parece não ser o caso do nosso modelo, uma vez que os camundongos tratados não apresentaram nenhum defeito na sua capacidade de limitar

a infecção bacteriana por *Salmonella*. O Hsp65 parece ter mantido a produção de anticorpos específicos, mas, ao mesmo tempo potencializou mecanismos de controle da inflamação e de dano tecidual como pode ser observado pela redução dos eventos inflamatórios na mucosa intestinal dos camundongos infectados e previamente tratados com LL-HSP65 (Figs. 8 a 11). Nossos resultados nos remetem a um aspecto da relação parasito-hospedeiro foi discutido interessantemente por Schneider e Medzhitov. Esses autores propõem que tolerar uma infecção, e não só resistir a um patógeno, pode ser uma forma evolutivamente vantajosa de limitar a destruição causada pela inflamação e resposta imune exacerbada (Schneider e Ayres, 2008; Medzhitov et al., 2012). Entretanto, existe também a possibilidade do LL-HSP65 mediar um efeito protetor diretamente por indução de peptídeos antimicrobianos pelo epitélio e pela ação de ILCs (*Innate Lymphoid Cells*) produtoras de IL-22 que possuem reconhecido papel na proteção contra patógenos intestinais. Outra possibilidade é a interferência na capacidade migratória ou no perfil de ativação das APCs que poderiam limitar a perpetuação inflamatória. Entretanto, um efeito unicamente inato gerado pelo Hsp65 ou de competição pela bactéria *L. lactis* parece não ser o caso, visto que os animais foram desafiados com *Salmonella* somente sete dias após o tratamento oral. Assim, o intervalo prolongado elimina os efeitos diretos do *L. lactis* (que somente persiste no intestino por 48-72 horas) e torna uma ação direta de estimulação de células do tecido linfoide associado à mucosa intestinal (GALT) mais provável. Esse probiótico pode ter mediado ainda um efeito adjuvante na resposta imune anti-infecciosa visto que o grupo LL-Hsp65 foi capaz de gerar uma resposta humoral mais robusta (Fig. 11). A ação do *Lactococcus lactis* NCDO2118 como um probiótico que potencia os efeitos supressores da tolerância oral induzida por uma proteína foi recentemente descrita por Mercadante e colaboradores no modelo de doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) (Mercadante et al., 2014). Nesse trabalho, os autores mostraram que a associação de *L. lactis* com antígenos alogênicos (derivados de células esplênicas) por via oral nos doadores de células foi capaz de inibir a reação de GVH em camundongos. Esse efeito foi mediado por células B LAP<sup>+</sup> e dependente da citocina IL-10 sugerindo um papel importante dos linfócitos B nas propriedades imunomoduladoras do *L. lactis*. O papel imunorregulador do LL-HSP65 no contexto da infecção está sendo avaliado atualmente em modelo de infecção por *Leishmania major*, onde parte da resposta patológica e do dano tecidual é também creditada ao sistema imune.

Os resultados obtidos pelo tratamento oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 indicam a possibilidade de se reduzir contextos inflamatórios e proteger o organismo da atividade autoimune. Nos trabalhos anteriores do nosso grupo, utilizamos o tratamento com *L. lactis*

produtor de Hsp65 previamente à indução de modelos experimentais de doenças inflamatórias agudas ou crônicas: a) a administração oral de DSS - para a indução de colite experimental em camundongos C57BL/6 (Gomes-Santos et al., 2014); b) a imunização com os peptídeos 35-55 da proteína MOG (*myelin oligodendrocyte protein*) e injeção da toxina pertussis - para a indução de EAE (Rezende et al., 2013). Nesses experimentos, as vias de imunorregulação e provavelmente de tolerância oral já estavam estabelecidas quando o desafio inflamatório ocorreu (a indução da doença). Neste estudo, partimos para a avaliação do efeito do tratamento com LL-Hsp65 num modelo de doença autoimune de origem espontânea que é a diabetes tipo 1 em camundongos NOD.

Algumas intervenções visando restaurar a imunorregulação no contexto da diabetes já foram desenvolvidas em camundongos NOD e também testadas clinicamente. Dentre elas, destacam-se os ensaios envolvendo as Hsps, como a administração do peptídeo DiaPep277 da Hsp60 (Elias et al., 1997; Schloot e Cohen, 2013).

A Hsp60 já foi descrita como um antígeno envolvido na diabetes, porém acredita-se não se tratar de um auto-antígeno primário na patogênese e sim envolvido com a regulação da insulite (Birk et al., 1996; Van Halteren et al., 2000).

Dessa forma, a perspectiva de se utilizar o fenômeno da tolerância oral associado ao potencial imunorregulador da Hsp65 para suprimir a ativação dos mecanismos envolvidos na patogênese da diabetes autoimune se mostrou como uma ideia promissora. No presente estudo, entretanto, a administração oral de LL-Hsp65, seja em dose única ou tripla ou ainda associada à administração de *L. lactis* produtor de IL-10 não foi suficiente para impedir o desenvolvimento da diabetes espontânea em camundongos NOD (Figs. 14, 16 e 17).

Outros grupos demonstraram a supressão da diabetes em camundongos NOD pela estratégia da tolerância oral, mas apenas o uso de peptídeos antigênicos (Gong et al., 2010) ou a administração neonatal de insulina pela via oral foram efetivos (Maron et al., 2001). Uma abordagem recente de indução de tolerância oral em camundongos NOD utilizou a bactéria *Lactococcus lactis* recombinante que liberava antígenos diretamente na mucosa intestinal. Peptídeos da gliadina produzidos pelo *L. lactis* foram capazes de suprimir respostas sistêmicas de células T efectoras específicas para essa proteína nos camundongos NOD ABoDq8 transgênicos, utilizados como modelo de doença celíaca (Huibregtse et al., 2009). Entretanto, esses animais foram gerados para produzir uma linhagem transgênica com o repertório de células T modificado e não há correlação com uma melhora no desenvolvimento de diabetes (Gong et al., 2010). Outro estudo de indução de tolerância no camundongo NOD utilizando *L. lactis* recombinante para produzir insulina suprimiu a doença, mas, nesse caso, além do

antígeno específico, foram coadministrados, pela via oral, anti-CD3 e IL-10, que potencializaram o efeito modulador do tratamento (Takiishi et al., 2012). Sabemos que peptídeos da Hsp65 também possuem atividade no sistema imune, mas a citocina IL-10 deve estar intacta para exercer seu efeito anti-inflamatório (Slavin et al., 2001). No nosso estudo, a degradação gastrointestinal pode ter limitado um possível efeito potencializador do tratamento no nosso protocolo de administração conjunta de IL-10 e Hsp65 via *L. lactis*. Outra possibilidade é que a dose utilizada (secretada espontaneamente pelo *L. lactis* produtor de IL-10) não tenha sido suficiente para o efeito adjuvante desejado.

Como já discutido anteriormente, a administração oral de proteínas é capaz de impedir a geração de resposta imune humoral elevada a esse mesmo antígeno após a imunização. A tolerância oral induzida por ingestão voluntária de antígeno teve efeito mesmo em animais velhos ou deficientes em IL-10 que possuem reconhecidamente alterações importantes na homeostase intestinal (Santiago et al., 2010; Gomes-Santos et al., 2011). Entretanto, verificamos nesse trabalho que a capacidade de indução de tolerância oral, mesmo utilizando o protocolo de ingestão contínua de antígeno (no nosso caso, a ovalbumina diluída em água) em camundongos NOD estava comprometida (Fig. 18). Nossos dados estão de acordo com os resultados de um trabalho recente que descreve o impedimento de camundongos NOD em estabelecer tolerância oral utilizando um modelo de administração de peptídeos acoplados a CTB (subunidade b da toxina colérica). Os autores mostram uma redução da resposta imune específica a antígenos administrados em camundongos resistentes à diabetes (NOR), mas não em camundongos NOD (Presa et al., 2013).

Portanto, tornou-se importante avaliar a preservação de mecanismos de imunorregulação quando há o objetivo de se utilizar terapêuticamente a via mucosa. Decidimos, então, iniciar um estudo extensivo para verificar possíveis alterações nos elementos imunorreguladores principais da mucosa intestinal de camundongos NOD. Assim, teríamos um avanço no entendimento do impacto da estimulação da mucosa intestinal pela microbiota e pelos antígenos da dieta no desenvolvimento da diabetes e, além disso, poderíamos esclarecer como poderíamos intervir positivamente nesse importante componente da fisiologia imunológica que é o intestino.

Um possível defeito na capacidade de gerar células T reguladoras na periferia poderia explicar a incapacidade de camundongos NOD em se tornarem tolerantes aos antígenos ingeridos. De fato, desde a caracterização de células T reguladoras, distúrbios na ação desses linfócitos tem sido alvo de debate na literatura sobre autoimunidade. A diferença aqui observada na cinética distinta de expansão de células Tregs entre camundongos C57BL/6

(Fig. 6) e NOD (Fig. 12) após o tratamento com LL-Hsp65 poderia estar relacionada a uma reduzida capacidade de manutenção de células Tregs induzidas na periferia. Estudos com células T isoladas de biópsias duodenais de pacientes diabéticos indicaram uma menor eficiência na geração de células T  $CD4^+Foxp3^+$  por DCs  $CD103^+$  isoladas da lâmina própria do intestino. Este poderia ser um dos motivos para a menor frequência de células Tregs observada no intestino desses indivíduos (Badami et al., 2011). Porém, pelas limitações em se realizar co-culturas heterólogas de células T e DCs de indivíduos diabéticos e indivíduos saudáveis, não se pode concluir exatamente se trata-se de um distúrbio nas DCs ou defeitos intrínsecos aos linfócitos T.

Utilizamos a linhagem NOR para explorar melhor essa questão utilizando linhagens congênicas que expressam o mesmo MHC: camundongos NOR e NOD. Porém, nos nossos experimentos de co-cultura, diferentemente do relato em humanos, a indução de *foxp3* em linfócitos T *naive* de camundongos NOD e NOR foi similar após estímulo com DCs de ambas as linhagens (Fig. 19). Entretanto, as DCs aqui utilizadas foram obtidas dos linfonodos mesentéricos. É possível que as DCs de camundongos NOD com esse fenótipo e que chegam efetivamente a esse órgão possuam a mesma capacidade de indução de linfócitos Tregs. Porém, como também demonstrado, a frequência dessas células nos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD era menor (Fig. 20) e essa redução pode causar um déficit na capacidade total de diferenciação de células Tregs. O ensaio de estimulação com anti-CD3 *in vitro* pode ainda não refletir corretamente os mecanismos naturais de indução de células T reguladoras por células dendríticas carregando antígenos intestinais *in vivo*.

A deficiência na integridade da barreira intestinal é outro fator que poderia estar envolvido nas alterações da mucosa desses camundongos. A correlação entre uma maior permeabilidade intestinal e a diabetes tipo 1 tem sido demonstrada tanto em animais como em humanos (Vaarala et al., 2008). No presente estudo, não encontramos diferença na permeabilidade intestinal entre camundongos NOD e BALB/c de seis semanas de idade (Fig. 21). Entretanto, uma maior entrada de materiais na mucosa foi evidenciada por outro estudo em camundongos NOD pré-diabéticos de doze semanas de idade, quando comparados a controles C57/BL6 ou NOR (Lee et al., 2009). O aumento de permeabilidade intestinal verificado ocorre concomitantemente ao início da insulite e precede o desenvolvimento da diabetes (Lee et al., 2009). Este poderia ser um dos fatores que contribuem para o início da infiltração de células e ativação da resposta autoimune invasiva no pâncreas. Provavelmente, em animais mais jovens, como os utilizados no nosso trabalho, essa diferença não pode ser ainda ser evidenciada, ao menos com o ensaio utilizado em ambos os estudos que é o uso da

técnica de medir a concentração de dextrano marcado com fluoresceína (FITC) no soro após gavagem com o mesmo composto.

Dessa maneira, o maior acesso de antígenos luminais à lâmina própria ocasionando uma sobrecarga aos mecanismos fagocíticos e de resposta não inflamatória, poderia facilitar a perda da homeostase na mucosa intestinal e fornecer estímulos inflamatórios ao organismo alimentando a progressão autoimune. Em concordância com essa ideia, a perda da integridade da barreira intestinal em camundongos NOD é acelerada pela infecção entérica pela bactéria *Citrobacter rodentium* e causa aceleração da insulite, ativação e proliferação de células T nos linfonodos pancreáticos, agravando a patologia da diabetes (Lee et al., 2009).

Essa relação entre o intestino e a diabetes não é universalmente reconhecida, mas um conjunto de indícios experimentais nos permite fazer algumas observações.

Verificamos que, ao longo do processo de desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD, ocorreu um grande aumento de células na lâmina própria intestinal e esse acúmulo parece estar associado a uma condição inflamatória, visto que observamos um número maior de células Th17 no intestino delgado e cólon e um número maior de células produzindo IFN- $\gamma$  no intestino delgado (Fig. 23 e 24). O mesmo cenário foi observado nos linfonodos mesentéricos. Porém, em camundongos NOD pré-diabéticos somente houve aumento de células CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos (Fig. 24).

Apesar de tradicionalmente a diabetes ter sido considerada uma doença de polarização Th1, recentemente a participação de células produtoras de IL-17 tem sido relacionadas à sua patogênese. Células Th17 já foram descritas como altamente patogênicas e como mediadoras primárias de inflamação tecidual em condições autoimunes (Martin-Orozco et al., 2009; Lee et al., 2012). Crianças com diagnóstico recente de diabetes tipo 1 apresentam aumento de células T produzindo IL-17 (Marwaha et al., 2010). Na diabetes, há aumento de células T CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> produtoras de IL-17. CCR6 é um receptor de quimioquina importante para a migração de células para o intestino e sítios inflamatórios onde há produção de seu ligante CCL-20 (MIP-3a), como o intestino delgado e células  $\beta$  pancreáticas sob inflamação. O bloqueio da ligação de CCL20 a CCR6 inibe o desenvolvimento de diabetes tipo 1 em camundongos (Lee et al., 2011). A polarização Th17 potencializa a destruição de células  $\beta$  (Honkanen et al., 2010) e anticorpos neutralizantes de IL-17 evitam a diabetes nos camundongos NOD (Emamaullee et al., 2009).

Verificamos também que a proporção entre Tregs e Th17 estava reduzida em camundongos NOD diabéticos em todos os órgãos e nos linfonodos pancreáticos de animais

pré-diabéticos (Fig. 26). Aparentemente a perda do equilíbrio entre ativação e regulação ocorre inicialmente nos linfonodos pancreáticos e posteriormente um processo de expansão inflamatória com a migração de células Th17 para o intestino.

Os linfonodos pancreáticos foram demonstrados como um sítio privilegiado de drenagem de antígenos e células presentes no peritônio e no intestino. Essa conexão se estabelece nas primeiras semanas de vida do camundongo (Turley et al., 2005). Os linfonodos pancreáticos foram, então, considerados pelo grupo de Mathis e Benoist como uma interseção imunológica que permite o encontro de auto-antígenos endócrinos provindos do pâncreas e antígenos externos vindos da mucosa (Turley et al., 2005). O pâncreas, através de seus produtos endócrinos e exócrinos, exerce destacada função no metabolismo energético. O intestino é uma via de integração imunológica entre o organismo, os nutrientes e a microbiota. Talvez essa localização privilegiada dos linfonodos pancreáticos possa realmente se relacionar a um mecanismo de integração entre imunidade e metabolismo do organismo.

Nos camundongos NOD foi demonstrado que células T ativadas no intestino expressando o receptor de endereçamento para mucosa  $\alpha 4\beta 7$  podem infiltrar as ilhotas pancreáticas, pois o endotélio associado passa a expressar o seu ligante MadCAM-1 durante a insulite (Turley et al., 2005). Outro trabalho mostrou que o bloqueio da adressina de mucosa MadCAM-1 iniciado na terceira semana de idade impede a incidência de diabetes. Essa molécula de adesão seria necessária para a entrada de células no intestino onde seriam ativados linfócitos relacionados com a iniciação da resposta patológica da diabetes (Hanninen et al., 1998).

Uma maior capacidade diabetogênica de linfócitos extraídos dos linfonodos mesentéricos de camundongos NOD de apenas três semanas em comparação ao linfonodo pancreático já foi também demonstrada (Jaakkola et al., 2003). Foi proposto que a ativação inicial de células diabetogênicas se daria no intestino e os linfonodos pancreáticos serviriam como um estágio de amplificação da autoimunidade. (Jaakkola et al., 2003)

Os linfócitos poderiam, portanto, circular entre o pâncreas e o intestino e células dendríticas poderiam transportar e apresentar antígenos intestinais nos linfonodos pancreáticos. Pode-se especular que células ativadas na mucosa poderiam migrar para o linfonodo pancreático e, através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, poderiam contribuir para a ativação de células T *naive* durante o reconhecimento de antígenos pancreáticos apresentados por DCs com caráter imunogênico.

Portanto, parece haver uma conexão imunológica importante entre o pâncreas e o intestino sendo que a autoimunidade na diabetes tipo 1 se correlacionaria a uma perda dos mecanismos reguladores no tecido linfóide associado à mucosa. Entretanto, não está claro se essa alteração na mucosa intestinal é causa, consequência ou um efeito disseminado e secundário da autoimunidade.

Muitas alterações funcionais já foram descritas em macrófagos e células dendríticas de humanos e animais diabéticos. Podemos destacar, por exemplo, uma deficiência na capacidade de clareamento de corpos apoptóticos (O'Brien et al., 2002) e uma elevada produção de IL-12 em macrófagos de camundongos NOD quando comparados aos camundongos controle NOR (Alleva et al., 2000). As primeiras células a infiltrar o tecido pancreático durante a peri-insulite são macrófagos e DCs e constituem a principal fonte de TNF- $\alpha$  que é crucial para a inflamação tecidual (Dahlen et al., 1998). Um estudo com amostras sanguíneas humanas demonstrou uma produção aumentada de IL-1 $\beta$  e IL-6 por monócitos de pacientes diabéticos associada a uma maior frequência de células T IL-17<sup>+</sup> (Bradshaw et al., 2009).

Portanto, as APCs poderiam contribuir para essa polarização pró-inflamatória desequilibrada observada no intestino e nos linfonodos de camundongos NOD diabéticos. Segundo Liu e colaboradores, células apresentadoras derivadas de NOD produzem mais mediadores envolvidos na polarização de células Th17 quando comparado a camundongos controle congênicos portadores do locus de resistência a diabetes *Idd3*. Uma maior produção de IL-21 e menor de IL-2 favoreceria a geração de células Th17 em detrimento de células Tregs (Liu et al., 2011). Esse poderia ser um dos fatores relacionados ao balanço irregular também observado no nosso estudo, onde ocorreu um aumento no número de células produtoras de IL-17 com potencial patogênico em relação a células T reguladoras (Fig. 26).

Apesar dos dados da figura 31 representarem a transcrição gênica total das citocinas IL-6, IL-12 e IL-10 no tecido, o perfil dessas citocinas no intestino está de acordo com as alterações nos subtipos de macrófagos e células dendríticas observadas em camundongos NOD e podem sugerir o papel funcional dessas APCs. Podemos correlacionar a reduzida expressão de IL-10 no intestino delgado a uma menor contribuição de macrófagos residentes (F4/80hiCD11c<sup>-lo</sup>) ao *pool* de APCs (Fig. 29). Além de reconhecidos pela produção de IL-10, esses macrófagos também podem contribuir para a manutenção e expansão de Tregs no intestino (Hadis et al., 2011) e são capazes de inibir a diferenciação de células Th17 por DCs *in vitro* (Denning et al., 2007). Um déficit nessa importante população da mucosa intestinal

poderia comprometer mecanismos de preservação da integridade intestinal, eliminação não inflamatória de bactérias comensais na lâmina própria e permitir a expansão de DCs pró-inflamatórias. Do mesmo modo, a maior expressão de IL-6 e IL-12 pode se relacionar com a maior representação de DCs do subtipo 1 (CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>) nos linfonodos mesentéricos e pancreáticos de camundongos diabéticos (Fig. 30), visto que essas células possuem capacidade migratória e se associam com a diferenciação de células T produtoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ . O decréscimo nos linfonodos do subtipo 2 de DC (CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) (Fig. 30) reconhecidas pela produção de TGF- $\beta$  e ácido retinóico pode se relacionar com a menor proporção de Tregs nos NOD diabéticos (Fig. 26)

Já é amplamente reconhecido que tolerância em nível sistêmico pode ser alcançada pela exposição a antígenos pela mucosa, significando que a atividade imunológica no intestino pode afetar o funcionamento global do sistema imune, mesmo em órgãos não diretamente relacionados. Se o pâncreas e o intestino são imunologicamente conectados através dos linfonodos pancreáticos, não causa espanto que a perda ou redução de fatores de regulação na mucosa possam contribuir para os eventos patogênicos da diabetes autoimune.

O esclarecimento dos defeitos na mucosa intestinal dos camundongos NOD que se relacionam diretamente ao desenvolvimento da diabetes poderá nos auxiliar na compreensão dos múltiplos fatores envolvidos na patogênese dessa doença autoimune.

## Conclusão



## Conclusões

Apesar de ser capaz de reduzir a resposta inflamatória em modelos murinos de colite ulcerativa e encefalomielite autoimune, o tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 não causa prejuízo à imunidade anti-infecciosa.

A administração oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 em camundongos C57BL/6 leva a uma expansão de células T reguladoras CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+ de maneira dependente de receptor do tipo toll-2.

Células T  $\gamma\delta$  expressando LAP constituem uma população distribuída por diversos órgãos linfoides, mas tem como sítio principal as placas Peyer, onde podem constituir outro importante mecanismo de regulação na mucosa intestinal.

O tratamento com *L. lactis* produtor de HSP65 em associação ou não com *L.lactis* produtor de IL-10 não foi capaz de interferir no desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD.

Não foi possível induzir tolerância oral por ingestão contínua de antígeno em camundongos NOD sugerindo que essa linhagem de camundongos apresenta defeitos na geração de mecanismos imunorreguladores na mucosa intestinal.

O desenvolvimento da patogênese da diabetes está associado a uma redução de fatores de regulação da mucosa como a produção local IL-10 e a redução de macrófagos residentes.

Camundongos NOD diabéticos apresentam desequilíbrio entre células T efetoras e reguladoras no intestino, com frequência aumentada de células Th17 e predominância de células dendríticas com perfil inflamatório no tecido linfóide associado à mucosa intestinal.

Devido às implicações da atividade imunológica no intestino para o organismo, é importante entender os fatores e mecanismos que contribuem para o seu funcionamento fisiológico, mas também para a perturbação do seu equilíbrio e assim desenvolver estratégias de intervenção via mucosa que sejam seguras e bem sucedidas.

# Perspectivas



## Perspectivas

Validar e explorar em detalhe as alterações no tecido linfóide associado ao intestino de camundongos NOD descritas neste trabalho de acordo com o estágio de desenvolvimento da diabetes.

Investigar as propriedades funcionais de macrófagos isolados da mucosa intestinal de camundongos NOD *in vitro* como capacidade fagocítica e produção de citocinas após estímulo.

Comparar a capacidade de diferenciação de linfócitos T reguladores e Th17 por células dendríticas do intestino de camundongos NOD e NOR.

Extrair células dendríticas da lâmina própria intestinal de camundongos NOD em diferentes fases do desenvolvimento da diabetes. Por meio de transferência adotiva de células, avaliar a capacidade de migração dessas células para os linfonodos pancreáticos.

Avaliar a morfologia, arquitetura e sinais de inflamação no intestino e no pâncreas de camundongos NOD diabéticos ou em fases pré-insulite e pré-diabetes a fim de entender melhor a cinética de alterações nos dois tecidos.

Buscar novas estratégias para prevenir ou reduzir a gravidade da diabetes autoimune em camundongos NOD através da inibição de estágios iniciais de inflamação no intestino. Um exemplo desse tipo de estratégia seria a administração oral de fatores tolerogênicos como lipossomas contendo fosfatidil serina.

# Referências Bibliográficas



## Referências bibliográficas

- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Alam, C., S. Valkonen, V. Palagani, J. Jalava, E. Eerola, and A. Hanninen. (2010). Inflammatory tendencies and overproduction of IL-17 in the colon of young NOD mice are counteracted with diet change. *Diabetes* 59:2237-2246
- Alleva, D.G., Pavlovich, R.P., Grant, C., Kaser, S.B., and Beller, D.I. (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49, 1106-1115.
- Alpan, O; Bachelder, E; Isil, E; Arnheiter, H; Matzinger, P. (2004). 'Educated' Dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat. Immunol.*,5(6): 564-566
- Anderson, M.S., and J.A. Bluestone. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485.
- Auricchio, R., Paparo, F., Maglio, M., Franzese, A., Lombardi, F., Valerio, G., Nardone, G., Percopo, S., Greco, L., and Troncone, R. (2004). In vitro-deranged intestinal immune response to gliadin in type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 1680-1683.
- Badami, E., C. Sorini, M. Coccia, V. Usuelli, L. Molteni, A.M. Bolla, M. Scavini, A. Mariani, C. King, E. Bosi, and M. Falcone. (2011). Defective differentiation of regulatory FoxP3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 60:2120-2124.
- Bain, C.C., and Mowat, A.M. (2011). Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. *Eur J Immunol* 41, 2494-2498.
- Bandeira, A., A. Coutinho, C. Carnaud, F. Jacquemart, and L. Forni. (1989). Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:272-276.
- Bar-on, L., Zigmund, E., and Jung, S. (2011). Management of gut inflammation through the manipulation of intestinal dendritic cells and macrophages? *Semin Immunol* 23, 58-64.
- Bermúdez-Humarán Lg, Corthier G, Langella PR. (2004) Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res Devel Microbiology* 8:147-160
- Besredka, A. De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. *Ann. Inst. Pasteur*, v.23, p.166-174, 1909.
- Bilate, A.M., and J.J. Lafaille. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 30:733-758.
- Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-606.
- Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar. (1955). Acquired tolerance to skin homografts. *An.N.Y.Acad. Sci.* 59:409-416.
- Birk, O.S., Elias, D., Weiss, A.S., Rosen, A., Van-Der Zee, R., Walker, M.D., and Cohen, I.R. (1996). NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun* 9, 159-166.
- Bluestone, J.A., and A.K. Abbas. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3:253-257.
- Bluestone, J.A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293-1300.

- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich Sd, Sorokin A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. *Genome Res* 11: 731-753,
- Bonomo, A., Kehn, P.J., and Shevach, E.M. (1994). Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J Immunol* 152, 1509-1514.
- Bonomo, A., Kehn, P.J., Payer, E., Rizzo, L., Cheever, A.W., and Shevach, E.M. (1995a). Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *J Immunol* 154, 6602-6611.
- Bonomo, A., Kehn, P.J., and Shevach, E.M. (1995b). Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol Today* 16, 61-67.
- Braat, H., P. Rottiers, D.W. Hommes, N. Huyghebaert, E. Remaut, J.P. Remon, S.J. van Deventer, S. Neiryneck, M.P. Peppelenbosch, and L. Steidler. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:754-759.
- Bradshaw, E.M., Raddassi, K., Elyaman, W., Orban, T., Gottlieb, P.A., Kent, S.C., and Hafler, D.A. (2009). Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol* 183, 4432-4439.
- Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, G. Haraldsen, and F.L. Jahnsen. (1998). Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. *Dev Biol Stand* 92:93-108.
- Brandtzaeg, P., T.S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T.O. Rognum, H. Scott, and L.M. Sollid. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97:1562-1584.
- Brode, S., T. Raine, P. Zacccone, and A. Cooke. (2006). Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:6603-6612.
- Brugman, S., Visser, J.T., Hillebrands, J.L., Bos, N.A., and Rozing, J. (2009). Prolonged exclusive breastfeeding reduces autoimmune diabetes incidence and increases regulatory T-cell frequency in bio-breeding diabetes-prone rats. *Diabetes Metab Res Rev* 25, 380-387. Burnet, M.F. 1959. The Clonal Selection Theory of Antibody Formation. The Vanderbilt and Cambridge University Presses, Cambridge, Nashville.
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R.B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M., and Dotta, F. (2005). Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 48, 1565-1575.
- Caldas, C., Luna, E., Spadafora-Ferreira, M., Porto, G., Iwai, L.K., Oshiro, S.E., Monteiro, S.M., Fonseca, J.A., Lemos, F., Hammer, J., Ho, P.L., Kalil, J., and Coelho, V. (2006). Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clin Exp Immunol* 146, 66-75.
- Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms, and T.J. Ley. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
- Carvalho, C.R., and N.M. Vaz. (1996). Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol* 43:613-618.
- Carvalho, C.R., B.A. Verdolin, A.V. de Souza, and N.M. Vaz. (1994). Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol* 39:533-538.
- Carvalho, C.R., B.A. Verdolin, and N.M. Vaz. (1997). Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol* 45:276-281.

- Carvalho, C.R., H.L. Lenzi, R. Correa-Oliveira, and N.M. Vaz. (2002). Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. *Braz J Med Biol Res* 35:1195-1199.
- Cederbom, L., Hall, H. And Ivars, F. (2000). Cd4+Cd25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, v.30, p.1538-43,
- Cerovic, V., Houston, S.A., Scott, C.L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A.M., and Milling, S.W. (2012). Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* 6, 104-113.
- Chakir, H., Lefebvre, D.E., Wang, H., Caraher, E., and Scott, F.W. (2005). Wheat protein-induced proinflammatory T helper 1 bias in mesenteric lymph nodes of young diabetes-prone rats. *Diabetologia* 48, 1576-1584.
- Champagne, E. (2011). gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59, 117-137.
- Chase, M. (1946). Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.61, p.257-259,
- Chen, Y., J. Inobe, and H.L. Weiner. (1997). Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model. *Cell Immunol* 178:62-68.
- Chen, Y; Kuchroo, VK; Inobe, J; Hafler, DA; Weiner, HL. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265(5176): 1237-1240
- Coelho, V., and A.M. Faria. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. *Front Immunol* 2:97.
- Concannon, P., S.S. Rich, and G.T. Nepom. (2009). Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360:1646-1654.
- Conde, A.A., B. Stransky, A.M. Faria, and N.M. Vaz. (1998). Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. *Braz J Med Biol Res* 31:377-380.
- Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 435-446.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757-1764.
- Coutinho, A., and Haas, W. (2001). In vivo models of dominant T-cell tolerance: where do we stand today? *Trends Immunol* 22, 350-351.
- Curotto De Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29, 114-126.
- da Cunha, A.P., and H.L. Weiner. 2011. Induction of immunological tolerance by oral anti-CD3. *Clin Dev Immunol* 2012:425021.
- Dahlen, E., Dawe, K., Ohlsson, L., and Hedlund, G. (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 160, 3585-3593.
- Daniel, D., and D.R. Wegmann. (1996). Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:956-960.
- de Azevedo, M.S., C.S. Rocha, N. Electo, D.S. Pontes, J.B. Molfetta, E.D. Goncalves, V. Azevedo, C.L. Silva, and A. Miyoshi. (2012). Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-

- grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 11:1146-1157
- De Kleer, I.M., Kamphuis, S.M., Rijkers, G.T., Scholtens, L., Gordon, G., De Jager, W., Hafner, R., Van De Zee, R., Van Eden, W., Kuis, W., and Prakken, B.J. (2003). The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. *Arthritis Rheum* 48, 2001-2010.
- De Vos Wm, Simons Gfm. Gene cloning and expression systems in lactococci. In: M. J. Gasson and W. M. de Vos 1994. (Ed.). *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Chapman & Hill, Glasgow. 52-105,
- Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8, 1086-1094.
- Dighiero, G., B. Guilbert, and S. Avrameas. (1982). Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J Immunol* 128:2788-2792.
- Dighiero, G., P. Lymberi, D. Holmberg, I. Lundquist, A. Coutinho, and S. Avrameas. (1985). High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* 134:765-771.
- Duwat P, Cesselin B, Sourice S, Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int J Food Microbiol* 55: 83- 86, 2000.
- Eisenbarth, G.S. (1986). Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314:1360-1368.
- Eizirik, D.L., Sammeth, M., Bouckenooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M.L., Barthson, J., Bouwens, L., Hughes, L., Gregory, L., Lunter, G., Marselli, L., Marchetti, P., Mccarthy, M.I., and Cnop, M. (2012). The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet* 8, e1002552.
- Elias, D., A. Avron, M. Tamir, and I. Raz. 2006. DiaPep277 preserves endogenous insulin production by immunomodulation in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1079:340-344.
- Elias, D., A. Meilin, V. Ablamunits, O.S. Birk, P. Carmi, S. Konen-Waisman, and I.R. Cohen. (1997). Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. *Diabetes* 46:758-764.
- Ellis, R.J. (1990). The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biol.*, 1(1): 1-9
- Ellwardt, E., and Zipp, F. (2014). Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. *Exp Neurol*.
- Emamaullee, J.A., Davis, J., Merani, S., Toso, C., Elliott, J.F., Thiesen, A., and Shapiro, A.M. (2009). Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58, 1302-1311.
- Faria, A. M. C. . (2008) Tolerância Imunológica. In: Vera Calich, Celidéia Vaz. (Org.). *Imunologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 179-201.
- Faria, A.M., and H.L. Weiner. (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* 73:153-264.
- Faria, A.M., and H.L. Weiner. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 13:143-157.
- Faria, A.M., G. Garcia, M.J. Rios, C.L. Michalaros, and N.M. Vaz. (1993). Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old

- mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology* 78:147-151.
- Faria, A.M., R. Maron, S.M. Ficker, A.J. Slavin, T. Spahn, and H.L. Weiner. (2003). Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 20:135-145.
- Faria, A.M., S.M. Ficker, E. Speziali, J.S. Menezes, B. Stransky, V. Silva Rodrigues, and N.M. Vaz. (1998). Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev* 102:67-80.
- Feige, U., and Cohen, I.R. (1991). The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. *Springer Semin Immunopathol* 13, 99-113.
- Feuerer, M., J.A. Hill, K. Kretschmer, H. von Boehmer, D. Mathis, and C. Benoist. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5919-5924.
- Fife, B.T., Guleria, I., Gubbels Bupp, M., Eagar, T.N., Tang, Q., Bour-Jordan, H., Yagita, H., Azuma, M., Sayegh, M.H., and Bluestone, J.A. (2006). Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J Exp Med* 203, 2737-2747.
- Finnish-German APECED Consortium. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17:399-403.
- Fishman-Lobell, J., A. Friedman, and H.L. Weiner. (1994). Different kinetic patterns of cytokine gene expression in vivo in orally tolerant mice. *Eur J Immunol* 24:2720-2724.
- Fu, Z., Zhen, W., Yuskavage, J., and Liu, D. (2010). Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr* 105, 1218-1225.
- Fujihashi, K., *et al.* (1999). gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int. Immunol.* 11, 1907-1916
- Funda, D.P., Kaas, A., Tlaskalova-Hogenova, H., and Buschard, K. (2008). Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 24, 59-63.
- Gale, E.A. (2005). Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. *Diabetologia* 48, 1435-1438.
- Garside, P., and A.M. Mowat. (2001). Oral tolerance. *Semin Immunol* 13:177-185.
- Gershon, R.K., P. Cohen, R. Hencin, and S.A. Liebhaber. (1972). Suppressor T cells. *J Immunol* 108:586-590.
- Govert, M., and Lafaille, J.J. (2012). Maternal-fetal immune tolerance, block by block. *Cell* 150, 7-9.
- Gomes-Santos, A.C., Moreira, T.G., Castro-Junior, A.B., Horta, B.C., Lemos, L., Cruz, D.N., Guimaraes, M.A., Cara, D.C., Mccafferty, D.M., and Faria, A.M. (2011). New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol* 2012, 560817.
- Gomes-Santos A.C.; Castro-Junior, A.; Horta, B.; Moreira, T.; Almeida, L.; Oliveira, R.; Rezende, R.; Cara, D.; Oliveira, S.; Miyoshi, A.; Faria, A. C.. (2014, *Manuscrito a ser submetido*) Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents intestinal inflammatory disease by IL-10- and TLR2-dependent pathways
- Gong Z, Pan L, Le Y, Liu Q, Zhou M, Xing W, Zhuo R, Wang S, Guo J. (2010). Glutamic acid decarboxylase epitope protects against autoimmune diabetes through activation of Th2 immune response and induction of possible regulatory mechanism. *Vaccine*. May 28;28(24):4052-8.

- Gowans, J.L. 1959. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 146:54-69.
- Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., Chatenoud, L., Klatzmann, D., Salomon, B.L., and Piaggio, E. (2010). IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 207, 1871-1878.
- Guarner, F., and J.R. Malagelada. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237-246
- Hamilton-Williams, E.E., Palmer, S.E., Charlton, B., and Slattery, R.M. (2003). Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6688-6693.
- Hanninen, A., Jaakkola, I., and Jalkanen, S. (1998). Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 160, 6018-6025.
- Hanson, D.G., N.M. Vaz, L.C. Maia, M.M. Hornbrook, J.M. Lynch, and C.A. Roy. (1977). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 55:526-532.
- Hanson, D.G., N.M. Vaz, L.C. Maia, and J.M. Lynch. (1979a). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. *J Immunol* 123:2337-2343.
- Hanson, D.G., N.M. Vaz, L.A. Rawlings, and J.M. Lynch. (1979b). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization. *J Immunol* 122:2261-2266.
- Hanson, D.G. 1981. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol* 127:1518-1524.
- Harada, M., and S. Makino. (1984). Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia* 27:604-606.
- Haskins, K., and Wegmann, D. (1996). Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes* 45, 1299-1305.
- Herold, K.C., Gitelman, S.E., Masharani, U., Hagopian, W., Bisikirska, B., Donaldson, D., Rother, K., Diamond, B., Harlan, D.M., and Bluestone, J.A. (2005). A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1763-1769.
- Homo-Delarche, F. (2001). Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? *Braz J Med Biol Res* 34, 437-447.
- Honkanen, J., Nieminen, J.K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H.M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T., and Vaarala, O. (2010). IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 185, 1959-1967.
- Hooijkaas, H., R. Benner, J.R. Pleasants, and B.S. Wostmann. (1984). Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol* 14:1127-1130.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, Koning F, Rottiers P, David CS, van Deventer SJ, Murray JA. (2009). Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Abo Dq8 transgenic mice. *J Immunol*, 183(4): 2390-6.

- Huibregtse, I.L., Snoeck, V., De Creus, A., Braat, H., De Jong, E.C., Van Deventer, S.J., and Rottiers, P. (2007). Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology* 133, 517-528.
- Inagaki-Ohara, K., *et al.* (2004). Mucosal T cells bearing TCR $\gamma$ delta play a protective role in intestinal inflammation. *J. Immunol.* 173, 1390-1398
- Ishikawa, H., H. Ochi, M.L. Chen, D. Frenkel, R. Maron, and H.L. Weiner. (2007). Inhibition of autoimmune diabetes by oral administration of anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes* 56:2103-2109.
- Jaakkola, I., Jalkanen, S., and Hanninen, A. (2003). Diabetogenic T cells are primed both in pancreatic and gut-associated lymph nodes in NOD mice. *Eur J Immunol* 33, 3255-3264.
- Johnson, M.C., Garland, A.L., Nicolson, S.C., Li, C., Samulski, R.J., Wang, B., and Tisch, R. (2013). beta-cell-specific IL-2 therapy increases islet Foxp3<sup>+</sup>Treg and suppresses type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 62, 3775-3784.
- Kagnoff, M.F. 1982. Oral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 392:248-265.
- Keymeulen, B., Walter, M., Mathieu, C., Kaufman, L., Gorus, F., Hilbrands, R., Vandemeulebroucke, E., Van De Velde, U., Crenier, L., De Block, C., Candon, S., Waldmann, H., Ziegler, A.G., Chatenoud, L., and Pipeleers, D. (2010). Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia* 53, 614-623.
- Keymeulen, B., Walter, M., Mathieu, C., Kaufman, L., Gorus, F., Hilbrands, R., Vandemeulebroucke, E., Van De Velde, U., Crenier, L., De Block, C., Candon, S., Waldmann, H., Ziegler, A.G., Chatenoud, L., and Pipeleers, D. (2010). Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia* 53, 614-623.
- Khoury, SJ; Hancock, WW; Weiner, HL. (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 beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(5): 1355-1364
- Kutlu, B., Burdick, D., Baxter, D., Rasschaert, J., Flamez, D., Eizirik, D.L., Welsh, N., Goodman, N., and Hood, L. (2009). Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell. *BMC Med Genomics* 2, 3.
- Lee, A.S., Gibson, D.L., Zhang, Y., Sham, H.P., Vallance, B.A., and Dutz, J.P. (2009). Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia* 53, 741-748
- Lee, S.M., Yang, H., Tartar, D.M., Gao, B., Luo, X., Ye, S.Q., Zaghouani, H., and Fang, D. (2011). Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 54, 1136-1146. doi: 10.1007/s00125-011-2064-1.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13, 991-999.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191.
- Liu, S.M., Lee, D.H., Sullivan, J.M., Chung, D., Jager, A., Shum, B.O., Sarvetnick, N.E., Anderson, A.C., and Kuchroo, V.K. (2011). Differential IL-21 signaling in APCs leads to disparate Th17 differentiation in diabetes-susceptible NOD and diabetes-resistant NOD.Idd3 mice. *J Clin Invest* 121, 4303-4310.

- Lonyai, A., S. Kodama, D. Burger, and D.L. Faustman. (2008). Fetal Hox11 expression patterns predict defective target organs: a novel link between developmental biology and autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 86:301-309.
- Maillard, M.H., and S.B. Snapper. (2007). Teaching tolerance with a probiotic antigen delivery system. *Gastroenterology* 133:706-709.
- Makino, S., K. Kunimoto, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri, and Y. Tochino. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29:1-13.
- Malaisse, W.J., P. Courtois, and F.W. Scott. (2004). Insulin-dependent diabetes and gut dysfunction: the BB rat model. *Horm Metab Res* 36:585-594.
- Maree, A.F., M. Komba, D.T. Finegood, and L. Edelstein-Keshet. (2008). A quantitative comparison of rates of phagocytosis and digestion of apoptotic cells by macrophages from normal (BALB/c) and diabetes-prone (NOD) mice. *J Appl Physiol* 104:157-169.
- Maron R, Guerau-de-Arellano M, Zhang X, Weiner HL. (2001). Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun*, 16(1):21-8.
- Maron R, Sukhova G, Faria AM et al. (2002) Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of lowdensity lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*.;106:1708-15.
- Marth, T., S. Ring, D. Schulte, N. Klensch, W. Strober, B.L. Kelsall, A. Stallmach, and M. Zeitz. (2000). Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. *Eur J Immunol* 30:3478-3486.
- Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S.H., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 216-224.
- Marwaha, A.K., Crome, S.Q., Panagiotopoulos, C., Berg, K.B., Qin, H., Ouyang, Q., Xu, L., Priatel, J.J., Levings, M.K., and Tan, R. (2010). Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol* 185, 3814-3818.
- Mathis, D., and C. Benoist. (2009). Aire. *Annu Rev Immunol* 27:287-312. 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141532
- Mathis, D., L. Vence, and C. Benoist. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798.
- Maurano, F., Mazzarella, G., Luongo, D., Stefanile, R., D'ariento, R., Rossi, M., Auricchio, S., and Troncone, R. (2005). Small intestinal enteropathy in non-obese diabetic mice fed a diet containing wheat. *Diabetologia* 48, 931-937.
- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231-241. doi: nature11551 [pii]10.1038/nature11551.
- Medawar, P.B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J. Anat.* 78:176-199.
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., and Soares, M.P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335, 936-941.
- Mellanby, R.J., Thomas, D., Phillips, J.M., and Cooke, A. (2007). Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology* 121, 15-28.
- Menezes, J.S., D.S. Mucida, D.C. Cara, J.I. Alvarez-Leite, M. Russo, N.M. Vaz, and A.M. de Faria. 2003. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 15:447-455.

- Mengel, J., *et al.* Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol. Lett.* **48**, 97-102 (1995).
- Mercadante, A.C., Perobelli, S.M., Alves, A.P., Goncalves-Silva, T., Mello, W., Gomes-Santos, A.C., Miyoshi, A., Faria, A.M., and Bonomo, A. (2014). Oral combined therapy with probiotics and alloantigen induces B cell-dependent long-lasting specific tolerance. *J Immunol* 192, 1928-1937.
- Mercenier A, Muller-Alouf A, Granette C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mol Biol* 2: 17-25
- Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 7:265-276.
- Miller, A., Lider, O. And Weiner, H. L. (1991). Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med*, v.174, p.791-8
- Miller, A., O. Lider, A.B. Roberts, M.B. Sporn, and H.L. Weiner. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:421-425.
- Miller, A., O. Lider, O. Abramsky, and H.L. Weiner. (1994). Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *Eur J Immunol* 24:1026-1032.
- Miller, B.J., Appel, M.C., O'neil, J.J., and Wicker, L.S. (1988). Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 140, 52-58.
- Miller, S. D. And Hanson, D. G. (1979). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol*, v.123, p.2344-50,
- Miller, S.D., and D.G. Hanson. (1979). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol* 123:2344-2350.
- Mingueneau, M., Jiang, W., Feuerer, M., Mathis, D., and Benoist, C. (2012). Thymic negative selection is functional in NOD mice. *J Exp Med* 209, 623-637
- Miyoshi, A., E. Jamet, J. Commissaire, P. Renault, P. Langella, and V. Azevedo. (2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 239:205-212.
- Modigliani, Y., Bandeira, A., and Coutinho, A. (1996). A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol Rev* 149, 155-120.
- Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Sci Am* 245:154-158, 160, 162 et passiom.
- Mowat, A.M., A.G. Lamont, and M.G. Bruce. (1987). A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due to failure of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen. *Eur J Immunol* 17:1673-1676.
- Mucida, D., and H. Cheroutre. 2007. TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. *Cell Adh Migr* 1:142-144. 5062
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J.J. Lafaille, and M.A. Curotto de Lafaille. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115:1923-1933. 10.1172/JCI24487
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.

- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10, 1178-1184.
- Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
- Neutra Mr, Kozlowski Pa. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6:148-58,
- Nevius, E., Srivastava, P.K., and Basu, S. (2011). Oral ingestion of Capsaicin, the pungent component of chili pepper, enhances a discreet population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. *Mucosal Immunol* 5, 76-86
- Ngan, J., and L.S. Kind. (1978). Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol* 120:861-865.
- Nishizuka, Y., Y. Tanaka, T. Sakakura, and A. Kojima. (1973). Murine thyroiditis induced by neonatal thymectomy. *Experientia* 29:1396-1398.
- Nomura, T., and S. Sakaguchi. (2005). Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 293:287-302.
- Norris, J.M., Barriga, K., Klingensmith, G., Hoffman, M., Eisenbarth, G.S., Erlich, H.A., and Rewers, M. (2003). Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290, 1713-1720.
- Nouaille S, Ribeiro La, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y; Oliveira Sc, Langella P, Azevedo V (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 31;2(1):102-11,
- O'Brien, B.A., Y. Huang, X. Geng, J.P. Dutz, and D.T. Finegood. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. *Diabetes* 51:2481-2488.
- Ochi, H., M. Abraham, H. Ishikawa, D. Frenkel, K. Yang, A.S. Basso, H. Wu, M.L. Chen, R. Gandhi, A. Miller, R. Maron, and H.L. Weiner. (2006). Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. *Nat Med* 12:627-635.
- Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H.L. Weiner. (2003). CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2516-2522.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., and Bach, J.F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 160, 1-9.
- Orban, T., Bundy, B., Becker, D.J., Dimeglio, L.A., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Greenbaum, C.J., Marks, J.B., Monzavi, R., Moran, A., Raskin, P., Rodriguez, H., Russell, W.E., Schatz, D., Wherrett, D., Wilson, D.M., Krischer, J.P., and Skyler, J.S. (2011). Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 378, 412-419. Owen, R.D. 1945. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102:400-401.
- Pelegri, C., Rosmalen, J.G., Durant, S., Throsby, M., Alves, V., Coulaud, J., Esling, A., Pleau, J.M., Drexhage, H.A., and Homo-Delarche, F. (2001). Islet endocrine-cell behavior from birth onward in mice with the nonobese diabetic genetic background. *Mol Med* 7, 311-319.
- Peron, J.P., Yang, K., Chen, M.L., Brandao, W.N., Basso, A.S., Commodaro, A.G., Weiner, H.L., and Rizzo, L.V. (2010). Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J Neuroimmunol* 227, 10-17.

- Persson, E.K., Scott, C.L., Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2013). Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol* 43, 3098-3107
- Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., Mcgee, P.F., Moran, A.M., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D., Wilson, D.M., Lachin, J.M., and Skyler, J.S. (2009). Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 361, 2143-2152
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141-153.
- Phillips, B., M. Trucco, and N. Giannoukakis. (2011). Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clin Dev Immunol* 2011:432016.
- Platt, A.M., Bain, C.C., Bordon, Y., Sester, D.P., and Mowat, A.M. (2010). An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J Immunol* 184, 6843-6854.
- Presa, M., Ortiz, A.Z., Garabatos, N., Izquierdo, C., Rivas, E.I., Teyton, L., Mora, C., Serreze, D., and Stratmann, T. (2013). Cholera toxin subunit B peptide fusion proteins reveal impaired oral tolerance induction in diabetes-prone but not in diabetes-resistant mice. *Eur J Immunol* 43, 2969-2979.
- Pull, S.L., Doherty, J.M., Mills, J.C., Gordon, J.I., and Stappenbeck, T.S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 99-104
- Qualls, J.E., Kaplan, A.M., Van Rooijen, N., and Cohen, D.A. (2006). Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 80, 802-815.
- Quintana, F.J., and Cohen, I.R. (2010). The HSP60 immune system network. *Trends Immunol* 32, 89-95.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T.Z., Futter, C.E., Anderson, G., Walker, L.S., and Sansom, D.M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600-603.
- Rabinovitch, A. 1992. Free radicals as mediators of pancreatic islet beta-cell injury in autoimmune diabetes. *J Lab Clin Med* 119:455-456.
- Rabinovitch, A., and W.L. Suarez-Pinzon. (1998). Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55:1139-1149.
- Rezende, R.M., R.P. Oliveira, S.R. Medeiros, A.C. Gomes-Santos, A.C. Alves, F.G. Loli, M.A. Guimaraes, S.S. Amaral, A.P. da Cunha, H.L. Weiner, V. Azevedo, A. Miyoshi, and A.M. Faria. (2012). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *J Autoimmun* S0896-8411(12)00108-4
- Rezende, R.M. Andre P da Cunha, Hanane M'Hamdi, Galina Gabriely, Tyler Vandeventer, Shirong Liu, Ron Cialic, Natalia P Rosa, Rafael P Oliveira, Jellert T Gaublomme, Nathalie Pochet, Hongkun Park, Ana M C Faria and Howard L. Weiner. (2014) Identification and characterization of latency-associated peptide (LAP)-expressing  $\gamma\delta$  regulatory T cells. ***Manuscrito submetido para publicação***
- Richman, L.K., J.M. Chiller, W.R. Brown, D.G. Hanson, and N.M. Vaz. 1978. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol* 121:2429-2434.

- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.
- Rios, M.J., M.A. Pereira, L.M. Lopes, A.M. Faria, C.M. Gontijo, E.B. Castanheira, and N.M. Vaz. (1988). Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. *Braz J Med Biol Res* 21:825-836.
- Rivollier, A., J. He, A. Kole, V. Valatas, and B.L. Kelsall. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* 209:139-155.
- Robinson, C.P., Yamamoto, H., Peck, A.B., and Humphreys-Beher, M.G. (1996). Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scid mouse in the absence of detectable lymphocytic infiltration: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* 79, 50-59.
- Roep, B.O., and Peakman, M. (2012). Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007781.
- Rosmalen, J.G., Homo-Delarche, F., Durant, S., Kap, M., Leenen, P.J., and Drexhage, H.A. (2000). Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. *Lab Invest* 80, 769-777.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
- 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. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Saklayen, M.G., A.J. Pesce, V.E. Pollak, and J.G. Michael. (1984). Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 73:5-9.
- Santiago, A.F., A.C. Alves, R.P. Oliveira, R.M. Fernandes, J. Paula-Silva, F.A. Assis, C.R. Carvalho, H.L. Weiner, and A.M. Faria (2010). Aging correlates with reduction in regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. *Immunobiology* 216:1085-1093.
- Santoro, M.G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59, 55-63.
- Saravia, F., and Homo-Delarche, F. (2003). Is innervation an early target in autoimmune diabetes? *Trends Immunol* 24, 574-579.
- Schloot, N.C., and Cohen, I.R. (2013). DiaPep277(R) and immune intervention for treatment of type 1 diabetes. *Clin Immunol* 149, 307-316.
- Schneider, D.S., and Ayres, J.S. (2008). Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 889-895.
- Serreze, D.V., Prochazka, M., Reifsnyder, P.C., Bridgett, M.M., and Leiter, E.H. (1994). Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 180, 1553-1558.
- Shieh, S.J., Chou, F.C., Yu, P.N., Lin, W.C., Chang, D.M., Roffler, S.R., and Sytwu, H.K. (2009). Transgenic expression of single-chain anti-CTLA-4 Fv on beta cells protects nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol* 183, 2277-2285.
- Slavin, A.J., R. Maron, and H.L. Weiner. 2001. Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Int Immunol* 13:825-833.

- Smith, K.M., J.M. Davidson, and P. Garside. (2002). T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* 106:144-158.
- Smith, P.D., Smythies, L.E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., and Wahl, S.M. (2010). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 4, 31-42.
- Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., and Smith, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115, 66-75.
- Smythies, L.E., Shen, R., Bimczok, D., Novak, L., Clements, R.H., Eckhoff, D.E., Bouchard, P., George, M.D., Hu, W.K., Dandekar, S., and Smith, P.D. (2010). Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation. *J Biol Chem* 285, 19593-19604.
- Soleimanpour, S.A., and Stoffers, D.A. (2013). The pancreatic beta cell and type 1 diabetes: innocent bystander or active participant? *Trends Endocrinol Metab* 24, 324-331.
- Srikanta, S., A.T. Ricker, D.K. McCulloch, J.S. Soeldner, G.S. Eisenbarth, and J.P. Palmer. (1986). Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 35:139-142.
- Stadinski, B.D., Zhang, L., Crawford, F., Marrack, P., Eisenbarth, G.S., and Kappler, J.W. (2010). Diabetogenic T cells recognize insulin bound to IA2 in an unexpected, weakly binding register. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10978-10983.
- Steidler L, Rottiers P. (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci* 1072:176-86,.
- Steinman RM, Cohn ZA Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 1. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of experimental medicine*. 1973;137:1142-1162
- Stiller, C.R., J. Dupre, M. Gent, M.R. Jenner, P.A. Keown, A. Laupacis, R. Martell, N.W. Rodger, B. von Graffenried, and B.M. Wolfe. (1984). Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 223:1362-1367.
- Strobel, S., and A. Ferguson. (1984). Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res* 18:588-594.
- Strober, W., Fuss, I.J., and Blumberg, R.S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 20, 495-549.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775-1785.
- Sun, J., M. Alison Stalls, K.L. Thompson, and N. Fisher Van Houten. (2003). Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. *Cell Immunol* 225:33-41.
- Taams, L. S., Boot, E. P., Van Eden, W. And Wauben, M. H. (2000). 'Anergic' T cells modulate the T-cell activating capacity of antigen-presenting cells. *J Autoimmun*, v.14, p.335-41,
- Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M.T., Honda, H., Oshima, Y., Saito, R., Takayama, T., Kobayashi, T., Chinen, H., Mikami, Y., Kanai, T., Okamoto, S., and Hibi, T. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol* 184, 2671-2676.

- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310.
- Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, Robert S, Grieco FA, Caluwaerts S, Galleri L, Spagnuolo I, Steidler L, Van Huynegem K, Demetter P, Wasserfall C, Atkinson MA, Dotta F, Rottiers P, Gysemans C, Mathieu C. (2012). Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest*. May 1;122(5):1717-25.
- Thomas, H.C., and M.V. Parrott. (1974). The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology* 27:631-639.
- Thornton, A.M., E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523.
- Titus, R. G. And Chiller, J. M. (1981) Orally induced tolerance. Definition at the cellular level. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, v.65, p.323-38,
- Titus, R.G., and J.M. Chiller. (1981). Orally induced tolerance. Definition at the cellular level. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 65:323-338.
- Tomasi, T.B., Jr. (1980). Oral tolerance. *Transplantation* 29:353-356.
- Tooley, J.E., F. Waldron-Lynch, and K.C. Herold. (2012). New and future immunomodulatory therapy in type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 18:173-181.
- Tsai, Y.T., P.C. Cheng, and T.M. Pan. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:853-862.
- Turley, S., L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist, and D. Mathis. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med* 198:1527-1537.
- Turley, S.J., J.W. Lee, N. Dutton-Swain, D. Mathis, and C. Benoist. (2005). Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17729-17733.
- Vaarala, O. (2011). The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18:241-247.
- Vaarala, O., Atkinson, M.A., and Neu, J. (2008). The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 57, 2555-2562.
- Van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen R J, De Vos W M, Simons G. (1990) Cloning, Expression In Escherichia Coli And Characterization Of Usp45, A Gene Encoding A Highly Secreted Protein From *Lactococcus Lactis* Mg1363. *Gene* 95: 55-160,.
- Van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and Von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91, 79-118.
- van der Heijden, P.J., W. Stok, and A.T. Bianchi. (1987). Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology* 62:551-555.
- van Eden, W., R. van der Zee, and B. Prakken. (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5:318-330.
- Van Halteren, A.G. et al. (2000). T cell reactivity to heat shock protein 60 in diabetes-susceptible and genetically protected nonobese diabetic mice is associated with a protective cytokine profile. *J Immunol*. 165: 5544-5551.

- Vantourout, P. & Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88-100
- Vaz, N.M., and C.R. Carvalho. (1994). Assimilation, tolerance and the end of innocence. *Ciência e Cultura* 46:351-357.
- Vaz, N.M., L.C. Maia, D.G. Hanson, and J.M. Lynch. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol* 60:110-115.
- Vaz, N.M., L.C. Maia, D.G. Hanson, and J.M. Lynch. (1981). Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76:83-91.
- Vaz, N.M., M.J. Rios, L.M. Lopes, C.M. Gontijo, E.B. Castanheira, F. Jacquemart, and L.A. Andrade. (1987). Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Braz J Med Biol Res* 20:785-790.
- Vendetti, S., J.G. Chai, J. Dyson, E. Simpson, G. Lombardi, and R. Lechler. (2000). Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 165:1175-1181.
- Viney, J.L., A.M. Mowat, J.M. O'Malley, E. Williamson, and N.A. Fanger. (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 160:5815-5825.
- Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1098-1113. doi: 10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9
- Weber, B., Saurer, L., Schenk, M., Dickgreber, N., and Mueller, C. (2011). CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 41, 773-779
- Weiner, H.L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
- Weiner, H.L., A. Friedman, A. Miller, S.J. Khoury, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R.B. Nussenblatt, D.E. Trentham, and D.A. Hafler. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 12:809-837.
- Weiss, J.M., A.M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M.A. Curotto de Lafaille, C.N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A.B. Frey, M.G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M.O. Li, R.E. Niec, A.Y. Rudensky, M.L. Dustin, D.R. Littman, and J.J. Lafaille. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209:1723-1742
- Wells Jm, Mercenier A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature.* 1038:1-14,.
- Wells, H.G. and OSBORNE, T.B. The biological reactions of the vegetable proteins. I. Anaphylaxis. *J. Infect. Dis.*, v.8, p.66-123, 1911.
- Wells, H.G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *J. Infect. Dis.*, v.8, p.147-171, 1911.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., and Chervonsky, A.V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455, 1109-1113.
- Wesch, D., Peters, C., Oberg, H.H., Pietschmann, K. & Kabelitz, D. (2011) Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2357-2370.
- Wicker, L.S., J. Clark, H.I. Fraser, V.E. Garner, A. Gonzalez-Munoz, B. Healy, S. Howlett, K. Hunter, D. Rainbow, R.L. Rosa, L.J. Smink, J.A. Todd, and L.B. Peterson. (2005). Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun* 25 Suppl:29-33.

- Winer, S., Tsui, H., Lau, A., Song, A., Li, X., Cheung, R.K., Sampson, A., Afifiyan, F., Elford, A., Jackowski, G., Becker, D.J., Santamaria, P., Ohashi, P., and Dosch, H.M. (2003). Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 9, 198-205.
- You, S., Alyanakian, M.A., Segovia, B., Damotte, D., Bluestone, J., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (2008). Immunoregulatory pathways controlling progression of autoimmunity in NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* 1150, 300-310.
- Zanin-Zhorov, A., G. Nussbaum, S. Franitza, I.R. Cohen, and O. Lider. (2003). T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J* 17:1567-1569.
- Zanin-Zhorov, A., L. Cahalon, G. Tal, R. Margalit, O. Lider, and I.R. Cohen. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116:2022-2032.
- Zanin-Zhorov, A., R. Bruck, G. Tal, S. Oren, H. Aeed, R. Hershkoviz, I.R. Cohen, and O. Lider. (2005). Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol* 174:3227-3236.
- Zhang L, Nakayama M, Eisenbarth GS. (2008). Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. *Curr Opin Immunol* 20: 111–118.
- Ziegler, A.G., Schmid, S., Huber, D., Hummel, M., and Bonifacio, E. (2003). Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290, 1721-1728.
- Kelsall, B. (2008). Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol* 1, 460-469.
- Tezuka, H., and Ohteki, T. (2010). Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 247-258.

