

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

GUILHERME GUSMÃO SILVA

**EFEITOS IMUNO-REGULADORES DO *LACTOCOCCUS LACTIS*
PRODUTOR DE HSP65 NA ARTRITE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

BELO HORIZONTE
2016

GUILHERME GUSMÃO SILVA

**EFEITOS IMUNO-REGULADORES DO *LACTOCOCCUS LACTIS*
PRODUTOR DE HSP65 NA ARTRITE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial na obtenção do título de doutor em Bioquímica e Imunologia.

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. ANA MARIA CAETANO FARIA

**BELO HORIZONTE
2016**

Dedicado à minha e à todas as mães.

“As ciências naturais pressupõem um mundo vivo, mas o mundo vivo não é o mundo das ciências naturais”

Kurt Goldstein

“A fronteira entre a saúde e a doença é determinada por um equilíbrio delicado entre os processos de reparo e o potencial destrutivo do corpo, do qual as doenças autoimunes, alérgicas e a inflamação são apenas aspectos particulares.”

Ohad Parnes

Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica em que a inflamação das articulações determina a sua destruição e perda da mobilidade. Não há prevenção ou cura para a artrite reumatoide, e o tratamento baseia-se em anti-inflamatórios e analgésicos, restrito ao controle dos sintomas. A perda de tolerância na doença autoimune pode ser restaurada por ingestão do antígeno. Este processo induz tolerância oral, e os seus efeitos terapêuticos são bem estabelecida em modelos experimentais e clínicos. No entanto, a ingestão contínua de antígeno purificado nem sempre é viável. A Hsp65 é uma chaperonina essencial no dobramento de proteínas e adaptação ao estresse celular. Ela também é uma potente reguladora da resposta imune e do processo inflamatório. Para a entrega direta de Hsp65 na mucosa, nós usamos uma linhagem recombinante de *Lactococcus lactis* que secreta Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. Demonstramos que a terapia oral com Hsp65 inibiu a Artrite Induzida por Colágeno e um modelo agudo de artrite em camundongos. Este efeito preventivo incluiu a inibição do edema da pata, a inflamação das articulações. Ele esteve também associado à redução dos níveis de citocinas inflamatórias e de anticorpos patogênicos, assim como ao aumento de linfócitos B e T reguladores.

Palavras-Chave: Tolerância, Autoimunidade, Artrite Reumatóide, Heat-shock proteins

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease in which inflammation of the joints determines its destruction and loss of mobility. There is no prevention or cure for RA, and the treatment is based on conventional anti-inflammatory, analgesic drugs restricted to symptoms control. The loss of tolerance resulting in pathogenic autoimmunity can be restored by ingestion of the target antigen. This procedure induces oral tolerance, and their therapeutic effects are well established in experimental models and clinical trials. However, the continuous intake of purified antigen is not always feasible as an alternative therapy. Hsp65 is a chaperonin essential to protein folding and response to cellular stress. The Hsp65 is also a known regulator of the immune response and inflammatory process. For direct delivery of Hsp65 to the mucosa, a recombinant *Lactococcus lactis* was constructed in a way to produce and secrete *Mycobacterium leprae* Hsp65. The present study has shown that the therapy with *Lactococcus lactis* prevented a Collagen Induced Arthritis and a model of acute arthritis in mice. This preventive effect included inhibition of paw edema and joint inflammation associated with reduced levels of inflammatory cytokines and pathogenic autoantibodies and augmented numbers of regulatory B and T lymphocytes.

Keywords: Tolerance, Autoimmunity, Rheumatoid Arthritis, Heat-shock proteins

Lista de Figuras

Figura 1: Escores clínico e histológico da AIC em camundongos BALB/c.....	47
Figura 2: Análise histopatológica dos efeitos do tratamento com Hps65-lac.....	48
Figura 3: Produção de citocinas nas culturas de células de camundongos com AIC.....	50
Figura 4: Produção de IL-17 e IFN- γ nas culturas de células de camundongos com AIC.....	50
Figura 5: Frequências de células T CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α no baço de camundongos com AIC.....	51
Figura 6: Produção de anticorpos específicos em camundongos com AIC.....	52
Figura 7: Eixo REGULA/INFLAMA.....	53
Figura 8: Frequência de células T CD4 ⁺ CD44 ⁺ de memória no baço de camundongos com AIC.....	55
Figura 9: Frequências de células T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ LAP ⁺ no baço e nos linfonodos de camundongos com AIC.....	56
Figura 10: Frequências de células T reguladores no baço e nos linfonodos de camundongos com AIC.....	57
Figura 11: Frequências de células B produtoras de IL-10 (Bregs) no baço de camundongos com AIC.....	58
Figura 12: Níveis de anticorpos específicos em camundongos BALB/c deficientes em IL-10 com AIC.....	59
Figura 13: Efeitos do tratamento oral com Hsp65-lac em parâmetros imunológicos associados ao desenvolvimento da artrite aguda induzida por mBSA (AIA).....	60
Figura 14: Frequência de linfócitos T _{REG} em camundongos com AIA tratados previamente com Hsp65-lac.....	61

Lista de Abreviaturas

AIA: Artrite Induzida por Antígeno
AIC: Artrite Induzida por Colágeno
AIRE: Regulador autoimune (*Autoimmune Regulator*)
ADAMT : agrecanases
AR: Artrite Reumatoide.
CCP: Peptídeo Citrulinados Cíclicos (*Citrullinated Cyclic Peptide*)
CCL: quimiocina
CCR: receptor de quimiocinas
CD: Agregado de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)
CII: Colágeno tipo II
CTLA-4: proteína 4 associada a citotoxicidade de linfócitos T
EAE: Encefalomielite Autoimune Experimental
FR: Fator Reumatoide
GALT: Tecido linfoide associado ao intestino (*Gut Associated Lymphoid Tissue*)
GPI-6: glicose-6-fosfato isomerase
HLA: Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)
IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ : Interferon gamma
IL: Interleucinas
IPEX: desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao X
LAP: Peptídeo associado a Latência (*Latency Associated Peptide*)
LI-EP-: *Lactococcus lactis* portador de plasmídeo vazio
HSP: Proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Proteins*)
Hsp65-lac: Hsp65 de *Mycobacterium leprae* produzido por *L. lactis*
MALT: Tecido linfóide associado a mucosa (*Mucosal Associated Lymphoid Tissue*)
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)
MMP: metaloproteinases de matriz
NOD: Non Obese Diabetes
OVA: Ovalbumina
PAD: arginina-peptidil-desaminase (*PeptidylArginine Deiminases*)
PD-L1: ligante 1 de morte programada (*Programmed Death-Ligand 1*)
RANK: Receptor Ativador do fator Nuclear κ B
RANKL: ligante de RANK
ROR- γ : retinoic acid receptor–related orphan receptor γ
TCR: Receptor de células T (*T Cell Receptor*)
TGF- β : Transforming Growth Factor β
T_H: Linfócito T *helper*
T_{REG}: Linfócito T regulador
TLR: *Toll Like Receptor*
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

.

Sumário

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	39
3 Métodos.....	40
4 Resultados.....	46
5 Discussão	62
6 Conclusão.....	77
7 Referências Bibliográficas.....	78

1. Introdução

1.1. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que leva à destruição das articulações e incapacitação progressiva. A inflamação crônica também está associada a complicações sistêmicas, induzindo aumento das taxas de morbidade e mortalidade. Estima-se atingir cerca de 1% da população mundial, é prevalente no sexo feminino, sendo o grupo de maior incidência mulheres acima de 40 anos. Não existe cura ou prevenção para a artrite, e os tratamentos convencionais são baseados em anti-inflamatórios, analgésicos e drogas antirreumáticas. Uma remissão completa dos sintomas raramente é conseguida e depende do uso crônico de fármacos (Global Burden of Disease Study, 2015).

O estágio sintomático inicial da AR é a inflamação das membranas sinoviais (sinovite), que revestem as articulações. A condição inflamatória determina a hiperplasia dos fibroblastos sinoviais, angiogênese e infiltrado leucocitário (Paleolog, 2002). Infiltrado que inclui células mononucleares, principalmente macrófagos, neutrófilos, e linfócitos que secretam mediadores que mantêm e aumentam a inflamação (Firestein e Zvaifler, 1987). Essas condições alteram a fisiologia celular de condrócitos e osteoclastos. A progressão desse estado inflamatório induz a conversão da cartilagem e osso em tecido fibroso (Gravallese *et al.*, 2000). E nos estágios mais avançados da artrite ocorre a paralisação da articulação e perda da função.

Existem vários processos de degeneração das articulações, como a espondiloartrose e a artrose. Essas doenças são desencadeadas por danos mecânicos e geralmente localizadas. A artrite reumatoide inclui na sua patogênese o sistema imune adaptativo e afeta sistemicamente as articulações. Os efeitos da inflamação sistêmica e crônica também tornam os pacientes de artrite mais propensos a desenvolver outras condições patológicas, como vasculite, aterosclerose e fibrose hepática e pulmonar (McInnes e Schett, 2011; Selmi *et al.*, 2011).

Os linfócitos têm papel central na patogênese da AR provavelmente como os principais desencadeadores da inflamação sinovial e da produção de autoanticorpos

patogênicos. O linfócito T CD4⁺ é mais proeminente (Cope *et al.*, 2007), e o papel dos CD8⁺ está ainda sendo caracterizado na artrite clínica e experimental (Petrelli e Van Wijk, 2016). A transferência de linfócitos pode ser o bastante para desencadear AR em modelos animais e, em alguns casos, o bloqueio de linfócitos T CD4⁺ pode inibir sua indução. Os linfócitos T são potentes produtores de citocinas e mediadores inflamatórios (Firestein, 2005).

A população dos linfócitos T CD4⁺ inclui diferentes tipos de T “*helper*” (T_H) capazes de conduzir o processo inflamatório principalmente por meio da produção diferencial de citocinas. Os linfócitos T_H1 e T_H17 produzem IFN-γ e IL-17 respectivamente, que são centrais na indução da artrite. Essas citocinas são capazes de induzir um infiltrado inflamatório com predominância de macrófagos e neutrófilos. Outras citocinas e mediadores inflamatórios relevantes na AR incluem TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-15, IL-23 (McInnes e Schett, 2007). O microambiente criado por esse infiltrado inflamatório e citocinas podem resultar em uma realimentação positiva capaz de sustentar a inflamação crônica.

A IL-1β, IL-6 e o TNF-α são citocinas envolvidas na indução da inflamação aguda em uma grande diversidade de células e tecidos. IL-1β e IL-6 são potentes indutores de inflamação no nível celular. A IL-1β é capaz de ativar o inflamossoma e outras cascatas inflamatórias intracelulares. A IL-6 é capaz de ativar uma série de diferentes tipos celulares a secretar proteínas de inflamação aguda. Animais geneticamente modificados que tenham essas duas citocinas comprometidas são refratários à indução de artrite (McInnes e Schett, 2007; 2011).

O TNF-α é um potente pró-inflamatório, capaz de induzir fortes respostas celulares e sistêmicas, desde a ativação de leucócitos até febre e choque séptico. Tem um papel central em vários aspectos localizados e sistêmicos na artrite. Além de induzir a osteoclastogênese, o TNF-α pode aumentar essa conversão junto a outros fatores (Lam *et al.*, 2000). Muitos dos mecanismos desencadeados pela IL-1β e IL-6 dependem do TNF-α (Li *et al.*, 2004). Mas seu papel essencial na patogênese da artrite fica ainda mais evidente nos tratamentos baseados em anticorpos monoclonais anti-TNF-α. Dentre os anticorpos monoclonais sendo testados estão anti-IL-1β, IL-6 e IL-17. No entanto, os resultados com anti-TNF-α foram os únicos até o presente que tornaram esse tratamento

disponível para humanos. Pacientes reumáticos que recebem por via endovenosa esse anticorpo apresentam redução quase total dos sintomas. Dentre as desvantagens desse tratamento são os custos elevados e a necessidade de aplicação crônica (Kalliolias e Ivashkiv, 2016).

As citocinas secretadas por linfócitos T induzem a ativação e hiperplasia dos fibroblastos sinoviais, principalmente o TNF- α , a IL-1 β e a IL-17. Os fibroblastos hiperplásicos invadem a cartilagem também produzindo metaloproteinases de matriz (MMP) e agrecanases (ADAMTS) que degradam a matriz cartilaginosa induzindo o processo de fibrose. Essas citocinas são capazes de induzir o mesmo processo nos condrócitos, mantendo a degeneração crônica (Catterall *et al.*, 2001).

A integridade dos ossos é relativa à um equilíbrio dinâmico entre produção da matriz óssea por osteoblastos e sua reabsorção pelos osteoclastos. A diferenciação de osteoblastos em osteoclastos pode ser induzida por mediadores inflamatórios (Boyle *et al.*, 2003). Dentre as citocinas secretadas pelos linfócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais ativados por processos inflamatórios estão o GM-CSF e o RANKL, ambos indutores da diferenciação de osteoclastos (Gravallese *et al.*, 2000). Essa diferenciação através do sistema RANK-RANKL pode ser ativada por TNF- α , que também é capaz de bloquear a diferenciação e ativação de osteoblastos. A IL-17 também age como indutora da diferenciação de osteoclastos independente de RANKL (Lam *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2006; Chen, L. *et al.*, 2008).

A degradação da matriz cartilaginosa e a manutenção da inflamação sinovial determina a formação do *pannus*, uma camada de tecido inflamatório constituído por leucócitos, vasos sanguíneos e células fibrogênicas que se expande a partir da membrana sinovial e por fim invade a articulação. Esse processo crônico por fim substitui o tecido articular por tecido fibrótico levando à imobilização das articulações.

Por muito tempo os linfócitos T_H1 produtores de IFN- γ foram considerados os principais mediadores da AR. Mas alguns dados obtidos de pacientes mostravam algumas contradições e, em modelos experimentais, o IFN- γ nem sempre foi capaz de induzir ou contribuir com a artrite. Os linfócitos T_H17 foram descritos mais recentemente e são fundamentais no desenvolvimento não só da artrite, mas também de outras doenças autoimunes. Tanto no sangue quanto nas cavidades sinoviais de pacientes

reumáticos ocorre aumento na frequência de linfócitos T_H17 (Chabaud *et al.*, 1999). Esses linfócitos expressam receptores quimiotáticos que induzem sua localização nas articulações inflamadas (Hirota *et al.*, 2007).

A IL-17 é capaz de induzir a formação do *pannus* independentemente da RANKL e da osteoclastogênese. O tecido sinovial responde ao estímulo com IL-17 produzindo citocinas inflamatórias pró-inflamatórias e MMP (Rossini *et al.*, 2016). Esses linfócitos também estão associados à artrite resistente ao tratamento com corticosteroides (Ramesh *et al.*, 2014). Ainda assim o tratamento com anticorpo anti-IL-17 não apresentou resultados comparáveis ao tratamento com anticorpos anti-TNF- α , o que pode estar relacionado às várias isoformas de IL-17 encontradas na cavidade sinovial (Koenders *et al.*, 2005; Genovese *et al.*, 2010). A IL-23 está relacionada à manutenção da resposta prolongada de T_H17 e anticorpos que neutralizam essa citocina ou seu receptor estão sendo investigados (Buckland, 2013).

1.2. Modelos experimentais de Artrite

Grandes avanços na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares de processos patológicos dependem de modelos experimentais em animais. A artrite pode ser induzida em diferentes animais, incluindo macacos, cachorros, coelhos, porquinhos da Índia (*C. porcellus*). Os modelos mais usados e bem estudados são ratos e camundongos (Van Den Berg, 2009). Nenhum modelo experimental em animais reproduz todas as características das doenças em humanos e, quando existem diversas formas de indução da doença em animais, é importante a escolha de acordo com o aspecto que se tem interesse de investigar. Vários procedimentos diferentes podem induzir artrite em ratos e camundongos.

A artrite pode ser induzida com agentes inespecíficos como adjuvante de Freund, óleo mineral e pristano. A injeção subcutânea desses agentes em ratos promove inflamação sinovial e edema nas patas (Pearson, 1956; Cromartie *et al.*, 1977; Wooley *et al.*, 1989). Esses modelos apresentam várias características da artrite em humanos, incluindo aumento de citocinas pró-inflamatórias e ativação crônica de linfócitos T (Kleinau *et al.*, 1991), mas reproduzem apenas parcialmente as repostas humorais e apresentam remissão espontânea. Esse tipo de patologia também pode ser induzido com

material derivado de bactérias, como a parede celular de estreptococos. Procedimento eficaz em ratos *Lewis* e em algumas linhagens de camundongos (Holmdahl *et al.*, 2001).

A indução de artrite também é possível por meio da imunização com diferentes antígenos. Um dos modelos mais usados aplica a albumina bovina metilada (mBSA). A imunização com esse antígeno em adjuvante de Freund e o desafio com mBSA diretamente na articulação é capaz de induzir a formação do *pannus*. O modelo com mBSA é rápido e eficaz em induzir as alterações inflamatórias localizadas na articulação. No entanto, assim como os modelos induzidos por adjuvantes, o modelo induzido por mBSA também apresenta remissão espontânea e depende menos da imunidade adaptativa do que da inata (Van e Van, 1984).

A imunização com antígenos que são abundantes na articulação, como o colágeno tipo II e proteoglicanos, em adjuvante de Freund pode induzir artrite sem a necessidade de desafio local (Trentham *et al.*, 1977; Finnegan *et al.*, 1999). Esses modelos reproduzem vários aspectos patológicos da doença em humanos, incluindo inflamação aguda e crônica, a formação do *pannus* e a participação do sistema imune adaptativo (Chang *et al.*, 1980). A desvantagem principal é que essa indução só funciona completamente em linhagens específicas de camundongos. A imunização com colágeno só induz artrite em camundongos DBA/1 e com proteoglicanos em BALB/c.

Existem também diferentes camundongos geneticamente modificados que desenvolvem artrite espontaneamente. Os camundongos transgênicos TNFtg que expressam TNF- α humano além do murino desenvolvem artrite aguda e sistêmica (Li e Schwarz, 2003). Os camundongos IL-1tg expressam e produzem altos níveis de IL-1 β sendo também propensos ao desenvolvimento da artrite (Niki *et al.*, 2001). Da mesma maneira, camundongos IL-1ra^{-/-} nocaute para o receptor agonista de IL-1 β desenvolvem artrite espontânea (Horai *et al.*, 2000). Esses modelos apresentam inflamação crônica, hiperplasia sinovial, formação de *pannus*, destruição da cartilagem e poliartrite sistêmica. No entanto, o papel dos granulócitos parece ser mais fundamental que dos linfócitos nesses animais.

Existem outros três modelos de camundongos geneticamente modificados que são baseados na sinalização de linfócitos T. Defeitos nas moléculas transdutoras de sinais de receptores presentes nos linfócitos T interferem com o desenvolvimento e a seleção

dessas células, tornando esses animais propensos ao desenvolvimento de artrite. Os camundongos SKG possuem uma mutação pontual na proteína sinalizadora ZAP-70 que torna os linfócitos T mais sensíveis à ativação (Yoshitomi e Sakaguchi, 2005). Os camundongos com mutação na proteína gp130 sinalizadora do receptor de IL-6 apresentam transdução de sinal aumentada na proteína adaptadora STAT3 presente em linfócitos T (Atsumi *et al.*, 2002). Esses animais desenvolvem espontaneamente diversos aspectos patológicos da artrite inclusive edema da pata e degeneração sinovial induzida por linfócitos.

Os camundongos K/BxN expressam grandes quantidades do receptor de células T (TCR) KRN e de MHC II I-Ag7 desenvolvendo também artrite espontaneamente. Esses receptores são específicos para enzima da via glicolítica glicose-6-fosfato isomerase. Apesar de essa proteína ser constitutiva em todas as células do corpo, os linfócitos T e anticorpos específicos tendem a se localizar na articulação. Especula-se que isso se deve ao potencial catiônico do antígeno (Monach *et al.*, 2008).

A especificidade para o colágeno pode ser transferida. Anticorpos de animais imunizados com colágeno quando transferidos para camundongos não manipulados induzem artrite (Stuart e Dixon, 1983). A injeção com anticorpo anti-colágeno tipo II promove artrite sistêmica (Terato *et al.*, 1992). A transfusão dos anticorpos de camundongos K/BxN em camundongos BALB/c é capaz de induzir inflamação e degeneração da articulação (Monach *et al.*, 2004).

A linhagem do camundongo é extremamente relevante na reposta e desenvolvimento da patologia. A infusão de anticorpos de camundongos K/BxN só induzem artrite na linhagem BALB/c e não nos camundongos C57BL/6 (Monach *et al.*, 2004). Da mesma maneira, anticorpos de camundongos nocaute para IL-1ra induzem artrite na linhagem BALB/c e arterite de células gigantes na linhagem C57BL/6 (Horai *et al.*, 2000). A imunização com colágeno e anti-colágeno só é capaz de induzir artrite nos camundongos da linhagem DBA/1 (Holmdahl *et al.*, 1993).

Todos esses resultados mostram que a artrite é uma doença experimental e uma doença autoimune dependente de fatores genéticos importantes, principalmente dos genes do complexo MHC.

A indução experimental de artrite em animais permitiu grandes avanços na compreensão dos seus mecanismos patogênicos, mas também mostrou a complexidade da doença. A artrite experimental pode ser desencadeada por agentes inespecíficos e em seguida recrutar células do sistema imune adaptativo. Os linfócitos T específicos para GPI-6 quando transferidos para animais não manipulados não induzem artrite, mas o soro dos animais K/BxN induz um quadro sistêmico grave quando transferido. A reatividade ao colágeno precede o aparecimento da patologia em pacientes reumáticos, e nem sempre pode ser diretamente relacionada ao quadro clínico (Fujii *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1996). Portanto, ainda que muitos mecanismos na artrite estejam esclarecidos, a compreensão dessa patologia ainda é incompleta.

Os diferentes modelos da indução experimental de artrite favorecem um ou mais aspectos da patologia em humanos. Nosso estudo é focado no aspecto autoimune da artrite, assim o modelo usado deve priorizar a reprodução desses aspectos patológicos. Backstrom e Dahlgren desenvolveram uma metodologia de imunização com colágeno junto a outro antígeno em modelo crônico de artrite que dispensa a demanda de uma linhagem específica (Backstrom e Dahlgren, 2008). Esse modelo reproduz aspectos autoimunes fundamentais da doença em humanos, incluindo o fator reumatoide.

1.3. Autoimunidade Patológica

As doenças autoimunes decorrem da quebra de tolerância imunológica e da perda de diversos mecanismos reguladores e supressores da inflamação. A tolerância central se desenvolve nos órgãos linfoides primários, i.e. medula óssea e timo. Durante esse desenvolvimento linfócitos imaturos que apresentam uma afinidade muito alta para componentes próprios são eliminados. Os processos de tolerância periférica além de contarem com mecanismos de deleção celular, incluem também linfócitos e citocinas reguladoras da inflamação (Nemazee, 2006).

Falhas na deleção e controle desses linfócitos específicos para componentes próprios resultam na inflamação crônica e destruição de órgãos e tecidos. O alvo da doença autoimune é relacionado à especificidade dos linfócitos patogênicos (Asano *et al.*, 1996). Por exemplo, na miastenia gravis, o autoantígeno alvo são os receptores

nicotínicos musculares. Mas algumas doenças autoimunes apresentam autoantígenos alvo mais variáveis, como as diferentes proteínas das células β na diabetes tipo I. A ocorrência de duas doenças autoimunes simultâneas é raramente observada. Não existe uma causa única para falhas na tolerância, mas geralmente uma associação de fatores genéticos e ambientais (Goodnow *et al.*, 2005).

A susceptibilidade genética das doenças autoimunes é frequentemente ligada ao gene HLA indicando a relevância de interações moleculares e bioquímicas entre o MHC e o peptídeo na apresentação de antígenos e no desenvolvimento de linfócitos T efetores. Os genes HLA-DR1 e HLA-DR4 são associados ao desenvolvimento de artrite (McMichael *et al.*, 1977). No entanto, assim como nas demais doenças autoimunes, a presença desse gene não é capaz de causar a doença. Estudos com irmãos gêmeos mostraram que a genética não é a única determinante no desenvolvimento da artrite (Aho *et al.*, 1986). Tabagistas portadores do HLA-DR4 estarem entre as populações mais propícias ao desenvolvimento de AR demonstra a conjunção de fatores ambientais e genéticos como um fator determinante (Klareskog *et al.*, 2006).

A importância do MHC é evidente também em camundongos. Os genes que codificam o MHC nesses animais são nomeados H. A capacidade da linhagem DBA em desenvolver artrite quando imunizada com colágeno tipo II é relacionada aos haplótipos H-2^q e H-2^r (Brand *et al.*, 1996; Rosloniec *et al.*, 1996). Esses animais são resistentes à indução de artrite com proteoglicanos, ao contrário dos camundongos da linhagem BALB/c que são portadores de H2^d (Glant *et al.*, 2003). Camundongos transgênicos que expressam HLA-DR1 e HLA-DR4 humanos também apresentam reatividade à imunização com colágeno tipo II e desenvolvimento da artrite reproduzindo inclusive a associação ao sexo feminino (Taneja *et al.*, 2007). A diferenciação estrutural envolvendo a ligação de peptídeos de colágeno tipo II a essas moléculas já foi mostrada através de cristalografia (Rosloniec *et al.*, 2006). Apesar da influência genética na reatividade ao colágeno, essa associação não é absoluta nem determinante. Nem mesmo a reatividade ao colágeno é determinante no desenvolvimento da artrite, sendo observada também em outras doenças.

A especificidade da autoimunidade patogênica na AR pode ser considerada mais elusiva que em outras doenças autoimunes. Muitos antígenos já foram observados na

geração e perpetuação na resposta de linfócitos T, como produtos virais e bacterianos, incluindo a HSP65 (Kaufmann *et al.*, 1987; Fujinami *et al.*, 1988) assim como proteínas próprias, principalmente as mais abundantes nas articulações, como proteoglicanos e colágeno tipo II (Cope *et al.*, 1999). No líquido sinovial obtido de pacientes reumáticos, é possível encontrar linfócitos específicos para essas proteínas (Londei *et al.*, 1989). Com esses antígenos é possível induzir artrite experimental em diferentes espécies, como ratos, camundongos e macacos. A reatividade ao colágeno tipo II é a mais evidente em pacientes e modelos experimentais, mas essa especificidade ainda não pôde ser estabelecida como o fator primário no estabelecimento da AR (Holmdahl *et al.*, 1993; Brand *et al.*, 2003).

A reatividade para o colágeno tipo II nem sempre pode ser relacionada à gravidade dos sintomas clínicos de pacientes (Nielen *et al.*, 2004). Em modelos de doenças autoimunes, a transferência de linfócitos T específicos para componentes próprios induz a doença em camundongos *naive*. A transferência de linfócitos T específicos para colágeno tipo II não induz um quadro patológico completo, mas a transferência de anticorpos anti-colágeno é capaz de induzir degeneração severa da articulação (Trentham *et al.*, 1978; Stuart *et al.*, 1983; Holmdahl *et al.*, 1985). Mesmo que linfócitos T específicos para colágeno não sejam necessariamente os desencadeadores da artrite, esse tipo celular está presente e é fundamental na manutenção e desenvolvimento da doença.

Os modelos animais demonstram a complexidade da reatividade na artrite. Os diversos modelos de artrite desencadeados por adjuvantes apresentam linfócitos T patogênicos e específicos para componentes da articulação. A artrite no camundongo K/BxN é desencadeada por um antígeno constitutivo expresso em todos os tipos celulares, GPI-6. Ainda assim a patologia desenvolvida é localizada principalmente na articulação e, em certo estágio, a especificidade para o colágeno tipo II passa a estar presente em linfócitos T e anticorpos. A imunização com GPI-6 induz artrite somente em camundongos DBA/1, a linhagem suscetível à indução da doença com colágeno (Schubert *et al.*, 2004). Apesar de demonstrar a complexidade envolvendo o sistema imune adaptativo e o desenvolvimento da artrite, a GPI-6 não é um antígeno relevante

na doença em humanos (Kassahn *et al.*, 2002). O fator que determina a suscetibilidade das articulações ao desenvolvimento patológico ainda resta por ser determinado.

Existem ainda outros anticorpos específicos para componentes próprios relevantes na AR. O Fator Reumatoide (FR) e Anticorpos Anti-Peptídeos Citrulinados Cíclicos (Anti-CCP) estão presentes no soro de pacientes reumáticos e contribuem com a gravidade da doença. O Fator Reumatoide (FR) é um anticorpo (IgG ou IgM) específico para região constante da imunoglobulina da IgG (Litwin e Singer, 1965). A deposição desses imunocomplexos pode ativar macrófagos e o sistema complemento e está diretamente relacionada aos sintomas sistêmicos da AR (Borretzen *et al.*, 1997). O FR pode ser relacionado ao estado clínico e ao aparecimento dos sintomas de forma mais confiável que a reatividade ao colágeno.

Os Anticorpos Anti-Peptídeos Citrulinados Cíclicos são específicos para epítomos contendo citrulina, um aminoácido não incorporado em proteínas durante a síntese proteica, sendo gerado através da modificação de resíduos de arginina pela enzima arginina-peptidil-desaminase (PAD). Essa modificação pode ser relacionada à processos inflamatórios e existem evidências de que apenas a enzima PAD derivada de bactérias é capaz de gerar epítomos imunogênicos (Chatfield *et al.*, 2009).

Tanto o FR quanto os anticorpos anti-CCP são usados em diagnósticos serológicos de AR, sendo que o último é um teste mais sensível e detectável em cerca de 70% dos pacientes reumáticos (Avouac *et al.*, 2006). A relação dos anti-CCP com a gravidade dos sintomas é mais direta que a observada em relação ao FR (Puszczewicz e Iwaszkiewicz, 2011). Apesar de muitos mecanismos patológicos estarem descritos para ambos os anticorpos na AR, eles também não podem ser considerados agentes desencadeadores da doença. O FR também está presente no lúpus eritematoso sistêmico, em outras doenças reumatóides e também em várias infecções. O anti-CCP mesmo sendo mais específico e relacionado ao prognóstico, seu desenvolvimento é associado a processos inflamatórios e infecciosos fora da articulação.

Apesar da especificidade elusiva, a AR é uma doença baseada na autodestruição perpetuada por linfócitos e anticorpos. Os fatores ou antígenos que dão início à artrite são complexos. Está claro que a conjunção de vários fatores é necessária para a

ocorrência da artrite reumatoide, mas a compreensão desse quadro é essencial ao desenvolvimento de novas terapias.

A quebra da tolerância precede o aparecimento dos sintomas localizados na membrana sinovial, em alguns casos por anos. Esse e outros fatores indicam que o início da autoimunidade na AR se desenvolve antecipadamente em locais diferente das articulações, incluindo as mucosas. Essas características abrem possibilidades para uma abordagem preventiva diversa das terapias convencionais.

Os tratamentos convencionais para artrite são baseados em anti-inflamatórios, corticoides e drogas modificadoras da artrite. Esses fármacos não são capazes de mudar a progressão da artrite e são restritos ao alívio dos sintomas. Além disso, o uso crônico dessas drogas está vinculado a graves efeitos colaterais como imunossupressão e suscetibilidade a tumores.

1.4. Tolerância Oral como alternativa terapêutica

A primeira teoria explicativa para a tolerância imunológica aos auto componentes foi idealizada por Burnet na metade do século XX. Burnet propôs, na sua Teoria da Seleção Clonal, que o mecanismo fundamental para o estabelecimento da tolerância aos auto componentes seria a deleção clonal de linfócitos específicos para componentes próprios (Burnet, 1976). Um pouco antes dele, Medawar havia demonstrado o vínculo entre a rejeição de transplante de tecidos ao desenvolvimento dos leucócitos (Billingham *et al.*, 1956) e cunhado o termo “tolerância imunológica”. Esses estudos marcaram a compreensão da tolerância como um processo vinculado à deleção de linfócitos.

Linfócitos apresentando propriedades supressoras começaram a ser descritos na década de 70, dando início à noção de células T regularem ativamente a atividade inflamatória e conduzir a tolerância (Gershon e Kondo, 1970). Uma das consequências da timectomia é o desenvolvimento de autoimunidade patogênica, demonstrando o papel celular ativo dos linfócitos T, muito além da deleção celular (Sakaguchi *et al.*, 1982). Nos anos 80, foram descritos linfócitos T específicos e inespecíficos capazes de atividade supressora (Green *et al.*, 1983; Sakaguchi *et al.*, 1985). Alguns fenótipos e mecanismos como secreção de fatores supressores foram observados mais tarde (Green *et al.*, 1983; Sakaguchi *et al.*, 1995). Mas investigações nessa área se interromperam nas próximas

décadas, provavelmente devido à limitação tecnológica necessária para o conhecimento de mecanismos e marcadores específicos. Somente no final da década de 90, esses fatores foram esclarecidos e linfócitos T reguladores (T_{REG}) foram finalmente estabelecidos na compreensão do sistema imune (Sakaguchi, 2000).

Atualmente está bem estabelecido que a tolerância imunológica deriva não somente da deleção clonal, mas também da atividade direta de linfócitos reguladores. A população de T_{REG} emprega uma série de mecanismos que podem agir de forma específica ou inespecífica para o antígeno, sendo capaz de controlar a inflamação através da deleção de outros leucócitos ou pela modulação de mediadores inflamatórios. Em 2003, *foxp3* foi descrito pelo grupo de S. Sakaguchi como o principal fator de transcrição envolvido na diferenciação dos linfócitos T_{REG} e no desenvolvimento do seu fenótipo regulador (Brunkow *et al.*, 2001; Fontenot *et al.*, 2003). A expressão de *foxp3* pode ser induzida em linfócitos *naïve* e também em efetores, sendo capaz de desativar a produção de diversas citocinas inflamatórias e outros fatores de transcrição relacionados à inflamação (Hori *et al.*, 2003). Os linfócitos T_{REG} podem mediar sua ação supressora por contato celular ou pela produção de citocinas como IL-10 e o TGF- β , que são as principais citocinas inibidoras da inflamação (Kehrl *et al.*, 1986; Mosmann, 1991; Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

A IL-10 e o TGF- β são capazes não somente de suprimir o processo inflamatório em diversos tipos celulares, mas também estão envolvidas na indução da diferenciação de outros linfócitos reguladores. A supressão através de citocinas pode ocorrer através de mecanismos mais indiretos. A IL-2 é fundamental para a atividade celular de linfócitos ativados e os Treg podem expressar uma versão do receptor de IL-2 (CD25^{high}) de alta afinidade (Jordan *et al.*, 2001). O consumo de grande parte dessa citocina livre no meio extracelular reduz a atividade de linfócitos ativados. A exaustão de mediadores e recursos envolvidos na atividade celular é um dos mecanismos efetivos na regulação e supressão. Outro mecanismo seria via interferência na proliferação de linfócitos por células dendríticas. O triptofano é um aminoácido essencial para o metabolismo de linfócitos ativados e células dendríticas tolerogênicas podem expressar na sua superfície a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que catalisa a degradação do triptofano no meio extracelular (Pallotta *et al.*, 2011). A depleção desse aminoácido livre no meio

extracelular pode inibir a proliferação celular e induzir a diferenciação de linfócitos com propriedades reguladoras.

O contato celular direto também pode ser um mecanismo empregado pelos linfócitos T reguladores. O CTLA-4 e o PD-1L são proteínas expressas na superfície de alguns linfócitos Treg e capazes de induzir apoptose e inibição da atividade celular diretamente através de contato (Paust *et al.*, 2004). Outro mecanismo envolvido na interação intercelular é mediado pela indução da apoptose e secreção de granzinas (Janssens *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006).

Os mecanismos pelos quais os linfócitos Treg controlam a inflamação continuam sendo descritos. As citocinas secretadas por esses linfócitos alteram o curso da inflamação em diversos tipos celulares desde leucócitos até células epiteliais. Além de reduzir a inflamação e suprimir diretamente a atividade de outros linfócitos, os Treg mantêm a tolerância associada a antígenos próprios.

O desenvolvimento dos linfócitos reguladores se dá de diferentes maneiras resultando em diversos fenótipos. Linfócitos T_{REG} podem ser originados no timo a partir de linfócitos imaturos, são classificados como naturalmente reguladores ou tímicos (tTreg). Na periferia a diferenciação em Treg pode ser a partir tanto de linfócitos *naive* quanto de linfócitos efetores, e são classificados como induzidos ou periféricos (pTreg). A especificidade dessas populações difere e também seu papel fisiológico (Shevach e Thornton, 2014; Yuan *et al.*, 2014).

Os linfócitos pTreg induzidos na periferia estão associados a diminuição do processo inflamatório em curso. Como se diferenciam a partir de linfócitos periféricos sua especificidade é ampla. Já os linfócitos tTreg sendo diferenciados no timo são específicos para componentes próprios. E essa especificidade não é restrita apenas aos antígenos típicos das células do timo. O fator de transcrição AIRE induz a expressão de antígenos extra tímicos que garante a diversidade no processo de seleção clonal. (Lin *et al.*, 2016). Os linfócitos tTreg estão envolvidos na manutenção da tolerância aos autoantígenos. Mas esses processos não são excludentes. A supressão induzida por um linfócito induz a diferenciação e manutenção de outros linfócitos reguladores (Curotto De Lafaille e Lafaille, 2009).

Existem diferentes classificações quanto ao fenótipo diferencial dos linfócitos reguladores. Weiner *et al.* propõem cinco classes de linfócitos T reguladores. Os linfócitos que expressam foxp3 induzidos na periferia ou no timo são duas classes que podem ser diferenciadas. Os Tr1 são diferenciados por células dendríticas produtoras de IL-27 junto ao TGF- β , e são produtores de IL-10. O T_H3 expressa o pro-peptídeo associado à latência (LAP) que é capaz de ligação não covalente à região terminal do TGF- β (Chen, M. L. *et al.*, 2008). Linfócitos T CD8⁺ reguladores podem expressar foxp3, CD25 ou LAP. Os mecanismos usados por essas cinco classes de Treg variam de acordo com as condições em que são induzidos (Weiner *et al.*, 2011).

Deficiências nesses processos reguladores estão associadas a diversas doenças inflamatórias, autoimunes e alérgicas. Esses comprometimentos estão evidentes em defeitos genéticos presentes em humanos ou induzidos em camundongos. A doença genética IPEX advém de defeitos no gene FOXP3 e os portadores desenvolvem autoimunidade generalizada contra múltiplos órgãos e dermatite alérgica (Bennett *et al.*, 2001). O camundongo geneticamente modificado “*scurfy*” replica a deficiência de foxp3 e apresenta muitos dos fenótipos dos pacientes IPEX. A transfusão de linfócitos reguladores nesses camundongos previne o desenvolvimento do quadro patológico (Brunkow *et al.*, 2001).

Existe comprometimento da função dos linfócitos Treg na AR. Análises genômicas encontraram associações em locos gênicos envolvidos no desenvolvimento de linfócitos reguladores, inclusive no foxp3 (Xiao *et al.*, 2016). O sangue de pacientes reumáticos apresenta maior quantidade de linfócitos T_H17 em relação aos Treg (Niu *et al.*, 2012). Porém, em comparação com indivíduos saudáveis, a quantidade de Treg foi semelhante (Liu *et al.*, 2005). No líquido sinovial de pacientes, a frequência de linfócitos efetores é maior do que a quantidade de linfócitos reguladores (Jiao *et al.*, 2007; Moradi *et al.*, 2014). Mas, em algumas ocasiões, mesmo com alta frequência de Treg ainda existe patologia. Isso porque a inflamação pode alterar a efetividade dos linfócitos reguladores.

O TNF- α inibe a sinalização por fosforilação do Foxp3, diminuindo a propriedade reguladora dos Treg (Bromberg, 2013). Já foi demonstrado que linfócitos reguladores CD4⁺CD25⁺ periféricos e presentes na cavidade sinovial de pacientes reumáticos apresentam capacidade inibitória de linfócitos efetores reduzida (Cao *et al.*, 2003; Cao

et al., 2004; Mottonen *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006). A inflamação crônica também pode tornar linfócitos efetores refratários à regulação pelos Treg, o que já foi observado na artrite e em outras condições inflamatórias (Nie *et al.*, 2013; Moradi *et al.*, 2014). Mesmo quando os T_{REG} se encontram em altas quantidades e com fenótipos favoráveis, a inflamação pode tornar os linfócitos efetores cronicamente ativados (Herrath *et al.*, 2011; Wehrens *et al.*, 2011). O tratamento com anticorpo anti-TNF- α ou IL-6 reduz a frequência de linfócitos T_H17 e aumento de linfócitos Treg (Nadkarni *et al.*, 2007; McGovern *et al.*, 2012). A frequência e o fenótipo dos T_{REG} já foram associados à gravidade dos sintomas (Sempere-Ortells *et al.*, 2009; Kawashiri *et al.*, 2011). A redução da inflamação induzida pelos tratamentos convencionais pode influenciar a capacidade supressora dos linfócitos T_{REG}. Experimentos *in vitro* demonstraram a capacidade do quimioterápico metotrexato em aumentar a diferenciação de T_{REG} em pacientes reumáticos (Lina *et al.*, 2011).

Ainda existem algumas contradições na observação sobre efeitos e defeitos na função supressora dos T_{REG} durante a artrite, o que pode ser relacionado às diferentes metodologias usadas em cada estudo. Mas o papel desse tipo celular e suas falhas no desenvolvimento patológico estão relativamente bem estabelecidos. Os diversos fenótipos e mecanismos dos T_{REG} podem ter diferentes resultados na capacidade de supressão da inflamação (Yuan *et al.*, 2014). Da mesma forma, a diminuição de mediadores inflamatórios pode alterar a efetividade da supressão.

O potencial terapêutico de linfócitos T_{REG} está demonstrado de diversas formas em diferentes modelos animais de artrite. A transferência de linfócitos T_{REG} singênicos inespecíficos diferenciados *ex vivo* foi capaz de inibir a artrite induzida por colágeno (AIC) em camundongos (Morgan *et al.*, 2005). A deleção desses T_{REG} piorou a artrite induzida por colágeno e sua reposição reverteu essa piora (Frey *et al.*, 2005). A transfecção de células *ex vivo* e *in vivo* com foxp3 e TGF- β foi capaz de aumentar a frequência de T_{REG} e diminuir a patologia da artrite experimental (Wright *et al.*, 2009; Haque *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011). Existem ainda outras abordagens capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T_{REG}. Anticorpos como anti-CD3 e anti-CD4 já demonstraram esse efeito em diferentes modelos de artrite (Duarte *et al.*, 2010; Notley *et al.*, 2010). A manipulação epigenética indutora de T_{REG} também foi capaz de diminuir os sintomas (Saouaf *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). O aumento de T_{REG} foi associado à diminuição dos sintomas

na artrite experimental através de métodos menos diretos, como lipossomos bloqueadores de NF κ B, inibidores de ROR- γ e peptídeo vasoativo intestinal. A indução de linfócitos T_{REG} através de terapia gênica e manipulação *ex vivo* de células tronco mesenquimais e dendríticas também tem sido estabelecida como uma abordagem eficiente (Chen, G. *et al.*, 2008; Capini *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2010; Solt *et al.*, 2012).

Esses procedimentos, no entanto, dependem de procedimentos hospitalares complexos. Além disso, apresentam um custo muito elevado com agentes como anticorpos monoclonais e peptídeos sintéticos. A aplicação endovenosa do anticorpo anti-TNF- α até o momento tem sido utilizada como a terapia alternativa mais bem-sucedida em procedimentos clínicos. Ela apresenta bons resultados, incluindo a supressão de grande parte dos sintomas e mesmo a regressão da artrite. Porém, além do custo elevado, a aplicação do anticorpo deve ser contínua, assim como nos tratamentos convencionais, caso contrário a progressão da doença rapidamente retoma seu curso (Smolen e Emery, 2011).

Outros anticorpos capazes de induzir a diferenciação de T_{REG} estão sendo testados, mas possivelmente as mesmas restrições encontradas no anti-TNF- α estarão presentes (Konig *et al.*, 2016). Portanto, a aplicação da regulação e da tolerância imunológica como um procedimento terapêutico ainda necessita de uma abordagem viável e de fácil aplicação. A forma mais promissora pode ser através do reforço de processos fisiológicos que envolvem esse tipo de resposta. E a fisiologia da tolerância imunológica é fortemente associada às mucosas.

As mucosas são compostas por uma camada de células epiteliais, lâmina própria e tecido conjuntivo que revestem as cavidades internas que permanecem em contato com o meio externo, como pulmão, trato intestinal e urogenital. Locais como o intestino e os pulmões tem papel fundamental de troca constante com o meio, o que também torna esses locais vulneráveis. A grande maioria das infecções por patógenos tem início nas mucosas, o que demanda uma resposta eficiente do sistema imune. Os linfócitos localizados nesses locais apresentam fenótipos de ativação crônica e também grande frequência de T_{REG} (Brandtzaeg, 2007; 2009b).

O tecido linfoide associado a essas superfícies (*Mucosal Associated Lymphoid Tissue* – MALT) concentra a maior parte das células e componentes do sistema imune

presente no organismo. Além disso, o sistema imune das mucosas apresenta várias características diferenciais do sistema periférico (Brandtzaeg, 1998; 2009a). Essas superfícies são locais de intensa e contínua exposição infecciosa e antigênica, portanto a atividade imunológica e inflamatória é fundamental para a proteção desses locais. Mas também é o controle dessa resposta, e os mecanismos de tolerância periférica são fundamentais nesse controle. A constituição do sistema imune associado às mucosas é diretamente relacionada à regulação da inflamação e manutenção do equilíbrio fisiológico. As mucosas apresentam as maiores concentrações de IL-10 e TGF- β , que mantêm a população de linfócitos reguladores (Brandtzaeg *et al.*, 2008).

A IL-10 e o TGF- β induzem a diferenciação de linfócitos Treg e também interferem na atividade de outros leucócitos. Macrófagos e células dendríticas são fundamentais na apresentação de antígenos e na diferenciação de linfócitos T. E os fenótipos induzidos nessas células pela IL-10 e o TGF- β são determinantes no equilíbrio das mucosas. A concentração de componentes regulatórios e inflamatórios é fundamental para que a mucosa possa responder a patógenos e evitar a autoagressão. Os linfócitos T_H17 são grandes recrutadores de eosinófilos e mecanismos protetores contra infecções. Mas nas mucosas o seu equilíbrio junto aos linfócitos reguladores é necessário para manutenção fisiológica (Dubin e Kolls, 2008; Khader *et al.*, 2009). As citocinas são fundamentais no equilíbrio T_H17/T_{REG}, o TGF- β junto com IL-6 induz a diferenciação de T_H17, já o TGF- β por si só ou com IL-10 e IL-2 induz a diferenciação de T_{REG} (Afzali *et al.*, 2010). Existe ainda um fenótipo intermediário entre o T_H17 e o T_{REG} influenciado pela concentração dessas e de outras citocinas (O'connor *et al.*, 2010). A reciprocidade na diferenciação desses tipos celulares é fundamental nas mucosas e ainda mais na intestinal. Alterações que favorecem a indução de T_H17 estão envolvidas com o desenvolvimento de doenças autoimunes, inclusive na artrite em humanos e experimentais (Kobezda *et al.*, 2014).

O intestino é o local onde os mecanismos de tolerância periférica ocorrem mais frequentemente. A regulação e inibição da resposta inflamatória do sistema imune em relação aos antígenos derivados da alimentação e microbiota é conhecida como tolerância oral (Weiner, 1994). Esse tipo de tolerância periférica é a atividade imunológica e fisiológica mais intensa e contínua do corpo.

A mucosa gastrointestinal é a maior superfície do corpo humano e, junto ao pulmão, é a principal área de trocas com o meio externo. Essa superfície está em contato constante com antígenos naturais presentes nos alimentos e na microbiota intestinal. O ser humano ingere cerca de 130-190 gramas de proteínas por dia (Brandtzaeg, 1998). Além dos antígenos da dieta, o intestino abriga a maior comunidade microbiana presente no organismo (Donaldson *et al.*, 2016). Estima-se que a microbiota intestinal contém cerca de 10^{14} bactérias, uma ordem de grandeza acima do número de células do corpo humano. Ao contrário da epiderme, o epitélio intestinal é mais permeável e ativamente envolvido na captação de nutrientes e antígenos (Mowat, 2003; Suzuki, 2013). Essa exposição intensa e contínua deve ser controlada de forma fisiológica pelo sistema imune.

O tecido linfoide associado a mucosa intestinal (*Gut Associated Lymphoid Tissue* - GALT) apresenta a maior concentração de componentes do sistema imune. Além dos tecidos linfoides organizados linfócitos estão presentes entre as células epiteliais e na lâmina própria. Os linfócitos intraepiteliais e os produtores de imunoglobulinas localizados no intestino são mais numerosos que no restante do corpo (Brandtzaeg, 2009b; a). A imunoglobulina isotipo A (IgA) é predominante nas mucosas, e apresenta a propriedade de não induzir respostas inflamatórias (Fagarasan *et al.*, 2010). A IgA e a IgM são ativamente secretadas na luz intestinal. Junto à camada de muco presente na mucosa, essas imunoglobulinas revestem microrganismos, contribuindo para o controle mecânico (Macpherson *et al.*, 2008).

Os linfonodos mesentéricos são os maiores do corpo. O GALT conta também com as Placas de Peyer e folículos linfoides. As Placas de Peyer são aglomerados de tecidos linfoides localizados na lâmina própria do intestino delgado e visíveis a olho nu (Brandtzaeg, 2009a). Essas placas são fundamentais no início da resposta imune intestinal e apresentam mais linfócitos B que os linfonodos periféricos. Os folículos linfoides são microscópicos e podem ser encontrados no intestino delgado e grosso. Ao contrário das placas de Peyer, esses folículos se desenvolvem após o nascimento. O epitélio associado aos folículos linfoides e às placas de Peyer incluem as células M, um tipo diferenciado de epitélio especializado em captação de antígenos presentes na luz

intestinal. Os folículos e as placas de Peyer são conectados entre si e aos linfonodos mesentéricos através de dutos linfáticos (Brandtzaeg, 2007; Brandtzaeg *et al.*, 2008).

Antígenos presentes nas superfícies mucosas podem ser transportados através do epitélio intestinal e processados anteriormente ao contato direto com o sistema imune. As placas de Peyer e os folículos linfoides são especializados na captação de antígenos a partir do lúmen intestinal. A membrana de células basais de uma célula M apresenta é associada a linfócitos e células dendríticas. As células dendríticas são capazes de transportar os antígenos captados nas células M e processá-los para apresentação a linfócitos T nas placas de Peyer. As condições em que ocorrem esses processos favorecem a diferenciação de linfócitos B secretores de IgA e T_{REG} (Fagarasan *et al.*, 2010).

Linfócitos *naïve* chegam às placas de Peyer e aos linfonodos mesentéricos pelas vênulas de endotélio alto. A localização e migração de leucócitos são controladas por quimiocinas e moléculas de adesão. Linfócitos *naïve* expressam o receptor CCR7 que respondem às quimiocinas CCL21 e CCL19 produzidas pelos tecidos linfoides. A ativação dos linfócitos *naïve* altera a expressão desses receptores e induzem a localização celular. A localização intestinal de linfócitos ativados é determinada pela expressão da molécula de adesão $\alpha 4:\beta 7$. Essa integrina liga-se à adressina vascular de mucosa MAdCAM-1, que é encontrada nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos da parede intestinal. A manutenção dos linfócitos ativados no intestino é através da do receptor CCR9 e a quimiocinas ligante CCL25, expressa exclusivamente pelos tecidos intestinais. Mas existem outros ligantes para CCR9 expressos em outras mucosas. O MAdCAM-1 também é uma adressina comum a todas as mucosas. De modo que as células ativadas na mucosa intestinal podem migrar, tornando as mucosas interligadas (Pabst *et al.*, 2008; Rescigno e Di Sabatino, 2009; Schulz *et al.*, 2009).

As células dendríticas são fundamentais no processo de ativação e diferenciação de linfócitos T podendo ser consideradas como grandes intermediadoras das propriedades locais dos tecidos sobre os linfócitos. As células dendríticas são abundantes nas mucosas e diversas subpopulações locais têm sido descritas. As características dessas células refletem a sua localização na mucosa. As células dendríticas associadas às células M são CD11b⁺ e respondem rapidamente a estímulos

infecciosos. Outra população de células dendríticas também associada aos folículos e placas de Peyer expressa CD8 α e responde a estímulos infecciosos secretando altas quantidades de IL-12. Células dendríticas são abundantes também na parede intestinal e apresentam grande variedade de fenótipos, inclusive uma morfologia intermediária a macrófagos. Essas células empregam diferentes mecanismos de captação de antígenos da luz intestinal sem perturbar o epitélio (Rescigno e Di Sabatino, 2009).

As células dendríticas localizadas lâmina própria são grandes mediadoras da tolerância aos antígenos derivados de proteínas alimentares. Uma subpopulação das células dendríticas localizadas na lâmina própria expressa $\alpha\text{E}\beta_7$ (CD103) e o receptor de quimiocina CCR7. Então a migração de células dendríticas CD103⁺ não depende da presença de patógenos ou outros estímulos inflamatórios, embora seja aumentada por esses eventos (Schulz *et al.*, 2009). De forma que a captação e apresentação de antígenos por essas células é um processo fisiológico constante.

As células dendríticas da lâmina própria respondem fracamente a estímulos inflamatórios, como a ativação dos TLR (*Toll-like receptors*) e produzem IL-10 e TGF- β . As células dendríticas CD103⁺ também expressam desidrogenases retinais (RALDH) capazes de converter a vitamina A em ácido retinoico. Que é capaz de induzir e expressão de CCR9 e da integrina $\alpha_4\beta_7$ em linfócitos, direcionando sua localização para a mucosa. Algumas das células dendríticas CD103⁺ também podem expressar a enzima IDO (Del Rio *et al.*, 2010). Por serem capazes de produzir ácido retinoico, IL-10 e TGF- β , essas células dendríticas são eficientes na indução de linfócitos Treg foxp3. Em condições fisiológicas, macrófagos e células epiteliais do intestino também produzem IL-10, TGF- β e outros mediadores da supressão e regulação como PGE-2, contribuindo para o estabelecimento da tolerância. A geração de linfócitos T reguladores específicos para antígenos ingeridos capazes de atuar sistemicamente é um dos principais fundamentos da tolerância oral (Iwata *et al.*, 2004; Coombes *et al.*, 2007; Iwasaki, 2007).

A relação entre ingestão de antígenos capazes de suprimir processos patológicos pode ser encontrada na literatura desde o século XIX. Existem relatos de populações de nativos norte-americanos ingerindo ervas relacionadas ao gênero *Rhus* para diminuir a urticária. Em 1910 e 1911, foram testados os primeiros procedimentos de dessensibilização por via oral na alergia ao leite e ao ovo (Mowat *et al.*, 2004). Esse

processo também foi testado na alergia a medicamentos (Chase, 1946). No entanto, nas próximas décadas, as investigações nessa área não foram numerosas. Na década de 70, a capacidade supressora de antígenos aplicados via oral foram experimentalmente investigadas. Vaz e colaboradores demonstraram que a gavagem com antígeno foi capaz de prevenir a produção de anticorpos específicos para esse antígeno quando utilizado em imunização com adjuvante (Vaz *et al.*, 1977).

A capacidade da tolerância oral em prevenir processos patológicos foi estabelecida em diversos modelos experimentais, incluindo doenças autoimunes (Faria e Weiner, 2005). A ingestão prévia de um antígeno previne o desenvolvimento da patologia quando induzida pela imunização com o mesmo antígeno. Esse efeito pode ser relacionado ao aumento de IL-10, TGF- β e de linfócitos T_{REG} (Faria e Weiner, 1999). A transferência de linfócitos T reguladores específicos ou de células dendríticas geradas em animais tolerizados para animais não manipulados induz a supressão de respostas a esse antígeno (Da Cunha *et al.*, 2004; Nagatani *et al.*, 2006).

Potencialmente todos os tipos de respostas específicas podem ser suprimidas pela tolerância oral. Mas respostas T_{H2} são mais difíceis de serem suprimidas do que T_{H1} e T_{H17}. O contato com proteínas via mucosa intestinal pode induzir diferentes linfócitos reguladores, já foram relatados T_{REG} foxp3⁺, CD4⁺CD25⁺, Tr1 e T_{H3}. O linfócito T_{H3} e o TGF- β são fortemente associados a tolerância oral (Gandhi *et al.*, 2010). Esse tipo de T_{REG} pode induzir a diferenciação de outros linfócitos e células de fenótipo regulador. Ele pode também modular a diferenciação de células dendríticas em tolerogênicas, que serão capazes de induzir novos linfócitos T foxp3⁺ em um efeito cascata (Weiner *et al.*, 2011). O bloqueio dos linfócitos produtores de TGF- β (T_{H3}) com anticorpo anti-LAP compromete muitos aspectos da tolerância oral (Da Cunha *et al.*, 2015).

A tolerância oral é mediada por diversos mecanismos e o regime de ingestão de antígenos interfere nos resultados. Por exemplo, poucas doses de antígenos em curtos períodos são capazes de induzir inibição de respostas T_{H1}, e a inibição de T_{H2} requer maiores quantidades de antígenos por mais tempo (Faria e Weiner, 1999). A tolerância também pode ocorrer na ausência de tT_{REG} (Mucida *et al.*, 2005), mas depende da presença dos linfonodos mesentéricos e da migração de células dendríticas (Worbs *et al.*, 2006). Assim, a tolerância oral é mediada não somente por linfócitos T reguladores

mas também pela operação fisiológica do tecido linfoide associado à mucosa intestinal (Pabst e Mowat, 2012).

As proteínas da dieta são em sua maioria degradadas em aminoácidos, mas uma quantidade de peptídeos entra em contato com a mucosa e o sistema imune (Bruce e Ferguson, 1986a; b). De fato, o desenvolvimento completo do tecido linfoide intestinal depende da exposição aos antígenos derivados da alimentação (Menezes et al, 2003; Paula-Silva et al., 2015). Em condições fisiológicas as proteínas da dieta geram linfócitos T_{REG} foxp3⁺ no intestino delgado, que podem ser diferenciados dos T_{REG} induzidos pela microbiota através da ausência do fator de transcrição ROR γ t (Kim et al., 2016).

Já foi proposto que altas doses de antígeno induzem apoptose de linfócitos T, enquanto baixas doses induzem linfócitos T reguladores. Essa relação não é absoluta, mesmo antígenos ingeridos em grandes quantidades por períodos prolongados induzem linfócitos T reguladores específicos (Ise et al., 2005; Mirenda et al., 2005). Assim, a tolerância oral depende fundamentalmente da ativação e diferenciação de linfócitos T com propriedades reguladoras e não da simples deleção de clones específicos (Castro-Junior et al., 2012).

Muitos protocolos usam a gavagem para aplicação de quantidades exatas de antígeno. Mas a tolerância induzida por esse método é menos robusta do que um regime de alimentação contínua, i. e. o antígeno contido na comida ou na água da mamadeira. Os efeitos da tolerância oral induzida pela gavagem apresentam variações em relação à linhagem de camundongos, assim como sua idade e mesmo o tempo de duração. A alimentação contínua induz um efeito robusto que é duradouro e independe da idade ou linhagem do camundongo (Faria et al., 2003; Oliveira et al, 2015).

A capacidade dos linfócitos T_{REG} de ampliarem a resposta reguladora induzindo outros linfócitos reguladores é associada a um mecanismo conhecido como supressão indireta (Miller et al., 1991). Experimentalmente esse efeito é conseguido pela imunização conjunta com dois antígenos sendo que um deles foi anteriormente usado na indução de tolerância. Dessa forma, a tolerância é estendida ao antígeno para o qual o animal experimental não teve contato anterior. Esse efeito é mediado pela ação dos T_{REG} específicos a um antígeno induzindo a diferenciação de outros linfócitos específicos em reguladores, principalmente através da produção de citocinas. Por isso a supressão

indireta depende de co-localização espacial e temporal com linfócitos T_{REG} já diferenciados (Wildner e Thureau, 1995).

A ingestão de antígenos é a forma mais eficiente de se induzir mecanismos de tolerância periférica, podendo ser aplicada por longos períodos sem induzir efeitos colaterais. A tolerância oral foi capaz de induzir benefícios inclusive em doenças que não iniciadas pelo sistema imune, mas incluem um componente imunológico como aterosclerose, derrame, doença de Alzheimer e asma (Weiner *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Maron *et al.*, 2002; Frenkel *et al.*, 2003). Esses efeitos demonstram a capacidade da supressão indireta em controlar processos patológicos. Mesmo que o processo patológico não seja desencadeado por linfócitos, a inflamação local pode converter essas células em patogênicas. A indução de linfócitos T_{REG} específicos para o tecido afetado pode reverter a inflamação.

A capacidade da tolerância oral em inibir a indução de doenças autoimunes foi demonstrada em uma série de modelos experimentais. Esses modelos incluem esclerose múltipla, tireoidite, síndrome anti-fosfolípide, miastenia gravis e AR (Higgins e Weiner, 1988; Lee *et al.*, 1998; Weiner, 1999; Krause *et al.*, 2002). A primeira demonstração da tolerância oral em modelo experimental foi em modelo de artrite induzida por colágeno (Nagler-Anderson *et al.*, 1986).

A ingestão prévia de colágeno foi capaz de inibir o desenvolvimento de artrite induzida por adjuvantes em diferentes modelos (Thompson *et al.*, 1993; Yoshino, 1995; Ding *et al.*, 2003) demonstrando o papel do colágeno e da supressão indireta na artrite. A tolerância pela ingestão de colágeno induziu linfócitos T_{REG} produtores de IL-10 e células dendríticas tolerogênicas (Min *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2006). A inoculação via nasal também induz a tolerância (Garcia *et al.*, 1999). Os peptídeos mais tolerogênicos do colágeno tipo II também foram eficientes na indução de tolerância oral (Zhu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). A manipulação genética de linfócitos B e células dendríticas para apresentar peptídeos de colágeno também induziu tolerância capaz de prevenir a artrite experimental (Andersson *et al.*, 2016; Tengvall *et al.*, 2016).

Ensaios clínicos aplicando a tolerância oral em doenças humanas têm produzido resultados positivos e estudos em fase III de larga escala estão sendo conduzidos em pacientes com esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e AR. Nenhum desses ensaios

indicaram toxicidade sistêmica ou exacerbação de doença. No começo dos anos 90, foram realizados os primeiros estudos clínicos utilizando a tolerização oral com colágeno tipo II de galinha. Alguns pacientes apresentaram alguma melhora e apenas quatro, em sessenta, apresentaram remissão completa dos sintomas (Trentham *et al.*, 1993).

Em alguns estudos, foram utilizadas doses orais de 0,1 a 0,5 mg de colágeno bovino ou galináceo em intervalos de um mês ou mais, obtendo respostas em poucos ou nenhum paciente (Barnett *et al.*, 1996; Sieper *et al.*, 1996; Ausar *et al.*, 2001). Outros ensaios utilizaram quantidades variadas (em µg) diariamente, com respostas variadas, sendo a mais eficaz 20 µg/dia por 24 semanas (Trentham *et al.*, 1993; Mckown *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 2001). Dentre as doses testadas nesses ensaios clínicos, a resposta mais eficiente foi obtida com 0,5 mg/dia durante seis meses ou doze semanas. Os resultados desses ensaios mostraram que as doses maiores aplicadas diariamente foram mais eficazes.

A tolerância oral é mais eficiente quando se aplica a proteína de interesse de um modo semelhante à alimentação normal. No entanto, a quantidade de proteína purificada para tal procedimento em humanos é um fator limitante. Outro fator relevante é que a tolerância apresenta melhores resultados quando iniciada previamente ao estabelecimento da inflamação. Nos estudos já mencionados, os pacientes foram tratados com anti-inflamatórios convencionais para a artrite. Esses medicamentos podem comprometer algumas etapas do desenvolvimento imunológico, sendo que uma forma de reduzir a inflamação sem imunossupressão seria mais apropriada.

Outros fatores que podem interferir nos resultados são a especificidade e a aplicação de um único antígeno. Os modelos experimentais são geralmente induzidos com um único antígeno específico, enquanto que a doença em humanos ocorre espontaneamente em resposta provavelmente a vários antígenos alvo. A inflamação desencadeada por um linfócito específico induz a conversão de outros linfócitos em efetores e patogênicos, de forma que mais de um antígeno é envolvido. Na artrite reumatoide, a variação em relação a um antígeno específico é complexa. Mesmo que o colágeno tipo II seja altamente relevante, ainda assim não pode ser estabelecido como o antígeno que desencadeia a artrite. Essa reatividade pode estar presente até mesmo dez anos antes das manifestações clínicas, nem sempre sendo diretamente relacionada

aos sintomas. Portanto, a aplicação de somente um antígeno em baixas quantidades e de forma intermitente pode interferir nos resultados dos ensaios clínicos de tolerância oral em humanos. Uma alternativa é a aplicação de proteínas e fatores que sejam capazes de induzir tolerância a antígenos que sejam ubiquamente presentes em sítios inflamados.

1.5. As proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Proteins*)

O processo de seleção clonal não é simplesmente binário como já foi sugerido, mas está mais próximo a um gradiente baseado em afinidade. Linfócitos T imaturos portando receptores TCR que não sejam capazes de ligação alguma com MHC+peptídeo durante seu desenvolvimento no timo entram em apoptose. Aquelas que apresentam alguma afinidade se diferenciam em linfócitos *naive* e deixam o timo ainda não ativados. Uma afinidade mais alta induz a ativação do linfócito imaturo, que no contexto tímico se diferenciam em linfócitos reguladores naturais. Já um excesso de afinidade também induz a deleção clonal (Schwartz, 2005; Curotto De Lafaille e Lafaille, 2009).

A ativação dos linfócitos efetores que deixam o timo depende não só do contato com antígeno, mas também de sinais complementares conferidos por citocinas e sinalização pelos CD40-L e CD28. Os nTreg deixam o timo em estado diferencialmente ativado. O estímulo através do TCR induz sua proliferação e localização (Shevach e Thornton, 2014).

Os linfócitos reguladores desenvolvidos no timo (tTreg) são específicos para antígenos próprios. Essa especificidade que não é restrita a antígenos típicos do timo e o seu repertório está expandido pela expressão da AIRE por células da medula tímica. Esse repertório reflete ainda a frequência da expressão de proteínas constitutivas na atividade celular. Proteínas fundamentais ao funcionamento celular, por exemplo, envolvidas no metabolismo da glicose, podem ser processadas e peptídeos apresentados no MHC. Assim, esses epítomos são amplamente representados no repertório de linfócitos T reguladores (Jordan *et al.*, 2001).

As HSP60 são chaperoninas celulares envolvidas no dobramento ótimo de proteínas. São constitutivamente expressas e o estresse celular eleva essa expressão.

Estão presentes em todos os tipos celulares nos três domínios, Archaea, Eubactéria e Eucariotos e são altamente homologas. As HSP60 microbianas são classificadas como HSP65 mas fazem parte da mesma família que as HSP60 de eucariotos (Gupta, 1995).

As HSP apresentam vários efeitos no sistema imune. As HSP70 e HSP90 tem funcionalidade imunológica direta, envolvidas no processamento e apresentação de antígenos. No entanto, até o presente não foi descrita uma função intracelular para a HSP60 ainda assim essas proteínas possuem diversas propriedades imunológicas. HSP60 são encontradas no meio extracelular durante processos inflamatórios. O modo como são secretadas ainda é investigado, mas pode ser diretamente relacionado ao dano e destruição celular. Os processos inflamatórios que induzem a secreção de HSP60 podem ter origens infecciosas ou hiperplásicas, o que possibilita as HSP60 funcionarem como um tipo de alarmina (Srivastava, 2002; Pockley *et al.*, 2008).

As HSP60 agem sobre leucócitos de diversas maneiras. A exposição a essas proteínas pode alterar a resposta migratória induzida por quimiotaxia. Assim, elas funcionam como sinalizadoras inatas em macrófagos e células dendríticas através de receptores TLR. E sua origem diferencial, HSP65 de patógenos ou HSP60 de tumores e células danificadas, pode afetar o resultado dessa ativação. A exposição a HSP60 pode induzir a maturação e diferenciação de monócitos (Basu *et al.*, 2000; Bulut *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002).

A especificidade para HSP60 endógena e bacteriana é encontrada em linfócitos T e B e está presente em condições patológicas e saudáveis. Os níveis de anticorpos específicos aumentam durante processos infecciosos e também durante doenças autoimunes e inflamatórias como diabetes, artrite, lúpus, esclerose múltipla, aterosclerose e colite (Quintana e Cohen, 2005b). A ligação simultânea da HSP60 ao TLR-4 e ao receptor BCR é capaz de induzir a produção de anticorpos de maneira independente de linfócitos T (Cohen-Sfady *et al.*, 2005). Autoanticorpos para HSP60 são prevalentes em indivíduos saudáveis, sendo detectáveis desde o nascimento (Madi *et al.*, 2009). Existe, no entanto, uma diferenciação desse repertório entre indivíduos saudáveis e pacientes. Na esclerose múltipla, essa diferença ocorre tanto em relação a afinidade de ligação dos anticorpos anti-HSP60 quanto com relação à composição dos isotipos desses anticorpos (Quintana *et al.*, 2008).

A ativação de linfócitos B por HSP60 através do TLR-4 pode induzir proliferação e produção de IL-10 e IL-6 assim como a indução de produção de IgG3 (Cohen-Sfady *et al.*, 2009). Linfócitos B ativados pela HSP60 apresentam aumento da apresentação de antígenos e indução da produção de IL-10 e IFN- γ por linfócitos T. A ativação, através do TLR-4, foi descrita para a proteína endógena. A HSP60 também pode tornar os linfócitos B resistentes a apoptose independentemente da TLR-4 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006).

O reconhecimento de epítomos de HSP60 e HSP65 também está fortemente representado no repertório de linfócitos T na saúde e na doença. Durante processos infecciosos, ocorre a expansão de clones específicos para HSP60 e HSP65. Essas proteínas apresentam homologia de mais de 90% e linfócitos T específicos para HSP60 endógenas podem interagir com HSP65 (Anderton *et al.*, 1995). Peptídeos derivados da HSP60 modulam a diferenciação dos linfócitos T através do TLR-2, afetando vários aspectos (Zanin-Zhorov, Tal, *et al.*, 2005).

Essa modulação está relacionada a vários efeitos benéficos. A infusão intraperitoneal dessa proteína foi capaz de inibir a indução de hepatite por concanavalina-A de forma dependente de TLR-2 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2003; Zanin-Zhorov, Bruck, *et al.*, 2005). A especificidade de linfócitos T para HSP60 pode estar envolvida na resistência à insulina e pancreatite no modelo de diabetes em camundongos NOD (Quintana *et al.*, 2004). A HSP60 pode também ativar mecanismos efetores e inflamatórios em linfócitos específicos (Quintana e Cohen, 2005c; Rajaiah e Moudgil, 2009). A capacidade dessa proteína em induzir imunizações também vem sendo explorada em processos de vacinação (Amir-Kroll *et al.*, 2006).

A atividade imunológica da HSP60 é mediada através de receptores inespecíficos como o TLR-2 e 4 e receptores específicos em linfócitos T e B. Podendo induzir respostas inflamatórias e reguladoras em macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Portanto, sua relação com o sistema imune é particularmente complexa.

Quintana e colaboradores apresentam a hipótese de que a reatividade à Hsp60 endógena ou à Hsp65 bacteriana age como um sinal de atividade celular generalizada para o sistema imune. Segundo essa hipótese, toda proliferação celular, seja derivada de inflamação, neoplasia ou infecção, resultaria em um aumento de proteínas da família

HSP60. Assim, altas quantidades de HSP60 estariam relacionadas à ativação de respostas inflamatórias e seus peptídeos à ativação de mecanismos reguladores. Esses efeitos seriam mediados tanto por receptores TLR da imunidade inata quanto pelo repertório de linfócitos específicos para HSP60 e HSP65 (Quintana e Cohen, 2011).

Irun Cohen propôs, na década de 90, que a reatividade a componentes próprios é um mecanismo ativo de controle e regulação e o conjunto dessa reatividade foi chamada por ele de homúnculo imunológico (Cohen, 1992). Esse conceito é derivado do homúnculo cerebral, um mapa do cérebro baseado na representação quantitativa diferencial de neurônios motores. Os membros e órgãos não estão igualmente representados no homúnculo cerebral. De forma semelhante, no homúnculo imunológico, a representação de autoantígenos no repertório não é igualmente distribuída entre todos os componentes próprios. A HSP60 é altamente representada no repertório para autoantígenos. Os avanços na identificação de linfócitos T_{REG} e do repertório dos tTreg demonstram a adequação do modelo do homúnculo imunológico. A alta homologia entre a HSP60 endógena e HSP65 bacteriana e sua sobreposição no repertório de linfócitos T reguladores conferem a essa proteína características únicas (Cohen, 1991; Cohen e Young, 1991; Konen-Waisman *et al.*, 1995).

A dominância imunológica da HSP65 de *M. tuberculosis* foi observada primeiramente na AR, assim como suas propriedades supressoras (Kaufmann *et al.*, 1987; Van Eden *et al.*, 1988). A alta reatividade à HSP65 encontrada em pacientes e modelos experimentais de artrite tornou essa proteína candidata a antígeno desencadeador da doença. A forte reação a esse antígeno também foi observada na diabetes em humanos e em modelos experimentais dessa doença autoimune (Cohen, 1991). A HSP60 é encontrada no sangue e sua concentração pode ser relacionada à gravidade da doença (Abulafia-Lapid *et al.*, 1999). Porém, a imunização com a proteína inteira diminui a progressão da diabetes em camundongos NOD e inibe a indução da artrite em ratos (Elias *et al.*, 1991; Feige e Cohen, 1991).

Foram então encontrados diferentes epítomos derivados da HSP60, mas imunizações com esses peptídeos inibiram o desenvolvimento da artrite e diabetes, sendo que somente alguns foram patogênicos em certas condições. Linfócitos T específicos para o epítopo A2b derivado de HSP65 só foram capazes de induzir artrite

em ratos irradiados (Holoshitz *et al.*, 1983; Van Der Zee *et al.*, 1989). Na diabetes, foi estabelecido o peptídeo p277 como o principal mediador dos efeitos reguladores (Elias e Cohen, 1994; Elias *et al.*, 1995). Quando a HSP60 foi finalmente isolada e testada como um indutor da artrite ao invés funcionou como um agente supressor (Van Den Broek *et al.*, 1989).

Esse efeito protetor foi verificado em diversos modelos experimentais de artrite, induzida por adjuvante, por pristano e por colágeno (Thompson *et al.*, 1990; Feige e Cohen, 1991; Jorgensen *et al.*, 1998; Moudgil e Durai, 2008). Diferentes formas de aplicação também mostraram esse efeito. Tanto a imunização com as proteínas HSP60 quanto HSP65 foram capazes de inibir a indução da artrite com adjuvantes assim como a vacinação com plasmídeos contendo HSP60 e HSP65 (Quintana e Cohen, 2005a). As vias oral e nasal foram eficientes em inibir a indução e a progressão de artrite induzida por adjuvante (Prakken *et al.*, 1997; Quintana *et al.*, 2002; Zonneveld-Huijssoon *et al.*, 2013). Deve-se notar que a via oral nesses experimentos foi eficiente somente quando a HSP65 estava associada com inibidor de tripsina ou um sistema recombinante de expressão (Cobelens *et al.*, 2002; Rodriguez-Narciso *et al.*, 2011).

A imunização peritoneal com HSP65 preveniu a artrite induzida por adjuvante através da diminuição de IL-17 e da proliferação celular e aumento de IL-10 (Satpute *et al.*, 2009). O tratamento via oral com HSP65 na artrite induzida por adjuvante foi capaz de inibir a progressão do quadro patológico e induziu o aumento de linfócitos T_{REG} produtores de TGF- β , IL-10 e diminuição da produção de IFN- γ (Cobelens *et al.*, 2002). Um outro estudo demonstrou que a aplicação via oral de folhas de tabaco produtoras de HSP65 recombinante também foi capaz de reduzir a progressão da artrite induzida por adjuvante em ratos (Rodriguez-Narciso *et al.*, 2011). A alimentação com essas folhas de tabaco foi mais eficiente que a gavagem com HSP65 recombinante pura demonstrando a importância do regime aplicado na administração oral do antígeno.

O contato com a mucosa nasal também desencadeia efeitos tolerizantes. Esse efeito está demonstrado na prevenção da artrite induzida por adjuvante com a inoculação nasal com peptídeos derivados de HSP60, incluindo derivados de HSP65 bacteriana e endógena (Prakken *et al.*, 1997). A inibição da artrite induzida por adjuvante pela

inoculação nasal de peptídeos do HSP60 dependeu de linfócitos T_{REG} produtores de IL-10 (Prakken *et al.*, 2002).

O papel da HSP em pacientes de artrite também está bem evidenciado, principalmente na forma juvenil. A artrite reumatoide juvenil difere clinicamente da AR em seu curso clínico. A forma juvenil apresenta fases de remissão espontânea, enquanto que a AR não apresenta remissão se não tratada. A expressão de HSP60 no líquido sinovial é aumentada em pacientes com AR na forma juvenil e em modelos experimentais. O aumento da reatividade para HSP60 por células mononucleares periféricas de pacientes com AR juvenil é relativamente mais alto durante as remissões (De Graeff-Meeder *et al.*, 1991).

As células sinoviais obtidas desses três quadros proliferam em contato com HSP60 e HSP65. Mas, no caso da artrite juvenil, a reatividade para HSP60 é maior durante quadros clínicos piores (Wu *et al.*, 2011). O aumento da frequência de linfócitos T CD30⁺ específicas para HSP60 e sua reação cruzada com HSP65 é associado com melhor prognóstico (De Kleer *et al.*, 2003; Prakken *et al.*, 2003). Células T específicas para HSP60 e HSP65 presentes no líquido sinovial de pacientes reumáticos produzem IL-4 quando estimuladas e são capazes de bloquear a produção de TNF- α por outros leucócitos (Vercoulen *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014). Foi encontrada uma relação entre o quadro clínico de pacientes reumáticos e a produção de IL-10 estimulada *in vitro* com HSP60 (Zanin-Zhorov, Tal, *et al.*, 2005).

A alta reatividade para HSP60 foi observada em diversos processos patológicos e inflamatórios, como infecções, esclerose múltipla, lúpus, Alzheimer, colite, e muitas vezes relacionada à intensidade da inflamação. É evidente que suas relações com a inflamação e o sistema imune são complexas. A expressão aumentada de HSP60 pode ser considerada como uma forma fisiológica de desencadear mecanismos de inibição da progressão da inflamação destrutiva. Devido ao seu potencial terapêutico em regular a inflamação, essa proteína já foi considerada como adjuvante da tolerância. Porém, essas proteínas interagem com muitos mecanismos efetores e inflamatórios e podem também ser associadas também a imunização contra patógenos (Shiny *et al.*, 2011). Por isso, pode ser mais adequado considerar a HSP60 como um mecanismo endógeno capaz de modular o eixo regulação-inflamação (Coelho e Faria, 2011). Pode-se, então, especular

que nos pacientes com doenças inflamatórias crônicas, as HSP60 falharam em controlar o eixo regula/inflama. Assim, reforçar a tolerância aplicando essa proteína pode induzir os mecanismos reguladores de forma a sobressair os inflamatórios.

Atualmente existem dois ensaios clínicos investigando os efeitos de peptídeos derivados das HSP60. A aplicação subcutânea do peptídeo p277 derivado de HSP60 humana tem apresentado bons resultados em pacientes de diabetes tipo I, reduzindo a demanda de insulina e a destruição do pâncreas (Nussbaum *et al.*, 2006; Eldor *et al.*, 2009). Porém, a aplicação desse peptídeo nesse ensaio é por via parenteral. Em outro estudo clínico pacientes reumáticos que receberam peptídeos APJ1 derivados de Hsp65 de *E. coli* por via oral apresentaram melhoras no quadro clínico (Koffeman *et al.*, 2009). Os pacientes desses dois ensaios apresentaram também redução de citocinas inflamatórias e aumento das reguladoras.

No entanto, a melhor forma de se induzir tolerância por via oral é a administração contínua do antígeno. Além disso, visto a complexidade de suas relações, o uso de peptídeos pode comprometer a efetividade da HSP60 e todos os mecanismos relacionados. O problema com relação ao regime de administração contínua de antígenos é que a quantidade de proteína purificada necessária é um fator limitante para esse procedimento em humanos, ainda mais no caso de proteínas complexas cuja forma recombinante é de difícil estocagem. Por isso, uma alternativa viável para aplicação da HSP65 diretamente na mucosa é necessária para efetividade dessa terapia.

1.6. O *Lactococcus lactis* NCDO 2118 produtor de HSP65

Uma alternativa para essa limitação em relação à quantidade de antígeno necessária para a administração oral é a produção de proteínas recombinantes por bactérias que são seguras para consumo humano. Esse método foi aplicado no desenvolvimento de uma linhagem de *Lactococcus lactis* que secreta Hsp65 de *Mycobacterium leprae*, sendo capaz de entregar a proteína íntegra na mucosa (De Azevedo *et al.*, 2012).

As bactérias lácticas são um grupo heterógeno, gram-positivas cujo produto final de fermentação de açúcares é o ácido láctico. Esse grupo inclui espécies de *Lactococcus*,

Streptococcus, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Essas espécies são historicamente associadas a alimentação humana e a preservação de alimentos. Portanto, são seguras para consumo humano. As linhagens de algumas espécies são probióticas, oferecendo ainda mais vantagens para terapias através da mucosa intestinal (Cavanagh *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Nas últimas duas décadas, essas bactérias vêm sendo usadas como vetores de proteínas recombinantes, o que possibilitou o desenvolvimento de diferentes sistemas capazes de produzir inclusive proteínas eucarióticas funcionais, secretadas ou expressas na membrana celular. A bactéria láctica mais usada em sistemas recombinantes é a *Lactococcus lactis*, existindo dezenas de linhagens geneticamente modificadas descritas (Cavanagh *et al.*, 2015; Wyszynska *et al.*, 2015).

O método de expressão mais usado nesses *L. lactis* geneticamente modificados é o induzido por nisina (NICE – *nisin controlled induced system*). O sistema desenvolvido por Azevedo *et al.* é induzido por xilose (XIES – *Xylose Inducible Expression System*) e também inclui um gene de resistência a cloranfenicol (Miyoshi *et al.*, 2004). *L. lactis* geneticamente modificados estão sendo usados para entrega de proteínas recombinantes na mucosa tanto para indução de imunização para antígenos derivados de agentes infecciosos e quanto para indução da regulação.

L. lactis recombinantes usados para vacinação através das mucosas incluem antígenos para HPV, HIV, tétano, malária, *C. difficile*, *H. pylori*, influenza, malária, hepatite e leishmaniose (Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012; Benbouziane *et al.*, 2013; Ribelles *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Rangel-Colmenero *et al.*, 2014; Chamcha *et al.*, 2015). Os dados resultantes desse tipo de aplicação demonstram a eficiência dessas bactérias em estimular o sistema imune das mucosas através da tecnologia recombinante.

A aplicação de *L. lactis* geneticamente modificados na mucosa com o objetivo de regulação e diminuição da inflamação também vem sendo bem estabelecida. A secreção da enzima catalase foi efetiva na redução da colite e do câncer intestinal (De Moreno De Leblanc *et al.*, 2008). *L. lactis* produtor de nano anticorpos anti-TNF- α é capaz de inibir a indução e a progressão de colite em camundongos (Vandenbroucke *et al.*, 2010). A primeira linhagem de *L. lactis* geneticamente modificada para controlar a inflamação intestinal foi uma produtora de IL-10 (Steidler, 2003; Steidler e Rottiers, 2006).

A aplicação parenteral de IL-10 recombinante, além de custosa, é associada a efeitos colaterais. Steidler e colaboradores desenvolveram linhagens de *L. lactis* capazes expressar na membrana e também de secretar IL-10. O *L. lactis* foi capaz de produzir IL-10 funcional demonstrando o potencial dessa bactéria em produzir e expressar proteínas eucarióticas de forma eficiente. A linhagem capaz de secretar IL-10 foi adaptada ao consumo humano e está atualmente sendo testada em ensaio clínico, os resultados em pacientes de colite têm sido promissores (Baat *et al.*, 2006).

Outras abordagens aplicando *L. lactis* geneticamente modificados no tratamento da colite também tem mostrado bons resultados. Essas abordagens incluem proteínas envolvidas no processo patológico do intestino como elastases, antígeno V de cálcio reduzido, e fatores trifólicos (TFF – *trefoil factors*), inibidor de protease de leucócitos (SLIP1) e lipoxigenase-15 (Vandenbroucke *et al.*, 2004; Saraiva *et al.*, 2015). A redução da oxidação pode reduzir drasticamente a patologia da colite e o *L. lactis* tem se mostrado capaz de induzir esses efeitos. Outra bactéria láctica, o *Lactobacillus casei* produtor de superóxido dismutase, também apresentou efeitos positivos no controle da colite (Watterlot *et al.*, 2010; Leblanc *et al.*, 2011). Portanto a versatilidade e a segurança da utilização de bactérias lácticas como a *L. lactis* na terapia oral estão bem demonstradas.

A capacidade do *L. lactis* em secretar proteínas na mucosa e capazes de induzir tolerância está demonstrada com ovalbumina (OVA) e alérgenos derivados de ácaros (Derp1) e também do amendoim (Huibregtse *et al.*, 2007; Ai *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014). A dessensibilização de camundongos alérgicos com *L. lactis* recombinante foi eficiente nesses modelos. O contato com alérgeno de amendoim esteve associado com aumento de IL-10, TGF- β , expressão de foxp3, IgA específica e supressão de IgE, e aumento da resposta T_H1 em relação a T_H2. Esses efeitos também foram observados no modelo usando Derp1 junto a diminuição dos sintomas pulmonares.

O *L. lactis* secretor de OVA também foi capaz de induzir a tolerância quando aplicado via oral em camundongos DO11.1. Esses animais apresentam o receptor de linfócitos TCR geneticamente modificados de modo a terem quase todo repertório específico para OVA. A tolerância nesse modelo foi mediada por linfócitos CD4⁺CD25⁺ produtores de TGF- β , esse efeito também incluiu aumento da expressão de CTLA-4 e foxp3 (Huibregtse *et al.*, 2007).

O tratamento da diabetes em modelos experimentais com *L. lactis* também tem mostrado resultados positivos com aplicação de diferentes antígenos, inclusive a HSP65. A secreção de insulina por *L. lactis* também está sendo investigada como agente terapêutico (Ng e Sarkar, 2011). O tratamento com *L. lactis* produtor de IL-10 junto a baixas doses de anti-CD3 induziram a reversão da patologia autoimune e a integridade das células β pancreáticas (Takiishi *et al.*, 2012). Dois autoantígenos relevantes no desenvolvimento da diabetes tipo I, a ácido glutâmico descarboxilase (GAD65) e a tirosina semelhante a fosfatase (IA-2) também foram estudados como peptídeos secretados por *L. lactis* aplicados via oral no camundongo NOD (Robert *et al.*, 2015). Os resultados indicaram diminuição da resistência à insulina e da hiperglicemia.

A HSP65 secretada por *L. lactis* já foi usada na construção de dois plasmídeos diferentes inseridos em *L. lactis* e testadas em camundongos NOD (Ma *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Ma *et al* construíram um plasmídeo capaz de secretar a HSP65 seguida de seis repetições do peptídeo 277. O tratamento oral com esse *L. lactis* preveniu a hiperglicemia, diminuíram a proliferação celular e a destruição do pâncreas e aumento da IL-10. Liu *et al* desenvolveram um plasmídeo produtor de peptídeo de HSP65 associado com o IA-2. Esse *L. lactis* quando usado via oral em camundongos NOD também foi capaz de prevenir a hiperglicemia e a destruição do pâncreas. Além disso, esse tratamento diminuiu a frequência de linfócitos T_H1 e 17, e aumentou a frequência de T_H2 e T_{REG} .

Assim a segurança e a capacidade do *L. lactis* em produzir proteínas recombinantes para entrega diretamente no tubo intestinal está bem demonstrada e estabelecida em diversos sistemas, incluindo no tratamento da diabetes e artrite experimentais. Em nenhum desses estudos foi observado efeitos colaterais nos modelos em animais. No ensaio clínico do *L. lactis* produtor de IL-10 tem sido relatado leve desconforto por poucos pacientes, mostrando que essa bactéria é segura para uso terapêutico humano.

Assim, a capacidade do *L. lactis* em interagir com as mucosas e secretar proteínas recombinantes está bem demonstrada inclusive em humanos. Nosso grupo já demonstrou que o tratamento via oral com Hsp65 de *M. leprae* produzido por *Lactococcus lactis* (Hsp65-lac) é capaz de prevenir a encefalomielite autoimune experimental em camundongos (Rezende, R. M. *et al.*, 2013) e a colite (dados não

publicados). Essa bactéria também foi capaz de reduzir a gastrite experimental induzida pelo consumo de etanol em camundongos (Alvarenga et al, 2015). A inibição da EAE em camundongos foi mediada por linfócitos reguladores LAP⁺, aumento da IL-10 e diminuição da IL-17 e IFN- γ .

A associação da HSP65 com a artrite é um fator historicamente estabelecido, e o potencial terapêutico da aplicação dessa proteína está demonstrado inclusive em pacientes reumáticos. O sistema de secreção de HSP65 pelo *L. lactis* torna esse procedimento viável e seguro. Outro fator relevante é que a linhagem NCDO2118 usada na transformação apresenta propriedades probióticas comprovadas em modelos experimentais de colite (Luerce et al., 2014). Probióticos podem interferir na modulação sistêmica da inflamação e vem sendo explorados na terapia da AR.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que administrados em certas quantidades são capazes de induzir efeitos benéficos. Evidências sobre o efeito dos probióticos sobre o sistema imune vem se acumulando. Grande parte das bactérias probióticas são ácido lácticas ou bifidobacterias. A atividade probiótica é geralmente observada em uma linhagem específica da espécie. Os benefícios do tratamento com probióticos vêm sendo relatados para uma série de processos patológicos como colite, diarreia infecciosa, intolerância a lactose, alergias, fibromialgia, artrite dentre muitas outras (Menard, 2004; Imaoka, 2008; Dongarra et al., 2013).

A capacidade da modulação do sistema imune pela microbiota vem sendo demonstrada *in vivo* e *in vitro* em modelos experimentais e em humanos. Ensaios clínicos com probióticos foram aplicados no tratamento da colite ulcerativa, doença de Crohn, síndrome de intestino irritável, diabetes tipo 2 e alergias (Cuello-Garcia et al., 2015; Guarino et al., 2015; Homan e Orel, 2015; Saez-Lara et al., 2015). Esses estudos têm mostrado diversos efeitos benéficos incluindo diminuição do quadro clínico e da ocorrência de relapsos, aumento de T_{REG} e diminuição de células e citocinas pró-inflamatórias. Quando ocorre diminuição ou controle da inflamação pode haver reversão da disbiose e retorno da microbiota aos estados de diversidade ideal. Esse efeito é observado mesmo que a diversidade da microbiota em nível de espécies ainda não seja um fator totalmente esclarecido. O impacto dos probióticos na composição da microbiota

não é totalmente compreendido. Mas já foi mostrado que algumas bactérias são capazes de inibir o crescimento de outras *in vitro* (Millette *et al.*, 2007).

Os mecanismos de ação de bactérias probióticas diferem entre as espécies podendo incluir os efeitos do polissacarídeo A, a produção de SCFA (*short chain fatty acids*), produção de peptídeos antimicrobianos, aumento da adesão e aderência epitelial (Kirjavainen *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2000; Konieczna *et al.*, 2012; Lopetuso *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2016). A aplicação de alguns microrganismos probióticos mesmo mortos é capaz de induzir efeitos reguladores *in vitro* e *in vivo*. O contato direto com algumas espécies probióticas também pode induzir a diferenciação de células dendríticas tolerogênicas e linfócitos foxp3⁺ *in vitro* (Baat *et al.*, 2004). Os mecanismos envolvidos na indução através de contato não são completamente compreendidos, mas podem envolver a ativação diferencial de TLR. Assim, nem todo microrganismo probiótico irá apresentar o mesmo benefício em diferentes processos patológicos.

Os efeitos dos probióticos foram demonstrados em diferentes modelos experimentais de artrite. O *Lactobacillus* GG reduziu os processos patológicos no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos Lewis (Pessi *et al.*, 2001; Baharav *et al.*, 2004). O *L. casei* suprimiu a indução de artrite por colágeno II em camundongos (Amdekar *et al.*, 2011). O tratamento oral com *L. casei* reduziu várias moléculas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , NF- κ B e COX-2), anticorpos específicos para colágeno tipo II e proliferação de linfócitos T_H1 e aumento da IL-10 (So, Kwon, *et al.*, 2008). A aplicação oral de *L. casei* juntamente com colágeno II ampliou os efeitos da tolerância oral nesse modelo (So, Lee, *et al.*, 2008). Além de maior redução das citocinas pro-inflamatórias e proliferação de linfócitos T CD4 específicos, nessa abordagem também foi observado o aumento do TGF- β . O uso de probióticos em pacientes de artrite também tem mostrado melhoras em vários aspectos dos quadros clínicos (Vaghef-Mehrabany *et al.*, 2014).

Esses resultados são altamente relevantes na terapia via oral. Muitas abordagens aplicando a tolerância oral mostraram que aplicações conjuntas de probióticos com fármaco anti-inflamatório ampliaram os efeitos, principalmente quando a inflamação já está estabelecida. Este efeito já foi constatado inclusive para HSP65. Porém, essas

drogas podem ter efeitos supressores que interferem com a fisiologia da tolerância oral enquanto que a regulação da inflamação com probióticos não demonstrou, até o momento, efeitos imunossupressores.

O *Lactococcus lactis* NCDO2118 não pode ser considerado estritamente um probiótico por não fazer parte da microbiota normal e não ter sido ainda analisado com relação a todas as propriedades necessárias para classifica-lo como tal. No entanto, as suas propriedades anti-inflamatórias já foram comprovadas por vários estudos conduzidos em modelos de colite (Luerce et al, 2015), gastrite induzida por álcool (Alvarenga et al, 2015), encefalomielite autoimune experimental (Rezende et al, 2013) e doença enxerto-versus-hospedeiro (Mercadante et al, 2014).

Por outro lado, o caráter imunodominante e regulador da HSP60 na artrite está bem estabelecido em modelos animais e em pacientes reumáticos. A manutenção da especificidade para HSP65 é mantida fisiologicamente pelas bactérias comensais (Van Eden *et al.*, 2005). Além disso, a HSP60 interage com sinalizadores da imunidade inata como os TLR, assim como as bactérias (Cohen-Sfady *et al.*, 2005; Zanin-Zhorov *et al.*, 2006). Em uma aplicação de peptídeos derivados de HSP60 via mucosa nasal, a adição de agonistas de TLR9 induziu um efeito mais potente desse tratamento na artrite induzida por adjuvante (Zonneveld-Huijssoon *et al.*, 2012). Demonstrando a complexidade envolvida nas interações da HSP60, bactérias comensais e hospedeiro.

Os efeitos da terapia com Hsp65-lac estão bem estabelecidos na prevenção da patologia autoimune EAE e na colite. Outros sistemas usando a produção recombinante de HSP65 por linhagens de *L. lactis* que não apresentam atividade anti-inflamatória foram capazes de inibir o desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD. A tolerância oral induzida pela HSP65 associada a um microrganismo com atividade anti-inflamatória semelhante àquela observada em probióticos oferece uma abordagem ainda mais eficaz na indução fisiológica da regulação na prevenção da artrite induzida por colágeno.

Utilizamos um modelo de artrite induzida por colágeno (AIC) artrite que inclui também a ovalbumina (OVA) emulsificados em adjuvante completo de Freund (CFA) e injetados em camundongos BALB/c (Backstrom e Dahlgren, 2008). Esse protocolo apresenta várias vantagens. É crônico, apresenta anticorpos anti-CII, fator reumatoide e

edema de pata. Já foi demonstrado também o desenvolvimento de tecidos linfoides terciários na articulação dos camundongos BALB/c submetidos a esse tratamento (Baddack *et al.*, 2013). E já foi demonstrado que a tolerância oral com OVA é eficaz na inibição desse modelo (Thome *et al.*, 2012).

Para se avaliar a robustez do tratamento oral com Hsp65-lac, este também foi testado em outro modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) no qual a albumina sérica bovina metilada (mBSA) emulsificada com CFA é injetada em camundongos C57BL/6 (Van e Van, 1984). Esse é um modelo agudo no qual a lesão é localizada e o aspecto autoimune é menos evidente, mas a inflamação ainda é um componente fundamental.

Estudos anteriores do nosso grupo já demonstraram que a administração oral de Hsp65-lac é uma maneira eficaz de se induzir tolerância oral sendo capaz de regular a inflamação em processos específicos, como a EAE, e inespecíficos, como a colite. Essa abordagem se mostra ainda mais eficaz levando-se em conta as relações entre a HSP60, a microbiota e a artrite. Assim, nossa **hipótese de trabalho** testada nesse trabalho foi que o tratamento oral com a bactéria recombinante *L. lactis* produtora de Hsp65 seria capaz de prevenir a indução da artrite por colágeno em camundongos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Testar o efeito do tratamento oral com Hsp65-lac no desenvolvimento da artrite experimental em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo experimental murino de artrite crônica.
- Testar os efeitos do tratamento dos camundongos com Hsp65-lac previamente à indução do modelo crônico de artrite
- Analisar mudanças histopatológicas na articulação
- Verificar a reatividade de imunoglobulinas séricas por ELISA
- Quantificar citocinas inflamatórias e regulatórias no baço e linfonodos por ELISA
- Analisar as frequências de linfócitos B e T efetores e reguladores induzidas no modelo e após o tratamento.
- Analisar os efeitos do tratamento oral com Hsp65-lac em modelo agudo de artrite.
- Verificar o efeito desse tratamento nos níveis de citocinas patogênicas e na frequência de células T reguladoras

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 com seis semanas de idade foram fornecidas pelo Centro de Bioterismo a UFMG (CeBIO). Esses animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia em microisoladores e vermifugadas com ivermectina. Eles receberam ração e água *ad libitum*, com exceção dos períodos da aplicação via oral da solução contendo *L. lactis* quando essa solução foi a única fonte líquida oferecida. Os experimentos desse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo 118/2013).

3.2. *Lactococcus lactis*

Dois plasmídeos diferentes foram usados como vetores na transformação da linhagem NCDO2118 de *L. lactis* (De Azevedo *et al.*, 2012). O plasmídeo PSEC:hsp65 utiliza um sistema de expressão induzida por xilose (XIES) e que dirige a expressão de Hsp65 de *Mycobacterium leprae* para o meio extracelular. Como controle, utilizamos um plasmídeo semelhante (pXylT:SEC) mas vazio (sem hsp65) para transformar o *L. lactis* NCDO2118. Ambos os vectores contêm gene de resistência ao cloranfenicol para possibilitar a seleção das bactérias que contêm os vectores.

3.2.1. Condições de crescimento bacteriano

As linhagens de *L. lactis* produtora de Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (Hsp65-lac) e a portadora do plasmídeo vazio (*L. lactis*-EP) foram cultivadas em meio M17 (Difco), suplementado com 0,5% de glucose (meio GM17) ou 1% de xilose (XM17) e cloranfenicol (10 µg/mL), a 30 ° C, sem agitação.

No primeiro dia, uma única colônia recombinante de *L. lactis* um vetor vazio (*L. lactis*-EP) ou expressando Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (Hsp65-lac), em 5 ml de GM17. No segundo dia, a cultura crescida ao longo da noite em GM17 foi diluída 1:10000 em XM17 para induzir a expressão do plasmídeo. No terceiro dia, os animais receberam o XM17 para beber.

3.3. Grupos Experimentais

Os animais foram submetidos aos tratamentos de acordo com os seguintes grupos: **N**- grupo “naïve” como controle negativo, animal não foi submetido a nenhum procedimento; **C**- grupos controle positivo, bebeu por quatro apenas meio XM17 duas semanas antes da indução de artrite; **EP**- o grupo bebeu por quatro dias seguidos o meio XM17 inoculado com *L. lactis* portador do plasmídeo vazio (*L. lactis*-EP) duas semanas antes da indução da artrite; **HSP**- o grupo bebeu por quatro dias seguidos o meio XM17 inoculado com *L. lactis* produtor de Hsp65 de *M. leprae* (Hsp65-lac), duas semanas antes da indução da artrite.

3.4. Tratamento com *L. Lactis*

Quinze dias antes da primeira imunização, o acesso à água foi suspenso e os animais tinham disponível para beber apenas meio XM17 (grupo C), meio XM17 inoculado com *L. lactis* portador do plasmídeo vazio (*L. lactis*-EP, grupo EP) ou meio XM17 inoculado com *L. lactis* produtor de Hsp65 de *M. leprae* (Hsp65-lac, grupo HSP) por quatro dias consecutivos. Cada frasco continha 5 ml por animal.

3.5. Modelos experimentais de artrite

3.5.1. Modelo crônico induzido por colágeno e ovalbumina

Utilizamos uma solução salina com 2mg/mL de ovalbumina (OVA) e 2mg/mL de colágeno tipo II de galinha (CII) em 1mL de solução salina usada na emulsão com volume igual de adjuvante completo de Freund (CFA) mais 4mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* macerado. Foi injetado, por via subcutânea, 100µL dessa solução na base da cauda dos camundongos BALB/c nos dias 14, 35, 56 e 77. Foi realizada uma análise cinética dos diversos parâmetros imunológicos, coletando-se material uma semana depois de cada imunização.

3.5.2. Modelo agudo induzido por BSA metilada

Utilizamos uma solução contendo albumina sérica bovina metilada (mBSA) dissolvida em solução salina em uma concentração de 10 mg/mL emulsionada com volume igual de CFA acrescido de 5mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* macerado. Essa solução foi injetada, no volume de 100µL, por via subcutânea na base da cauda dos camundongos C57BL/6. O desafio foi realizado 14 dias

depois com injeção de 10 µg de mBSA em 10 µL de solução salina diretamente no joelho de cada animal.

3.6. Avaliação do escore clínico da artrite

Para avaliar as alterações clínicas induzidas pela artrite, o volume das patas traseiras foi medido com um pletismômetro (Ugo Basili, Itália) e sua sensibilidade à dor foi avaliada por um analgesímetro (Ugo Basili, Itália), respectivamente. O volume das duas patas traseiras foi medido no pletismômetro e a média dos valores calculada. O teste de sensibilidade foi realizado três vezes, para habituação dos camundongos. Somente a quarta medida foi computada.

3.7. Sacrifício e coleta de amostras

Sete dias depois da última imunização os animais foram injetados via i.p. com Quetamina (60mg/kg) e Xilazina (8,0mg/kg). O volume total de sangue foi coletado pela aorta e, após coagulação, foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro foi estocado em tubos individuais e congelado (-20°C). Retirou-se o baço, os linfonodos cervicais e os inguinais. Uma das patas foi removida para histologia da articulação e a outra foi usada para obtenção do lavado intra-articular.

3.7.1. Lavado intra-articular

O lavado intra-articular foi obtido pela injeção de 10µL de solução BSA 3% no joelho, coletado e diluído em 90µL da solução BSA 3%. Alíquotas de 30µL desse lavado articular foram diluídas em 60µL em solução de Turk, e a contagem dos leucócitos feita em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (objetiva com aumento de 100 vezes) e contador manual.

3.8. Análise histológica das articulações

Amostras dos joelhos foram fixadas em solução formaldeído 10% pH 7,2 durante 48 horas. Foram então lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA 10% pH 7.2, em temperatura ambiente, por um período de três semanas. Em seguida, foram desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto; diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. O material foi seccionado em micrótomo obtendo-se cortes

consecutivos de 4 µm, que foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas qualitativamente usando os parâmetros a seguir: Fibrose Sinovial, Pannus, Alterações na Cartilagem e Perda Óssea. O score foi computado pontuando-se 0 para parâmetro não observado, 1 para parâmetro observado e 2 para parâmetro intenso.

3.9. Medida de anticorpos específicos no soro

As concentrações de anticorpos do soro para OVA, colágeno tipo II e mBSA foram avaliadas por ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com uma solução de OVA [5 ug/mL], CII [5 ug/mL], HSP65 [10 ug/mL] ou mBSA [2 ug/mL] e incubadas durante a noite a 4º C. As placas foram incubadas com o soro e os anticorpos ligados foram detectados utilizando um anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo ligado à fosfatase alcalina (Southern Biotechnology). Reação de cor foi desenvolvida à temperatura ambiente com ortofenilenodiamina (OPD; 1 mg / ml), 0,04% de H₂O₂ em tampão de citrato de sódio. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ a 2 N. A absorbância foi medida a 492 nm por um leitor de ELISA (Bio-Rad modelo 450 Microplate Reader e Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader).

3.10. Cultura de células isoladas de órgãos linfóides

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foram coletados os linfonodos mesentéricos e inguinais e o baço. Os órgãos foram macerados e a suspensão de células ajustada na concentração 1x10⁶ células/poço em meio de cultura RPMI (Hyclone – Logan, Utah, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, SP, BR), 2mM de l-glutamina (GibcoBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA), 25mM de HEPES (Sigma – St. Louis, MO, EUA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 20 µg/mL de sulfato de gentamicina (Schering-Plough – Rio de Janeiro). O cultivo foi realizado em placas de cultura de poliestireno com 96 poços mantidos por 48 horas. Para avaliação da produção de citocinas, as células foram estimuladas com 50µg/mL de OVA. Como controle positivo de ativação celular, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3 (Bioscience) e, para o controle negativo, foram mantidas na

cultura sem nenhum estímulo. Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas para dosagem das citocinas IL-17, IFN- γ e IL-10.

3.11. Medida de citocinas

A determinação da concentração de citocinas em sobrenadantes de cultura foi feita por meio de ELISA sanduíche utilizando-se como anticorpos primários anticorpos monoclonais anti-IFN- γ e anti-IL-17 murinos (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) na sensibilização de placas de poliestireno de 96 poços (Nunc) que foram incubadas por 18 horas a 4°C. O sobrenadante da cultura celular foi adicionado 50 μ L/poço e as placas incubadas por 18 horas a 4°C. Após as placas foram lavadas e as incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com biotina específicos às citocinas em questão, IFN- γ e IL-17 (Pharmigen). Após uma hora as placas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri). Reação de cor foi desenvolvida à temperatura ambiente com ortofenilenodiamina (OPD; 1 mg / ml), 0,04% de H₂O₂ em tampão citrato de sódio. A reação foi interrompida pela adição de 20 μ L/poço de H₂SO₄ a 2N. A absorbância foi medida a 492 nm por um leitor de ELISA (Bio-Rad modelo 450 Microplate Reader e Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader).

3.12. Análise de populações celulares por citometria de fluxo

Anticorpos monoclonais conjugados à Aloficocianina (APC) específicos para CD4, CD62L e Foxp3 de camundongo; anticorpos monoclonais conjugados à Ficoeritrina (PE) específicos para IL-10, CD44, LAP, e TNF- α de camundongo; anticorpos monoclonais conjugados à PerCP-Cy5.5 específicos para CD4, IFN- γ de camundongo e anti-IgG2a de rato (como controle de isotipo) foram adquiridos da BD Bioscience. Os anticorpos monoclonais conjugados à (PE) específico para Helios e PE/Cy5 específicos para CD19 foram adquiridos da BioLegend. A marcação de moléculas de superfície foi realizada de acordo com procedimentos padronizados, sendo a concentração de células de 1×10^6 células em 25 μ L por poço e a placa incubada com os anticorpos por meia hora. A marcação intracelular de Foxp3 e das citocinas IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ foi feita após a permeabilização das células com tampão contendo saponina (eBioscience). A produção e secreção das citocinas foram induzidas pela

incubação das células com ionomicina (500 ng/poço), PMA (20 ng/mL) e sua acumulação dentro da célula pela brefeldina (100 ng/mL) por 5h a 37° C em estufa de CO₂. A densidade celular para esse tipo de marcação foi aumentada para 3 x 10⁶ em 25 uL por poço.

A análise das células foi realizada por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur (BD Biosciences) com o uso de software FlowJo (Tree Star Inc). Foram adquiridos no mínimo 30.000 eventos de cada amostra.

3.13. Análise Estatística

Os dados foram testados para análise de variância (ANOVA) e pós teste de Turkey no programa *Graph Pad 6.0*. Os valores plotados se referem à média do grupo $\pm$ desvio padrão.

4. Resultados

4.1 O tratamento com Hsp65-lac inibe a Atrite Induzida por Colágeno (AIC)

O processo patológico desencadeado pela AIC não foi observado em animais previamente tratados com Hsp65-lac via oral, conforme os parâmetros analisados. O inchaço das articulações e o aparecimento de infiltrado inflamatório sinovial são algumas das principais manifestações clínicas da AR. O modelo de AIC adotado provocou edema pronunciado da pata traseira. O inchaço começou uma semana após a primeira imunização de reforço, sua medida foi inicialmente tomada utilizando-se um paquímetro (dados não mostrados). O pletismômetro, equipamento de maior precisão, é capaz de medir pequenas alterações de volume. A medida das patas por esse aparelho confirmou que o grupo controle C apresentou maior inchaço das patas traseiras, sendo que este permaneceu inalterado a partir do dia 60. O tratamento oral com Hsp65-lac previamente à AIC foi capaz de prevenir completamente o aparecimento desse inchaço (Fig. 1A).

O inchaço da pata foi associado ao aumento da sensibilidade à pressão. Os animais do grupo C foram tratados apenas com XM17 antes da AIC e apresentaram maior sensibilidade à pressão. Ao contrário, animais previamente tratados com Hsp65-lac (grupo HSP) mantiveram a mesma reatividade que os animais não manipulados do grupo N (Fig. 1B)

O infiltrado inflamatório sinovial foi confirmado pela observação de leucócitos no lavado sinovial e nas secções histológicas (Figura 1C e D e Figura 2). Além do infiltrado inflamatório, camundongos com AIC apresentaram desgaste da cartilagem e degeneração óssea. (Figura 1D). O tratamento prévio com Hsp65-lac via oral preveniu o edema da pata, o aparecimento de infiltrado inflamatório e a destruição da articulação, resultando em uma melhoria global da doença. Um efeito intermediário foi observado no tratamento oral com *L. lactis*-EP. Animais desse grupo apresentaram processo inflamatório e edema de pata menos intensos do que os apresentados pelos animais do grupo controle, embora também distintos dos animais tratados com Hsp65-lac.

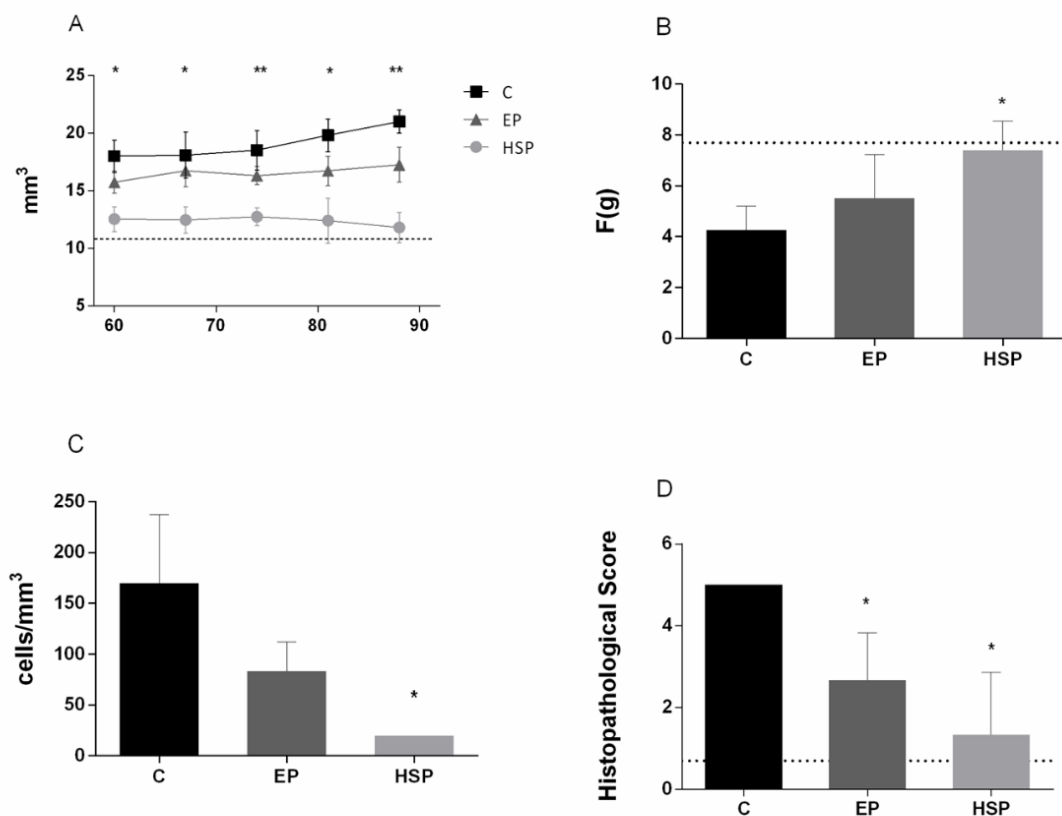


Figura 1. Escores clínico e histológico da AIC em camundongos BALB/c. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA por via subcutânea intercaladas por 21 dias. **(A)** Ambas patas traseiras foram medidas com um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). As medidas foram tomadas semanalmente após a segunda imunização de reforço e a média dessas medidas foi utilizada. O grupo tratado com Hsp65-lac apresentou edema menor que os grupos de controle. **(B)** Limiar nociceptivo induzido por força mecânica quantificada por um analgesímetro (Ugo Basile, Itália). **(C)** Leucócitos presentes no lavado sinovial da cavidade do joelho esquerdo. Apenas em um animal do grupo tratado Hsp65-lac foi observado infiltrado leucocitário. **(D)** Pontuação histopatológica baseada em infiltrado inflamatório, pannus, aspecto da cartilagem e erosão óssea. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. (n=5). Dados representativos de três experimentos independentes.

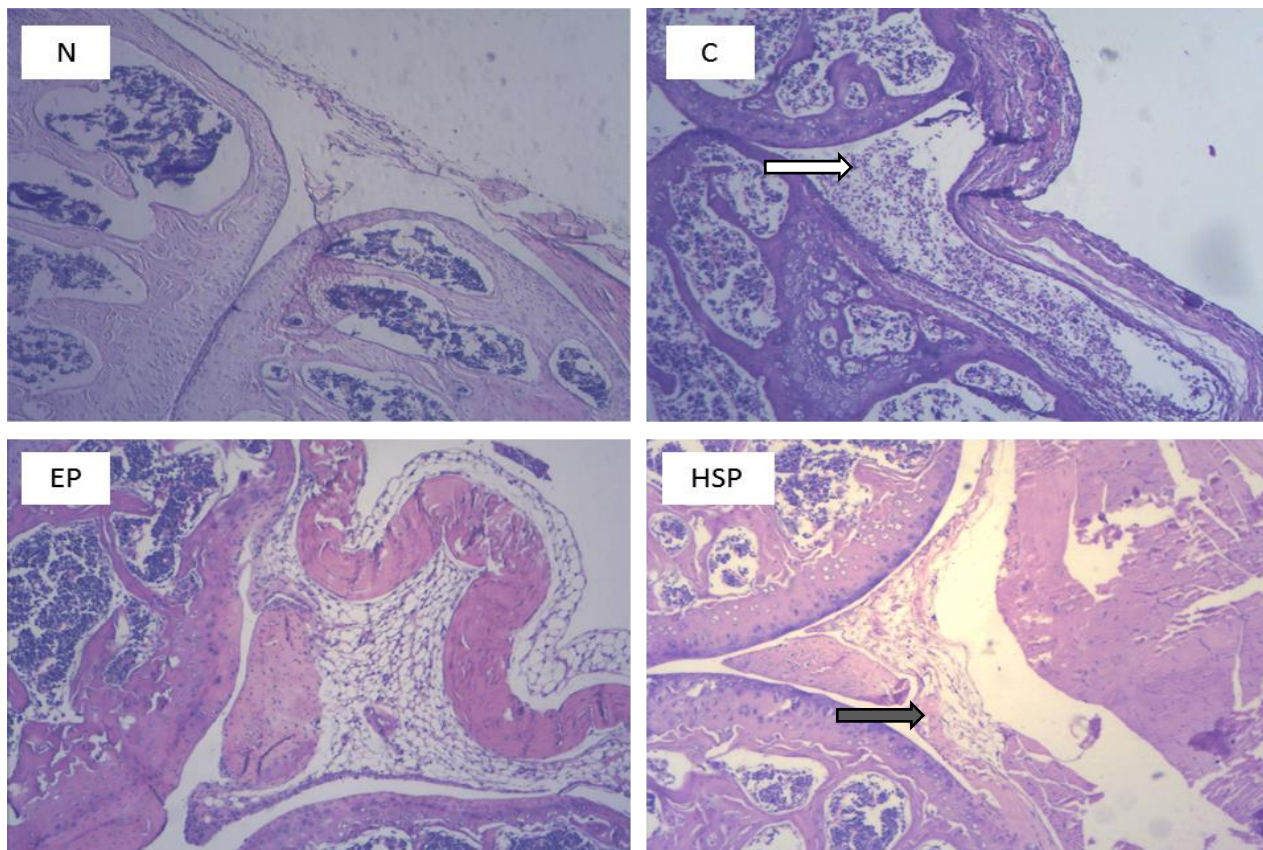


Figura 2. Análise histopatológica dos efeitos do tratamento com Hps65-lac em joelhos de camundongos BALB/c com AIC. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. No dia 95, os animais foram submetidos à eutanásia e o joelho direito foi utilizado na confecção de cortes histológicos corados com HE. Ampliação de 10X. A seta branca indica o infiltrado inflamatório na cavidade sinovial dos animais do grupo C. A seta cinza indica a cavidade sinovial dos animais tratados com Hsp65-lac. (n=5). Imagens representativas de dois experimentos diferentes.

4.2 O tratamento com Hsp65-lac reduz a produção de citocinas pró inflamatórias e anticorpos específicos durante o desenvolvimento da AIC crônica.

INF- γ e IL-17 são as principais citocinas produzidas na resposta imune durante o curso da AR (McInnes e Schett, 2007). Por esse motivo, investigamos a produção dessas duas citocinas durante o desenvolvimento do modelo crônico. Camundongos com AIC apresentaram elevados níveis de citocinas inflamatórias e de anticorpos específicos (anti-OVA e anti-colágeno). Por outro lado, os níveis das citocinas e dos anticorpos estavam significativamente reduzidos nos camundongos tratados previamente com Hsp65-lac.

Os sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos animais do grupo HSP apresentaram níveis reduzidos de IL-17 (Figura 3A) e de INF- γ (Figura 3C) em relação ao grupo C. A cultura celular feita a partir dos linfonodos mesentéricos de animais previamente tratados com Hsp65-lac mostrou a mesma redução (Figuras 3B e D). O mesmo foi observado nas culturas de células de linfonodos inguinais (Figura 4).

A inflamação e a ativação celular induzida por citocinas produzidas por linfócitos T é um componente relevante da AR. Nossos resultados mostraram que a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de INF- γ e TNF- α estava muito aumentada nos animais com AIC, mas significativamente reduzida em animais que foram previamente tratados com Hsp65-lac (Figuras 5 A e B).

Os anticorpos específicos também são de grande importância na patogênese da AR (Corsiero *et al.*, 2014). O soro de animais com AIC apresentou níveis elevados de anticorpos específicos para a ovalbumina (Figura 6A) e colágeno tipo II (Figura 6B). Esses níveis estavam diminuídos nos camundongos tratados previamente com Hsp65-lac. O fator reumatoide estava diminuído no grupo HSP apenas no final do experimento (Figura 6C). Os níveis de anticorpos anti-HSP65 também estavam diminuída apenas nesse grupo no fim do experimento (Figura 6D).

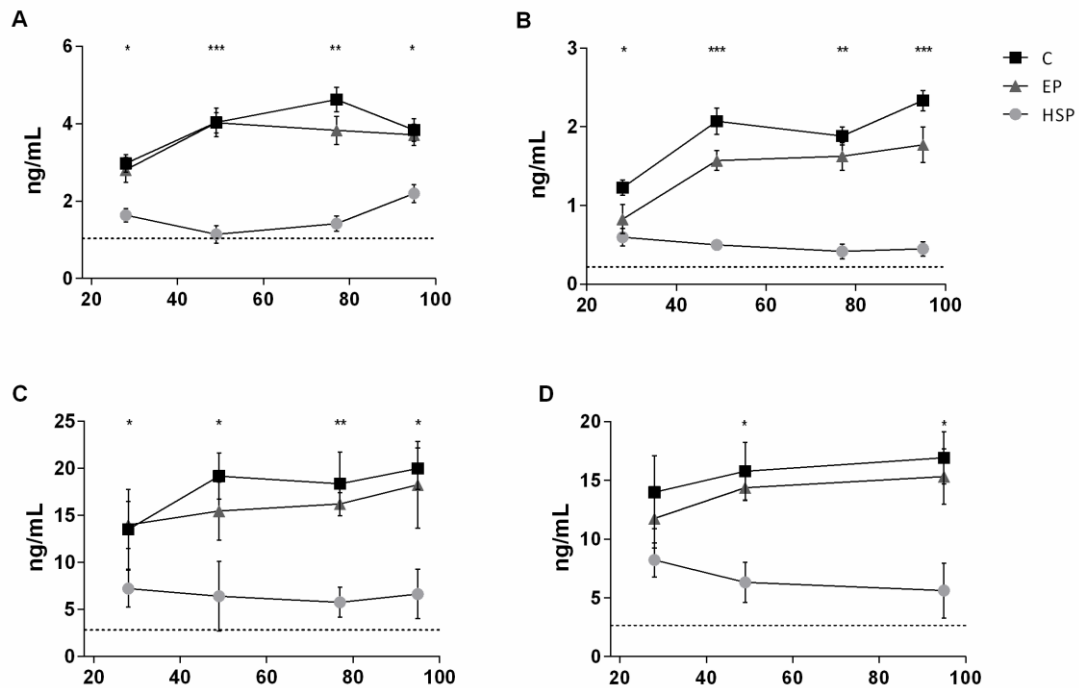


Figura 3. Produção de citocinas nas culturas de células de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. Para avaliação da produção de citocinas, os animais foram sacrificados uma semana após cada imunização e o baço e linfonodos mesentéricos recolhidos e as células isoladas e estimuladas *in vitro* com OVA. **(A)** IL-17 produzida por células do baço e **(B)** linfonodo mesentérico. **(C)** INF-γ produzido por células do baço e do **(D)** linfonodo mesentérico. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. *** $p < 0,0005$. (n=5). Dados representativos de quatro experimentos independentes.

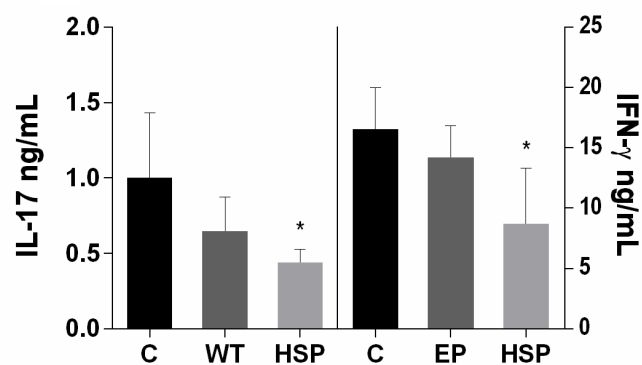


Figura 4. Produção de IL-17 e IFN- γ nas culturas de células de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA e CII emulsificados em CFA intercaladas por 21 dias. O sobrenadante da cultura de células de linfonodos inguinais estimuladas in vitro com OVA foi colhido no dia 95 e testado por ELISA específica para IL-17 e IFN- γ . Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. (n=5)

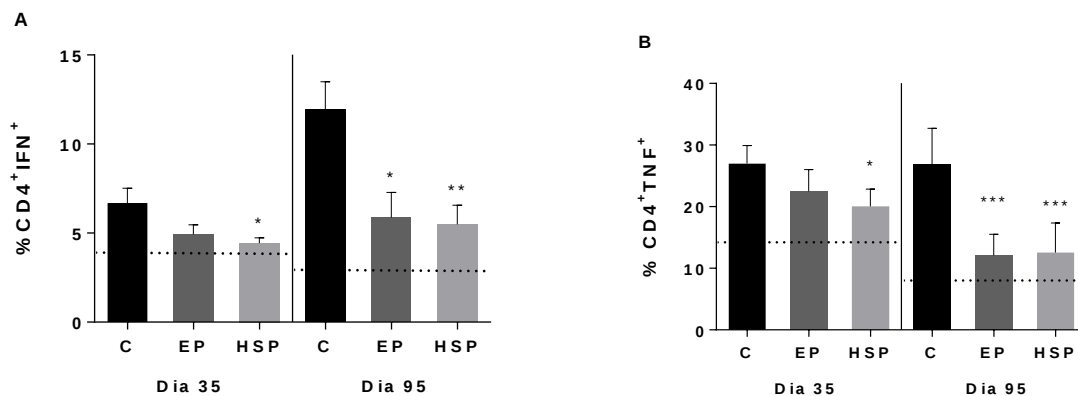


Figura 5. Frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α no baço de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. O baço foi recolhido após a segunda imunização e no dia 95 e as células foram marcadas com (A) APC-anti-CD4 e PerCP-Cy5.5-anti-IFN- γ ou com (B) APC-anti-CD4 e PE-anti-TNF- α e analisadas por citometria de fluxo. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. *** $p < 0,0005$. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independente

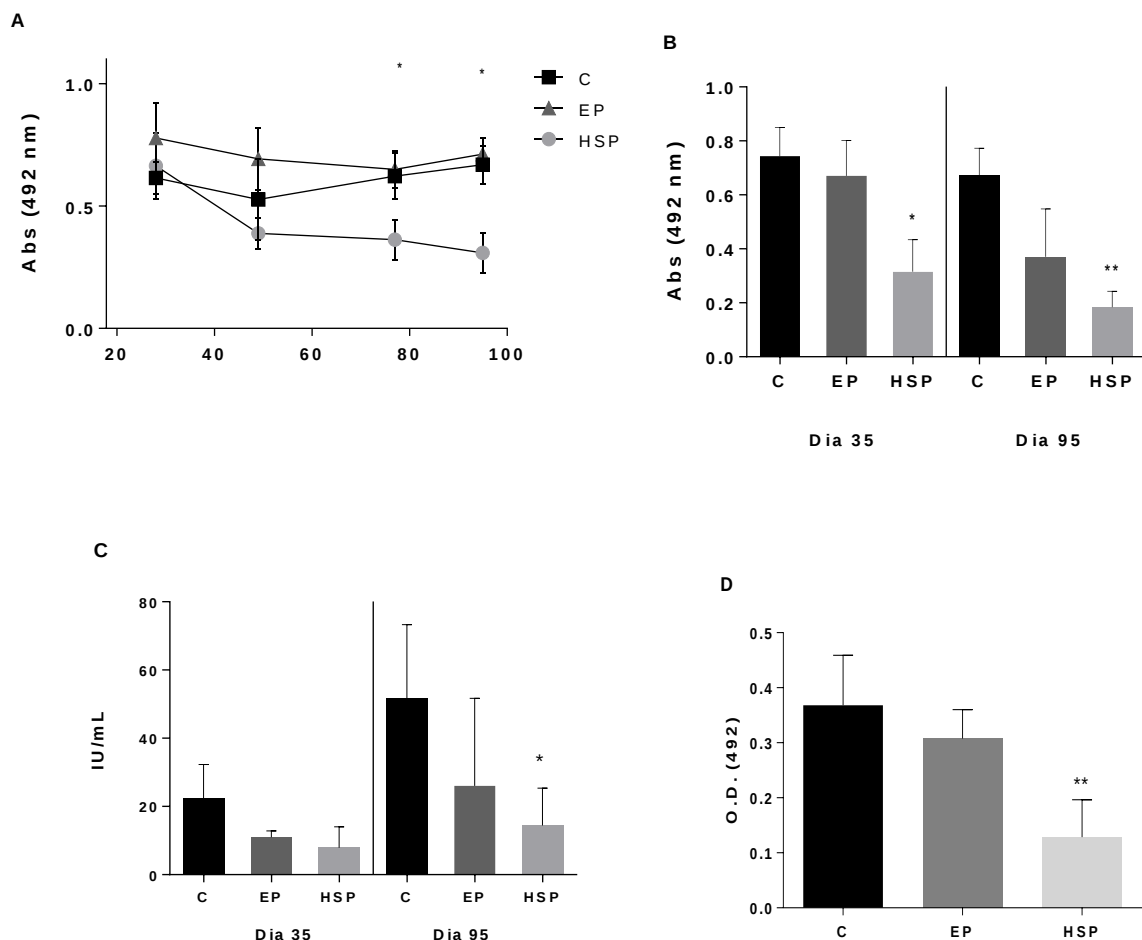


Figura 6. Produção de anticorpos específicos em camundongos com AIC tratados previamente com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C – retângulo preto), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP – triângulo cinza) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP – círculo cinza) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. **(A)** A avaliação da produção de IgG específica para OVA foi realizada no soro uma semana após cada imunização por ELISA **(B)** IgG específica para CII medidas por ELISA nos soros colhidos uma semana depois da segunda imunização e no dia 95. **(C)** Fator reumatoide nos soros colhidos uma semana depois da segunda imunização e no dia 95 dosado por ELISA. **(D)** IgG específicas para HSP65 medidas por ELISA em soro colhido no fim do experimento no dia 95. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.3 – O tratamento com *L. lactis* produtor de Hsp65 alterou o eixo Regula/Inflama de citocinas durante o desenvolvimento da artrite.

A IL-10 medida no sobrenadante da cultura de células de baço foi elevada em todos os grupos experimentais. No entanto, o processo de regulação depende não só de níveis elevados das citocinas reguladoras, pois a relação entre a concentração das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias interfere na efetividade da regulação. Por isso foi feita uma razão entre os valores de IL-10 em relação aos valores de IL-17 e de IFN- γ para se construir o eixo regula/inflama durante o desenvolvimento da doença. A razão IL-10/IL-17 e IL-10/IFN- γ foi mais alta no grupo tratado com Hsp65-lac quando comparada àquela obtida para os demais grupos, sugerindo que o componente regulador (IL-10) predominou no balanço de citocinas desse grupo.

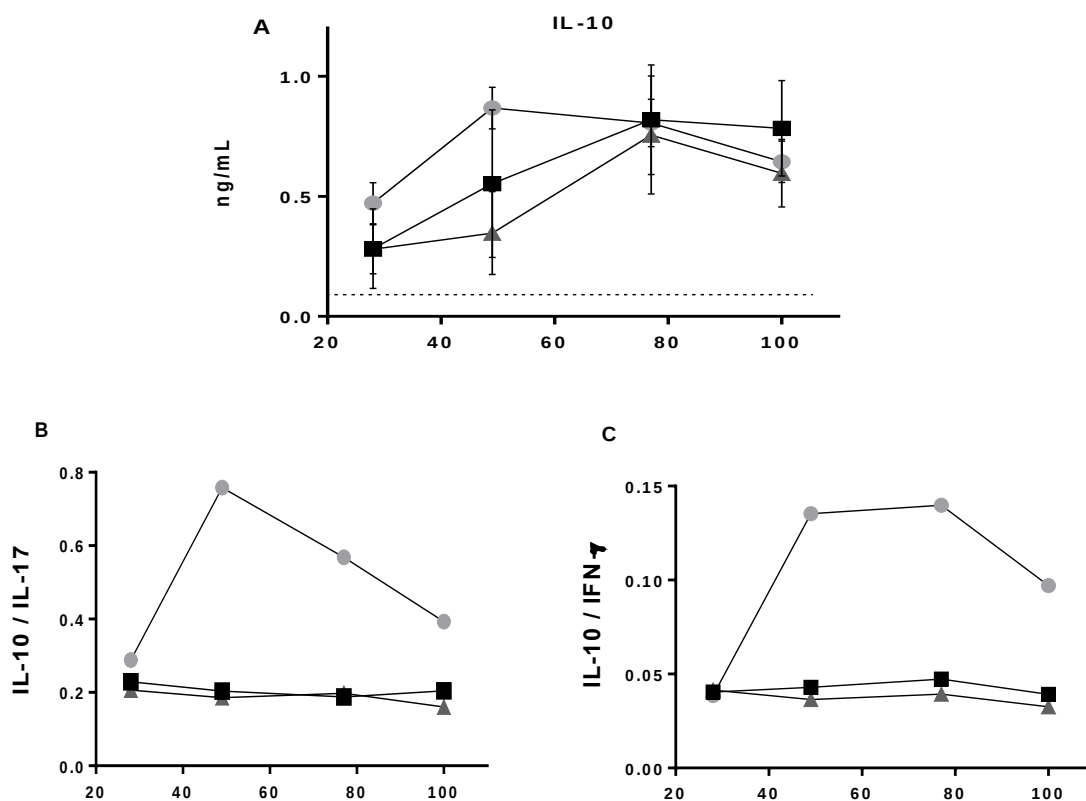


Figura 7. Eixo REGULA/INFLAMA. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C – retângulo preto), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP – triângulo cinza) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP – círculo cinza) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e

intercaladas por 21 dias. Para avaliação da produção de citocinas, os animais foram sacrificados uma semana após cada imunização e o baço e linfonodos mesentéricos recolhidos e as células isoladas e estimuladas *in vitro* com OVA. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. (A) Nível de IL-10 medido através de ELISA. Razão dos níveis de (B) IL-10/ IL-17 e (C) IL-10/IFN- γ dosados no sobrenadante da cultura celular feita com os linfonodos.

4.4 Efeitos do tratamento oral com o Hsp65-lac incluem a redução da ativação de células T efetoras de memória e o aumento de linfócitos reguladores.

A inflamação induz a ativação de linfócitos T e a sua diferenciação em células efetoras de memória (Seder e Ahmed, 2003). Por isso, investigamos a frequência de linfócitos T efetores de memória (CD4⁺CD44^{hi}) por citometria de fluxo. A inflamação crônica induziu frequências mais elevadas de linfócitos T efetores de memória nos animais do grupo controle C. O tratamento oral com Hsp65-lac manteve essas frequências comparáveis àsquelas observadas nos animais não manipulados do grupo N (Figura 8).

Muitos processos patológicos são associados com desvios de funções de regulação, especialmente aquelas que envolvem linfócitos T. A redução na frequência de linfócitos T_{REG} já foi observado em pacientes com AR (Zare *et al.*, 2015) sendo que a restauração da frequência desses linfócitos com fenótipo regulador tem sido associada com melhora clínica (Su *et al.*, 2014). O tratamento oral com Hsp65-lac induziu aumento na frequência de linfócitos T_{REG} CD4⁺Foxp3⁺. Um outro tipo de linfócitos Treg já descrito durante a indução de tolerância oral apresenta o TGF- β associada com a membrana (LAP). Esta população de linfócitos tem uma forte capacidade para suprimir processos patológicos, incluindo doenças autoimunes (Faria e Weiner, 2006; Ochi *et al.*, 2006). Nós já demonstramos que linfócitos T CD4⁺LAP⁺ estão associados com o efeito benéfico da terapia oral com Hsp65-lac (Rezende, R. *et al.*, 2013). O tratamento com Hsp65-lac foi capaz de induzir níveis elevados de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ no baço e inibir a AIC (Figura 9A). Nesse momento do desenvolvimento da doença, o tratamento também aumentou as células T CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos mesentéricos e inguinais (Figuras 9B e C). Esses

dados foram inicialmente observados uma semana depois da primeira imunização de reforço.

No estágio mais tardio do desenvolvimento da AIC (dia 95), observamos que o aumento da frequência de linfócitos T_{REG} ocorreu apenas nos linfonodos. Os linfonodos mesentéricos dos animais tratados com Hsp65-lac apresentaram as frequências mais elevadas de T_{REG} CD4⁺Foxp3⁺ (Figura 10A), CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ (Figura 10B) e CD4⁺LAP⁺ (Figura 10C). Nesse mesmo momento, houve um aumento, nos linfonodos inguinais, na frequência de células CD4⁺Foxp3⁺ (Figura 10D) e CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ (Figura 10E) somente.

Os linfócitos B são relevantes não apenas na patologia da AR, mas também podem apresentar fenótipo e atividade reguladora, principalmente através da produção de IL-10 e a indução de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ (Mercadante *et al.*, 2014). De forma consistente com a inibição da AIC, observamos o aumento de linfócitos B_{REG} (CD19⁺ IL10⁺) no baço dos animais tratados com Hsp65-lac antes da AIC (Figura 11).

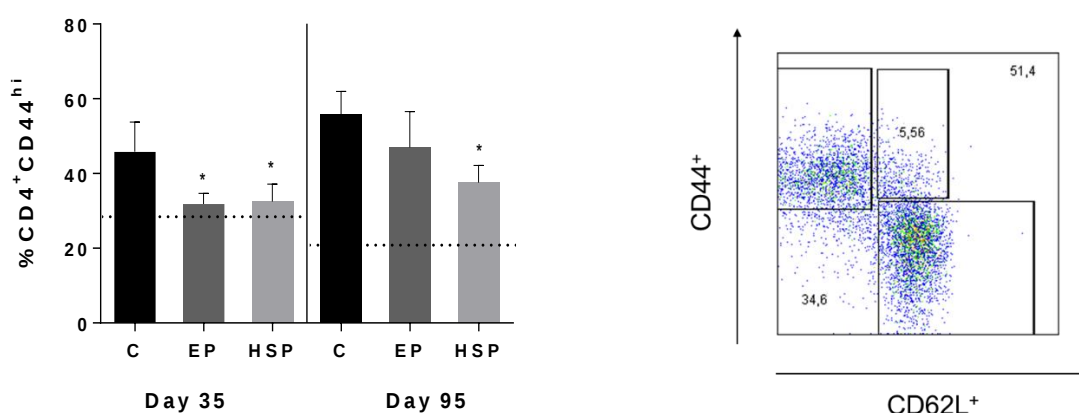


Figura 8. Frequência de células T CD4⁺CD44^{hi} de memória no baço de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. O baço foi recolhido uma semana após a segunda imunização e no dia 95, as células foram marcadas com PerCP-Cy5.5-anti-CD4, APC-anti-CD62L e PE-anti-CD44 e analisadas por citometria de fluxo. Linfócitos T CD4⁺CD62L⁻CD44^{hi} foram contabilizadas como memória efetora. Os valores representam a média ± SEM. * p < 0,05 em relação ao grupo controle C. ** p < 0,005 em relação ao grupo controle C. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independentes.

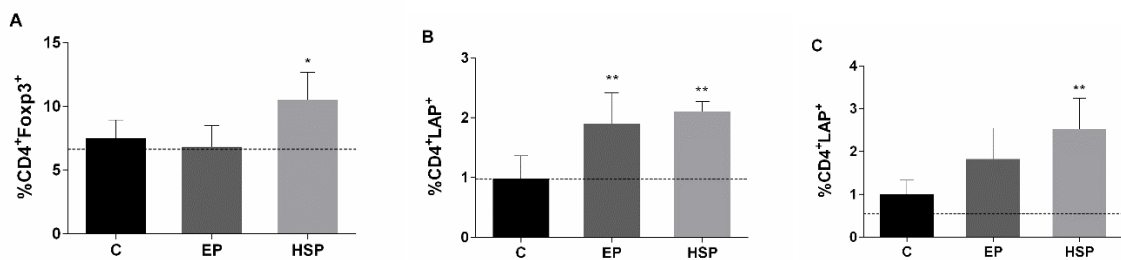
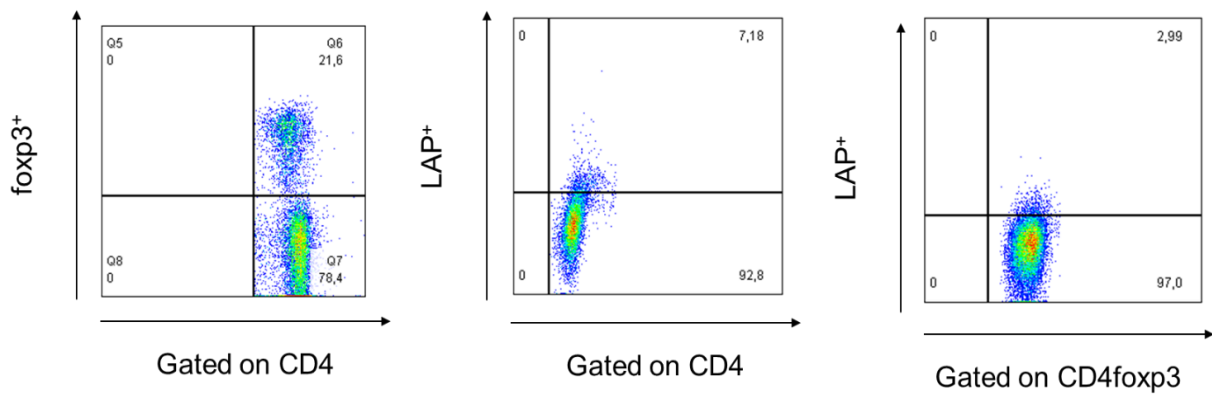


Figura 9. Frequências de células T CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ no baço e nos linfonodos de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. Uma semana após a segunda imunização (dia 35), células coletadas do (A) baço e marcadas com PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e APC-anti-foxp3; e células dos linfonodos (B) mesentéricos e (C) inguinais marcadas com PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e PE-anti-LAP foram analisadas por citometria de fluxo. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independentes.

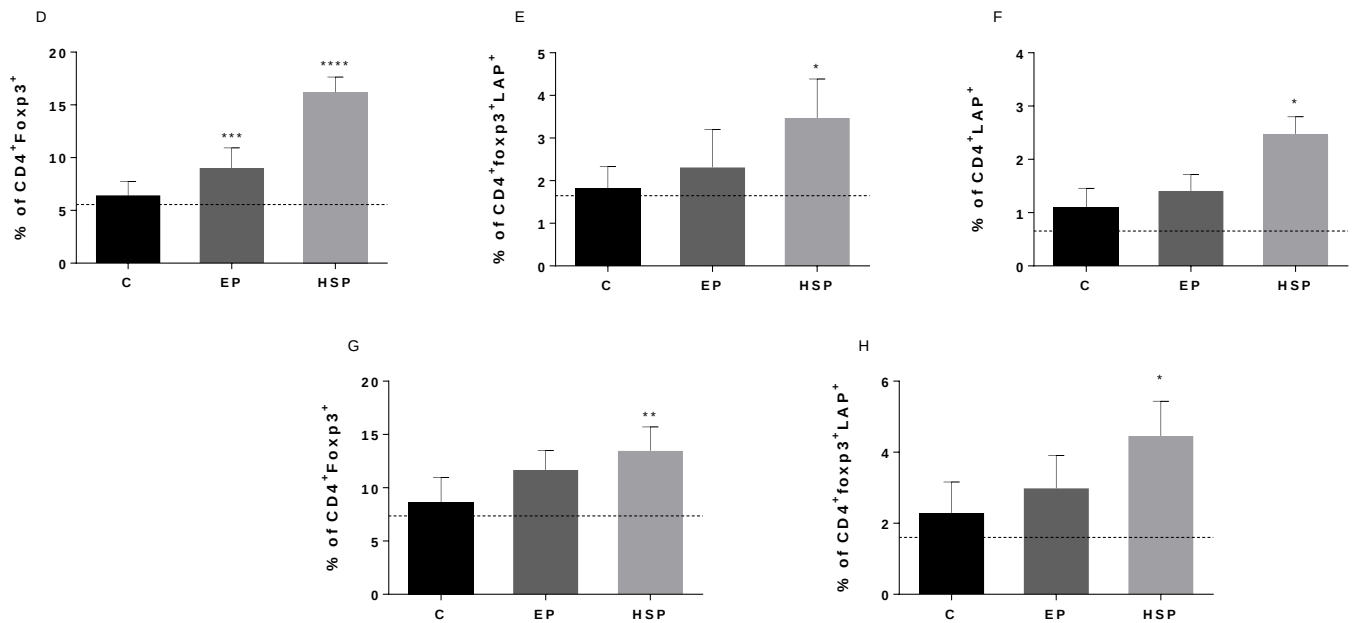


Figura 10. Frequências de células T reguladores no baço e nos linfonodos de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. Células dos linfonodos mesentéricos coletados no dia 95 e marcadas com (D) PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e APC-anti-foxp3; (E) PerCP-Cy5.5-anti-CD4, APC-anti-foxp3 e PE-anti-LAP e (F) PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e PE-anti-LAP. Células dos linfonodos inguinais coletados no dia 95 e marcadas com (G) PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e APC-anti-foxp3 e (H) PerCP-Cy5.5-anti-CD4, APC-anti-foxp3 e PE-anti-LAP foram analisadas por citometria de fluxo. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. *** $p < 0,0005$. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independentes.

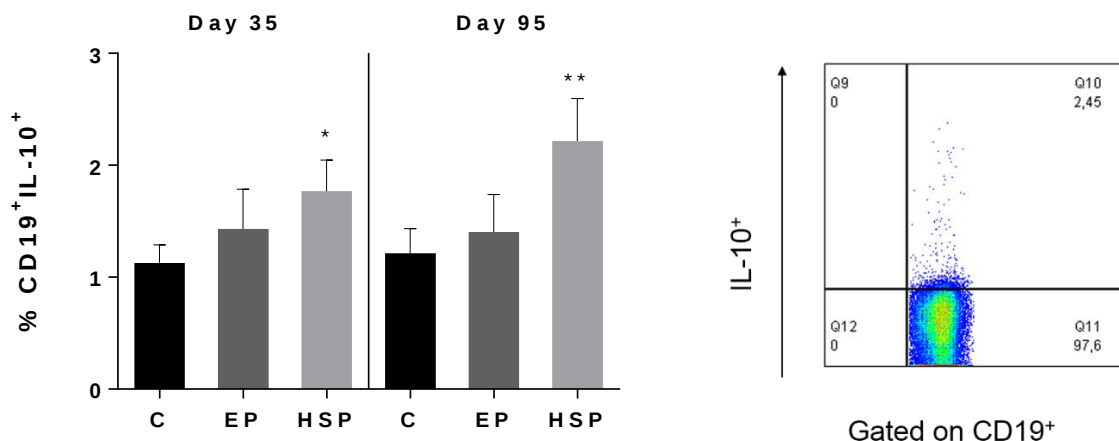


Figura 11. Frequências de células B produtoras de IL-10 (Bregs) no baço de camundongos com AIC crônica tratados previamente por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com 4 injeções de OVA+CII em CFA, subcutâneas e intercaladas por 21 dias. Células do baço recolhido uma semana após a segunda imunização e no dia 95, que foram marcadas com PE/Cy5-anti-CD19 e PE-anti-IL-10 e analisadas por citometria de fluxo. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. (n=5). Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.5 A IL-10 é necessária para redução dos níveis de anticorpos específicos pelo tratamento com Hsp65-lac.

Camundongos fêmeas BALB/c IL-10^{-/-} foram tratados com Hsp65-lac previamente à imunização com CII+OVA. Diferentemente do que observamos nos camundongos BALB/c selvagens, esses camundongos deficientes em IL-10 apresentaram altos níveis de anticorpo anti-OVA semelhantes aos dos animais do grupo controle (figura 12A). Os níveis do fator reumatoide também estavam elevados e, embora o tratamento com Hsp65 tenha reduzido os níveis de fator reumatoide, essa inibição foi mais pronunciada nos animais selvagens (figuras 12B e 6C).

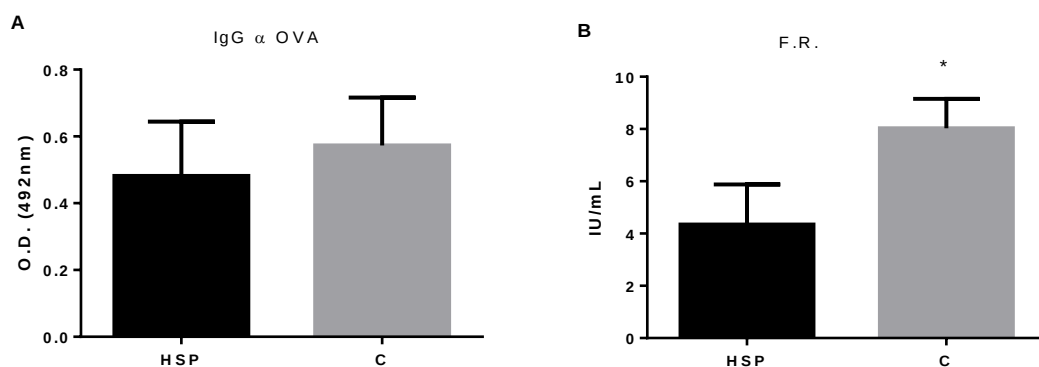


Figura 12. Níveis de anticorpos específicos em camundongos BALB/c deficientes em IL-10 com AIC tratados por via oral com Hsp65-lac. Camundongos fêmeas BALB/c IL-10^{-/-} foram tratados com meio (grupo C, n=4), ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP, n=3) durante quatro dias. Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida pela imunização subcutânea com OVA+CII em CFA. Uma semana depois, os animais foram sacrificados e o soro avaliado por ELISA para detecção de (A) IgG específica para OVA e (B) fator reumatoide. Os valores plotados representam a média ± SEM. * p < 0,05 entre os grupos.

4.6 O tratamento oral com Hsp65-lac também inibiu a indução de um modelo agudo de artrite induzida por mBSA.

O tratamento oral com Hsp65-lac no modelo agudo de AIA induziu um efeito semelhante àquele observado no modelo crônico de AIC demonstrando a robustez da ação moduladora do tratamento com Hsp65 associado ao probiótico *L. lactis* NCDO2118. Os níveis de anticorpos específicos para mBSA estavam reduzidos pelo tratamento com Hsp65-lac (figura 13A), assim como os níveis de IFN-γ (figura 13D) e IL-17 (figura 13B) nos sobrenadantes de cultura de células do baço e dos linfonodos mesentéricos (figura 13C). A análise, por citometria de fluxo das frequências de subpopulações de linfócitos, mostrou que o tratamento com Hsp65-lac preveniu a ativação de linfócitos T CD4⁺ e sua diferenciação em linfócitos T de memória efetora no baço (figura 13F) e nos linfonodos mesentéricos (figura 13E).

A frequência de linfócitos T_{REG} também estava aumentada nos animais que tiveram a AIA inibida pelo tratamento prévio com Hsp65-lac. O baço dos animais tratados com Hsp65-lac apresentava maior frequência de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ (figura 14A) e T_{REG} CD4⁺Foxp3⁺LAP⁺ (figura 14B) que no baço dos

animais do grupo controle C. Nos linfonodos mesentéricos, o tratamento com Hsp65 induziu o aumento de linfócitos TCD4⁺LAP⁺ (figura 14C).

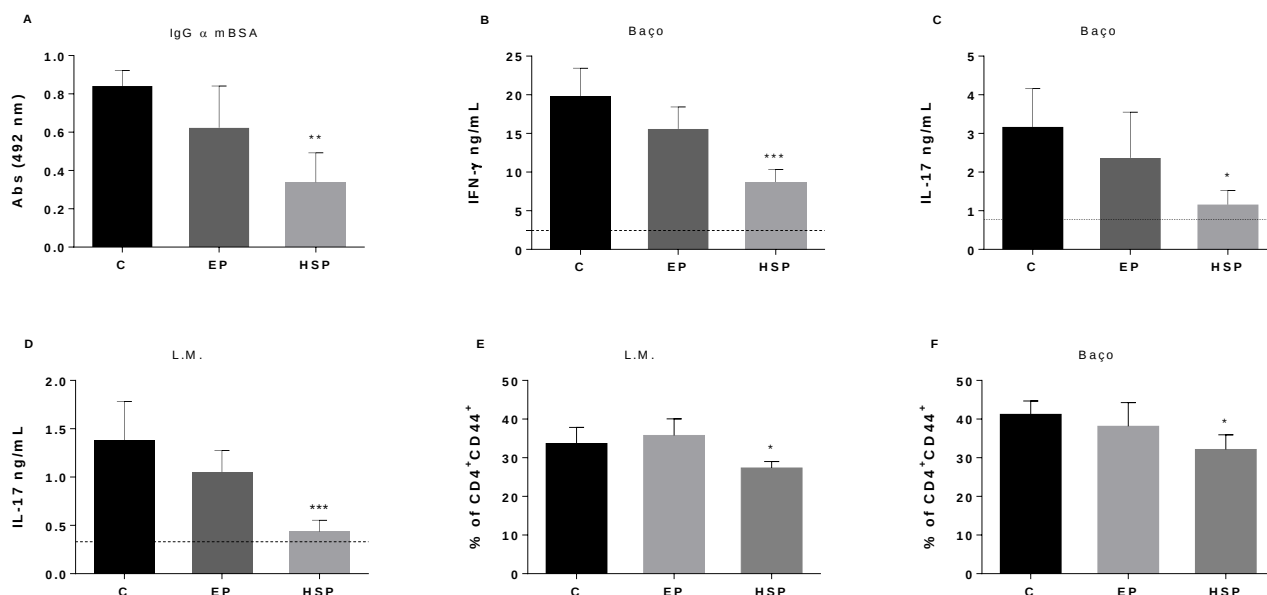


Figura 13. Efeitos do tratamento oral com Hsp65-lac em parâmetros imunológicos associados ao desenvolvimento da artrite aguda induzida por mBSA (AIA). Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram alimentadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA, quinze dias depois o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e uma semana depois os animais sacrificados. **(A)** O soro foi recolhido para análise de IgG anti-mBSA. Para avaliação da produção de citocinas os animais foram sacrificados uma semana após a imunização e o baço **(B e C)** e linfonodos mesentéricos **(D)** recolhidos e as células isoladas e estimuladas *in vitro* com mBSA. Os sobrenadantes de cultura foram testados por ELISA sanduíche para **(B e D)** IL-17 e **(C)** IFN-γ. Anticorpos PerCP-Cy5.5-anti-CD4, APC-anti-CD62L e PE-anti-CD44 foram usados para marcar células do **(E)** Linfonodo Mesentérico e do **(F)** baço que foram analisadas por citometria de fluxo. Linfócitos T CD4⁺CD62L⁻CD44^{hi} foram contabilizadas como memória efetora. Os valores plotados representam a média ± SEM. * p < 0,05 em relação ao grupo controle C. ** p < 0,005 em comparação com o grupo controle C. (n=5).

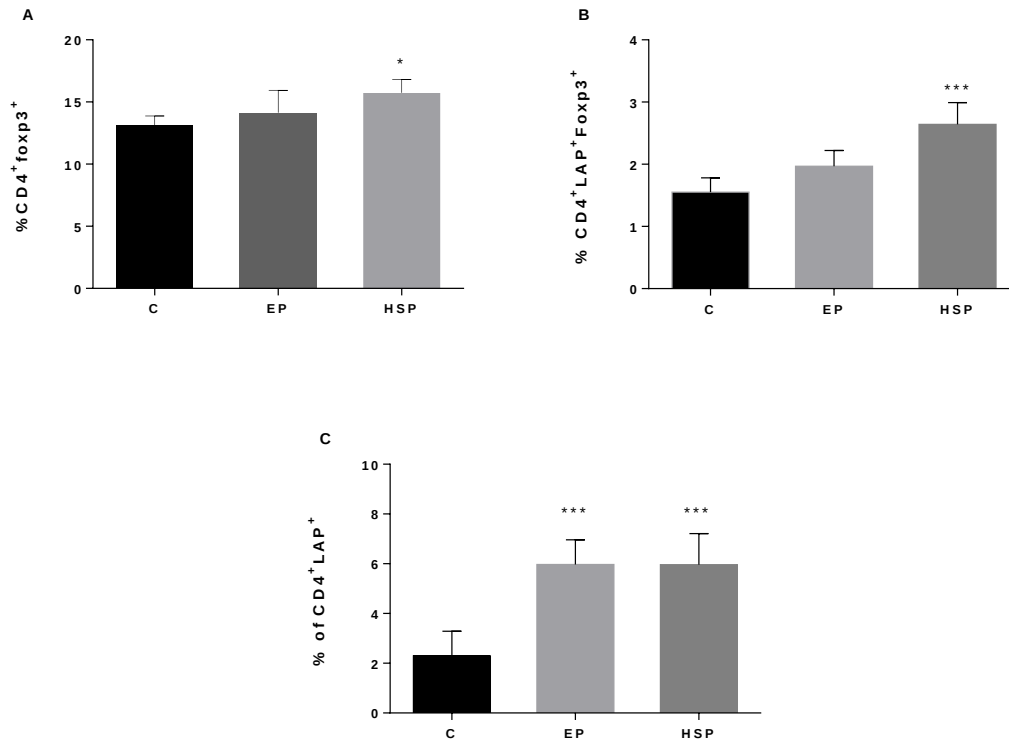


Figura 14. Frequência de linfócitos T_{REG} em camundongos com AIA tratados previamente com Hsp65-lac. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram tratadas com meio (grupo C), meio inoculado com *L. lactis*-EP (grupo EP) ou meio inoculado com Hsp65-lac (grupo HSP) durante quatro dias. Animais não manipulados (grupo N) foram usados na obtenção de níveis basais (linha tracejada). Dez dias após o tratamento, a artrite foi induzida com uma imunização subcutânea de mBSA em CFA, quinze dias depois o desafio foi realizado pela injeção de mBSA diretamente no joelho e uma semana depois os animais sacrificados. Células do baço foram isoladas e marcadas com **(A)** PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e APC-anti-foxp3 e **(B)** PerCP-Cy5.5-anti-CD4, APC-anti-foxp3 e PE-anti-LAP e analisadas por citometria de fluxo. **(C)** Células do linfonodo mesentérico marcadas com PerCP-Cy5.5-anti-CD4 e PE-anti-LAP também foram analisadas por citometria de fluxo. Os valores plotados representam a média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle C. ** $p < 0,005$ em comparação com o grupo controle C. (n=5).

5. Discussão

Demonstramos, nesse estudo, que a ingestão contínua da Hsp65 produzida por uma bactéria geneticamente modificada é capaz de prevenir a indução de artrite por colágeno e promover a regulação da inflamação por um longo período após o tratamento. A bactéria *Lactococcus lactis* em si foi capaz de alterar a severidade dos sintomas patológicos induzidos no modelo crônico, enquanto que o tratamento com Hsp65-lac preveniu o desenvolvimento da patologia.

A capacidade da tolerância oral em inibir o desenvolvimento da autoimunidade patológica induzindo linfócitos reguladores específicos é evidente em modelos experimentais (Faria e Weiner, 2006). Mas ensaios clínicos nem sempre reproduzem a mesma eficiência encontrada em modelos experimentais. Principalmente no caso de doenças como a artrite e a diabetes, que apresentam especificidade a um antígeno menos evidente. Por isso tem-se explorado antígenos que podem reduzir a inflamação de forma mais ampla.

A HSP60, e outras proteínas de choque térmico como a HSP70, estão em fase de ensaios clínicos, inclusive com aplicações via mucosa oral. O DiaPep277® é um peptídeo derivado de HSP60 que está sendo testado via parenteral em pacientes de diabetes tipo I (Huurman *et al.*, 2007), e o dnaJP1 em pacientes reumáticos (Koffeman *et al.*, 2009). Os resultados desses ensaios têm sido promissores e o tratamento com Hsp65-lac reproduziu vários desses benefícios no modelo experimental de artrite. Os efeitos na diabetes incluem menor necessidade de insulina injetável e aumento em marcadores da tolerância. (Huurman *et al.*, 2007; Raz *et al.*, 2007; Huurman *et al.*, 2008). Os resultados dos ensaios em pacientes reumáticos tratados com peptídeos via oral incluíram diminuição dos sintomas patológicos, redução de citocinas inflamatórias e aumento de linfócitos reguladores e IL-10 (Koffeman *et al.*, 2009). Mas pode-se considerar que, nesses ensaios, os pacientes reumáticos receberam baixas doses desse peptídeo, o que irá induzir apenas alguns mecanismos da tolerância.

Existem diferentes maneiras de se induzir a tolerância oral e a forma mais eficaz é através da administração contínua da proteína de interesse (Faria *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2015). Esse procedimento que nem sempre é viável em

humanos. A quantidade de proteína purificada necessária para ingestão contínua em humanos apresenta um custo elevado e uma logística proibitiva. O que é ainda mais complicado no caso da HSP65 recombinante, que é instável e difícil de estocar (Miyoshi *et al.*, 2002; Cappello *et al.*, 2008).

A produção de HSP65 por uma bactéria ácido láctica segura para consumo humano apresenta uma alternativa viável. Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que o *Lactococcus lactis* é capaz de resistir ao processo digestivo no tubo intestinal sendo possível recuperar bactérias viáveis de diferentes secções do intestino e a partir das fezes de animais alimentados com o meio de cultura bacteriológico. A presença de HSP65 secretada nesse meio de cultura é cerca de 7 µg/mL, somando-se ainda a produção *in situ* na mucosa intestinal. Portanto, a diferença dos resultados obtidos entre os grupos tratados com *L. lactis*-EP ou Hsp65-lac foi relacionada ao efeito do HSP65 (Rezende, R. M. *et al.*, 2013). Esse efeito se relaciona à tolerância oral induzida à proteína e isto pode ser comprovado pela redução nos níveis de anticorpos anti-Hsp65 (Figura 6 D). Por outro lado, também observamos, como no trabalho anterior com a encefalomielite autoimune experimental (Rezende *et al.*, 2013), a tolerância cruzada ou efeito indireto supressor na reatividade específica aos antígenos relacionados à artrite, ovalbumina, colágeno e fator reumatóide (Figura 6 A, B e C).

O modelo de artrite induzida por colágeno é relativamente longo (cerca de 70 dias para indução), assim acompanhamos os efeitos do tratamento com *L. lactis* em diferentes momentos do desenvolvimento da doença (até o dia 100). Os benefícios do tratamento com *L. lactis* portando plasmídeo vazio (grupo EP) e Hsp65-lac foram observados ao longo de todo o modelo, demonstrando um efeito benéfico duradouro induzido por um único tratamento inicial.

O tratamento com *L. lactis*-EP não exerceu uma prevenção completa da indução de artrite por colágeno, mas reduziu significativamente vários aspectos patológicos. O *Lactococcus lactis* NCDO2118 apresentou propriedades anti-inflamatórias em um modelo de colite (Luerce *et al.*, 2014). Nossos resultados indicam que estas propriedades também estiveram presentes no tratamento da AIC.

Os efeitos do tratamento com *LI*-EP foram significativos em estágios mais tardios da doença. O edema da pata traseira foi menor do que o do grupo

controle, assim como o escore histopatológico (Fig. 1A e 1D). Os níveis de IFN- γ produzidos por células do baço e linfonodos permaneceram elevados (Fig. 3C e 3D), e também os níveis de IL-17 do baço (Fig. 3A). Mas nos linfonodos mesentéricos, essa citocina permaneceu reduzida em relação ao grupo controle, indicando que o *L. lactis*-EP é capaz de induzir mudanças no trato intestinal (Fig. 3B). A diminuição da frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados e produtores de IFN- γ e TNF- α no baço (Fig. 5A e 5B) mostram que os efeitos reguladores induzidos no trato intestinal pelo *L. lactis* foram sistêmicos.

A IL-10 produzida por células do baço esteve igualmente elevada em todos os grupos durante o experimento (Fig. 7A). E, mesmo com esse aumento, o grupo controle apresentou os piores sintomas. A razão entre a IL-10 e as citocinas inflamatórias foi elevada no grupo HSP (Fig. 7B e 7C) sugerindo, então, que o balanço regulador (eixo regula/inflama) nos animais tratados prevaleceu. A regulação efetiva resulta do equilíbrio entre mediadores inflamatórios e inibitórios, assim a redução de IL-17 e TNF- α foi o bastante para capacitar a atuação da IL-10 no curso da doença.

A relação entre o sistema imune e a microbiota envolve não apenas a regulação, mas também o desenvolvimento da função efetora. A produção de IFN- γ e IL-17 pode ser diretamente relacionada à diversidade da microbiota. De forma que a microbiota pode atuar na manutenção do equilíbrio da operação do sistema imune tanto na indução de mecanismos inibidores e reguladores quanto na modulação de mecanismos efetores. Modelos animais de artrite têm demonstrado o papel dos produtos microbianos no controle da diferenciação de T_H17 e IL-17 (Niess *et al.*, 2008; Eberl e Lochner, 2009). As condições higiênicas e bacteriológicas envolvidas no biotério onde os animais são criados têm, assim, um papel importante no desenvolvimento da doença. Animais criados em condições *germ-free* apresentam menos probabilidade de desenvolver artrite. Mesmo no caso de camundongos geneticamente modificados ou de linhagens que apresentam propícios ao desenvolvimento de artrite, o acondicionamento e a exposição bacteriana são fundamentais. Camundongos transgênicos K/BxN são geneticamente modificados para expressar TCR específicos para GPI-6, uma enzima da via glicolítica, e desenvolvem artrite espontaneamente. Mas o desenvolvimento do quadro patológico não ocorre quando os camundongos são acondicionados em condições *germ free*. A transferência desses animais para

biotérios convencionais resulta no desencadeamento da doença. Mesmo animais monoconolizados por *Lactobacillus bifidus* ou bactérias filamentosas segmentadas (SFB) desenvolvem artrite. Esse efeito é relacionado à capacidade dessas bactérias de induzir a diferenciação de linfócitos CD4⁺ em Th17 (Wu *et al.*, 2010).

O camundongo nocaute para o receptor antagonista de IL-1 (IL-1AR^{-/-}) também desenvolve artrite espontaneamente e também depende da presença de bactérias para o aparecimento dos sintomas da doença. Como nos camundongos K/BxN, as bactérias SBF são o bastante para indução e diferenciação de linfócitos Th17 capazes de desencadear a artrite. (Brusca *et al.*, 2014). Os mecanismos que tornam esses camundongos susceptíveis diferem do K/BxN. Nesses animais, é a autoimunidade conferida pelo TCR a responsável pela inflamação, enquanto que, nos camundongos IL-1AR^{-/-}, a inflamação crônica das articulações surge em consequência da des-repressão da IL-1β. Mas na ausência de IL-17 ou TNF-α, a IL-1β não é suficiente para induzir artrite. Isto demonstra o papel fundamental da produção de IL-17 na mucosa intestinal em diferentes processos patogênicos relacionados à AR.

Os camundongos SKG possuem uma mutação no gene ZAP-70 e os camundongos que expressam HLA-DRB1*0401 são suscetíveis ao desenvolvimento da artrite (Rehaume *et al.*, 2014). Esses processos patológicos também dependem do contato com produtos microbianos e são inibidos em condições *germ free*. Mas essas duas linhagens de camundongos também apresentam microbiota espontaneamente alterada e são ainda capazes de reproduzir a propensão do sexo feminino ao desenvolvimento da artrite (Gomez *et al.*, 2012).

Em humanos, essa relação da IL-17 induzida pela microbiota intestinal com a AR ainda é não tão esclarecida quanto nos modelos experimentais. No entanto, Maeda e colaboradores demonstraram que camundongos SKG criados em condições *germ free* e inoculados com fezes de pacientes reumáticos desenvolveram severo quadro de artrite. Esses animais apresentaram aumento de células Th17 no intestino e linfonodos mesentéricos e também maior produção de IL-17 por células estimuladas por RPL23A, um autoantígeno relacionado à AR. Uma subpopulação de pacientes reumáticos apresentava *Prevotella copri* como população dominante na microbiota intestinal. Células

dendríticas cultivadas na presença da *P. copri* induzem a diferenciação de células T *naive* de camundongos SKG em células Th17 (Maeda *et al.*, 2016).

No início do tratamento com *L. lactis*-EP, o aumento de linfócitos T_{REG} foi observado apenas nos linfonodos inguinais próximos aos locais onde ocorre o desafio por imunização (Fig. 9C). Ao final do período experimental, o grupo EP apresentou maior frequência de T_{REG} apenas nos linfonodos mesentéricos (Fig. 10D) indicando uma mudança nos mecanismos reguladores a longo prazo. Os linfócitos T reguladores estimulados na mucosa intestinal podem migrar para outros linfonodos ou para o local da inflamação. Alternativamente, o *L. lactis*-EP pode levar a mudanças diretamente na microbiota intestinal dos animais tratados e essas mudanças resultarem em melhoria no quadro inflamatório.

Probióticos podem induzir regulação e redução da inflamação e já foi demonstrada a capacidade desses microrganismos em reduzir parâmetros patológicos na artrite experimental. Frequentemente a forma observada da modulação do sistema imune através da microbiota é através da alteração da relação T_H/T_{REG} (Ghadimi *et al.*, 2008; Amdekar *et al.*, 2013; Barberi *et al.*, 2015). Esse efeito foi observado *in vitro* e *in vivo*, inclusive em modelos experimentais de artrite. O *L. casei* foi capaz de aumentar a frequência de linfócitos T_{REG} ao mesmo tempo em que diminuiu a frequência de linfócitos T efetores em um modelo de artrite induzida por colágeno em camundongo (Amdekar *et al.*, 2011). O consumo de leite fermentado por *L. casei* reduziu os sintomas da artrite induzida por produtos bacterianos em camundongos BALB/c, incluindo diminuição da IL-17 (Noto Llana *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos nesse efeito não são completamente conhecidos, mas evidências experimentais têm apontado para um papel central da imunidade inata e de células dendríticas no processo (Kwon *et al.*, 2010). Existem, no entanto, outros mecanismos pelos quais os probióticos podem diminuir inflamação. Essa diminuição pode ser mediada pela diminuição de citocinas inflamatórias e também pela inibição direta de COX-2, como no caso de *Lactobacillus casei* (Amdekar *et al.*, 2011). Os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) produzidos por algumas espécies de bactérias comensais podem agir sistematicamente e induzir diretamente a diferenciação de linfócitos T *naive* em reguladores fora da mucosa (Kim, C. H. *et al.*, 2014; Di Cerbo *et al.*, 2016).

Alguns ensaios clínicos envolvendo o uso de probióticos em pacientes reumáticos apresentaram bons resultados. Os resultados mais consistentes foram observados nos ensaios clínicos que usaram *L. casei* 01 e *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. Muitos pacientes apresentaram menor escore patológico e redução de diversos mediadores inflamatórios, como o TNF- α , e aumento de IL-10 ou TGF- β (Mandel *et al.*, 2010; Alipour *et al.*, 2014). Em outros estudos, os efeitos positivos foram mais variados, relacionados ao bem-estar dos pacientes enquanto que os indicadores patológicos nem sempre apresentaram melhoras tão claras (Hatakka *et al.*, 2003; Pineda Mde *et al.*, 2011). Mesmo que esses estudos não tenham investigado o impacto do probiótico sobre a microbiota, eles mostram a capacidade dos probióticos em induzir melhoras em pacientes reumáticos.

As bactérias envolvidas na patogênese da artrite são componentes normais da microbiota, sendo que o desenvolvimento do quadro inflamatório desencadeado se relaciona ao desequilíbrio na composição relativa das populações da microbiota, ou seja, à disbiose. O uso de antibióticos pode melhorar o quadro clínico em alguns pacientes reumáticos (Marshall *et al.*, 1992) demonstrando que diminuição da carga bacteriana pode afetar o desenvolvimento da artrite. Porém, esses efeitos são limitados e os antibióticos agem de modo inespecífico, com o uso prolongado também sendo associado à disbiose. Os probióticos oferecem uma possibilidade de normalização da microbiota que não é associada a efeitos colaterais (Iannitti e Palmieri, 2010).

Muitos estudos mostram uma tendência da microbiota de pacientes reumáticos a apresentarem uma redução da representatividade de bactérias do gênero *Bifidobacteria* e aumento de *Clostridium* e *Lactobacillus* (Shinebaum *et al.*, 1987; Vaahtovuori *et al.*, 2008). Foi também encontrada uma relação entre a expansão de *Prevotella copri* e a susceptibilidade à artrite (Scher *et al.*, 2013). A redução do quadro clínico com o uso de drogas anti-inflamatórias ou antirreumáticas tem sido relacionada às alterações na composição da microbiota (Neumann *et al.*, 1987; Dearlove *et al.*, 1992; Bradley, King, *et al.*, 1993; Bradley, Neumann, *et al.*, 1993). Um estudo desenvolvido por Zhang e colaboradores contando com um tamanho amostral significativo corroborou essa tendência. Esse estudo analisou alterações na microbiota em toda a mucosa gastrointestinal, incluindo cavidade oral, intestinal e material fecal. Também foi

demonstrado que existe uma correlação direta entre a severidade da disbiose e o quadro clínico dos pacientes reumáticos, incluindo marcadores séricos como FR e anti-CCP. O uso de drogas anti-inflamatórias e a remissão dos sintomas nesses pacientes também foram relacionados a uma reversão parcial da disbiose. Esses resultados demonstram que a relação entre disbiose e artrite não é somente causal (Zhang *et al.*, 2015).

A associação entre probióticos e reversão da disbiose ainda não é completamente compreendida. A relação entre sistema imune e as bactérias comensais inclui múltiplos fatores, tanto do ambiente quanto do hospedeiro, e essas relações ainda estão sendo compreendidas (Toivanen *et al.*, 2001; Vaahtovuori *et al.*, 2008). É razoável supor que os efeitos induzidos pelos probióticos no sistema imune tenham repercussões sobre suas relações com a microbiota. Mas os probióticos podem agir diretamente sobre as bactérias comensais. Já foi demonstrada *in vitro* a capacidade de bactérias lácticas de suprimir a proliferação de outras espécies de bacterianas inclusive patogênicas (Wang *et al.*, 2004)

Os efeitos dos probióticos em modelos experimentais frequentemente são mais evidentes que os ensaios clínicos. A microbiota e sua relação com o hospedeiro é altamente complexa, estando sujeita a diversos fatores genéticos e ambientais. Os camundongos usados em modelos experimentais são isogênicos e passam a maior parte do tempo em ambientes controlados e dietas uniformes. Todos esses fatores contribuem para variabilidade dos resultados encontrados em ensaios clínicos aplicando probióticos (Brusca *et al.*, 2014; Catrina *et al.*, 2016). De qualquer forma é improvável que, em humanos, a relação entre microbiota, probióticos e disbiose possa ser vinculada a apenas um único microrganismo como muitas vezes ocorre em camundongos isogênicos. Mesmo em modelos animais, o uso de mais de um microrganismo tem apresentado resultados mais promissores (Timmerman *et al.*, 2004; Betta, 2014).

O *Lactococcus lactis* não é convencionalmente considerado um probiótico e essa propriedade é pouco investigada. Os seus efeitos positivos na colite e na prevenção dos danos associados ao consumo de etanol em camundongos incluem redução da reação inflamatória e proteção do epitélio intestinal (Luerce *et al.*, 2014; Alvarenga *et al.*, 2015). Esse tipo de lesão também está associada

ao desenvolvimento da artrite em humanos (Kaetzel, 2010). Assim, para uma compreensão completa dos efeitos exercidos pelo *L. lactis* NCDO2118 no modelo de artrite induzida por colágeno, a ação antimicrobiana dessa bactéria no intestino assim como sua capacidade de interferir na composição da microbiota devem ser investigadas.

Além de estarem de acordo com os efeitos probióticos capazes de induzir diferenciação de linfócitos T_{REG} e diminuição de citocinas inflamatórias, nossos resultados demonstraram que esses benefícios atuam de forma sistêmica e duradoura. A secreção de Hsp65 pelo *L. lactis* NCDO 2118 foi capaz de prevenir a indução da artrite induzida por colágeno em muitos aspectos.

O grupo HSP foi o que apresentou o menor edema da pata e também as menores contagens celulares no infiltrado inflamatório sinovial (Figuras 1A e 1C). Esses resultados podem estar associados à atuação da Hsp65 diretamente nos leucócitos. A indução de Artrite por Adjuvante funciona em ratos Lewis, mas não em ratos Wistar. Essa diferença está relacionada à capacidade de resposta à HSP65 bacteriana e endógena. Essa resposta é significativamente menor em ratos Wistar e essa diferença interfere na capacidade migratória e invasiva dos leucócitos (Wooley *et al.*, 1998; Mia *et al.*, 2008). O tratamento com Hsp65-lac via oral pode agir sobre os leucócitos de forma a diminuir sua capacidade de infiltrar a cavidade sinovial.

O tratamento com Hsp65-lac não somente preveniu o aumento de citocinas inflamatórias, mas também o aumento dos níveis de autoanticorpos patológicos, enquanto que o grupo EP apresentou altos níveis desses anticorpos. Os níveis de IgG para OVA e colágeno tipo II estavam reduzidos ao longo de todo o desenvolvimento da doença nos camundongos tratados (Fig. 6A e 6B). O Fator Reumatoide e anticorpos específicos para Hsp65 também estiveram reduzidos no período mais tardio da doença (Fig. 6C e 6D). Esses dados indicam que o tratamento via oral Hsp65-lac exerceu um efeito tolerogênico.

A imunização com CFA conta com uma alta carga de produtos microbianos inclusive a própria Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis*. Pode-se argumentar que a tolerância induzida foi relacionada a esse antígeno bacteriano. No entanto, o tratamento com Hsp65-lac em um modelo de EAE que não fez uso desse adjuvante também foi igualmente capaz de inibir o desenvolvimento da

doença (Rezende, R. M. *et al.*, 2013). Os efeitos benéficos da HSP60 já foram demonstrados em modelos de artrite que não são induzidos por adjuvantes bacterianos (Wooley *et al.*, 1998; Mia *et al.*, 2008). Esses dados mostram que a tolerância desencadeada por esse tratamento não é dirigida somente aos produtos microbianos presentes no adjuvante CFA.

A diminuição da frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados produtores de TNF- α e IFN- γ demonstra que o tratamento com Hsp65-lac foi capaz de impedir o desenvolvimento da inflamação (Fig. 5A, 5B e 8). Essa propriedade anti-inflamatória é bem estabelecida na literatura. Para que as HSP60 possam agir como adjuvantes da tolerância deve-se adotar um regime tolerizante. Essa propriedade depende não somente de receptores específicos da imunidade adaptativa, mas também de inespecíficos da imunidade inata. Existem evidências de que este também é o caso dos probióticos na indução da regulação. O tratamento com Hsp65-lac em um modelo de colite induzida por DSS não funcionou em camundongos TLR2^{-/-} da mesma maneira que em camundongos selvagens (Gomes-Santos, 2011). Por outro lado, a bactéria *L. lactis* pode ter atuado como adjuvante da tolerância oral induzida para Hsp65. Em modelo de doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), Mercadante e colaboradores demonstraram que a cepa *L. lactis* NCDO2118 foi capaz de atuar como adjuvante na indução de tolerância oral a alo-antígenos administrados pela via oral. Esse efeito adjuvante foi dependente de IL-10 e de células B expressando LAP (Mercadante *et al.*, 2014). Ainda não está claro quais são os componentes do *L. lactis* NCDO2118 responsáveis por esse efeito na tolerância oral.

O aumento dos linfócitos T reguladores no baço dos animais do grupo HSP foi observado somente nos primeiros 30 dias do desenvolvimento da doença. Em tempos mais tardios, houve aumento dos linfócitos T reguladores apenas nos linfonodos mesentéricos e inguinais indicando que houve uma mudança na dinâmica de migração dessas células a partir de sua geração no intestino (Fig. 10D-H). A resposta reguladora ficou restrita aos linfonodos inguinais mais próximos dos locais onde ocorre a reação inflamatória. Essa alteração na localização dos linfócitos T reguladores ao longo da AIC está de acordo com a atração em locais onde a inflamação induz maior expressão de HSP60.

A capacidade de células reguladoras específicas para HSP60 de migrarem aos locais onde ocorre a reação inflamatória é uma das principais vantagens associadas a essa nova possibilidade terapêutica. A variabilidade da especificidade patogênica na AR em humanos é um fator limitante para a indução de linfócitos T reguladores específicos para epítomos relacionados à doença. Nossos resultados indicam que tratamento oral com Hsp65-lac induziu células T reguladoras na mucosa intestinal capazes de agir sistemicamente e inibir localmente o desenvolvimento da doença. O aumento de linfócitos T_{REG} LAP⁺ foi observado também na prevenção da EAE pelo tratamento com Hsp65-lac (Rezende, R. M. *et al.*, 2013). Esse trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que a depleção dessas células pelo tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais anti-LAP aboliu completamente os efeitos benéficos do tratamento com Hsp65-lac.

A ação específica desse tratamento para a HSP60 endógena e a Hsp65 bacteriana parece relacionada aos processos de diminuição da inflamação e manutenção da regulação. Já foi demonstrado que linfócitos T reguladores específicos para HSP60 de pacientes reumáticos sofrem apoptose com mais facilidade. Experimentos *in vitro* mostraram que a expansão e ativação de linfócitos T_{REG} específicos para APL-1, um peptídeo derivado da HSP60, é capaz de inibir linfócitos efetores específicos obtidos de pacientes de AR (Barbera *et al.*, 2016). A terapia oral com Hsp65-lac parece ser capaz de reforçar e manter a fisiologia reguladora associada a HSP60 durante os processos patológicos e inflamatórios.

A Hsp65-lac via oral também aumentou a frequência de linfócitos B produtores de IL-10 (Fig. 11). Esse tipo de regulação é menos investigado que nos linfócitos T. Mas já está demonstrado que linfócitos B produtores de IL-10 são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T_{REG} (Carter *et al.*, 2012; Miyagaki *et al.*, 2015). O tratamento com *L. lactis* em conjunto com antígenos alogênicos via oral induziu tolerância aos aloantígenos, diminuindo a inflamação relacionada à doença enxerto versus hospedeiros (GVHD). Efeito que foi dependente de linfócitos B reguladores produtores de IL-10 (Mercadante *et al.*, 2014). Por outro lado, a própria Hsp65 ou seus peptídeos são capazes de induzir a produção de IL-10 em linfócitos B, inclusive em experimentos *in vitro* com sangue em humanos (Fontoura *et al.*, 2015).

Anticorpos tem um papel central na patogenia da AR. O bloqueio de linfócitos B com um anticorpo monoclonal anti-CD20 exerce efeitos positivos em modelos de artrite experimental e em pacientes reumáticos (Shaw *et al.*, 2003; Roll *et al.*, 2008). Dentre os efeitos observados durante a depleção de linfócitos B estão a redução dos sintomas clínicos em pacientes reumáticos e o aumento da frequência de linfócitos Treg. Foi observada ainda relação inversa entre a frequência de linfócitos B_{REG} e os sintomas de pacientes com artrite (Kim, J. *et al.*, 2014).

A transferência de B_{REG} foi capaz de inibir a indução de artrite por colágeno (Mauri *et al.*, 2003). Nesse modelo de artrite, a diferenciação de linfócitos T_{R1} foi dependente da produção de IL-10 por linfócitos B (Carter *et al.*, 2012). Para estabelecermos o papel dessa citocina nos efeitos observados neste estudo, pretendemos utilizar camundongos deficientes em IL-10 ou o bloqueio de linfócitos B. Dessa forma, poderemos estabelecer também se a indução de linfócitos B_{REG} é essencial para os efeitos do tratamento oral com Hsp65-lac, especialmente para a redução dos anticorpos patogênicos associados ao desenvolvimento da artrite. De qualquer forma, a propriedade da Hsp65-lac via oral de modular e regular a atividade de linfócitos B indica que essas células podem ter um efeito direto no potencial terapêutico do Hsp65-lac na AR.

O tratamento com Hsp65-lac no modelo de artrite aguda induzida por mBSA também reduziu mediadores inflamatórios e aumentou a frequência de linfócitos T reguladores. No entanto, nesse modelo de artrite, o *L. lactis*-EP não exerceu os mesmos efeitos observados no modelo crônico induzido por colágeno (Fig. 13 e 14). O modelo agudo utilizado resulta de mecanismos inflamatórios locais mais do que de circuitos autoimunes sistêmicos como os observados no modelo crônico. O modelo induzido por mBSA depende de um desafio com antígeno diretamente na articulação. Por isso, esse modelo reproduz mais os aspectos locais da formação do *pannus* do que os aspectos autoimunes da AR. O modelo de artrite induzida por colágeno que usamos reproduz aspectos autoimunes e crônicos. A diferença nos mecanismos patogênicos desses modelos pode explicar o fato do tratamento com *L. lactis*-EP induzir regulação apenas no modelo crônico.

O efeito da HSP60 em modelos agudos de artrite está bem estabelecido. As primeiras observações dos efeitos supressores da Hsp65 de *M. tuberculosis*

foram em modelos agudos de artrite em ratos. Esses modelos são baseados na infusão de adjuvantes diretamente na articulação. Já foi demonstrado inclusive que a terapia oral com Hsp65 de *M. tuberculosis* foi capaz de reduzir o quadro inflamatório já estabelecido nesse modelo (Satpute *et al.*, 2009). Esse efeito, no entanto, só foi observado quando a Hsp65 esteve protegida do processo digestivo pela administração conjunta de inibidores enzimáticos. A secreção do Hsp65 íntegra e diretamente na mucosa pelo *L. lactis* também foi capaz de reduzir a inflamação no modelo agudo de artrite no nosso estudo. Mas o seu efeito depois do estabelecimento da inflamação ainda precisa ser verificado.

O tratamento com *L. lactis*-EP no modelo agudo induziu aumento da frequência de linfócitos T LAP⁺ nos linfonodos mesentéricos, mas isso não foi o bastante para reduzir a inflamação nesse caso. Esse dado sugere que a especificidade desses linfócitos gerado pelo tratamento com Hsp65-lac é necessária para que as células sejam capazes de atuar no local da inflamação.

Uma das vantagens da tolerância imunológica sobre os tratamentos convencionais é não induzir imunossupressão generalizada. O tratamento com HSP60 não induz supressão generalizada nem comprometimento do sistema imune na resolução de infecção. Isto foi demonstrado no tratamento via oral com Hsp65-lac no modelo de EAE. Nesse estudo, a produção de anticorpos específicos para *Salmonella typhimurium* estava intacta e os animais sobreviviam à infecção aguda pela bactéria (Rezende, R. M. *et al.*, 2013). Além disso, a reatividade para Hsp65 pode atuar de forma protetora controlando a reatividade inflamatória excessiva contra alguns agentes infecciosos e reduzindo, assim, os danos causados ao hospedeiro pela resposta imune (Rouvio *et al.*, 2005; Gershoni-Yahalom *et al.*, 2010; Kamalakannan *et al.*, 2012).

Os resultados de um ensaio clínico que aplicam dnaJ1 (peptídeos derivados da HSP60) em pacientes reumáticos via oral mostram resultados promissores. Os pacientes que ingeriram o dnaJ1 apresentaram vários marcadores relacionados ao processo de tolerância imunológica como expressão de Foxp3 e IL-10 em células mononucleares do sangue em relação ao grupo placebo. Esse tratamento também não induziu imunossupressão. A diferença entre os grupos demorou a ser observada, o que também indica um efeito tardio do tratamento oral. Um fator a ser notado nesse estudo é que todos

os pacientes faziam uso de hidroxycloquina, uma droga imunossupressora muito utilizada também na artrite (Koffeman *et al.*, 2009).

Existem evidências de que imunoterapias apresentam melhor resultados quando associados com drogas imunossupressoras convencionais. A diminuição do processo inflamatório pode melhorar a atuação dessas terapias. Porém, o processo de tolerância deriva diretamente da ação de células reguladoras ativadas e a imunossupressão pode comprometer sua fisiologia. A propriedade anti-inflamatória dos probióticos é mediada por indução da regulação ao invés de imunossupressão, oferecendo uma grande vantagem para essa abordagem. Além disto, o *L. lactis* NCDO 2118 usado nos nossos estudos apresentaram atividades semelhantes às aquelas descritas para bactérias probióticas (Luerce *et al.*, 2015).

Estudos sobre o uso do *L. lactis* como vetor de proteínas recombinantes cresceram muito na última década. O seu potencial de atuar diretamente na mucosa está bem estabelecido, tanto quanto a sua diversidade de ação. Já está demonstrada a capacidade do *L. lactis* recombinantes de induzir tanto processos relacionados à regulação quanto imunização. O *L. lactis* produtor de IL-10 recombinante já apresentou efeitos benéficos no tratamento da doença de Crohn durante um ensaio clínico (Steidler e Rottiers, 2006).

É importante que o sistema recombinante usado nas bactérias geneticamente modificadas seja seguro para aplicação em humanos. Os ensaios clínicos com *L. lactis* produtor de IL-10 usaram um sistema que torna a bactéria viável apenas na presença de timina e timidina (Steidler e Rottiers, 2006). Outro problema a ser abordado é que o sistema recombinante usado na Hsp65-lac inclui resistência a antibiótico, assim como na maioria das bactérias geneticamente modificadas usadas em experimentação animal.

A indução da expressão através de xilose também é um ponto fraco no sistema XIES se aplicado a humanos. Uma abordagem alternativa é o uso de um sistema de expressão que responda ao ambiente intestinal. Um desses é controle induzido por estresse (*Stress-Inducible Controlled Expression*, SICE). Esse sistema de expressão já foi demonstrado viável no probiótico *L. casei* e é compatível com as condições do trato gastrointestinal. Sistemas capazes de tornar a expressão da proteína recombinante constitutiva vêm sendo

desenvolvidos e também seriam ideais para aplicação do Hsp65-lac em humanos.

O *L. lactis* está bem estabelecido como um vetor seguro para entrega de fármacos e biomoléculas via oral. Mas deve-se notar que quase todos os estudos nesse sentido aplicam a linhagem MG 1363, que até o presente não apresentou propriedades anti-inflamatórias. Esse fator pode ser relevante principalmente em aplicações que visam regulação e redução da inflamação, como no caso da IL-10 e nano anticorpos anti-TNF- α (Vandenbroucke *et al.*, 2010). Pode-se especular que o uso de uma linhagem com características anti-inflamatórias capaz de reduzir inflamação e auxiliar na indução de tolerância imunológica poderia ser ainda mais vantajoso nesses casos. A substituição dos fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores por um agente com ação semelhante às bactérias conhecidas como probióticas nas terapias orais com biomoléculas reguladoras por via oral é uma possibilidade que apresenta grandes vantagens.

Em um modelo de artrite induzida por colágeno, a tolerância oral para o antígeno é potencializada pela aplicação conjunta ao probiótico *L. casei*. Esse efeito foi mediado pelo aumento de linfócitos reguladores, diminuição da frequência de linfócitos T efetores e aumento de T_H2 em relação ao T_H1 (So, Kwon, *et al.*, 2008; So, Lee, *et al.*, 2008). Isto demonstra a importância da linhagem bacteriana nos efeitos de terapias baseadas na aplicação direta de microrganismos produtores de moléculas recombinantes. A associação da tolerância induzida por Hsp65 aos efeitos anti-inflamatórios do *L. lactis* pode ter sido um fator relevante nos resultados obtidos no nosso estudo. Uma forma de se investigar esses efeitos seria o uso da linhagem *L. lactis* MG 1363 como vetor para a Hsp65.

A autoimunidade em pacientes reumáticos é sistêmica e precede a inflamação sinovial, em alguns casos por anos. A quebra da tolerância que resulta na AR está associada a eventos envolvendo a microbiota e as mucosas. Essas características não são abordadas nas terapias convencionais. Os efeitos observados na aplicação oral de Hsp65-lac em modelos de artrite em camundongos demonstram as possibilidades terapêuticas nesse tipo de abordagem.

O tratamento com Hsp65 via oral é uma terapia eficaz no tratamento da artrite, propriedade que está bem estabelecida na literatura e nos ensaios

clínicos. O sistema que usamos é capaz de entregar a proteína inteira na mucosa intestinal, que é a forma mais eficaz de se induzir tolerância oral. A associação dessa terapia a um agente com propriedades anti-inflamatórias, além de potencialmente aumentar os efeitos associados à tolerância, pode oferecer uma alternativa aos anti-inflamatórios geralmente aplicados em terapias via oral. Feitos os ajustes para consumo humano, o *L. lactis* produtor de Hsp65 apresenta um potencial terapêutica grande no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes.

6. Conclusão

Nossos resultados mostraram que o tratamento oral com *L. lactis* secretor de Hsp65 é capaz de prevenir a indução da artrite em camundongos. Esse efeito foi observado em dois modelos diferentes de artrite induzida por antígeno, um crônico e outro agudo. O efeito preventivo observado incluiu os sintomas associados ao edema da pata, diminuição de citocinas inflamatórias e anticorpos específicos e aumento de linfócitos reguladores.

O tratamento com o *L. lactis* portando um plasmídeo vazio também exerceu efeitos benéficos nos animais do modelo crônico, indicando uma atividade probiótica dessa bactéria na artrite crônica induzida por colágeno. No modelo agudo o tratamento com *L. lactis*-EP não induziu diferença em relação ao grupo controle.

Esses resultados indicam o tratamento oral com *L. lactis* secretor de Hsp65 como uma alternativa terapêutica eficiente, segura e de fácil aplicação no tratamento da AR.

7. Referências Bibliográficas

ABULAFIA-LAPID, R. et al. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. **J Autoimmun**, v. 12, n. 2, p. 121-9, Mar 1999. ISSN 0896-8411 (Print)
0896-8411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047432>>.

AFZALI, B. et al. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. **Clin Exp Immunol**, v. 159, n. 2, p. 120-30, Feb 2010. ISSN 1365-2249 (Electronic)
0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912251>>.

AHO, K. et al. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. **J Rheumatol**, v. 13, n. 5, p. 899-902, Oct 1986. ISSN 0315-162X (Print)
0315-162X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3820198>>.

AI, C. et al. Genetically engineered *Lactococcus lactis* protect against house dust mite allergy in a BALB/c mouse model. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109461, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290938>>.

ALIPOUR, B. et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. **Int J Rheum Dis**, v. 17, n. 5, p. 519-27, Jun 2014. ISSN 1756-185X (Electronic)

1756-1841 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673738>>.

ALVARENGA, D. M. et al. Previous Ingestion of *Lactococcus lactis* by Ethanol-Treated Mice Preserves Antigen Presentation Hierarchy in the Gut and Oral Tolerance Susceptibility. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 39, n. 8, p. 1453-64, Aug 2015. ISSN 1530-0277 (Electronic)

0145-6008 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110492>>.

AMDEKAR, S. et al. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats. **J Interferon Cytokine Res**, v. 33, n. 1, p. 1-8, Jan 2013. ISSN 1557-7465 (Electronic) 1079-9907 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030670>>.

AMDEKAR, S. et al. *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines: *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 2, p. 147-54, Apr 2011. ISSN 1573-2592 (Electronic)

0271-9142 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838859>>.

AMIR-KROLL, H. et al. A conjugate vaccine composed of a heat shock protein 60 T-cell epitope peptide (p458) and *Neisseria meningitidis* type B capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 24, n. 42-43, p. 6555-63, Oct 30 2006. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843573>>.

ANDERSSON, S. E. et al. Collagen epitope expression on B cells is sufficient to confer tolerance to collagen-induced arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 18, n. 1, p. 140, 2016. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27301320>>.

ANDERTON, S. M. et al. Activation of T-Cells Recognizing Self 60-Kd Heat-Shock Protein Can Protect against Experimental Arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 943-952, Mar 1 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QH74700011 >.

ARPAIA, N. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 451-5, Dec 19 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24226773>>.

ASANO, M. et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 387-96, Aug 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760792>>.

ATARASHI, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature**, v. 500, n. 7461, p. 232-6, Aug 8 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842501>>.

ATSUMI, T. et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. **J Exp Med**, v. 196, n. 7, p. 979-90, Oct 7 2002. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370259>>.

AUSAR, S. F. et al. Treatment of rheumatoid arthritis by oral administration of bovine tracheal type II collagen. **Rheumatol Int**, v. 20, n. 4, p. 138-44, May 2001. ISSN 0172-8172 (Print)

0172-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411957>>.

AVOUAC, J.; GOSSEC, L.; DOUGADOS, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 7, p. 845-51, Jul 2006. ISSN 0003-4967 (Print)

0003-4967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16606649>>.

BACKSTROM, N. F.; DAHLGREN, U. I. Induction of experimental arthritis in BALB/c mice by inclusion of a foreign protein in the collagen inoculum. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 4, p. 322-8, Apr 2008. ISSN 1365-3083 (Electronic)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226011>>.

BADDACK, U. et al. A chronic model of arthritis supported by a strain-specific periarticular lymph node in BALB/c mice. **Nat Commun**, v. 4, p. 1644, 2013. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23552059>>.

BAHARAV, E. et al. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. **J Nutr**, v. 134, n. 8, p. 1964-9, Aug 2004. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284384>>.

BARBERA, A. et al. APL1, an altered peptide ligand derived from human heat-shock protein 60, increases the frequency of Tregs and its suppressive capacity against antigen responding effector CD4 + T cells from rheumatoid arthritis patients. **Cell Stress Chaperones**, v. 21, n. 4, p. 735-44, Jul 2016. ISSN 1466-1268 (Electronic)

1355-8145 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27241313>>.

BARBERI, C. et al. T cell polarizing properties of probiotic bacteria. **Immunol Lett**, v. 168, n. 2, p. 337-42, Dec 2015. ISSN 1879-0542 (Electronic)

0165-2478 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554608>>.

BARNETT, M. L.; COMBITCHI, D.; TRENTAM, D. E. A pilot trial of oral type II collagen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 4, p. 623-8, Apr 1996. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630112>>.

BASU, S. et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway.

Int Immunol, v. 12, n. 11, p. 1539-46, Nov 2000. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058573>>.

BENBOUZIANE, B. et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in Lactococcus lactis for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. **J Biotechnol**, v. 168, n. 2, p. 120-9, Oct 20 2013. ISSN 1873-4863 (Electronic)

0168-1656 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664884>>.

BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 20-1, Jan 2001. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137993>>.

BETTA, P. Not all Probiotics are the Same: Gut Microbiota Modulation with a Multistrain Probiotics. **N Am J Med Sci**, v. 6, n. 1, p. 58-9, Jan 2014. ISSN 2250-1541 (Print)

1947-2714 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678480>>.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. The antigenic stimulus in transplantation immunity. **Nature**, v. 178, n. 4532, p. 514-9, Sep 8 1956. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13358786>>.

BORRETZEN, M. et al. Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 3, p. 735-41, Mar 1997. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079816>>.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, May 15 2003. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748652>>.

BRAAT, H. et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 6, p. 754-9, Jun 2006. ISSN 1542-3565 (Print)

1542-3565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716759>>.

BRAAT, H. et al. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6, p. 1618-25, Dec 2004. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585777>>.

BRADLEY, S. M. et al. Faecal Clostridium perfringens and antibody responses to its antigens in arthritis patients on and off non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Br J Rheumatol**, v. 32, n. 10, p. 940-1, Oct 1993. ISSN 0263-7103 (Print)

0263-7103 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402010>>.

BRADLEY, S. M. et al. Sequential study of bacterial antibody levels and faecal flora in rheumatoid arthritis patients taking sulphasalazine. **Br J Rheumatol**, v. 32, n. 8, p. 683-8, Aug 1993. ISSN 0263-7103 (Print)

0263-7103 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102304>>.

BRAND, D.; KANG, A.; ROSLONIEC, E. Immunopathogenesis of collagen arthritis. **Springer seminars in immunopathology**, v. 25, n. 1, p. 3-18, 2003. ISSN 0344-4325. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00281-003-0127-1>>.

BRAND, D. D. et al. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. **J Immunol**, v. 157, n. 11, p. 5178-84, Dec 1 1996. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943430>>.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutr Rev**, v. 56, n. 1 Pt 2, p. S5-18, Jan 1998. ISSN 0029-6643 (Print)

0029-6643 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9481120>>.

_____. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467-84, Jul 26 2007. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227687>>.

_____. 'ABC' of mucosal immunology. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program**, v. 64, p. 23-38; discussion 38-43, 251-7, 2009a. ISSN 1661-6677 (Print)

1661-6677 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710513>>.

_____. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 6, p. 505-15, Dec 2009b. ISSN 1365-3083 (Electronic)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906191>>.

BRANDTZAEG, P. et al. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 1, p. 31-7, Jan 2008. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079158>>.

BROMBERG, J. TNF-alpha trips up Treg cells in rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 19, n. 3, p. 269-70, Mar 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467235>>.

BRUCE, M. G.; FERGUSON, A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. **Immunology**, v. 59, n. 2, p. 295-300, Oct 1986a. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3770805>>.

_____. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. **Immunology**, v. 57, n. 4, p. 627-30, Apr 1986b. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2420712>>.

BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 68-73, Jan 2001. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138001>>.

BRUSCA, S. B.; ABRAMSON, S. B.; SCHER, J. U. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. **Curr Opin Rheumatol**, v. 26, n. 1, p. 101-7, Jan 2014. ISSN 1531-6963 (Electronic) 1040-8711 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247114>>.

BUCKLAND, J. Therapy: Ustekinumab therapeutic effects--more than skin deep. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 8, p. 445, Aug 2013. ISSN 1759-4804 (Electronic) 1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820861>>.

BULUT, Y. et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. **J Immunol**, v. 168, n. 3, p. 1435-40, Feb 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801686>>.

BURNET, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. **CA Cancer J Clin**, v. 26, n. 2, p. 119-21, Mar-Apr 1976. ISSN 0007-9235 (Print) 0007-9235 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/816431>>.

CAO, D. et al. FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints. **Scand J Immunol**, v. 63, n. 6, p. 444-52, Jun 2006. ISSN 0300-9475 (Print) 0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16764698>>.

CAO, D. et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 1, p. 215-23, Jan 2003. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594850>>.

CAO, D. et al. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 4, p. R335-46, 2004. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225369>>.

CAPINI, C. et al. Antigen-specific suppression of inflammatory arthritis using liposomes. **J Immunol**, v. 182, n. 6, p. 3556-65, Mar 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265134>>.

CAPPELLO, F. et al. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 6, p. 801-9, Jun 2008. ISSN 1555-8576 (Electronic) 1538-4047 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497565>>.

CARTER, N. A.; ROSSER, E. C.; MAURI, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 1, p. R32, 2012. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315945>>.

CASTRO-JUNIOR, A. B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cell Immunol**, v. 280, n. 2, p. 171-81, Dec 2012. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399844>>.

CATRINA, A. I.; DEANE, K. D.; SCHER, J. U. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, n. 3, p. 391-402, Mar 2016. ISSN 1462-0332 (Electronic) 1462-0324 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539828>>.

CATTERALL, J. B. et al. Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1 α and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 10, p. 2296-310, Oct 2001. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11665970>>.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiol**, v. 47, p. 45-61, May 2015. ISSN 1095-9998 (Electronic)

0740-0020 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25583337>>.

CHABAUD, M. et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 5, p. 963-70, May 1999. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323452>>.

CHAMCHA, V. et al. Oral Immunization with a Recombinant *Lactococcus lactis*-Expressing HIV-1 Antigen on Group A Streptococcus Pilus Induces Strong Mucosal Immunity in the Gut. **J Immunol**, v. 195, n. 10, p. 5025-34, Nov 15 2015. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482408>>.

CHANG, Y. H.; PEARSON, C. M.; ABE, C. Adjuvant polyarthritis. IV. Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic, and other studies. **Arthritis Rheum**, v. 23, n. 1, p. 62-71, Jan 1980. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7352945>>.

CHASE, M. W. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 61, p. 257-9, Mar 1946. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21024163>>.

CHATFIELD, S.; WICKS, I.; STURGESS..., A. Anti-citrullinated peptide antibody: death of the rheumatoid factor? **Medical Journal of ...**, 2009. Disponível em: <<https://www.mja.com.au/journal/2009/190/12/anti-citrullinated-peptide-antibody-death-rheumatoid-factor>>.

CHEN, G. et al. The therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental arthritis is associated with CD4+CD25+ T regulatory cells. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 6, p. 572-8, Dec 2008. ISSN 1365-3083 (Electronic) 0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055696>>.

CHEN, L. et al. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 10, p. 2845-54, Oct 2008. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958885>>.

CHEN, M. L. et al. Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4+CD25+ Regulatory T Cell Subset with TGF- β -Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7327-7337, 2008. ISSN 0022-1767 1550-6606.

CHIU, C. C. et al. Monocolonization of germ-free mice with *Bacteroides fragilis* protects against dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 675786, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971344>>.

CHOY, E. H. et al. Control of rheumatoid arthritis by oral tolerance. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 9, p. 1993-7, Sep 2001. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592359>>.

COBELENS, P. M. et al. Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 41, n. 7, p. 775-9, Jul 2002. ISSN 1462-0324 (Print) 1462-0324 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096227>>.

COELHO, V.; FARIA, A. M. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. **Front Immunol**, v. 2, p. 97, 2011. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566886>>.

COHEN-SFADY, M. et al. Heat Shock Protein 60 Activates B Cells via the TLR4-MyD88 Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3594-3602, 2005. ISSN 0022-1767
1550-6606.

COHEN-SFADY, M. et al. Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 890-6, Jul 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561102>>.

COHEN, I. R. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. **Annu Rev Immunol**, v. 9, p. 567-89, 1991. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1680347>>.

_____. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. **Immunol Today**, v. 13, n. 12, p. 490-4, Dec 1992. ISSN 0167-5699 (Print)
0167-5699 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463581>>.

COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. **Immunol Today**, v. 12, n. 4, p. 105-10, Apr 1991. ISSN 0167-5699 (Print)
0167-5699 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2059311>>.

COOK, A. D. et al. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 10, p. 1720-7, Oct 1996. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843863>>.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1757-64, Aug 6 2007. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620361>>.

COPE, A. P. et al. T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 7, p. 1497-507, Jul 1999. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403279>>.

COPE, A. P.; SCHULZE-KOOPS, H.; ARINGER, M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 25, n. 5 Suppl 46, p. S4-11, Sep-Oct 2007. ISSN 0392-856X (Print)

0392-856X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977483>>.

CORSIERO, E.; PITZALIS, C.; BOMBARDIERI, M. Peripheral and synovial mechanisms of humoral autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Drug Discov Today**, v. 19, n. 8, p. 1161-5, Aug 2014. ISSN 1878-5832 (Electronic)

1359-6446 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880103>>.

CROMARTIE, W. J. et al. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. **J Exp Med**, v. 146, n. 6, p. 1585-602, Dec 1 1977. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/336836>>.

CUELLO-GARCIA, C. A. et al. Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, n. 4, p. 952-61, Oct 2015. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26044853>>.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 626-35, May 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464985>>.

DA CUNHA, A. P.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Study of oral tolerance and its indirect effects in adoptive cell transfer experiments. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1029, p. 321-7, Dec 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681771>>.

DA CUNHA, A. P. et al. In vivo anti-LAP mAb enhances IL-17/IFN-gamma responses and abrogates anti-CD3-induced oral tolerance. **Int Immunol**, v. 27, n. 2, p. 73-82, Feb 2015. ISSN 1460-2377 (Electronic)

0953-8178 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194146>>.

DE AZEVEDO, M. et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. **Genetics and**

molecular research : GMR, v. 11, n. 2, p. 1146-1157, 2012. ISSN 1676-5680.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4238/2012.April.27.14>>.

DE GRAEFF-MEEDER, E. R. et al. Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis. **Lancet**, v. 337, n. 8754, p. 1368-72, Jun 8 1991. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1674762>>.

DE KLEER, I. M. et al. 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**, v. 48, n. 7, p. 2001-10, Jul 2003. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847694>>.

DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 1, p. 100-5, Jan 2008. ISSN 0022-2615 (Print)
0022-2615 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065674>>.

DEARLOVE, S. M. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on faecal flora and bacterial antibody levels in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 31, n. 7, p. 443-7, Jul 1992. ISSN 0263-7103 (Print)
0263-7103 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1628165>>.

DEL RIO, M. L. et al. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 268-81, Mar 2010. ISSN 1600-065X (Electronic)
0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193025>>.

DENG, S. et al. Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. **Cell Immunol**, v. 265, n. 2, p. 105-10, 2010. ISSN 1090-2163 (Electronic)
0008-8749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716449>>.

DI CERBO, A. et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **J Clin Pathol**, v. 69, n. 3, p. 187-203, Mar 2016. ISSN 1472-4146 (Electronic)
0021-9746 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578541>>.

DIAMANTI, A. P. et al. Microbiota and chronic inflammatory arthritis: an interwoven link. **J Transl Med**, v. 14, n. 1, p. 233, 2016. ISSN 1479-5876 (Electronic) 1479-5876 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492386>>.

DING, C. H. et al. Oral administration of type II collagen suppresses pro-inflammatory mediator production by synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. **Clin Exp Immunol**, v. 132, n. 3, p. 416-23, Jun 2003. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780687>>.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 20-32, Jan 2016. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499895>>.

DONGARRA, M. L. et al. Mucosal immunology and probiotics. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 13, n. 1, p. 19-26, Feb 2013. ISSN 1534-6315 (Electronic) 1529-7322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054627>>.

DUARTE, J. et al. Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10558, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20479941>>.

DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th17 cytokines and mucosal immunity. **Immunol Rev**, v. 226, p. 160-71, Dec 2008. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161423>>.

EBERL, G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 5, p. 450-60, Sep 2010. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445502>>.

EBERL, G.; LOCHNER, M. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. **Mucosal Immunol**, v. 2, n. 6, p. 478-85, Nov 2009. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741595>>.

ELDOR, R.; KASSEM, S.; RAZ, I. Immune modulation in type 1 diabetes mellitus using DiaPep277: a short review and update of recent clinical trial results. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, n. 4, p. 316-20, May 2009. ISSN 1520-7560 (Electronic) 1520-7552 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19267355>>.

ELIAS, D.; COHEN, I. R. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. **Lancet**, v. 343, n. 8899, p. 704-6, Mar 19 1994. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907681>>.

ELIAS, D. et al. Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 10, p. 2851-7, Oct 1995. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589082>>.

ELIAS, D. et al. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 8, p. 3088-91, Apr 15 1991. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707531>>.

FAGARASAN, S. et al. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 243-73, 2010. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192805>>.

FANG, H. et al. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 47-52, Sep 2000. ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967260>>.

FARIA, A. M. et al. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Autoimmun**, v. 20, n. 2, p. 135-45, Mar 2003. ISSN 0896-8411 (Print) 0896-8411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657527>>.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv Immunol**, v. 73, p. 153-264, 1999. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399007>>.

_____. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 206, p. 232-59, Aug 2005. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048553>>.

_____. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 5, n. 3, p. 179-90, Sep 2006. ISSN 1871-5281 (Print)

1871-5281 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918481>>.

FARQUHARSON, D.; BUTCHER, J. P.; CULSHAW, S. Periodontitis, Porphyromonas, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 2, p. 112-20, Mar 2012. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274780>>.

FEIGE, U.; COHEN, I. R. 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**, v. 13, n. 1, p. 99-113, 1991. ISSN 0344-4325 (Print)

0344-4325 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1776121>>.

FINNEGAN, A. et al. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. **J Immunol**, v. 163, n. 10, p. 5383-90, Nov 15 1999. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553063>>.

FIRESTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J Clin Rheumatol**, v. 11, n. 3 Suppl, p. S39-44, Jun 2005. ISSN 1076-1608 (Print)

1076-1608 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357749>>.

FIRESTEIN, G. S.; ZVAIFLER, N. J. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. **Arthritis Rheum**, v. 30, n. 8, p. 864-71, Aug 1987. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3115274>>.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612578>>.

FONTOURA, I. C. et al. B cells expressing IL-10 mRNA modulate memory T cells after DNA-Hsp65 immunization. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 12, p. 1095-100, Dec 2015. ISSN 1414-431X (Electronic)
0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26397973>>.

FRENKEL, D. et al. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4⁺ T cells. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6549-55, Dec 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662856>>.

FREY, O. et al. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 2, p. R291-301, 2005. ISSN 1478-6362 (Electronic)
1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743476>>.

FUJII, K. et al. The diagnostic significance of anti-type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. **Int Orthop**, v. 16, n. 3, p. 272-6, 1992. ISSN 0341-2695 (Print)
0341-2695 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1428342>>.

FUJINAMI, R. S. et al. Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR beta chain: a means for graft rejection and immunosuppression. **J Virol**, v. 62, n. 1, p. 100-5, Jan 1988. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446012>>.

GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677-89, Oct 16 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833089>>.

GANDHI, R. et al. Cutting edge: human latency-associated peptide⁺ T cells: a novel regulatory T cell subset. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 4620-4, May 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368276>>.

GARCIA, G. et al. Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. **J Autoimmun**, v. 13, n. 3, p. 315-24, Nov 1999. ISSN 0896-8411 (Print)

0896-8411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550219>>.

GENOVESE, M. C. et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 4, p. 929-39, Apr 2010. ISSN 1529-0131 (Electronic)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20131262>>.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, n. 5, p. 723-37, May 1970. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4911896>>.

GERSHONI-YAHALOM, O. et al. Chimeric vaccine composed of viral peptide and mammalian heat-shock protein 60 peptide protects against West Nile virus challenge. **Immunology**, v. 130, n. 4, p. 527-35, Aug 2010. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331473>>.

GHADIMI, D. et al. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. **Immunobiology**, v. 213, n. 8, p. 677-92, 2008. ISSN 0171-2985 (Print)

0171-2985 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950596>>.

GLANT, T. T.; FINNEGAN, A.; MIKECZ, K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics. **Crit Rev Immunol**, v. 23, n. 3, p. 199-250, 2003. ISSN 1040-8401 (Print)

1040-8401 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14584879>>.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743-800, Aug 22 2015. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26063472>>.

GOMES-SANTOS, Ana Cristina. Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças inflamatórias intestinais. 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

GOMEZ, A. et al. Loss of sex and age driven differences in the gut microbiome characterize arthritis-susceptible 0401 mice but not arthritis-resistant 0402 mice. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36095, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553482>>.

GOODNOW, C. C. et al. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 590-7, Jun 2 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931211>>.

GRAVALLESE, E. M. et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 2, p. 250-8, Feb 2000. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693863>>.

GREEN, D. R.; FLOOD, P. M.; GERSHON, R. K. Immunoregulatory T-cell pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 1, p. 439-63, 1983. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6152712>>.

GUARINO, A.; GUANDALINI, S.; LO VECCHIO, A. Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. **J Clin Gastroenterol**, v. 49 Suppl 1, p. S37-45, Nov-Dec 2015. ISSN 1539-2031 (Electronic) 0192-0790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447963>>.

GUPTA, R. S. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. **Mol Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 1-11, Jan 1995. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7752884>>.

HAQUE, R. et al. FoxP3 and Bcl-xL cooperatively promote regulatory T cell persistence and prevention of arthritis development. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 2, p. R66, 2010. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384988>>.

HATAKKA, K. et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study. **Scand J Rheumatol**, v. 32, n. 4, p. 211-5, 2003. ISSN 0300-9742 (Print)

0300-9742 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14626627>>.

HERRATH, J. et al. The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 8, p. 2279-90, Aug 2011. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607944>>.

HIGGINS, P. J.; WEINER, H. L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J Immunol**, v. 140, n. 2, p. 440-5, Jan 15 1988. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447178>>.

HIROTA, K. et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **J Exp Med**, v. 204, n. 12, p. 2803-12, Nov 26 2007. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025126>>.

HOLMDAHL, R. et al. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. **Scand J Immunol**, v. 22, n. 3, p. 295-306, Sep 1985. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413528>>.

HOLMDAHL, R. et al. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. **Immunol Rev**, v. 184, p. 184-202, Dec 2001. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086312>>.

HOLMDAHL, R.; MALMSTROM, V.; VUORIO, E. Autoimmune recognition of cartilage collagens. **Ann Med**, v. 25, n. 3, p. 251-64, Jun 1993. ISSN 0785-3890 (Print)

0785-3890 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8333924>>.

HOLOSHITZ, J. et al. Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against autoimmune arthritis. **Science**, v. 219, n. 4580, p. 56-8, Jan 7 1983. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6336851>>.

HOMAN, M.; OREL, R. Are probiotics useful in Helicobacter pylori eradication? **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 37, p. 10644-53, Oct 7 2015. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457024>>.

HORAI, R. et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. **J Exp Med**, v. 191, n. 2, p. 313-20, Jan 17 2000. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637275>>.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, Feb 14 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522256>>.

HUANG, L. et al. Engineering DNA nanoparticles as immunomodulatory reagents that activate regulatory T cells. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 4913-20, May 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516958>>.

HUANG, X. L. et al. Faecalibacterium prausnitzii supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 22, p. 5201-10, Jun 14 2016. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298563>>.

HUIBREGTSE, I. L. et al. Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of Lactococcus lactis secreting ovalbumin. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 517-28, Aug 2007. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681173>>.

HUURMAN, V. A. et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, n. 4, p. 269-75, May 2007. ISSN 1520-7552 (Print) 1520-7552 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024692>>.

HUURMAN, V. A. et al. Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277 therapy in clinical type I diabetes. **Clin Exp Immunol**, v. 152, n. 3, p. 488-97, Jun 2008. ISSN 1365-2249 (Electronic)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422727>>.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clin Nutr**, v. 29, n. 6, p. 701-25, Dec 2010. ISSN 1532-1983 (Electronic)

0261-5614 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576332>>.

IMAOKA, A. Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 16, p. 2511, 2008. ISSN 1007-9327.

ISE, W. et al. Orally tolerized T cells can form conjugates with APCs but are defective in immunological synapse formation. **J Immunol**, v. 175, n. 2, p. 829-38, Jul 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002680>>.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 381-418, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17378762>>.

IWATA, M. et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527-38, Oct 2004. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485630>>.

JACQUES, P.; ELEWAUT, D. Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 5, p. 364-71, Sep 2008. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079200>>.

JANSSENS, W. et al. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. **J Immunol**, v. 171, n. 9, p. 4604-12, Nov 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568934>>.

JIAO, Z. et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 36, n. 6, p. 428-33, Nov-Dec 2007. ISSN 0300-9742 (Print) 0300-9742 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18092263>>.

JORDAN, M. S. et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 301-6, Apr 2001. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276200>>.

JORGENSEN, C. et al. Gastric administration of recombinant 65 kDa heat shock protein delays the severity of type II collagen induced arthritis in mice. **J Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 763-7, Apr 1998. ISSN 0315-162X (Print) 0315-162X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9558182>>.

KAETZEL, C. S. Out of joint: new insights into the role of commensal gut bacteria in autoimmune arthritis. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 6, p. 536-536, 2010. ISSN 1933-0219 1935-3456.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan 2016. ISSN 1759-4804 (Electronic) 1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656660>>.

KAMALAKANNAN, V. et al. Wolbachia heat shock protein 60 induces pro-inflammatory cytokines and apoptosis in monocytes in vitro. **Microbes Infect**, v. 14, n. 7-8, p. 610-8, Jul 2012. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326972>>.

KASSAHN, D. et al. Few human autoimmune sera detect GPI. **Nature Immunology**, v. 3, n. 5, p. 411-412, May 2002. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175411200003>.

KAUFMANN, S. H. et al. Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. **Eur J Immunol**, v. 17, n. 3, p. 351-7, Mar 1987. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3106059>>.

KAWASHIRI, S. Y. et al. CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 38, n. 12, p. 2517-21, Dec 2011. ISSN 0315-162X (Print) 0315-162X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921095>>.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Polysaccharide A of *Bacteroides fragilis*: actions on dendritic cells and T cells. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 206-7, Apr 24 2014. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766882>>.

KEHRL, J. H. et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J Exp Med**, v. 163, n. 5, p. 1037-50, May 1 1986. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2871125>>.

KHADER, S. A.; GAFFEN, S. L.; KOLLS, J. K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. **Mucosal Immunol**, v. 2, n. 5, p. 403-11, Sep 2009. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587639>>.

KILSGARD, O. et al. Peptidylarginine deiminases present in the airways during tobacco smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 46, n. 2, p. 240-8, Feb 2012. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960546>>.

KIM, C. H.; PARK, J.; KIM, M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. **Immune Netw**, v. 14, n. 6, p. 277-88, Dec 2014. ISSN 1598-2629 (Print) 1598-2629 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550694>>.

KIM, J. et al. Regulatory B cells are inversely associated with disease activity in rheumatoid arthritis. **Yonsei Med J**, v. 55, n. 5, p. 1354-8, Sep 2014. ISSN 1976-2437 (Electronic) 0513-5796 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048496>>.

KIM, K. S. et al. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 858-63, Feb 19 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26822607>>.

KIRJAVAINEN, P. V. et al. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS Microbiol Lett**, v. 167, n. 2, p. 185-9, Oct 15 1998. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809419>>.

KLARESKOG, L. et al. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 6, p. 650-5, Dec 2006. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010589>>.

KLEINAU, S. et al. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. **J Autoimmun**, v. 4, n. 6, p. 871-80, Dec 1991. ISSN 0896-8411 (Print)

0896-8411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812893>>.

KOBEZDA, T. et al. Of mice and men: how animal models advance our understanding of T-cell function in RA. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 3, p. 160-70, Mar 2014. ISSN 1759-4804 (Electronic)

1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24394350>>.

KOENDERS, M. I. et al. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. **Am J Pathol**, v. 167, n. 1, p. 141-9, Jul 2005. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972960>>.

KOFFEMAN, E. C. et al. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 11, p. 3207-16, Nov 2009. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877047>>.

KONEN-WAISMAN, S.; FRIDKIN, M.; COHEN, I. R. Self and foreign 60-kilodalton heat shock protein T cell epitope peptides serve as immunogenic carriers for a T cell-independent sugar antigen. **J Immunol**, v. 154, n. 11, p. 5977-85, Jun 1 1995. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538539>>.

KONIECZNA, P. et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Gut**, v. 61, n. 3, p. 354-66, Mar 2012. ISSN 1468-3288 (Electronic)

0017-5749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052061>>.

KONIG, M. et al. Tregalizumab - A Monoclonal Antibody to Target Regulatory T Cells. **Front Immunol**, v. 7, p. 11, 2016. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834751>>.

KRAUSE, I. et al. Induction of oral tolerance in experimental antiphospholipid syndrome by feeding with polyclonal immunoglobulins. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 12, p. 3414-24, Dec 2002. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432572>>.

KWON, H. K. et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 5, p. 2159-64, Feb 2 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080669>>.

LAM, J. et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J Clin Invest**, v. 106, n. 12, p. 1481-8, Dec 2000. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120755>>.

LEBLANC, J. G. et al. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. **J Biotechnol**, v. 151, n. 3, p. 287-93, Feb 10 2011. ISSN 1873-4863 (Electronic)

0168-1656 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167883>>.

LEE, S.; SCHERBERG, N.; DEGROOT, L. J. Induction of oral tolerance in human autoimmune thyroid disease. **Thyroid**, v. 8, n. 3, p. 229-34, Mar 1998. ISSN 1050-7256 (Print)

1050-7256 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545109>>.

LI, P.; SCHWARZ, E. M. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 25, n. 1, p. 19-33, Aug 2003. ISSN 0344-4325 (Print)

0344-4325 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904889>>.

LI, P. et al. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 2, p. 207-13, Feb 2004. ISSN 0884-0431 (Print)

0884-0431 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969390>>.

LI, Y. et al. Intranasal immunization with recombinant Lactococci carrying human papillomavirus E7 protein and mouse interleukin-12 DNA induces E7-specific antitumor effects in C57BL/6 mice. **Oncol Lett**, v. 7, n. 2, p. 576-582, Feb 2014. ISSN 1792-1074 (Print)

1792-1074 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396491>>.

LI, Z.; MENORET, A.; SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. **Curr Opin Immunol**, v. 14, n. 1, p. 45-51, Feb 2002. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790532>>.

LIN, J. et al. Increased generation of Foxp3(+) regulatory T cells by manipulating antigen presentation in the thymus. **Nat Commun**, v. 7, p. 10562, 2016. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923114>>.

LINA, C. et al. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 4, p. 596-605, Aug 2011. ISSN 1573-2592 (Electronic)

0271-9142 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562776>>.

LITTMAN, D. R.; PAMER, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 4, p. 311-23, Oct 20 2011. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018232>>.

LITWIN, S. D.; SINGER, J. M. Studies of the Incidence and Significance of Anti-Gamma Globulin Factors in the Aging. **Arthritis Rheum**, v. 8, p. 538-50, Aug 1965. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14323543>>.

LIU, K. F. et al. Oral administration of Lactococcus lactis-expressing heat shock protein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. **Immunol Lett**, v. 174, p. 28-36, Jun 2016. ISSN 1879-0542 (Electronic)

0165-2478 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27085380>>.

LIU, M. F. et al. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 3, p. 312-7, Sep 2005. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179019>>.

LONDEI, M. et al. Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 2, p. 636-40, Jan 1989. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463633>>.

LOPETUSO, L. R. et al. Bacillus clausii and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 8, p. 943-8, Aug 2016. ISSN 1747-4132 (Electronic)

1747-4124 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291780>>.

LUERCE, T. D. et al. Anti-inflammatory effects of Lactococcus lactis NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut Pathog**, v. 6, p. 33, 2014. ISSN 1757-4749 (Electronic).

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110521>>.

MA, Y. et al. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105701, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157497>>.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Human Colonic Microbiota: Ecology, Physiology and Metabolic Potential of Intestinal Bacteria. **Scand J Gastroenterol**, v. 32 Suppl 222, p. 3-9, 1997. ISSN 0036-5521 (Print) 0036-5521 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035182>>.

_____. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. **J AOAC Int**, v. 95, n. 1, p. 50-60, Jan-Feb 2012. ISSN 1060-3271 (Print) 1060-3271 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468341>>.

MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 1, p. 11-22, Jan 2008. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079156>>.

MADI, A. et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 34, p. 14484-9, Aug 25 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667184>>.

MAEDA, Y. et al. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. **Arthritis Rheumatol**, Jun 22 2016. ISSN 2326-5205 (Electronic) 2326-5191 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27333153>>.

MANDEL, D. R.; EICHAS, K.; HOLMES, J. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. **BMC Complement Altern Med**, v. 10, p. 1, 2010. ISSN 1472-6882 (Electronic) 1472-6882 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067641>>.

MARESZ, K. J. et al. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). **PLoS Pathog**, v. 9, n. 9, p. e1003627, Sep 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068934>>.

MARON, R. et al. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1708-15, Sep 24 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270867>>.

MARSHALL, D. A.; HUNTER, J. A.; CAPELL, H. A. Double blind, placebo controlled study of metronidazole as a disease modifying agent in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 51, n. 6, p. 758-60, Jun 1992. ISSN 0003-4967 (Print)

0003-4967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616359>>.

MAURI, C. et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. **J Exp Med**, v. 197, n. 4, p. 489-501, Feb 17 2003. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591906>>.

MAZMANIAN, S. K. Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 46 Suppl 1, p. E11-2, Apr 2008. ISSN 1536-4801 (Electronic)

0277-2116 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354314>>.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107-18, Jul 15 2005. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009137>>.

MCGOVERN, J. L. et al. Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 10, p. 3129-38, Oct 2012. ISSN 1529-0131 (Electronic)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674488>>.

MCINNIS, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752>>.

_____. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, Dec 8 2011. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150039>>.

MCKOWN, K. M. et al. Lack of efficacy of oral bovine type II collagen added to existing therapy in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 6, p. 1204-8, Jun 1999. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366113>>.

MCMICHAEL, A. J. et al. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 20, n. 5, p. 1037-42, Jun 1977. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/869952>>.

MENARD, S. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**, v. 53, n. 6, p. 821-828, 2004. ISSN 0017-5749.

MENEZES, J. S. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**, v. 15, n. 3, p. 447-55, Mar 2003. ISSN 0953-8178 (Print)
0953-8178 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618489>>.

MERCADANTE, A. C. et al. Oral combined therapy with probiotics and alloantigen induces B cell-dependent long-lasting specific tolerance. **J Immunol**, v. 192, n. 4, p. 1928-37, Feb 15 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453248>>.

MIA, M. Y. et al. The dynamics of articular leukocyte trafficking and the immune response to self heat-shock protein 65 influence arthritis susceptibility. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 5, p. 420-31, Sep 2008. ISSN 0271-9142 (Print)
0271-9142 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481159>>.

MILLER, A.; LIDER, O.; WEINER, H. L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. **J Exp Med**, v. 174, n. 4, p. 791-8, Oct 1 1991. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717632>>.

MILLETTE, M.; LUQUET, F. M.; LACROIX, M. In vitro growth control of selected pathogens by Lactobacillus acidophilus- and Lactobacillus casei-fermented milk. **Lett Appl Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 314-9, Mar 2007. ISSN 0266-8254 (Print)

0266-8254 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309510>>.

MIN, S. Y. et al. Induction of IL-10-producing CD4+CD25+ T cells in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 3, p. R213-9, 2004. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142267>>.

MIN, S. Y. et al. Antigen-induced, tolerogenic CD11c+,CD11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 3, p. 887-98, Mar 2006. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508971>>.

MIRENDA, V. et al. Tolerant T cells display impaired trafficking ability. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 7, p. 2146-56, Jul 2005. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948215>>.

MIYAGAKI, T.; FUJIMOTO, M.; SATO, S. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. **Int Immunol**, v. 27, n. 10, p. 495-504, Oct 2015. ISSN 1460-2377 (Electronic)

0953-8178 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957264>>.

MIYOSHI, A. et al. A xylose-inducible expression system for Lactococcus lactis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 239, n. 2, p. 205-12, Oct 15 2004. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476967>>.

MIYOSHI, A. et al. Controlled production of stable heterologous proteins in Lactococcus lactis. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 6, p. 3141-6, Jun 2002. ISSN 0099-2240 (Print)

0099-2240 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039780>>.

MOEN, K. et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. **Clin Exp Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 656-63, Nov-Dec 2006. ISSN 0392-856X (Print)

0392-856X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207381>>.

MONACH, P. A.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The role of antibodies in mouse models of rheumatoid arthritis, and relevance to human disease. **Adv Immunol**, v. 82, p. 217-48, 2004. ISSN 0065-2776 (Print)

0065-2776 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14975258>>.

MONACH, P. A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. The K/BxN arthritis model. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 15, p. Unit 15 22, May 2008. ISSN 1934-368X (Electronic)

1934-3671 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491295>>.

MORADI, B. et al. CD4(+)CD25(+)/highCD127low/(-) regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints--analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 2, p. R97, 2014. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24742142>>.

MORGAN, M. E. et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 7, p. 2212-21, Jul 2005. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986351>>.

MOSMANN, T. R. Role of a new cytokine, interleukin-10, in the cross-regulation of T helper cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 628, p. 337-44, 1991. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648883>>.

MOTTONEN, M. et al. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol**, v. 140, n. 2, p. 360-7, May 2005. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807863>>.

MOUDGIL, K. D.; DURAI, M. Regulation of autoimmune arthritis by self-heat-shock proteins. **Trends Immunol**, v. 29, n. 9, p. 412-8, Sep 2008. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675587>>.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 331-41, Apr 2003. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669023>>.

MOWAT, A. M. et al. Oral tolerance: overview and historical perspectives. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1029, p. 1-8, Dec 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806729>>.

MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1923-33, Jul 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937545>>.

NADKARNI, S.; MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. **J Exp Med**, v. 204, n. 1, p. 33-9, Jan 22 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200409>>.

NAGATANI, K. et al. Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1481-9, Feb 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424176>>.

NAGLER-ANDERSON, C. et al. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 19, p. 7443-6, Oct 1986. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3463976>>.

NARUSHIMA, S. et al. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. **Gut Microbes**, v. 5, n. 3, p. 333-9, May-Jun 2014. ISSN 1949-0984 (Electronic)

1949-0976 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642476>>.

NEMAZEE, D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 728-40, Oct 2006. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998507>>.

NEUMANN, V. C. et al. Effects of sulphasalazine on faecal flora in patients with rheumatoid arthritis: a comparison with penicillamine. **Br J Rheumatol**, v. 26, n. 5, p. 334-7, Oct 1987. ISSN 0263-7103 (Print)

0263-7103 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2889501>>.

NG, D. T.; SARKAR, C. A. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000. **Biotechnol Bioeng**, v. 108, n. 8, p. 1987-96, Aug 2011. ISSN 1097-0290 (Electronic)
0006-3592 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391210>>.

NIE, H. et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 19, n. 3, p. 322-8, Mar 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396208>>.

NIELEN, M. M. et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 2, p. 380-6, Feb 2004. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872479>>.

NIESS, J. H. et al. Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. **J Immunol**, v. 180, n. 1, p. 559-68, Jan 1 2008. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097058>>.

NIEUWENHUIS, E. E. et al. Oral antibiotics as a novel therapy for arthritis: evidence for a beneficial effect of intestinal *Escherichia coli*. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 11, p. 2583-9, Nov 2000. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083284>>.

NIKI, Y. et al. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. **J Clin Invest**, v. 107, n. 9, p. 1127-35, May 2001. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342576>>.

NIU, Q. et al. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 9, p. 2731-6, Sep 2012. ISSN 1437-160X (Electronic)
0172-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809006>>.

NOTLEY, C. A. et al. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 1, p. 171-8, Jan 2010. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039431>>.

NOTO LLANA, M. et al. Consumption of Lactobacillus casei fermented milk prevents Salmonella reactive arthritis by modulating IL-23/IL-17 expression. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82588, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24340048>>.

NUSSBAUM, G. et al. Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. **Int Immunol**, v. 18, n. 10, p. 1413-9, Oct 2006. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893923>>.

O'CONNOR, R. A.; TAAMS, L. S.; ANDERTON, S. M. Translational mini-review series on Th17 cells: CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell-mediated regulation. **Clin Exp Immunol**, v. 159, n. 2, p. 137-47, Feb 2010. ISSN 1365-2249 (Electronic)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912249>>.

OCHI, H. et al. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. **Nat Med**, v. 12, n. 6, p. 627-35, Jun 2006. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715091>>.

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **J Immunol Methods**, v. 421, p. 36-43, Jun 2015. ISSN 1872-7905 (Electronic)

0022-1759 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707356>>.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 3, p. 232-9, May 2012. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318493>>.

PABST, R.; RUSSELL, M. W.; BRANDTZAEG, P. Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. **Trends Immunol**, v. 29, n. 5, p. 206-8; author reply 209-10, May 2008. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394963>>.

PALEOLOG, E. M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S81-90, 2002. ISSN 1465-9905 (Print)
1465-9905 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110126>>.

PALLOTTA, M. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 12, n. 9, p. 870-8, Sep 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804557>>.

PARK, M. J. et al. Transforming growth factor beta-transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 6, p. 1668-80, Jun 2011. ISSN 1529-0131 (Electronic)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21384335>>.

PAULA-SILVA, J. et al. Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. **Br J Nutr**, v. 113, n. 6, p. 935-43, Mar 28 2015. ISSN 1475-2662 (Electronic)
0007-1145 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759975>>.

PAUST, S. et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 28, p. 10398-403, Jul 13 2004. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235129>>.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 91, n. 1, p. 95-101, Jan 1956. ISSN 0037-9727 (Print)
0037-9727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13297719>>.

PESSI, T. et al. Suppression of T-cell activation by Lactobacillus rhamnosus GG-degraded bovine casein. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 2, p. 211-8, Feb 2001. ISSN 1567-5769 (Print)
1567-5769 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11360922>>.

PETRELLI, A.; VAN WIJK, F. CD8(+) T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 7, p. 421-8, Jul 2016. ISSN 1759-4804 (Electronic)

1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256711>>.

PHILLIPS, R. Rheumatoid arthritis: Microbiome reflects status of RA and response to therapy. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 9, p. 502, Sep 2015. ISSN 1759-4804 (Electronic) 1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241185>>.

PINEDA MDE, L. et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 6, p. CR347-54, Jun 2011. ISSN 1643-3750 (Electronic)

1234-1010 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629190>>.

POCKLEY, A. G.; MUTHANA, M.; CALDERWOOD, S. K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 33, n. 2, p. 71-9, Feb 2008. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182297>>.

PRAKKEN, B. J. et al. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, n. 1, p. 47-63, 2003. ISSN 0344-4325.

PRAKKEN, B. J. et al. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 7, p. 1937-46, Jul 2002. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124879>>.

PRAKKEN, B. J. et al. Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3284-9, Apr 1 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096385>>.

PUSZCZEWICZ, M.; IWASZKIEWICZ, C. Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. **Arch Med Sci**, v. 7, n. 2, p. 189-94, Apr 2011. ISSN 1896-9151 (Electronic)

1734-1922 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291756>>.

QUINTANA, F. J. et al. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3422-8, Sep 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218165>>.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. DNA vaccines coding for heat-shock proteins (HSPs): tools for the activation of HSP-specific regulatory T cells. **Expert Opin Biol Ther**, v. 5, n. 4, p. 545-54, Apr 2005a. ISSN 1744-7682 (Electronic)

1471-2598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15934832>>.

_____. Heat Shock Proteins as Endogenous Adjuvants in Sterile and Septic Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 2777-2782, 2005b. ISSN 0022-1767

1550-6606.

_____. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. **J Immunol**, v. 175, n. 5, p. 2777-82, Sep 1 2005c. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116161>>.

_____. The HSP60 immune system network. **Trends Immunol**, v. 32, n. 2, p. 89-95, Feb 2011. ISSN 1471-4981 (Electronic)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145789>>.

QUINTANA, F. J. et al. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 48, p. 18889-94, Dec 2 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028871>>.

QUINTANA, F. J. et al. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101 Suppl 2, p. 14615-21, Oct 5 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308778>>.

RAJAIAH, R.; MOUDGIL, K. D. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 5, p. 388-93, Mar 2009. ISSN 1873-0183 (Electronic)

1568-9972 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121415>>.

RAMESH, R. et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. **J Exp Med**, v. 211, n. 1, p. 89-104, Jan 13 2014. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24395888>>.

RANGEL-COLMENERO, B. R. et al. Enhancement of Ad-CRT/E7-mediated antitumor effect by preimmunization with *L. lactis* expressing HPV-16 E7. **Viral Immunol**, v. 27, n. 9, p. 463-7, Nov 2014. ISSN 1557-8976 (Electronic)

0882-8245 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216057>>.

RAZ, I. et al. Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, n. 4, p. 292-8, May 2007. ISSN 1520-7552 (Print)

1520-7552 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124720>>.

REHAUME, L. M. et al. ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 10, p. 2780-92, Oct 2014. ISSN 2326-5205 (Electronic)

2326-5191 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048686>>.

REN, C. et al. Modulation of peanut-induced allergic immune responses by oral lactic acid bacteria-based vaccines in mice. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 14, p. 6353-64, 2014. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770368>>.

RESCIGNO, M.; DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. **J Clin Invest**, v. 119, n. 9, p. 2441-50, Sep 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729841>>.

REZENDE, R. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. **Journal of autoimmunity**, v. 40, p. 45-57, 2013. ISSN 0896-8411. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.012> >.

REZENDE, R. M. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. **J Autoimmun**, v. 40, p. 45-57, Feb 2013. ISSN 1095-9157 (Electronic) 0896-8411 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939403> >.

RIBELLES, P. et al. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 3, p. 1231-9, Feb 2013. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212671> >.

ROBERT, S. et al. Trimming of two major type 1 diabetes driving antigens, GAD65 and IA-2, allows for successful expression in *Lactococcus lactis*. **Benef Microbes**, v. 6, n. 4, p. 591-601, 2015. ISSN 1876-2891 (Electronic) 1876-2883 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25576592> >.

RODRIGUEZ-NARCISO, C. et al. Expression of *Mycobacterium leprae* HSP65 in tobacco and its effectiveness as an oral treatment in adjuvant-induced arthritis. **Transgenic Res**, v. 20, n. 2, p. 221-9, Apr 2011. ISSN 1573-9368 (Electronic) 0962-8819 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526808> >.

ROLL, P.; DORNER, T.; TONY, H. P. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 6, p. 1566-75, Jun 2008. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512772> >.

ROSLONIEC, E. F. et al. Crystallographic structure of a rheumatoid arthritis MHC susceptibility allele, HLA-DR1 (DRB1*0101), complexed with the immunodominant determinant of human type II collagen. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3884-92, Sep 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951351> >.

ROSLONIEC, E. F. et al. Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis. **Cell Immunol**, v. 172, n. 1, p. 21-8, Aug 25 1996. ISSN 0008-8749 (Print) 0008-8749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806802>>.

ROSSI, O. et al. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. **Sci Rep**, v. 6, p. 18507, 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725514>>.

ROSSINI, M. et al. Focal bone involvement in inflammatory arthritis: the role of IL17. **Rheumatol Int**, v. 36, n. 4, p. 469-82, Apr 2016. ISSN 1437-160X (Electronic) 0172-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26521079>>.

ROUVIO, O. et al. Self HSP60 peptide serves as an immunogenic carrier for a CTL epitope against persistence of murine cytomegalovirus in the salivary gland. **Vaccine**, v. 23, n. 27, p. 3508-18, May 20 2005. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855009>>.

RUIZ, L. et al. Proteinaceous Molecules Mediating Bifidobacterium-Host Interactions. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1193, 2016. ISSN 1664-302X (Electronic) 1664-302X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27536282>>.

RUSSO, M. et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 24, n. 5, p. 518-26, May 2001. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350820>>.

SAEZ-LARA, M. J. et al. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 505878, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793197>>.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455-8, May 26 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850488>>.

SAKAGUCHI, S. et al. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. **J Exp Med**, v. 161, n. 1, p. 72-87, Jan 1 1985. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3871469>>.

SAKAGUCHI, S. et al. 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**, v. 155, n. 3, p. 1151-64, Aug 1 1995. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>>.

SAKAGUCHI, S.; TAKAHASHI, T.; NISHIZUKA, Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. **J Exp Med**, v. 156, n. 6, p. 1577-86, Dec 1 1982. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6983558>>.

SANCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota and their influence on host health and disease. **Mol Nutr Food Res**, Aug 8 2016. ISSN 1613-4133 (Electronic) 1613-4125 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27500859>>.

SAOOUAF, S. J. et al. Deacetylase inhibition increases regulatory T cell function and decreases incidence and severity of collagen-induced arthritis. **Exp Mol Pathol**, v. 87, n. 2, p. 99-104, Oct 2009. ISSN 1096-0945 (Electronic) 0014-4800 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577564>>.

SARAIVA, T. D. et al. Milk fermented with a 15-lipoxygenase-1-producing *Lactococcus lactis* alleviates symptoms of colitis in a murine model. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 5, p. 424-9, 2015. ISSN 1873-4316 (Electronic) 1389-2010 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395213>>.

SATO, K. et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2673-82, Nov 27 2006. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088434>>.

SATPUTE, S. R. et al. Tolerization with Hsp65 induces protection against adjuvant-induced arthritis by modulating the antigen-directed interferon-gamma, interleukin-17, and antibody responses. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 1, p. 103-13, Jan 2009. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19116924>>.

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, v. 2, p. e01202, 2013. ISSN 2050-084X (Electronic)

2050-084X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192039>>.

SCHUBERT, D. et al. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4503-9, Apr 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034067>>.

SCHULZ, O. et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 3101-14, Dec 21 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008524>>.

SCHWARTZ, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 327-30, Apr 2005. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785757>>.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nat Immunol**, v. 4, n. 9, p. 835-42, Sep 2003. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12942084>>.

SEGAL, L. N. et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. **Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 19, 2013. ISSN 2049-2618 (Electronic)

2049-2618 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450871>>.

SELMI, C.; DE SANTIS, M.; GERSHWIN, M. E. Liver involvement in subjects with rheumatic disease. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, p. 226, 2011. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722332>>.

SEMPERE-ORTELLS, J. M. et al. Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity score-28. **Autoimmunity**, v. 42, n. 8, p. 636-45, 2009. ISSN 1607-842X (Electronic)

0891-6934 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886735>>.

SHAW, T.; QUAN, J.; TOTORITIS, M. C. B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. **Ann Rheum Dis**, v. 62 Suppl 2, p. ii55-9, Nov 2003. ISSN 0003-4967 (Print)

0003-4967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532151>>.

SHEVACH, E. M.; THORNTON, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. **Immunol Rev**, v. 259, n. 1, p. 88-102, May 2014. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712461>>.

SHINEBAUM, R. et al. Comparison of faecal flora in patients with rheumatoid arthritis and controls. **Br J Rheumatol**, v. 26, n. 5, p. 329-33, Oct 1987. ISSN 0263-7103 (Print)

0263-7103 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2889500>>.

SHINY, C. et al. Recombinant Wolbachia heat shock protein 60 (HSP60) mediated immune responses in patients with lymphatic filariasis. **Microbes Infect**, v. 13, n. 14-15, p. 1221-31, Dec 2011. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827871>>.

SIEPER, J. et al. Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 1, p. 41-51, Jan 1996. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546737>>.

SINGH, N. et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 128-39, Jan 16 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412617>>.

SMITH, P. M. et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 569-73, Aug 2 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828891>>.

SMOLEN, J. S.; EMERY, P. Infliximab: 12 years of experience. **Arthritis Res Ther**, v. 13 Suppl 1, p. S2, 2011. ISSN 1478-6362 (Electronic)
1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624181>>.

SO, J. S. et al. Lactobacillus casei suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. **Mol Immunol**, v. 45, n. 9, p. 2690-9, May 2008. ISSN 0161-5890 (Print)
0161-5890 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243320>>.

SO, J. S. et al. Lactobacillus casei potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. **Mol Immunol**, v. 46, n. 1, p. 172-80, Nov 2008. ISSN 0161-5890 (Print)
0161-5890 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804867>>.

SOLT, L. A. et al. Identification of a selective RORgamma ligand that suppresses T(H)17 cells and stimulates T regulatory cells. **ACS Chem Biol**, v. 7, n. 9, p. 1515-9, Sep 21 2012. ISSN 1554-8937 (Electronic)
1554-8929 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22769242>>.

SONG, F. et al. The thymus plays a role in oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1500-9, Aug 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849456>>.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 185-94, Mar 2002. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11913069>>.

STEIDLER, L. Genetically engineered probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 861-876, 2003. ISSN 15216918.

STEIDLER, L.; ROTTIERS, P. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1072, p. 176-86, Aug 2006. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057198>>.

STUART, J. M.; DIXON, F. J. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. **J Exp Med**, v. 158, n. 2, p. 378-92, Aug 1 1983. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6886622>>.

STUART, J. M. et al. Serum transfer of collagen-induced arthritis. II. Identification and localization of autoantibody to type II collagen in donor and recipient rats. **Arthritis Rheum**, v. 26, n. 10, p. 1237-44, Oct 1983. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6626283>>.

SU, D. et al. Tc-methylene diphosphonate improves rheumatoid arthritis disease activity by increasing the frequency of peripheral gammadelta T cells and CD4 CD25 Foxp3 Tregs. **Int J Rheum Dis**, Jan 28 2014. ISSN 1756-185X (Electronic)

1756-1841 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467668>>.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 4, p. 631-59, Feb 2013. ISSN 1420-9071 (Electronic)

1420-682X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782113>>.

TAKIISHI, T. et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 5, p. 1717-25, May 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484814>>.

TANEJA, V. et al. New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 1, p. 69-78, Jan 2007. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195209>>.

TENGVAL, S. et al. Gene Therapy Induces Antigen-Specific Tolerance in Experimental Collagen-Induced Arthritis. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154630, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159398>>.

TERATO, K. et al. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. **J Immunol**, v. 148, n. 7, p. 2103-8, Apr 1 1992. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545120>>.

THOME, R. et al. Oral tolerance and OVA-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. **Cell Immunol**, v. 280, n. 1, p. 113-23, Nov 2012. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298866>>.

THOMPSON, S. J. et al. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur J Immunol**, v. 20, n. 11, p. 2479-84, Nov 1990. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253686>>.

THOMPSON, S. J. et al. Prevention of pristane-induced arthritis by the oral administration of type II collagen. **Immunology**, v. 79, n. 1, p. 152-7, May 1993. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509136>>.

TIMMERMAN, H. M. et al. Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. **Int J Food Microbiol**, v. 96, n. 3, p. 219-33, Nov 15 2004. ISSN 0168-1605 (Print) 0168-1605 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454313>>.

TOIVANEN, P.; VAAHTOVUO, J.; EEROLA, E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2372-7, Apr 2001. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254595>>.

TRENTHAM, D. E. et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. **Science**, v. 261, n. 5129, p. 1727-30, Sep 24 1993. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8378772>>.

TRENTHAM, D. E.; DYNESIUS, R. A.; DAVID, J. R. Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats. **J Clin Invest**, v. 62, n. 2, p. 359-66, Aug 1978. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27533>>.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J Exp Med**, v. 146, n. 3, p. 857-68, Sep 1 1977. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/894190>>.

TROMPETTE, A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nat Med**, v. 20, n. 2, p. 159-66, Feb 2014. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390308>>.

VAAHTOVIUO, J. et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 35, n. 8, p. 1500-5, Aug 2008. ISSN 0315-162X (Print)

0315-162X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528968>>.

VAGHEF-MEHRABANY, E. et al. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 430-5, Apr 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic)

0899-9007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355439>>.

VAN DEN BERG, W. B. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. 250, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849822>>.

VAN DEN BROEK, M. F. et al. Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. **J Exp Med**, v. 170, n. 2, p. 449-66, Aug 1 1989. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2787830>>.

VAN DER ZEE, R. et al. Efficient mapping and characterization of a T cell epitope by the simultaneous synthesis of multiple peptides. **Eur J Immunol**, v. 19, n. 1, p. 43-7, Jan 1989. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2465904>>.

VAN EDEN, W. et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. **Nature**, v. 331, n. 6152, p. 171-3, Jan 14 1988. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448638>>.

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 4, p. 318-30, Apr 2005. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803151>>.

VAN, W.; VAN, L. Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice. **Journal of Clinical ...**, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC425365/>>.

VANDENBROUCKE, K. et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 1, p. 49-56, Jan 2010. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1935-3456 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794409>>.

VANDENBROUCKE, K. et al. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 502-13, Aug 2004. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300583>>.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J Allergy Clin Immunol**, v. 60, n. 2, p. 110-5, Aug 1977. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874210>>.

VERCOULEN, Y. et al. Heat shock protein 60 reactive T cells in juvenile idiopathic arthritis: what is new? **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 3, p. 231, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6362 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519922>>.

WAN, L. Y. et al. Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 56, n. 16, p. 2628-41, Dec 9 2016. ISSN 1549-7852 (Electronic)

1040-8398 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25629818>>.
WANG, K. Y. et al. Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 3, p. 737-41, Sep 2004. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321816>>.

WANG, M. et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 13, p. 5691-701, Jul 2016. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27154346>>.

WANG, Z. et al. Oral immunization with recombinant Lactococcus lactis expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus induces mucosal and systemic immune responses. **Future Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 1003-10, Aug 2012. ISSN 1746-0921 (Electronic)

1746-0913 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913358>>.

WATTERLOT, L. et al. Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant Lactobacillus casei BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. **Int J Food Microbiol**, v. 144, n. 1, p. 35-41, Nov 15 2010. ISSN 1879-3460 (Electronic)

0168-1605 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452077>>.

WEHRENS, E. J. et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3538-48, Sep 29 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828127>>.

WEINER, H. L. Oral Tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 23, p. 10762-10765, Nov 8 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994PQ93800002>.

_____. Induction of oral tolerance to the acetylcholine receptor for treatment of myasthenia gravis. **J Clin Invest**, v. 104, n. 12, p. 1667-8, Dec 1999. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606618>>.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 241, n. 1, p. 241-59, May 2011. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488901>>.

WEINER, H. L. et al. Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, v. 48, n. 4, p. 567-79, Oct 2000. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11026440>>.

WILDNER, G.; THURAU, S. R. Orally induced bystander suppression in experimental autoimmune uveoretinitis occurs only in the periphery and not in the eye. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 5, p. 1292-7, May 1995. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774632>>.

WOOLEY, P. H. et al. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis Rheum**, v. 32, n. 8, p. 1022-30, Aug 1989. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765002>>.

WOOLEY, P. H. et al. Pristane-induced arthritis in mice. V. Susceptibility to pristane-induced arthritis is determined by the genetic regulation of the T cell repertoire. **Arthritis Rheum**, v. 41, n. 11, p. 2022-31, Nov 1998. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811058>>.

WORBS, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 519-27, Mar 20 2006. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533884>>.

WRIGHT, G. P. et al. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 45, p. 19078-83, Nov 10 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884493>>.

WU, C. T. et al. Serum heat shock protein 60 can predict remission of flare-up in juvenile idiopathic arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 30, n. 7, p. 959-65, Jul 2011. ISSN 1434-9949 (Electronic)

0770-3198 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340498>>.

WU, H. J. et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. **Immunity**, v. 32, n. 6, p. 815-27, Jun 25 2010. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620945>>.

WYSZYNSKA, A. et al. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 7, p. 2967-77, Apr 2015. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750046>>.

XIAO, X. et al. Genome-wide association studies and gene expression profiles of rheumatoid arthritis: An analysis. **Bone Joint Res**, v. 5, n. 7, p. 314-9, Jul 2016. ISSN 2046-3758 (Electronic)

2046-3758 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27445359>>.

YOSHINO, S. Downregulation of silicone-induced chronic arthritis by gastric administration of type II collagen. **Immunopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 103-8, Nov 1995. ISSN 0162-3109 (Print)

0162-3109 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8655286>>.

YOSHITOMI, H.; SAKAGUCHI, S. [SKG mice as a model of RA]. **Nihon Rinsho**, v. 63 Suppl 1, p. 40-5, Jan 2005. ISSN 0047-1852 (Print)

0047-1852 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15799315>>.

YUAN, X.; CHENG, G.; MALEK, T. R. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. **Immunol Rev**, v. 259, n. 1, p. 103-14, May 2014. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712462>>.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3227-36, Mar 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749853>>.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 2022-32, Jul 2006. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767222>>.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **FASEB J**, v. 17, n. 11, p. 1567-9, Aug 2003. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824285>>.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 276-85, Jul 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972659>>.

ZARE, H. R. et al. Patients with Active Rheumatoid Arthritis Have Lower Frequency of nTregs in Peripheral Blood. **Iran J Immunol**, v. 12, n. 3, p. 166-75, Sep 2015. ISSN 1735-367X (Electronic)

1735-1383 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412635>>.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nat Med**, v. 21, n. 8, p. 895-905, Aug 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214836>>.

ZHANG, Z. H. et al. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1(19). **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 44, p. 6975-80, Nov 28 2005. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437602>>.

ZHAO, D. M. et al. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 3925-32, May 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418326>>.

ZHAO, J. et al. Mucosal administration of an altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulatory T cells. **Rheumatol Int**, v. 29, n. 1, p. 9-16, Nov 2008. ISSN 0172-8172 (Print)

0172-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600328>>.

ZHOU, J. et al. Synthetic peptides from heat-shock protein 65 inhibit proinflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 41, n. 1, p. 67-72, Jan 2014. ISSN 1440-1681 (Electronic)

0305-1870 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111596>>.

ZHU, P. et al. Oral administration of type-II collagen peptide 250-270 suppresses specific cellular and humoral immune response in collagen-induced arthritis. **Clin Immunol**, v. 122, n. 1, p. 75-84, Jan 2007. ISSN 1521-6616 (Print)

1521-6616 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045846>>.

ZONNEVELD-HUIJSSOON, E. et al. Heat shock protein bystander antigens for peptide immunotherapy in autoimmune disease. **Clin Exp Immunol**, v. 171, n. 1, p. 20-9, Jan 2013. ISSN 1365-2249 (Electronic)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199319>>.

ZONNEVELD-HUIJSSOON, E. et al. TLR9 agonist CpG enhances protective nasal HSP60 peptide vaccine efficacy in experimental autoimmune arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 10, p. 1706-15, Oct 2012. ISSN 1468-2060 (Electronic)

0003-4967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562976>>.