Aline Ignacio de Mattos

**Participação do complexo 2 da via mTOR (mTORC2) na
função de células dendríticas da lâmina própria durante a
inflamação intestinal**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

**São Paulo
2019**

Aline Ignacio de Mattos

**Participação do complexo 2 da via mTOR (mTORC2) na
função de células dendríticas da lâmina própria durante a
inflamação intestinal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia
Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Versão original

**São Paulo
2019**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ignacio de Mattos, Aline

Participação do complexo 2 da via mTOR (mTORC2)
na função de células dendríticas da lâmina própria
durante a inflamação intestinal / Aline Ignacio de
Mattos; orientador Niels Olsen Saraiva Câmara. --
São Paulo, 2019.

p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células dendríticas. 2. Intestino. 3. Via
mTOR. 4. Inflamação. 5. Microbiota. I. Olsen Saraiva
Câmara, Niels, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **48** nas fls. **18** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Niels Olsen Saraiva Camara**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Influência da microbiota intestinal residente sob a via mTOR em células dendríticas no modelo de colite ulcerativa aguda experimental*" do qual participam o(s) aluno(s) **Aline Ignacio Silvestre da Silva**, Especialista de Laboratório **Meire Ioshie Hiyane**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **07.05.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 09 de maio de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA.054.2018

São Paulo, 07 de maio de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Influência da microbiota intestinal residente sob a via mTOR em células dendríticas no modelo de colite ulcerativa aguda experimental*", registrado sob o protocolo nº 48/2014 e aprovado em 07/05/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 07/05/2022**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	C57Bl/6J	Macho	20-28 g	1º: 50 2º: 50 3º: 60 4º:

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Niels Olsen Saraiva Camara**
Departamento de **Imunologia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Às minhas famílias Ignacio e de Mattos.
Que alegria poder dividir com vocês mais uma etapa concluída!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e ao meu anjo da guarda, pela vida cheia de saúde e proteção.

Ao meu melhor amigo, meu companheiro, meu marido Pedro. Seu apoio incondicional e suas injeções de ânimo quando eu não tive me deram forças para eu chegar até aqui. Sou e serei eternamente grata por toda confiança que você coloca em mim, me impulsionando sempre a querer mais da vida e mais para nós. A isso tudo o que você me dá não existe outra palavra senão *“amor”*.

À minha amada irmã Cynthia por todo apoio e amor. *“Nossa família sempre é assim, maior que a humanidade”* (Mia Couto).

À minha mãe Regina que sempre nos ensinou que a única coisa que nunca perdemos é aquilo que aprendemos.

À minha Má, nossa Má, que sempre foi nossa mãe, nossa vó, nosso exemplo. Maior que o privilégio de receber seu amor é poder te amar em retribuição

Aos meus amados padrinhos Egle e Douglas que sempre foram verdadeiros segundos pais para mim.

Ao Niels por todas as oportunidades, confiança e incentivo. Por todo “espaço” que me permitiu me descobrir e crescer como profissional em uma nova área, deixando que eu construísse mais um pedaço do que sou hoje.

À minha querida amiga Tati. Obrigada por toda ajuda nos experimentos, por ter doado diversas vezes minutos do seu dia (e quantos foram!) para discussão de resultados e experimentos futuros. Por essa doação sempre sincera e amiga.

À Cris Aguiar com quem tive o prazer de dividir parte do meu doutorado. Obrigada por toda ajuda nos experimentos e discussões.

À Fer Terra por estar sempre disposta a ajudar, por toda dedicação e amizade sincera.

Aos antigos membros do LIT Mary, Angela, e Zidane pela ajuda nos experimentos e contribuições nas reuniões do lab.

Às minhas amigas do peito Flávia, Cris Naffah e Amanda. “Migas suas lokas” foi muito bom viver essa montanha russa que é o doutorado junto de vocês!

Às antigas LITianas Marina Burgos e Lis pela companhia até altas horas no lab, fazendo essas horas nem serem tão altas assim. Obrigada pelo aprendizado e amizade.

Ainda aos antigos membros do lab Tércio, Felipe, Marcela, Victor, Reinaldo, Thiago, Rafael, Raquel, Guilherme e Marina Macedo, e aos atuais membros Camila, Paulo,

Matheus, Marcella, Bruno, Jean, Omar, Adalberto, Nathalia Hiromi, Nathalia Tejada, Barbarinha e Mariana pelo companheirismo e por fazerem do lab um ambiente bom de se trabalhar.

À Meire por seu trabalho, seu enorme coração, por abrir tantas vezes sua casa para nossas comemorações, despedidas, recepções que também trazem uma unidade ao nosso grupo.

À Claudinha e a Greice, pela ajuda no laboratório durante boa parte desse trabalho, e agora à Thay por toda ajuda.

Ao Prof. Mario Julio e à Viviane Nakano, que mesmo não sendo mais meus orientadores sempre torceram por mim, me dando seu apoio no que fosse preciso.

Aos colegas do LICE Felizardo, Luis, Ingrid, Juan, Amandda e Marcos pela companheirismo e momentos de descontração.

Aos funcionários do CEFAP, em especial ao Mário e à Jô, pela atenção com os experimentos.

Ao Paulo Albe, pela confecção das lâminas.

À Eni, pela ajuda com todos os assuntos da pós-graduação.

Ao pessoal da portaria, em especial Milton e Otacílio.

Ao pessoal da limpeza, em especial à Salete, por seu empenho e alegria diários.

I'm thankful for the time I experienced at University of Calgary. I thank Dr. Kathy McCoy for having me at her lab and all the knowledge she shared. I also thank Dr. Markus Geuking and both lab members Kirsty, Madalaine, Lukas, Carolyn, Regula, Mia and Noah for the suggestions at the lab meetings and all the kind moments. I thank to Mike, Candance and Nathan for the help at the lab and in the germ-free facility.

Aos colegas da pós-graduação pelo convívio durante as disciplinas.

Aos professores e funcionários do ICB-IV.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“A felicidade aparece para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam em nossa vida”. Clarice Lispector

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia dos Transplantes, no ICB-IV da Universidade de São Paulo recebeu apoio financeiro da CAPES e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo: 2014/09450-7

*“Não é segurando as asas que se ajuda
um pássaro a voar.
O pássaro voa simplesmente
porque o deixam ser pássaro.”*

Mia Couto

RESUMO

IGNACIO, Aline. **Participação do complexo 2 da via mTOR (mTORC2) sob as funções de células dendríticas intestinais no modelo de inflamação intestinal**. 2019. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As células dendríticas (DC) da lâmina própria constituem um grupo heterogêneo de células essenciais na homeostase do intestino. Nos últimos anos, estudos vêm mostrando participação do complexo mTORC2 na regulação de células da imunidade inata. Desta forma, usando animais deficientes em mTORC2 nas DCs nós investigamos o papel deste complexo sob a funções das DCs num modelo de colite ulcerativa. Observamos que a ausência de mTORC2 nas DCs diminui a inflamação intestinal e prejudica a migração dessas células para os linfonodos. Consequentemente, estes animais também apresentam redução no número de linfócitos Th17, Treg e T CD8+IFN γ +. Estes resultados parecem ser independentes da composição da microbiota intestinal. *In vitro*, células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) deficientes em mTORC2 não mostraram deficiência na regulação positiva de CD80 e MHC-II quando estimuladas, mas mostraram menor produção de TNF- α e IL-6. Estas células também apresentaram menor capacidade na diferenciação de Th17. Nossos resultados indicam que mTORC2 participa na regulação das funções das DCs, especialmente na migração e produção de citocinas pós estímulos inflamatórios.

Palavras-chave: Células dendríticas. Intestino. Via mTOR. Inflamação. Microbiota.

ABSTRACT

IGNACIO, Aline. **Role of mTORC complex 2 (mTORC2) in dendritic cells functions in intestinal inflammation.** 2019. Thesis (PhD - Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dendritic cells from lamina propria encompass a heterogeneous group of cells which play a key role in intestinal homeostasis. In the past few years, it has been shown the participation of mTORC2 in regulating innate immune cells. In our study, we used mTORC- deficient DCs to investigate the role of this complex in DCs functions in ulcerative colitis model. Absence of mTORC2 in DCs reduces the intestinal inflammation, impairs DCs migration which in turn decreases the number of Th17, Tregs and CD8+IFN γ + T cells. These results seem to be independent of gut microbiota composition. Our in vitro results showed that bone marrow-derived DCs (BMDCs) deficient in mTORC2 can upregulate CD80 and MHC-II after stimulus but present decreased production of TNF- α and IL-6. Those cells also showed deficiency in Th17 differentiation. Our results suggest that mTORC2 play pivotal role in DCs functions highlighting migration and cytokine production.

Keyword: Dendritic cell. Intestine. mTOR pathway. Inflammation. Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ontogenia das células dendríticas intestinais.....	13
Figura 2. Vias de sinalização de mTORC1 e mTORC2.....	17
Figura 3. Geração do animal Rictor ^{flox/flox} - Itgax ^{cre}	24
Figura 4. Genotipagem das linhagens.....	25
Figura 5. Purificação de células dendríticas do baço.....	26
Figura 6. Verificação da excisão do gene Rictor.....	27
Figura 7. Caracterização do modelo de colite em animais selvagens.....	28
Figura 8. Estratégia de <i>gating</i> células dendríticas da lâmina própria do cólon.....	31
Figura 9. Estratégia de <i>gating</i> – DCs Linfonodos Mesentéricos (MLN).....	32
Figura 10. Estratégia de <i>gating</i> – Linfócitos T cLP e MLN.....	32
Figura 11. Pureza separação de células CD11c+.....	35
Figura 12. Estratégia de <i>gating</i> ensaio de proliferação.....	36
Figura 13. Análise da expressão proteica da via mTOR.....	40
Figura 14. Imunofenotipagem dos animais Rictor ^{flox/flox} e Rictor ^{DC-/-} em condições basais.....	41
Figura 15. Colite nos animais Rictor usando 2,5% de DSS.....	42
Figura 16. Indução da colite nos animais Rictor usando 3,5% de DSS.....	43
Figura 17. Indução da colite nos animais Rictor usando 3% de DSS.....	44
Figura 18. Avaliação de parâmetros clínicos após indução de colite.....	45
Figura 19. Avaliação da barreira intestinal.....	47
Figura 20. Avaliação da inflamação intestinal.....	49
Figura 21. Análise do infiltrado de células dendríticas (DCs) na lâmina própria do colon (cLP) após a colite.....	50
Figura 22. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) na lâmina própria do colon (cLP) após a colite.....	51
Figure 23. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) no linfonodo mesentérico após a colite.....	52

Figura 24. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) migratórias no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite.....	53
Figura 25. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite.....	54
Figura 26. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) da lâmina própria do cólon (cLP).....	56
Figura 27. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) migratórias no linfonodo mesentérico (MLN).....	57
Figura 28. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN).....	58
Figura 29. Análise das células dendríticas (DCs) na lâmina própria do colon (cLP) na homeostase.....	59
Figura 30. Análise das células dendríticas (DCs) migratória no linfonodo mesentérico (MLN) durante a homeostase.....	59
Figura 31. Análise das células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN) durante a homeostase.....	60
Figura 32. Infiltrado de linfócitos T na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite.....	61
Figura 33. Análise de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de citocina e de Treg na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite.....	62
Figura 34. Análise de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de citocina na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite.....	63
Figura 35. Linfócitos T no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite.....	64
Figura 36. Análise de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de citocina e T reg no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite.....	65
Figura 37. Análise de linfócitos T CD8 ⁺ produtores de citocina no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite.....	66
Figura 38. Análise da microbiota intestinal anterior ao início da colite.....	68

Figura 39. Expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).....	69
Figura 40. Síntese de citocinas em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).....	71
Figura 41. Ensaio de proliferação.....	72
Figura 42. Diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺	73
Figura 43. Ativação via TLR induz aumento do metabolismo glicolítico nas DCs.....	74
Figura 44. Metabolismo glicolítico nas DCs poucas horas pós ativação.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: célula apresentadora de antígeno
CCR: receptor de quimiocina C-C
cLP: lamina própria do cólon
CXCR: receptor de quimiocina C-X-C
DDI: doença inflamatória intestinal
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DC: célula dendrítica
DNase: desoxiribonuclease
dNTP: desoxinucleotídeos fosfatados
DSS: dextran sulfato de sódio
DTT: ditionitrito
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
FCCP: do inglês *fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone*
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FOXP3: Fator de transcrição de células T reguladoras
GF: livre de germes, do inglês *germ-free*
GM-CSF: fator estimulante de colônias de macrófagos/granulócitos
H&E: hematoxilina & eosina
HBSS: *Hanks's Balanced Salt Solution*
IFN: interferon
Ig: Imunoglobulina
IL: interleucina
IMDM: meio de Iscove e Dulbecco modificado
LP: lâmina própria
LPS: Lipopolissacarídeo
MHC: complexo maior de histocompatibilidade
MLN: Linfonodo mesentérico
mTOR: do inglês *mammalian target of rapamycin*
NK: natural killer
NOD: nucleotide-binding oligomerization domain

OCR: do inglês, *Oxygen consumption rate*

OVA: ovalbumina

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PP: placas de Peyer

RNA: ácido ribonucleico

RPMT: meio Roswell Park Memorial Institute

iSFB: soro fetal bovino inativado

SPF: livre de patógenos específicos, do inglês *specific-pathogen free*

TGF: fator de transformação de crescimento

TGI: trato gastrintestinal

Th: T *helper*

TLR: Receptores similares ao *Toll*

TNF: fator de necrose tumoral

Treg: célula T reguladora

UC: colite ulcerativa, do inglês *ulcerative colitis*

WT: selvagem, do inglês *wild type*

ZO-1: proteína de oclusão paracelular (Zonula occludens)

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1 Imunidade da mucosa intestinal	10
1.2 Células dendríticas da lâmina própria.....	11
1.3 Microbiota intestinal residente.....	15
1.4 Via mTOR.....	16
1.5 Via mTOR, células dendríticas e a microbiota intestinal residente.....	18
2 Hipótese	20
3 Objetivos	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 Material e Métodos.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Genotipagem dos camundongos.....	24
4.3 Verificação da deleção de Rictor em células CD11c+ purificadas.....	25
4.4 Indução de colite – Modelo de Colite induzido por Dextran Sulfato de Sódio (DSS). 27	
4.5 Análise histológica.....	29
4.6 Extração e dosagem de proteínas	29
4.7 Western Blotting.....	29
4.8 ELISA	29
4.9 Citometria de fluxo	30
4.10 Análise da invasão bacteriana por hibridização fluorescente in situ	32
4.11 Determinação da permeabilidade intestinal pela análise de FITC-Dextran	32
4.12 Análise da microbiota intestinal	33
4.13 Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC).....	34
4.14 Co-cultura DC:T CD4+ - Ensaio de proliferação e diferenciação de células T	35
4.15 Análise de fluxo extracelular (Seahorse).....	36
4.15 Análises estatísticas.....	36
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Ausência da atividade de mTORC2 nas células CD11c+ não induz regulação positiva na atividade de mTORC1	39
5.2 A ausência do complexo mTORC2 nas DCs não afeta frequência de populações celulares em animais Rictor ^{DC-/-}	39
5.3 Padronização e determinação da concentração do DSS para indução da colite.....	40
5.4 Ausência de mTORC2 nas DCs diminui a inflamação no cólon	44
5.5 Ausência de mTORC2 nas DCs resulta em menor comprometimento da integridade epitelial e menor invasão bacteriana durante a colite	46
5.6 Ausência de mTORC2 nas DCs diminui a inflamação no cólon.....	48
5.7 Ausência de Rictor nas DCs não inibe a maturação mas compromete a migração das subpopulações de DCs da lamina própria para o linfonodo mesentérico.....	50

5.8 Animais Rictor ^{DC-/-} apresentam redução no infiltrado de células T na cLP e no MLN.....	60
5.9 Análise preliminar da microbiota intestinal sugere que a inflamação atenuada em Rictor ^{DC-/-} é independente da sua composição	66
5.10 Ausência de mTORC2 não impede a maturação <i>in vitro</i> das DCs.....	68
5.11 mTORC2 regula a produção de citocinas em DCs.....	69
5.12 Deficiência de mTORC2 nas DCs são eficientes na indução de proliferação de linfócitos T CD4+.....	71
5.13 mTORC2 é necessário para polarização de células T CD4+em Th17.....	85
5.14 DCs deficientes em mTORC2 apresentam aumento na respiração mitocondrial e da glicólise.....	73
6 Discussão	77
7 Conclusões.....	84
8 Referências bibliográficas	85

Introdução

1. Introdução

As Doenças Inflamatórias do Intestino (DIIs) são patologias caracterizadas por episódios de inflamação recorrente no cólon e intestino delgado. Duas entidades distintas são bem estudadas: a colite ulcerativa (do inglês, Ulcerative colitis - UC) e a Doença de Crohn. Ambas as doenças são consideradas doenças da sociedade moderna, cujo desenvolvimento está associado ao fumo, a dietas ricas em gorduras e carboidratos, ao uso de medicamentos e ao estresse. A incidência das DIIs tem aumentado desde o século XX e, atualmente, milhares de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento são acometidos por essas doenças (1, 2).

A UC foi primeiramente descrita em meados de 1800 (3) e é uma das formas mais comum de DIIs no mundo todo. Diferentemente da Doença de Crohn, o processo inflamatório da UC está restrito à camada mucosa, sendo menos propensa a complicações (4). Comumente, os sintomas aparecem gradualmente, com períodos de remissão espontânea e relapsos subsequentes; na sua forma ativa, a doença é manifestada como uma inflamação da mucosa começando no reto (proctite) e em alguns casos se espalhando para o resto do cólon. Suas manifestações clínicas são variadas, mas a apresentação de diarreia sanguinolenta com ou sem muco está entre suas principais características. O indivíduo ainda pode apresentar urgência ou tenesmo, dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso (1).

Ainda que não haja critérios exatos para o diagnóstico da UC, características histológicas típicas são observadas, e incluem: depleção no número de células caliciformes, alteração da arquitetura das criptas, diminuição da densidade das criptas e ulcerações (4, 5). O prognóstico para os pacientes acometidos é geralmente bom e com o tempo ocorre remissão na maioria dos casos, no entanto, em casos persistentes a UC tem sido considerado fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon e reto (6).

Enquanto na Doença de Crohn os fatores genéticos são conhecidamente fortes influenciadores sobre o desenvolvimento da doença, a UC parece ser geneticamente mais heterogênea, sendo que o *screening* genético não é suficiente para determinar o seu risco de desenvolvimento (7). Embora de etiologia ainda desconhecida, acredita-se

que a UC ocorra em indivíduos suscetíveis que apresentam uma resposta imune anormal frente aos microrganismos da própria microbiota intestinal (1).

1.1 Imunidade da mucosa intestinal

A mucosa intestinal representa uma vasta área de superfície recoberta por uma camada única de células epiteliais que estão continuamente expostas a antígenos alimentares e bacterianos (6). Por ser uma área de interação do hospedeiro com o ambiente externo, tal superfície precisa ser protegida. Esta proteção é conferida ativamente pela secreção de mucina, defensinas e anticorpos secretórios (IgA). Além desses fatores, a presença de proteínas de junção especializadas (*tight junctions*) entre os colonócitos garantem a integridade da mucosa e a permeabilidade seletiva (8).

Juntamente com a barreira epitelial, células do sistema imune - principalmente células dendríticas (DC), macrófagos e linfócitos B e T - participam da vigilância do ambiente externo, com o desafio de distinguir os microrganismos comensais dos patogênicos, e os antígenos alimentares (9). Tais componentes celulares estão distribuídos ao longo do trato intestinal em microambientes, sendo eles as Placas de Peyer, a lâmina própria (LP), os folículos linfoides, os linfonodos mesentéricos (*Mesenteric Lymph Nodes* - MLNs) e ainda entre as células epiteliais. Estes são os locais de início das respostas imunes inatas adaptativa da mucosa (8).

Desta forma, a homeostase intestinal requer que padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (*Damage-associated molecular pattern* - DAMPs) sejam corretamente reconhecidos. Neste contexto, é fundamental que os receptores semelhantes ao Toll (*Toll-like receptors* - TLRs) e os receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (*Nod-like receptors* - NLR), expressos pelas células epiteliais e imunes, iniciem cascatas de sinalização adequadas frente aos microrganismos comensais e a antígenos alimentares, e quando necessário, iniciem a resposta imune de forma a impedir a instalação de patógenos. Esse processo de reconhecimento constante de antígenos extracelulares contribui para a tolerância, mas quando desregulado, pode resultar em quadros inflamatórios (10).

Outro importante fator regulador da homeostase intestinal consiste na produção de citocinas, que são capazes de regular a função das células da imunidade inata e

adaptativa em prol da defesa do hospedeiro contra patógenos exógenos, são cruciais no processo de reparação do tecido e para a manutenção da integridade da mucosa. As citocinas no intestino provêm de macrófagos, DCs, células linfóides inatas (*innate lymphoid cells* – ILCs), neutrófilos e linfócitos residentes, além dos próprios colonócitos (11). Sabe-se que a desregulação na produção de citocinas está ativamente envolvido na patogênese das DIIs (12, 13), o que pode influenciar o percurso da resposta inflamatória.

O processo inflamatório na UC, como já mencionado, é caracteristicamente restrito à camada mucosa, sendo que o infiltrado celular pode variar em densidade e em composição durante a doença ativa e os estágios de remissão. Tal infiltrado é composto principalmente de linfócitos e granulócitos (4). Anormalidades na imunidade humoral também ocorrem; níveis elevados de IgM, IgA e IgG são comuns, com maiores níveis de IgG1 (14). Assim, um ponto chave no desenvolvimento da UC é a comunicação entre a imunidade inata e a adaptativa. Neste panorama, destacam-se as DCs da lâmina própria que além de reconhecerem padrões moleculares através dos TLR e NLR, são produtoras de citocinas e apresentadoras de antígenos (*Antigen presenting cells* - APCs) profissionais responsáveis pela ativação dos linfócitos T *naive* e diferenciação destas células em efectoras (6).

1.2 Células dendríticas da lâmina própria

O lúmen intestinal contém uma variedade de antígenos externos derivados das bactérias comensais, dos alimentos e, ocasionalmente, de microrganismos patogênicos. Em virtude de sua capacidade de induzir tolerância a antígenos inócuos, iniciarem resposta imune específica contra patógenos intestinais e participarem das DIIs, as DCs da mucosa são centrais na homeostase intestinal. No presente estudo, focamos em compreender o papel das DCs convencionais (cDCs), portanto, a abreviação DC não aborda as DCs plasmocitoides (pDCs).

As DCs encontradas nos MLNs podem ser classificadas em residentes, originadas de um precursor da medula óssea que chega neste órgão a partir da circulação sanguínea; e migratórias, que migram a partir da lâmina própria e chegam nos linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes. A lâmina própria de murinos contém

quatro populações distintas de DCs. Todas são negativas para marcadores de linhagens (CD3, CD19, Nk1.1), podem ser diferenciadas dos macrófagos por não expressarem CD64 e F4/80, e expressam a integrina CD11c⁺ e a molécula MHC de classe II. Baseado na expressão das integrinas CD11b e CD103 (também chamada α E) encontramos três subpopulações majoritárias, CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺, CD103⁻CD11b⁺ e, em menor número as DCs CD103⁻CD11b⁻. Estas células que podem ser (1) provenientes de uma célula progenitora da medula óssea (pré-DC), atingem o sangue e chega nos órgãos linfoides e não-linfoides; (2) derivadas de um progenitor também da medula óssea, comprometido em se diferenciar em uma DC intestinal ao atingir o tecido (15). Neste último caso, o precursor chamado progenitor de pre-DC de mucosa (*pre-mucosal DC*, *pre- μ DCs*) é caracterizado por ser Lin⁻CD11c⁺ α 4 β 7⁺B220⁺CCR9⁻ e por apresentar *homing* preferencial para o intestino (Zeng, 2013, Retinoic acid regulates the development of a gut homing precursor for intestinal dendritic cells).

Ainda que todas as subpopulações de DCs sejam derivadas de um precursor comum, o desenvolvimento de cada uma delas requer fatores de transcrição distintos. As DCs CD103⁺CD11b⁻ são dependentes dos fatores de transcrição IRF8 (*interferon regulatory factor 8*), BATF3 (*basic leucine rich zipper transcription fator ATF-like 3*) e ID2 (*inhibitor of DNA-binding 2*). Já as DCs CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁺CD11b⁺ requerem a expressão e IRF4 (*interferon regulatory fator 4*), Notch2 (*neurogenic locus notch homolog protein 2*), e KLF4 (*Kruppel-like fator 4*). As células CD103⁻CD11b⁻ são as menos estudadas até o momento, mas acredita-se que uma parcela é dependente de IRF4 e uma fração dependente de IRF8 (15) (Figura 1).

Figura 1. Ontogenia das células dendríticas (DCs) da lâmina própria. Precursores de DCs convencionais (cDCs) dá origem às populações CD103⁺CD11b⁺, CD103⁺CD11b⁻, CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁻CD11b⁻ e são dependentes de fatores de transcrição distintos. Adaptado de (15).

As funções das DCs do intestino dependem do microambiente intestinal e, portanto, estudos a respeito das funções destas células continuam em percurso. Sabe-se que todas as quatro populações têm a capacidade de migrar para o MLN fazendo com que todas possuam o potencial de iniciar a resposta imune adaptativa nos linfonodos (15). Entretanto, por requerem fatores de transcrição e apresentarem fenótipo distintos, acredita-se que cada população possui sua função na regulação da homeostase intestinal.

Por exemplo, estudos sugerem que na homeostase as DCs CD103⁺CD11b⁺ são essenciais na indução da diferenciação de linfócitos T reguladores Foxp3⁺ (Tregs) a partir da síntese de TGF- β e ácido retinóico (16, 17). Em infecções por microrganismos

patogênicos, como a *Salmonella* sp., DCs CD103⁺ CD11b⁺ são as primeiras a capturarem o agente infeccioso e migrar para o linfonodo, promovendo ativação das células T CD4⁺ *naive* e diferenciação em T efetores (18). Portanto esta população está associada ao processo de vigilância e tolerância oral, manutenção da integridade da mucosa e ativação de resposta imune adaptativa frente ao patógeno invasor.

Já as DCs CD103⁺CD11b⁺, que expressam níveis intermediários CX3CR1⁺, são menos abundantes durante a homeostase. Estudos mostram que estas células conseguem emitir prolongamentos em direção à luz intestinal e assim capturar moléculas e microrganismos inteiros, por um mecanismo dependente da expressão de CX3CR1. Paradoxalmente, a migração destas células para os linfonodos foi descrita como não muito eficiente, nos conduzindo ao questionamento sobre seu papel fisiológico (17, 18). Dentre as possíveis explicações estão a de que estas DCs impediriam a translocação dos microrganismos da microbiota para os MLNs e, consequentemente, uma resposta imune inadequada; outra possibilidade seria que ao capturar o microrganismo, estas DCs secretariam citocinas que por sua vez regulariam a homeostase local e/ou modulariam a migração das DCs CD103⁺CD11b⁺ para os MLNs; por último, DCs CD103⁺CX3CR1⁺ transfeririam para as DCs CD103⁺CD11b⁺ os antígenos a serem apresentados (16, 19). Com isso, DCs CD103⁺CD11b⁺ poderiam ser responsáveis pela tolerância aos microrganismos da microbiota residente e se destacam na inflamação.

Embora a princípio a UC tenha sido caracterizada por apresentar um perfil de resposta Th2, trabalhos recentes mostraram que células Th17 produtoras de IL-17 são importantes na sua patogênese (20). Neste contexto, DCs CD103⁺CD11b⁺ tornam-se relevantes, pois estudos mostram que camundongos deficientes em DCs CD103⁺ são mais susceptíveis a colite induzida por Dextran-Sulfato de Sódio (DSS). O mecanismo envolvido ainda não foi totalmente descrito, mas trabalhos apontam para a capacidade tardia destas células migrarem para os MLNs e induzirem a diferenciação de células Th17 (21, 22).

Portanto, a participação dos subtipos de DCs na inflamação ainda precisa ser investigada.

1.3 Microbiota intestinal residente

O trato gastrointestinal (TGI) é um ecossistema extremamente complexo que envolve as condições físicas do hospedeiro, a dieta alimentar, o sistema imunológico e as interações com as diversas espécies microbianas. Os microrganismos que residem de forma estável no ambiente intestinal constituem a microbiota residente, também denominada microbiota indígena ou autóctone. Estes organismos atuam como primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão e proliferação de organismos exógenos e oportunistas através da síntese de substâncias antagonistas (bacteriocinas – moléculas antagonistas do crescimento bacteriano produzidas pelas bactérias residentes) e competição por espaço e nutrientes (23).

O intestino de um adulto saudável é colonizado por mais de 800 espécies bacterianas, com maior concentração no cólon (até 10^{12} células/grama de fezes) (24). Tais bactérias podem ser divididas em cinco filos: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, sendo que os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* compreendem mais de 90% das bactérias totais (25).

Em adultos e crianças a microbiota intestinal estabelece complexas relações com seu hospedeiro ao impedir a invasão e proliferação de microrganismos exógenos patogênicos (23), ao degradar polissacarídeos (fibras) não digeríveis pelo homem e sintetizar vitaminas (biotina, tiamina, vitamina B12 e vitamina K) (26) e ao promover a maturação e manutenção do sistema imune (27). Nos últimos anos a relação entre o estado de saúde do hospedeiro e sua microbiota tem sido intensamente estudada (25, 28) assim, conhecer sua composição torna-se um ponto chave para o entendimento de tais interações e seus possíveis efeitos.

As bactérias do intestino direcionam o desenvolvimento imunológico e orquestram a expansão de numerosas populações de células imunes no intestino, além de também desenvolverem importante papel na manutenção da permeabilidade intestinal (29). Bactérias comensais já foram apontadas como participantes ativas na diferenciação de células T, como por exemplo, a espécie *Bacteroides fragilis*, espécies pertencentes ao gênero *Clostridium*, e as bactérias filamentosas segmentadas (SFB) que induzem a expansão de células T reguladoras e Th17, respectivamente (21, 30-34).

Nas DIIs, a composição da microbiota parece estar alterada sendo que níveis diminuídos de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. tem sido encontrados em

amostras fecais, enquanto que um aumento de *Enterococcus* spp. e *Bacteroides* spp. tem sido descrito na mucosa inflamada de pacientes acometidos com a doença (35). Entretanto, na maioria dos casos é difícil saber se a microbiota alterada é causa ou resultado das doenças inflamatórias.

1.4 Via mTOR

A proteína quinase mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) é uma serina treonina quinase, membro da família das quinases PI3K (fosfatidilinositol-3-OH quinase) que desempenha um papel central no controle do ciclo celular, metabolismo, síntese proteica, balanço energético e sobrevivência celular. A quinase mTOR é ativada em resposta às moléculas presentes no microambiente extra- e intracelular como por exemplo, aminoácidos, fatores de crescimento e insulina, e integra tais sinais para regular o metabolismo da célula (36).

Dois complexos de sinalização distintos podem ser formados pela mTOR: o complexo mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 é formado pela proteína mTOR, que consiste no centro catalítico do complexo, a proteína Raptor (*Regulatory protein associated of mTOR*), essencial para a montagem do complexo e recrutamento dos substratos, e as subunidades mLST8 (ou GβL), PRAS40 (ou AKT1S) e DEPTOR (ou DEPDC6 –*DEP protein-containing protein 6*). A ativação de mTORC1 é mediada pelas quinases PI3K e PDK1 (*Piruvate dehydrogenase kinase isozyme 1*), e quando ocorre, promove a fosforilação dos reguladores traduçãoais S6 (proteína ribossômica) e 4E-BP1 (*Eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*). Em contrapartida, um metabólito com ação antifúngica produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* denominado rapamicina, é capaz de inibir mTORC1 a partir da formação de um complexo com a proteína intracelular FKB12 (*FK506-binding protein of 12kDa*) e sua ligação com o sítio de interação entre mTORC1 e Raptor (36, 37).

O complexo mTORC2 também é formado pela proteína mTOR, pela proteína Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), que estabiliza a montagem do complexo, e das subunidades mLST8, mSIN1 (*Mammalian stress-activated protein kinase interactin protein-1*) e Protor (*Protein observed with Rictor*) (37). Sua função central consiste na regulação de vias de sinalização “downstream” a família de quinases AGC

(como Akt e SGK1) e o citoesqueleto. Entretanto, os conhecimentos a respeito de mTORC2 são poucos quando comparados a mTORC1, devido à falta de inibidores específicos conhecidos deste complexo. Enquanto o antibiótico natural rapamicina é um agente inibidor conhecido de mTORC1, mTORC2 é aparentemente bloqueado apenas em situações de exposição prolongada a rapamicina sendo, portanto, considerado resistente a este inibidor. Outra alternativa é o uso de moléculas que bloqueiam ambos os complexos, como Torin1 (38, 39). Assim, as vias de sinalização que levam a ativação de mTORC2 e seu papel fisiológico ainda não foram totalmente elucidados (Figura 2).

Figura 2. Vias de sinalização de mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 é diretamente regulado pela proteína ligadora de rapamicina FK506 (FKB12) e controla o crescimento e tamanho da célula por regular a síntese de mRNA, a biogênese ribossomal e autofagia. Diversos sinais como fatores de crescimento, citocinas, receptores de antígenos, moléculas co-estimulatórias, proteínas WNT, hipóxia e danos no DNA determinam a atividade de mTORC1. Este complexo é negativamente regulado pelo complexo TSC1-TSC2. A ativação de RAS-MAPK quinase e de PI3K-AKT resulta na fosforilação inibitória de TSC2, que agora deixa de inibir RHEB, necessária para a ativação de mTORC1. A síntese proteica é regulada positivamente por mTORC1 a partir da síntese da proteína ribossomal S6K1 e da inibição da produção do regulador negativo da tradução 4E-BP1. mTORC2 não é rapidamente inibido por rapamicina, mas uma exposição prolongada tem sido sugerida como inibidor. As vias parecem convergir em PI3K e AKT, no entanto a inibição de mTORC2 parece não afetar a atividade de mTORC1 (38).

Células do sistema imune ativadas modificam sua morfologia, migram para tecidos e produzem grandes quantidades de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos inflamatórios. Parte da demanda metabólica envolvida com estes processos é regulada pela via mTOR. A ativação da via, por sua vez, pode ocorrer a partir da ligação de receptores de linfócitos T (TCR) e B (BCR), receptores de citocinas, de moléculas co-estimuladoras, e TLRs (40). Bons exemplos de como a via mTOR pode influenciar o destino de células do sistema imune são os trabalhos desenvolvidos com linfócitos T. Animais *knockout* (KO) em mTOR nas células T apresentam deficiência nas vias de sinalização através de mTORC1 e mTORC2 e com isso a ativação via TCR não induz a polarização destas células para um perfil Th1, Th2 ou Th17, mas sim em células Treg Foxp3+. Esse fenômeno foi associado com a redução nos níveis de STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e consequente falha na indução da expressão dos fatores de transcrição T-bet, Gata-e e ROR γ -t (41). Em um estudo subsequente, a inibição específica de mTORC1 nestas células impediu a polarização de linfócitos T em Th1 e Th17 enquanto a polarização para Th2 se manteve preservada (42). Adicionalmente, a deleção de Rictor em células T resulta no comprometimento da polarização para Th2, enquanto a indução da diferenciação em Th1 não é comprometida (43). Desta forma, estes estudos mostram que a via mTOR determina o perfil das células do sistema imune e que os complexos 1 e 2 não apresentam efeitos redundantes.

Em células da imunidade inata como macrófagos, DCs e neutrófilos, a ativação da via através dos complexos mTORC1 e 2 pode ocorrer através de fatores de crescimento, ligantes de TLRs e citocinas, e também irá regular a síntese proteica, o crescimento e o metabolismo celular (44-46). No entanto, os mecanismos efetores regulados pela via mTOR e as vias intracelulares integradas nas células da imunidade inata ainda precisam ser investigados.

1.5 Via mTOR, células dendríticas e a microbiota intestinal residente

A ativação de DCs, incluindo BMDCs, por ligantes de TLRs induz alterações metabólicas essenciais para a atividade funcional dessas células, e o aumento do metabolismo glicolítico é um ponto chave neste processo. Diversos trabalhos foram realizados elucidando o papel da via mTOR como um regulador “*upstream*” do

metabolismo glicolítico em DCs, mostrando que esta via atua sobre a sua diferenciação e maturação, sobre a captura e apresentação de antígeno, sobrevivência, e secreção de citocinas (47-49). Entretanto, a maioria dos estudos se concentram sobre o papel do complexo mTORC1. Adicionalmente, nosso conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento e a maturação dos subtipos de DCs de cada sítio anatômico ainda é incompleto.

O desenvolvimento das DCs requer que os progenitores da medula óssea expressem a tirosina quinase 3 semelhante à FMS (Flt3) e sua ligação com o ligante Fl3tL (50). Em camundongos, a injeção de Flt3L recombinante resulta em expansão na população de DCs e em esplenomegalia (47). Da mesma forma, animais deficientes em Flt3 ou em Fl3tL apresentam uma redução drástica no número de DCs (51). Sathaliyawala e colaboradores (52) mostraram que a injeção conjunta de rapamicina e Flt3L impede a expansão da população de DCs, enquanto que a injeção de apenas de rapamicina reduz pela metade a quantidade basal de DCs no baço do animal. Assim, sugere-se que a via mTOR confere sinais importantes para a manutenção e expansão de DCs a partir de seus progenitores.

A função das DCs também pode ser regulada pela via mTOR. mTORC1 é um regulador negativo de caspase 1 e a inibição do complexo pela rapamicina promove a secreção de IL-1 β via caspase 1. Subsequentemente, a produção de IL-1 β induz a expressão do receptor IL-1RL1, também conhecido como ST2, que sequestra MyD88 e com isso regula negativamente a ativação da DC através de ligantes de TLR4 (53). Assim, sugere-se que o impacto de mTOR sob a modulação da função da DC depende do momento de ativação desta célula.

A ativação da DC por LPS leva ao recrutamento e ativação de PI3K. Trabalhos recentes mostraram que mTOR e a proteína GSK3, ambas downstream a PI3K, regulam diferentemente a secreção de IL-12, citocina necessária para a polarização de células Th1. Em DCs estimuladas com LPS, a proteína PI3K regula negativamente a síntese de IL-12 através da ativação de RHEB-mTORC1, que a ativação de NF κ B. Em contraste, a inibição de GSK3 atenua a síntese de IL-12 por aumentar a síntese de IL-10. Neste caso, a citocina IL-10 estaria inibindo a síntese de IL-12 por feedback negativo (39, 49). Trabalhos paralelos mostraram que a ativação de mTORC1 ativa STAT3, que regula positivamente a síntese de IL-10 e que então inibe a produção de IL-12 (49).

A síntese de IL-10 pelas DCs tem sido associada à melhora dos quadros de UC induzida por DSS, entretanto esse resultado parece ser dependente da presença de microrganismos da microbiota intestinal (54). Em um trabalho com animais selvagens (WT) com colite induzida por DSS, a administração de um combinado de microrganismos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) resultou em redução nos danos na mucosa (17), mas nenhum mecanismo celular foi investigado.

Acredita-se que a melhora ou redução da sintomatologia observada em animais que apresentam uma microbiota residente ou que tiveram a mesma modulada por bactérias probióticas esteja associada ao aumento da síntese das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e redução das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α pelas células epiteliais do intestino, e também, pelas DCs. Apesar disso, as vias de sinalização envolvidas e o papel das subpopulações de DCs da lâmina própria que participam do desenvolvimento da UC ainda precisam ser investigadas (55, 56).

2 Hipótese

Considerando todas estas premissas, nós formulamos a hipótese de que a ausência do complexo 2 da via mTOR (mTORC2) em DCs reduz a capacidade de ativação destas células a partir da invasão bacteriana e de mediadores inflamatórios liberados durante a inflamação da mucosa intestinal. Assim, a falta de mTORC2 teria um efeito atenuador na colite induzida por DSS.

OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do complexo mTORC2 nas subpopulações de DCs da mucosa em resposta a ativação por microrganismos da microbiota intestinal e mediadores inflamatórios, num modelo de colite ulcerativa em murinos.

3.2 Objetivos específicos

Usando animais com deleção específica do complexo mTORC2 em células dendríticas (cre-lox), em situação de homeostase, avaliamos:

- o impacto da ausência do complexo nas DCs sobre as frequências das demais populações celulares (imunofenotipagem);
- a expressão de proteínas reguladas por mTORC1 e mTORC2 nas DCs

Em um modelo de colite induzida por Dextran-Sulfato de Sódio (DSS), avaliamos:

- os parâmetros clínicos da colite;
- o perfil de citocinas inflamatórias no cólon dos animais;
- o infiltrado celular na lâmina própria e nos linfonodos mesentéricos;
- o perfil de ativação e funcional das células na lâmina própria e nos linfonodos mesentéricos decorrentes do processo inflamatório; e
- a composição da microbiota intestinal dos animais.

Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Foram usados camundongos machos e fêmeas, com idade entre 8 e 10 semanas, pesando de 18-25 g. Para estudo da ausência de função da via mTORC2 nas DCs cruzamos animais *Rictor*^{flox/flox} com *Itgax*^{cre} (Figura 3), provenientes do laboratório The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos da América). Os cruzamentos e a indução da colite foram realizados no biotério do Departamento de Imunologia, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suplemento de água e alimento disponíveis todo o tempo.

Figura 3. Geração do animal *Rictor*^{flox/flox} - *Itgax*^{cre}

Os experimentos foram realizados de acordo com a lei federal 6638 de 1979 que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, e após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (Comitê de Ética 48/2014 USP).

4.2 Genotipagem dos camundongos

A genotipagem dos animais foi realizada por PCR convencional preparando os mixes para cada gene alvo, como se segue: 2µL de 10x PCR Buffer sem magnésio (200mM de TrisHCl – pH 8.4 e 500mM de KCl), 0,4µL de dNTP (10mM), 0,6 uL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada Primer (Tabela 1), diluídos a 10µM cada, 0,2µL de Taq Polimerase

(1 U de enzima) e H2O DEPC, variando de 11,2μL (quando usamos 1 par de Primer) ou (quando usamos 2 pares de Primers). Após amplificação as amostras foram corridas em gel agarose 3%, com Sybr Safe (1:10000). Para os animais *Rictor*^{flox/flox} x *Itgax*^{cre-positivo} empregamos a nomenclatura *Rictor*^{DC-/-} enquanto os *Rictor*^{flox/flox} x *Itgax*^{cre-negativo}, usados como grupo controle, denominamos *Rictor*^{flox/flox}.

Tabela 1. Sequências dos primers empregados na genotipagem dos animais.

Gene	Primers (5' - 3')	T de hibridização dos primers (°C)	Amplicons (bp)
<i>Itgax</i> ^{cre}	F: ACT TGG CAG CTG TCT CCA AG	64	Mutante: 313
	R: GCG AAC ATC TTC AGG TTC TG		Controle interno: 200
<i>Rictor</i> ^{flox}	F: ACT GAA TAT GTT CAT GGT TGT T	60	Wild type: 466
	R: GAA GTT ATT CAG ATG GCC CAG C		Mutante: 554

Figura 4. Genotipagem das linhagens. (A) *Rictor*. linha 1 - padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linha 2 - controle positivo homozigoto; linhas 3-8 - animais homozigotos; linha 9 - controle negativo (H₂O); (B) *cre*-recombinase. linha 1 - padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linha 2 - controle positivo; linhas 3, 7, 9 - animais *cre*-negativos; linhas 4-6, 8, 10 - animais *cre*-positivos; linha 11 - controle negativo (H₂O).

4.3 Verificação da deleção de *Rictor* em células *CD11c*⁺ purificadas

Uma vez que os animais foram obtidos por cruzamento, para confirmação da excisão do gene *rictor* especificamente nas DCs, células *CD11c*⁺ do baço de animais *Rictor*^{flox/flox} e *Rictor*^{DC-/-} foram purificadas usando o kit Easysep Mouse *CD11c* Positive Selection (Stem Cell Technologies). A pureza da separação celular foi confirmada por aquisição das células no citômetro BD Accuri C6 (DeNovo Software), conforme mostrado na Figura 5. Em seguida, extraímos o DNA dessas células e realizamos a

reação de PCR convencional para o gene *ric1or*^{flor}. Como podemos ver na Figura 6, as células CD11c⁺ provenientes do baço do animal *Ric1or*^{DC-/-} não amplificaram o gene *ric1or* enquanto as células provenientes do animal *Ric1or*^{flor/flor} foram positivas.

Figura 5. Purificação de células dendríticas do baço. Células CD11c⁺ marcadas com anticorpo anti-CD11c PE foram purificadas do baço e em seguida a pureza da purificação foi conferida por citometria de fluxo. (A) pool de células de baço não marcado; (B) células CD11c⁺ do animal *Ric1or*^{flor/flor}; (C) células CD11c⁺ do animal *Ric1or*^{DC-/-}.

Figura 6. Verificação da excisão do gene *Rictor*. Células CD11c⁺ purificadas do baço de animais *Ric1or*^{flor/flor} e *Ric1or*^{DC-/-} foram empregados na reação de genotipagem para detecção do gene *Rictor*. Linha 1 - padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linha 2 - controle positivo DNA extraído da cauda de animal *Ric1or*^{flor/flor}; linhas 3 - células CD11c⁺ animal *Ric1or*^{DC-/-}; linha 4 - células CD11c⁺ animal *Ric1or*^{flor/flor}; linha 5 - controle negativo (H₂O).

4.4 Indução de colite – Modelo de Colite induzido por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)

Para padronização da melhor concentração de DSS em nossos experimentos, diferentes concentrações deste açúcar (2,5%, 3% e 3,5%) foram diluídos no bebedouro dos animais e oferecido *ad libitum* por 7 dias. Durante este período avaliamos a perda de peso diária, a presença de sangue e a aparência e consistência das fezes. A colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) é um modelo bem estabelecido e confiável de doença inflamatória do intestino, pois seu quadro clínico se assemelha à colite ulcerativa em humanos (57). A fase aguda desse modelo é regida principalmente por células da imunidade inata (58), mas a imunidade adaptativa também tem papel importante no processo crônico (59).

Para avaliar o score clínico da doença e comparar os grupos, determinamos o Índice de Atividade da Doença (DAI), que tem como parâmetros a perda de peso (porcentagem de perda de peso em relação ao dia inicial, dia 0), a consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes/rabo/ao redor do ânus (Tabela 2) (60).

Tabela 2. Score do Índice de Atividade da Doença (DAI)

Score	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangramento
0	0	Normal	Ausente
1	1-5		
2	6-10	Amolecido	Evidência de sangue nas fezes ou ao redor do ânus
3	11-20		
4	>20	Diarréia	Sangramento severo

*O score do DAI de cada animal foi determinado pela média dos parâmetros.

Nosso laboratório já havia observado que camundongos C57Bl/6 selvagens (WT) quando bebiam água contendo 2,5% de DSS desenvolviam o quadro de inflamação aguda. Os parâmetros avaliados foram a perda de peso diária, a sobrevida (Figuras 7A-B) e o comprimento do cólon no dia 7 após o início da colite (Figura 7C-D).

Figura 7. Caracterização do modelo de colite em animais selvagens. A) Porcentagem de perda de peso dos animais WT controles e WT colite durante 7 dias da indução de colite; B) Curva de sobrevivência decorrente da ingestão de DSS a 2,5%. n=10/grupo; C) Imagem dos cólons retirados dos animais eutanasiados 7 dias após o início da indução de colite; n=5/grupo; D) Média do tamanho do cólon dos animais submetidos à colite e controles. A medida foi feita em cm; N=5/grupo. Imagem cedida por Dra. Cristhiane Favero Aguiar (Tese de Doutorado).

A figura acima mostra que os animais WT tratados apresentaram queda diária do peso em relação ao peso do dia inicial, diminuição do tamanho do cólon e menor sobrevivência, o que nos conduziu a empregar a mesma concentração de DSS nos animais *Rictor^{flox/flox}* e *Rictor^{DC-/-}*. Uma vez determinada a melhor concentração de DSS que permitisse a observação dos sinais clínicos da doença, com ausência de morte anterior ao dia 7, utilizamos machos e fêmeas irmãos ou fizemos o *co-housing* de animais do mesmo sexo e de genótipos diferentes até o momento de indução da colite, a fim de homogeneizar a microbiota. Os animais foram separados de acordo com seu genótipo apenas no dia em que a inflamação foi iniciada.

4.5 Análise histológica

Segmentos do cólon foram retirados em condições assépticas, porém não estéreis, e com os animais sob efeito de anestésico (Quetamina-Xilazina). O material foi

fixado em formol tamponado a 4% até a montagem em blocos de parafina e posterior confecção das lâminas coradas com H&E (Hematoxilina & Eosina).

4.6 Extração e dosagem de proteínas

Segmentos do cólon distal foram coletados e deles foram extraídas as proteínas utilizando tampão RIPA (. Após a extração, as proteínas foram dosadas utilizando o kit Pierce (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit). As amostras foram estocadas mantidas a -80 C até o uso.

4.7 Western blotting

Aproximadamente 60 µg de proteína total, obtida do intestino grosso, foram diluídos numa mistura de Laemmli-DTT. Em seguida, as proteínas foram denaturadas por aquecimento de 5 minutos a 95° C e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, sendo esta bloqueada 1 hora com leite 5% dissolvido em TBS-T. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *over night* com o anticorpo primário diluído em TBS-T contendo 5% de BSA. A seguir, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado. As etapas subseqüentes foram realizadas com o kit biotina-streptavidina (Amersham, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A massa molecular das proteínas foi determinada por comparação com a migração das proteínas padrão Rainbow ou Dual-Color (BioRad Laboratories, EUA). Os anticorpos usados foram goat anti-occludina (1:200), mouse anti-pJNK (1:500) e mouse anti-βactina (1:10000).

4.8 ELISA

Amostras de soro e cólon foram coletados para realização da técnica de ELISA “sanduíche”, utilizando kits da R&D Systems, segundo instruções do fabricante. Do soro, foi feita a quantificação da Proteína C Reativa. Das proteínas do cólon, foi feita a quantificação das citocinas TNF-α, IL-6, IL-17, IL-12p40, IL12p40 e IL-22.

4.9 Citometria de fluxo

Após a indução da colite, o cólon e os linfonodos mesentéricos (MLN) foram removidos dos animais eutanasiados e colocados em PBS-HEPES gelado. Para isolamento das células da lamina própria do cólon (cLP) os cólons foram abertos longitudinalmente, lavados com PBS para remoção das fezes e cortados em pedaços de cerca de 1 cm. Os pedaços foram incubados em meio RPMI contendo 2% de soro fetal bovino (SFB), 5 mM de EDTA, por 20 minutos a 37 °C, sob agitação. Após incubação, os pedaços foram peneirados e agitados com PBS (1X) gelado, para separação dos linfócitos intraepiteliais e cuja fração foi desprezada. Os segmentos restantes foram então digeridos em meio RPMI contendo 0,5 mg/mL de collagenase tipo VIII e 10 U/mL de DNase, por 20 a 37 °C, sob agitação. Para isolamento das células dos MLNs usamos collagenase tipo IV (MLN) e 10 U/mL de DNase, por -25 minutos a 37 °C, sob agitação. Após a digestão, a solução foi passada em peneira de 70 µm, centrifugada, ressuspendida em meio RPMI-SFB 2% e passada em peneira de 40 µm. Quando necessário, as células foram estimuladas com PMA (50ng) e ionomicina (750ng) na presença de *Stop Golgi* 1x (monensina), por 6 horas em estufa de CO₂ a 37 °C. Os anticorpos monoclonais para moléculas de superfície utilizados foram anti -CD45, -CD3, -B220, -Ly6G, -siglecF, Nkp46, -CD64, -CD11c, -CD11b, -I-A/I-E, -CD103, -CD40, -CD80 e -CD86 (mix DCs), e anti -CD45, -CD3, -CD4, -CD8, (mix linfócitos). A produção de citocinas foi analisada empregando-se os anticorpos anti-IL-6, -IL-10, -IL12p40, -TNFa, -IL-17 e -INFg. Células T não estimuladas foram marcadas para Foxp3+. As amostras foram analisadas no aparelho FACSCanto e LSRII Fortessa, utilizando o software FACSDIVA (BD Biosciences), e então analisadas com o software FLOWJO (Tree Star, San Carlo, CA, EUA).

Estratégia de *gating* – DCs Lamina Propria do cólon (cLP)

Figura 8. Após o *gate* dos *singlets*, as células foram selecionadas no *gate* vivas (LD) > CD45+> Lin- (negativas para -CD3, -B220, -Ly6G, -siglecF, -Nkp46, -CD64) > CD11c+MHCII+(DCs totais) > CD11b+CD103+ (determinação dos subtipos de DCs). Dentro do *gate* de cada subtipo de DC, avaliamos a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86.

Estratégia de *gating* – DCs Linfonodos Mesentéricos (MLN)

Figura 9. Após o *gate* dos *singlets*, as células foram selecionadas no *gate* vivas (LD) > CD45+> Lin- (negativas para -CD3, -B220, -Ly6G, -siglecF, -Nkp46, -CD64) > CD11c+MHCII^{high}(DCs migratórias) e CD11c+MHCII^{low} (DCs residentes) > CD11b+CD103+ (determinação dos subtipos de DCs). Dentro do *gate* de cada subtipo de DC, avaliamos a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86.

Estratégia de *gating* – Linfócitos T cLP e MLN

Figura 10. Após o *gate* dos *singlets*, as células foram selecionadas em vivas (LD) > CD45+ > CD3+ > CD4+ > IL-17 e IFNγ ou Foxp3, e CD8+ > IL-17 e IFNγ.

4.10 Análise da invasão bacteriana por hibridização fluorescente *in situ*

Um segmento do intestino grosso contendo fezes foi cortado transversalmente fixado em solução contendo metanol (60%), clorofórmio (30%) e ácido acético (10%) por 24h. Os segmentos foram transferidos para solução de álcool 70% e em seguida emblocados em parafina. Cortes transversais foram desparafinizados, lavados com PBS (1X) 2X por 5 minutos, e permeabilizados com solução de hibridização contendo Tris-HCl, NaCl e SDS. A sonda para o gene 16S rRNA (FITC, Sigma) foi diluída no mesmo tampão de hibridização (100nM) e os cortes devidamente recobertos foram incubados em câmara escura úmida, a 50 °C por 4 horas. Após lavagem em PBS 1X, recobrimos os cortes com a Lectina-Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I) TRITC-conjugada (20 µg/mL, Sigma) e as lâminas foram incubadas por 2h a temperatura ambiente. Após lavagem, a lâmina foi montada com Vectashield com DAPI. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal, no aumento 40X.

4.11 Determinação da permeabilidade intestinal pela análise de FITC-Dextran

A permeabilidade intestinal antes da indução da colite foi avaliada pela administração por gavagem de FITC dextran (DX-4000 Da – FITC, Sigma), uma

macromolécula não metabolizada utilizada como sonda de permeabilidade. Todos os camundongos foram mantidos em jejum de água e comida por 4 horas. Em seguida eles foram gavados com FITC-dextran (400 mg/Kg de peso corporal) e após mais 4 horas de jejum, o sangue foi coletado pela cauda. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e o soro separado. Diluições de FITC-dextran em PBS (1x) foram usadas como uma curva padrão, e absorbância de 100 µL de soro ou de padrão foi medida em um fluorímetro com excitação a 485 nm e a leitura em 535 nm.

4.12 Análise da microbiota intestinal

Extração de DNA das fezes

DNA total das fezes estocados a -80 °C foi extraído utilizando kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Brasil) conforme instruções do fabricante. Os DNA foram avaliados quanto à concentração e integridade, e quantificados por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e mantidos a -20 °C até seu uso.

Análises quantitativas das amostras fecais: PCR em tempo-real (SybrGreen)

A quantificação de bactérias totais foi determinada por PCR em tempo-real empregando um par de primers para 16S rRNA total. As reações de amplificação foram realizadas em duplicata, contendo 1x do SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Life Technologies, Brasil), 5 µM de cada primer (forward e reverse) e 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Quant Studio (Applied Biosystems, Life Technologies, Brasil). Após a ciclagem, a curva de dissociação foi realizada para avaliar a presença de primers dimers. Como controle negativo foi utilizado uma mistura da reação sem DNA.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

A preparação das amostras e sequenciamento foi feito pela empresa Neoprospeta Microbiome Technologies. No sequenciamento, a região V3/V4 do gene rRNA 16S foi amplificada utilizando-se os primers 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) no aparelho Illumina MiSeq, com kit V2. A análise de bioinformática foi realizada pela Neoprospeta Microbiome Technologies.

4.13 Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC)

Os fêmures dos camundongos foram retirados e colocados em PBS (1X). As células da medula óssea foram obtidas por *flushing* de PBS (1X), usando seringa e agulha 26G. As hemácias foram lisadas com tampão de lise (155mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA – pH 7,2). 1 x 10⁶ células/poço foram cultivadas em meio IMDM (10% iSBF, 1% Penicilina/Streptomicina) em placa de 6 poços (2mL/poço) por sete dias, na presença de fator estimulador de colônia de macrófago e granulócitos (GM-CSF - 20 ng/mL). Após 4 dias de cultura, metade do meio de cultura foi trocado com nova adição de GM-CSF (20 ng/mL). No dia 6, as células CD11c⁺ foram purificadas com o kit Easysep Mouse CD11c Positive Selection (Stem Cell Technologies), plaqueadas na novamente na densidade de 5 x 10⁵ células/mL e mantidas em cultura por 24h antes de seu uso para experimento. Quando necessário, as células foram estimuladas com LPS (100 ng/mL).

Figura 11. Pureza separação de células CD11c⁺. Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) foram cultivadas na presença de GM-CSF (20 ng/mL) e ao dia 6 as células CD11c⁺ foram purificadas com kit de beads magnéticas e empregadas nos experimentos *in vitro*.

4.14 Co-cultura DC:T CD4+ - Ensaio de proliferação e diferenciação de células T

As células CD11c+ purificadas das culturas de medula óssea no dia 6 foram pulsadas com 1 mg/mL de OVA (ovalbumina Grade VI, Sigma) e incubadas por 24h. Células T CD4+ naive foram purificadas com kit Easy Sep (Stem Cell Technologies) do baço e linfonodos do camundongo OT-II e marcadas com Cell Trace (LifeTechnologies). 1×10^5 linfócitos foram colocados em co-cultura com 1×10^4 DCs pulsadas com OVA e mantidos em co-cultura em meio RPMI completo por 4 dias. No dia 4, coletamos o sobrenadante e na presença de RPMI completo novo, parte das células foram estimuladas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (750 ng/mL) na presença de Stop Golgi 1x (monensina), por 6 horas em estufa de CO₂ a 37 °C. As células estimuladas foram marcadas para verificação da produção de IL-17 e IFN γ , enquanto parte das células não-estimuladas foram marcadas para o fator de transcrição Foxp3. Como controle negativo usamos células CD11c+ não pulsadas com OVA e co-cultivadas com linfócitos T. As amostras foram analisadas no citômetro FACS Canto utilizando o software FACSDIVA (BD Biosciences), e então analisadas com o software FLOWJO (Tree Star, San Carlo, CA, EUA).

Figura 12. Estratégia de *gating* ensaio de proliferação. 1×10^5 linfócitos T CD4 naive isolados de animal OT-II foram cultivados com 1×10^4 células CD11c+ pulsadas (não ilustrada) e não pulsada com OVA (imagem ilustrada acima - usada como controle negativo).

4.15 Análise de fluxo extracelular (Seahorse)

As taxas de consumo de oxigênio (OCR-O2 consumption rate) e taxas de acidificação extracelular (ECAR - *Extracellular Acidification Rates*) serão quantificadas em analisador de fluxo extracelular XF-96 (XF-96 Extracellular Flux Analyzer - Seahorse, Agilent) para se obter indicações da respiração mitocondrial e glicólise, respectivamente. Para isso, as células CD11c⁺ purificadas de culturas de BMDCs de cada grupo foram cultivadas em meio sem estímulo ou estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 24 ou 6 horas. Durante o ensaio, as células injetamos oligomicina (inibidor da síntese de ATP mitocondrial), FCCP (fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone; potente desacoplador e acelerador da cadeia respiratória mitocondrial) e antimicina-A/rotenona (ambos inibidores da cadeia transportadora de elétrons). Desse modo obtivemos dados de glicólise, capacidade glicolítica, reserva glicolítica, fosforilação oxidativa e capacidade respiratória máxima das células em estudo.

4.16 Análises estatísticas

A análise estatística foi feita com recursos do software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA). Long-rank test foi usado para análise da curva de sobrevida. Para comparação entre os grupos dos parâmetros avaliados foram aplicados os testes ANOVA de medidas repetidas (para avaliação da perda de peso), Two-way ANOVA, pós teste de Bonferroni e Teste t de Student (quando dois grupos). Para experimentos com n = 3 aplicamos o teste não-paramétrico de Krukall Wallis. O valor de p foi considerado significativo quando < 0,05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Ausência da atividade de mTORC2 nas células CD11c+ não induz regulação positiva na atividade de mTORC1

Uma vez verificado deleção do gene *rictor* especificamente nas células CD11c+, avaliamos também a expressão proteica de moléculas da via mTOR *upstream* e *downstream* à ativação do complexo mTORC2 nas DCs. Para isso, usamos BMDCs de animais *Rictor^{flox/flox}* e *Rictor^{DC-/-}*. Sabendo que culturas de BMDCs murino derivadas com mGM-CSF apresentam uma contaminação considerável de células CD11b+, purificamos as células CD11c+ para então realizarmos o experimento. Estudos recentes têm explorado os programas metabólicos necessários para a ativação e função das DCs. Sabe-se que a ativação de DCs derivadas da medula óssea quando ativadas com ligantes de TLRs iniciam dentro de minutos pós-ativação um processo de transição metabólica caracterizada por aumento da via glicolítica e ativação de Akt (61). Desta forma, as células CD11c+ purificadas foram estimuladas com LPS por diferentes tempos, seguida da coleta para extração de proteínas. Como mostra a Figura 13, as células CD11c+ derivadas dos animais *Rictor^{DC-/-}* não apresentaram a fosforilação da Akt no resíduo alvo do complexo mTORC2 ativado (Serina 473), indicando que a deleção do gene codificante da proteína Rictor resultou na perda de função desse complexo. Verificamos também se a ausência de funcional do complexo mTORC2 leva ao aumento da ativação do complexo mTORC1 como um efeito compensador. A fosforilação da Akt na treonina 308 leva a ativação do complexo mTORC1 que por sua vez fosforila a proteína S6 (44). Embora os níveis de fosforilação de Akt Thr308 estejam diminuídos em *Rictor^{DC-/-}*, não observamos aumento da expressão exacerbada de pS6, o que indica que DCs deficientes em mTORC2 quando ativadas com LPS não regulam positivamente mTORC1 como mecanismo de compensação.

Figura 13. Análise da expressão proteica da via mTOR. Células CD11c+ foram purificadas a partir de cultura de BMDC e plaqueadas em IMDM sem soro fetal bovino, na densidade de 5×10^5 células/mL por poço. As células foram ativadas com 100 ng/mL de LPS e coletadas após 30, 60 e 120 minutos de ativação. Células não estimuladas (NE) foram coletas após 120 minutos do início do ensaio.

5.2 A ausência do complexo mTORC2 nas DCs não afeta frequência de populações celulares em animais *Rictor*^{DC-/-}

Sabe-se que a integrina CD11c é predominantemente expressa em DCs no entanto, monócitos, macrófagos e por vezes linfócitos também podem expressar essa integrina (62). Assim, para avaliar se o cruzamento entre as duas linhagens geneticamente modificadas (*Itgax*^{Cre} X *Rictor*^{flox}) não provocou alterações nas frequências basais de populações celulares do sistema imune, realizamos estudos de fenotipagem das células do baço de animais *Rictor*^{flox/flox} e *Rictor*^{DC-/-}. Nenhuma diferença foi observada entre as frequência destas populações celulares, possibilitando a comparação dos grupos nos experimentos que seguem.

Figura 14. Imunofenotipagem dos animais Rictor^{flox/flox} e Rictor^{DC-/-} em condições basais. Esplenócitos foram marcados para CD11c⁺MHCII⁺ (DCs), CD11b⁺F4/80⁺ (macrófagos), CD11b⁺Ly6C⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T), CD220⁺ (linfócitos B) e CDNkp46⁺ (células NK). n= 3/grupo, repetido duas vezes independente. Os dados são expressos como média ± SEM. Teste Mann Whitney, $p > 0,05$.

CAPÍTULO 1 – ESTUDO *in vivo*

Para avaliar o papel de mTORC2 nas DCs intestinais, nós realizamos os experimentos *in vivo* que seguem neste capítulo.

5.3 Padronização e determinação da concentração do DSS para indução da colite

Tendo em vista que DCs da mucosa participam ativamente na indução de tolerância e ativação de respostas imunes aos microrganismos que compõem a microbiota intestinal, nós empregamos o modelo de colite induzida por DSS para avaliar o papel de mTORC2 sobre as funções das DCs da cLP. No modelo de colite induzidos por DSS os parâmetros clínicos que se desenvolvem e são observados nos animais mimetizam o quadro clínico visto em humanos (63).

Iniciamos nossos experimentos com a análise da sobrevivência e da perda de peso, e observamos que, tanto os animais Rictor^{flox/flox} como os Rictor^{DC-/-} não apresentaram queda significativa do peso em relação ao peso do dia inicial ao longo dos 7 primeiros dias de indução da colite. Além disso, a partir do dia 9 os animais iniciaram recuperação da perda de peso (Figura 15A). Também, não houve diferença significativa no índice de

atividade da doença (DAI) e nenhum animal morreu ao longo dos 15 dias que eles foram acompanhados (Figuras 15B e 15C).

Figura 15. Colite nos animais Rictor usando 2,5% de DSS. Indução da colite foi feita nos animais Rictor^{flox/flox} e Rictor^{DC-/-} através da adição de 2,5% de DSS na água dos animais; (A) Perda de peso diária relativa ao dia inicial; (B) score clínico avaliado pelo Índice de atividade da doença (DAI); (C) curva de sobrevivência. n=6-8/grupo colite. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, de um experimento. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p > 0,05$.

Sabe-se que a susceptibilidade à colite induzida por DSS é dependente do *background* genético do animal (60). Considerando que estamos estudando uma linhagem transgênica de fundo genético diferente dos animais selvagens C57Bl/6J – fundo C57Bl/129j – este resultado nos indicou a necessidade de padronização do modelo nos nossos camundongos. Com 3,5% de DSS diluído no bebedouro dos animais, iniciamos a determinação da sobrevivência, o acompanhamento da perda de peso diário e análise do DAI. Como mostrado na Figura 16, embora os animais tenham tido queda vertiginosa no peso, não pudemos observar diferenças entre os grupos Rictor^{flox/flox} e Rictor^{DC-/-} quanto ao peso (A) e DAI (B). Além disso, 20% dos animais Rictor^{flox/flox} morreram antes do sétimo dia de colite (16C), sugerindo que 3,5% pudesse ser uma concentração muito alta.

Figura 16. Indução da colite nos animais Rictor usando 3,5% de DSS. (A) Perda de peso diária relativa ao dia inicial; (B) score clínico avaliado pelo Índice de atividade da doença (DAI); (C) curva de sobrevivência. n=7-8/grupo colite. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, de um experimento. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni, $p > 0,05$.

Em seguida, optamos por tratar os animais com a concentração de 3% de DSS e determinar a sobrevivência, monitorar a perda de peso e o DAI. Com esta concentração observamos que ambos os grupos tiveram queda significativa ($p < 0,05$) no peso em relação ao peso inicial, nos 7 primeiros dias de indução da colite (Figura 17A). Ainda na Figura 17A observamos que os animais do grupo Rictor^{DC-/-} tiveram menor perda de peso e melhor score clínico, DAI, (Figura 17B) que os Rictor^{flx/flx}, embora sem diferenças estatísticas significantes.

Figura 17. Indução da colite nos animais Rictor usando 3% de DSS. (A) Perda de peso diária relativa ao dia inicial; (B) score clínico avaliado pelo Índice de atividade da doença (DAI); (C) curva de sobrevivência. n=6-7/grupo. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM, de um experimento. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni $p > 0,05$.

Observando que entre 50 e 70% dos animais morrem no dia 8 após início da colite, nós repetimos o experimento com a concentração de 3% de DSS. Com base nestes resultados concluímos que a concentração de 3% de DSS foi a mais indicada para o estudo do desenvolvimento da colite nos nossos animais, pois nos permitiu observar perda de peso significativa em relação ao dia inicial, encurtamento do cólon e desenvolvimento de sintomas clínicos em ambos os grupos.

5.4 Ausência de mTORC2 nas DCs atenua o score clínico da colite induzida por DSS

Após a padronização da concentração de DSS, iniciamos nossos experimentos eutanasiando os animais no dia 7 após início da indução da inflamação. Como mostrado na Figura 18A, observamos que ambos os grupos apresentaram perda de peso em relação aos animais que não tomaram DSS, e que os animais Rictor^{DC-/-} tiveram menor perda de peso significativa com relação aos animais Rictor^{flx/flx}. Adicionalmente, os

animais $Rictor^{DC-/-}$ apresentaram maior comprimento do cólon (Figura 18B) e menor score de atividade da doença (Figura 18C), indicando inflamação atenuada. Sabemos que nesse modelo a inflamação da camada mucosa durante a doença ativa não ocorre de forma uniforme ao longo do cólon, mas costuma iniciar-se no reto e em casos mais severos, se estende por todo seu comprimento (1). Desta forma, um segmento do cólon distal dos animais foi coletado e corado com HE para análise das lesões inflamatórias. Comparados com seus respectivos controles, observamos que ambos os grupos apresentaram comprometimento da estrutura do tecido, com perda massiva das dobras da mucosa e das criptas. Ainda que a determinação do score histológico precise ser feita por um patologista, podemos observar que $Rictor^{DC-/-}$ apresentam menos lesão quando comparados com o grupo $Rictor^{flox/flox}$, em que pudemos notar a perda total dos colonócitos (Figura 18D).

Figura 18. Avaliação de parâmetros clínicos após indução de colite. (A) acompanhamento da alteração do peso expresso em porcentagem da perda de peso entre os dias 0 e 7 de colite induzida por DSS 3%; (B) score de colite expresso pelo Índice de atividade da doença (DAI); (C) média da medida do tamanho do cólon dos animais, cortes histológicos das porções do cólon de $Rictor^{flox/flox}$ (controle e DSS) e $Rictor^{DC-/-}$ (controle e DSS) corados com HE. $Rictor^{flox/flox}$ CTRL n = 2 animais/grupo, $Rictor^{flox/flox}$ DSS n = 4-7 e $Rictor^{DC-/-}$ DSS n = 4-8. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. Two-way ANOVA, pós teste de Bonferroni, * $p < 0,05$. Dados representativos de 4 experimentos independentes.

A inflamação na colite pode ser caracterizada pela participação de diversos fatores. Um fator que pode ser avaliado para análise da inflamação é a proteína C reativa

no soro (*C reactive protein* - CRP). A CRP é uma proteína produzida pelo fígado e liberada na circulação durante a fase aguda da doença inflamatória, sendo induzida pela produção de citocinas inflamatórias como a IL-6, IL-1 β e TNF- α (64). A produção aumentada dessa proteína tem sido avaliada em pacientes com doenças inflamatórias intestinais e se correlaciona bem com a atividade da doença (65, 66). Observamos que os níveis da CRP em ambos os grupos submetidos à colite aumentaram significativamente em relação aos controles, e que seus níveis estavam significativamente diminuídos em Rictor^{DC-/-} com colite comparados aos animais Rictor^{flox/flox} (Figura 18E). Estes dados indicam que a ausência da atividade de mTORC2 nas DCs atenua a colite induzida por DSS.

5.5 Ausência de mTORC2 nas DCs resulta em menor comprometimento da integridade epitelial e menor invasão bacteriana durante a colite

A inflamação induzida por DSS conduz a disfunção da barreira epitelial devido à alteração na expressão das proteínas de junção especializadas, como as proteínas da família das claudinas, a ocludina e ZO-1 (60). A perda da integridade desta barreira aumenta a permeabilidade intestinal, permitindo a invasão bacteriana que contribui para a exacerbação da inflamação (64). Dentre estas proteínas, as claudinas são consideradas cruciais para o controle da permeabilidade paracelular. O domínio extracelular dessas proteínas formam poros com as células adjacentes e regulam a permeabilidade seletiva a íons. Assim, o aumento da expressão de claudina-2 está associado ao comprometimento da barreira epitelial devido a formação de poros na membrana das células e transporte irregular de íons (67). Desta forma, nós avaliamos a perda da integridade epitelial através da análise da expressão proteica da claudina-2.

Notamos que após 7 dias de inflamação o cólon dos animais Rictor^{DC-/-} apresentaram menor expressão de claudina-2 quando comparados com os animais Rictor^{flox/flox} (Figura 19A). Também, avaliamos a permeabilidade intestinal dos animais pelo método FITC-Dextran. O dextran é uma macromolécula que não é metabolizada e em condições normais, não é absorvida em grandes quantidades. Quando conjugamos esta molécula com um marcador fluorescente, como o FITC, é possível avaliar no soro quanto desse conjugado permeou através do epitélio e correlacionar este dado com a integridade da barreira. No nosso estudo observamos que os animais Rictor^{DC-/-} tendem

a apresentar menores quantidades do FITC-Dextran no soro (Figura 19B), sugerindo menor permeabilidade intestinal nesses animais.

Além de expressão das proteínas que constituem as zônulas de oclusão e aderente, a integridade da barreira epitelial também é mantida pela produção de muco. O muco é produzido pelas células caliciformes presentes entre os colonócitos e atua como uma barreira física e química, ajudando a impedir a invasão de microrganismos patogênicos e o contato íntimo entre as bactérias da microbiota e as células epiteliais (68). Usando cortes histológicos de animais submetidos a colite, fizemos marcação para o muco (vermelho) e para as bactérias (verde) presentes da luz intestinal, além do núcleo dos colonócitos (azul), buscando avaliar o comprometimento da produção do muco acompanhado da invasão bacteriana. Corroborando com os demais dados, os animais $Rictor^{DC-/-}$ apresentam menor invasão bacteriana que $Rictor^{flox/flox}$ (Figura 19C).

Figura 19. Avaliação da barreira intestinal. (A) Expressão proteica de claudina-2 no cólon dos animais submetidos à colite foi avaliada por Western Blotting; (B) A permeabilidade intestinal ao dia 7 da colite foi analisada pela dosagem de FITC-Dextran no soro dos animais. $Rictor^{flox/flox}$ n= 13 e $Rictor^{DC-/-}$ n=8, pool de dois experimentos independentes. Dados expressos em média±SEM. Teste t de Student; (C) Segmentos do cólon foram marcados com sonda para o gene 16S rRNA de bactéria conjugada com FITC (verde), o

mucosa marcada usando a Lectina *Ulex europaeus* aglutinina I (UEA-I) conjugada com TRIT (vermelho) e o núcleo das células estão corados com DAPI (azul). Aumento 40x.

Desta forma, nossos dados sugerem as DCs presentes na mucosa participam da manutenção da integridade da barreira intestinal, e que este mecanismo pode envolver a participação da via de sinalização de mTORC2, uma vez que a perda desse complexo especificamente nessas células diminui a permeabilidade intestinal e a invasão bacteriana durante a colite.

5.6 Ausência de mTORC2 nas DCs diminui a inflamação no cólon

A perda da integridade da barreira intestinal durante quadros inflamatórios permite a invasão bacteriana que contribui para a exacerbação da inflamação (64). Assim, citocinas como TNF- α , IL-1 β e INF- γ são destaque na patogênese das DIIs (69, 70), portanto além da integridade da mucosa a elucidação dos mecanismos envolvidos na indução da produção de citocinas também pode levar a novos alvos terapêuticos.

Neste contexto, a família das quinases de c-Jun NH₂-terminal (JNK), conhecidamente respondedoras a estímulos de estresse, merecem destaque. A família JNK compreende proteínas de três isoformas diferentes: JNK1, JNK2 e JNK3. As duas primeiras isoformas é expressa por todos os tecidos, enquanto a última é expressa no cérebro, coração e testículo (71). Uma vez ativada, JNK pode fosforilar fatores de transcrição como JunB, JunD, c-fos e AP-1, que por sua vez regulam a expressão de genes envolvidos com resposta à estresse (72). Ainda que sem um papel definido, a ativação de JNK foi vista em amostras de intestino de pacientes que sofrem de colite ulcerativa e Doença de Chron (73, 74). Desta forma, nós avaliamos a inflamação local a partir da análise da quinase c-Jun NH₂-terminal quinase fosforilada (p-JNK) no cólon dos animais. Níveis de expressão de p-JNK tenderam a ser menores nos animais Rictor^{DC-/-} (Figura 20A).

Adicionalmente, nós verificamos se a ativação de mTOR via atividade do complexo 2 podia ser observado juntamente à inflamação intestinal. Sabendo que mTORC2 fosforila AKT na serina 473 (75), avaliamos por Western Blotting a expressão de pAKT (Ser 473) e pan-AKT (AKT total), no cólon dos animais após a colite. Observamos que em ambos os grupos há ativação dessa via de sinalização, já que as

demais células imunes e não imunes mantêm a atividade da via intacta. Uma singela diminuição na fosforilação da pAKT (Ser 473) no grupo $\text{Rictor}^{\text{DC-/-}}$ pode ser sugerida (Figura 20A), no entanto a verificação da ativação dessa mTORC2 nas DCs deve ser feita com as células isoladas.

Figura 20. Avaliação da inflamação intestinal. (A) Análise da expressão da proteína pAKT(Ser473) (Cell signaling 1:500), panAKT (Cell signacling 1:500), do fator transcrição JNK fosforilado (Santa Cruz 1:500) e da Beta actina (Sigma 1:10000) no cólon dos animais tratados (3% DSS); (B) Produção de citocinas após inflamação foi determinada pela técnica de ELISA. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteínas totais presentes no segmento intestinal (n=5-8/grupo). Dados expressos em média±SEM. Teste t de Student, * p < 0,05. Representativo de três experimentos independentes.

Como mostrado na Figura 20B, níveis diminuídos significantes de TNF-α, IL-6, IL-17 e IL-23 foi detectada no cólon dos animais $\text{Rictor}^{\text{DC-/-}}$, mostrando que este grupo apresenta um grau de inflamação local menor que o animais $\text{Rictor}^{\text{flox/flox}}$. No entanto, nenhuma diferença foi observada para IL-22e IL-12p40.

Assim, estes achados sugerem que parâmetros clínicos (Figura 18) podem ser melhores compreendidos quando associados à detecção de fatores locais da inflamação, como a produção de citocinas no cólon. Além disso, estes dados nos levam a crer que o complexo mTORC2 nas DCs apresenta um papel imunomodulador nestas células e que sua ausência nas DCs da cLP resulta diminuição nos níveis da inflamação. Entretanto, o *crosstalk* entre mTORC2 e a via JNK, e as demais células envolvidas não foi avaliada nesse estudo.

5.7 Ausência de Rictor nas DCs não inibe a maturação mas compromete a migração das subpopulações de DCs da lamina própria para o linfonodo mesentérico

Como mencionado anteriormente, podemos encontrar quatro populações de DCs na lamina própria de murinos. Todas são caracterizadas por não expressarem marcadores de linhagem (CD3, CD19, Nk1.1, B220), se diferenciam de macrófagos por serem negativas para CD64, F4/80 e tirosina quinase Mer (MerTK), e por expressarem altos níveis da integrina CD11c e de MHC de classe II. Com base na expressão das integrinas CD11b e CD103 encontramos as DCs CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺, CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁻CD11b⁻ (15). Verificamos então a presença destas quatro subpopulações na cLP e nos MLNs dos animais após indução da colite.

Primeiramente, observamos que ambos os grupos apresentam a mesma frequência no total de DCs (células CD45⁺, Lin⁻, CD11c⁺MHC-II⁺) na cLP; no entanto, o número total dessas células encontra-se aumentada nos animais Rictor^{DC-/-} (Figura 21).

Figura 21. Análise do infiltrado de células dendríticas (DCs) na lâmina própria do colon (cLP) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e a cLP foi digerida para isolamento das células infiltrantes. O total de DCs [singlets, vivas, CD45⁺, Lin⁻(CD3⁻, B220-Ly6G⁻, siglecF⁻, Nkp46⁻, CD4⁻), CD11c⁺MHCII⁺), foi avaliado nos animais Rictor^{flox/flox} (n=7-

8/experimento) e $Rictor^{DC-/-}$ (n=8-13/experimento). Dados expressos em média $\pm$ SEM, *pool* de três experimentos independentes. Teste t de Student *** $p < 0,001$.

Interessantemente, quando dividimos a população total de DCs em seus subtipos (Figura 22) verificamos que há uma redução significativa na frequência da população $CD103^+CD11b^+$ (Figura 22B) e aumento no número de $CD103^-CD11b^-$ (Figura 22D) na cLP do grupo $Rictor^{DC-/-}$.

Figura 22. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) na lamina própria do colon (cLP) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e a cLP foi digerida para isolamento das células infiltrantes. Dentro do total de DCs avaliamos as subpopulações $CD103^+CD11b^-$ (A), $CD103^+CD11b^+$ (B), $CD103^-CD11b^+$ (C) e $CD103^-CD11b^-$ (D) nos animais $Rictor^{flox/flox}$ (n=7-8/experimento) e $Rictor^{DC-/-}$ (n=8-13/experimento). Dados

expressos em média±SEM, *pool* de três experimentos independentes. Teste t de Student * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Uma vez que o antígeno é engolfado ou sinais endógenos de perigo ativam as DCs da cLP, todos as subpopulações podem migrar para os linfonodos mesentéricos por um mecanismo dependente de CCR7, e lá apresentar o antígeno para células da imunidade adaptativa (76). No MLN, é possível identificar com base nos níveis de expressão da molécula MHC de classe II, as DCs migratórias (MHCII^{high}), localizadas na periferia do linfonodo próximas às áreas em que se encontram as células T, das residentes (MHCII^{low}) (Ref). No nosso estudo, observamos que tanto a frequência quanto o número das DCs migratórias e residentes estão drasticamente diminuídos nos animais Rictor^{DC-/-} (Figura 23A e B, respectivamente).

Figure 23. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) no linfonodo mesentérico após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs foram digeridos. O total de DCs foi dividido em DCs migratórias [singlets, vivas, CD45+, Lin-(CD3-, B220-Ly6G-, siglecF-, Nkp46-, CD4-), CD11c+MHCII^{high}], e residentes [singlets, vivas, CD45+, Lin-(CD3-, B220-Ly6G-, siglecF-, Nkp46-, CD4-), CD11c+MHCII^{low}] nos animais Rictor^{flx/flx} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, *pool* de três experimentos independentes. Teste t de Student ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Analisando as subpopulações dentro das DCs migratórias, assim como observado na cLP, a frequência das DCs CD103⁺CD11b⁺ (Figura 24B) mostrou-se diminuída e o número absoluto de todas as subpopulações encontra-se reduzido no grupo Rictor^{DC-/-} (Figura 24A-D).

Figura 24. Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) migratórias no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs foram digeridos. Dentro do total de DCs migratórias avaliamos as subpopulações CD103⁺CD11b⁻ (A), CD103⁺CD11b⁺ (B), CD103⁻CD11b⁺ (C) e CD103⁻CD11b⁻ (D) nos animais Rictor^{flox/flox} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, pool de três experimentos independentes. Teste t de Student * p < 0,05, **p<0,01.

A mesma identificação foi realizada para fração de DCs residentes nos MLNs, em que observamos aumento na frequência de DC CD103⁺CD11b⁺ mas sem diferença

significante no número de células (Figura 25B), frequência e números diminuídos das DCs CD103⁺CD11b⁺ residentes (Figura 25C), e número reduzido da população de DC CD103⁻CD11b⁻ (Figura 25D).

Figure 25 Análise das subpopulações de células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs foram digeridos. Dentro do total de DCs residentes avaliamos as subpopulações CD103⁺CD11b⁻ (A), CD103⁺CD11b⁺ (B), CD103⁻CD11b⁺ (C) e CD103⁻CD11b⁻ (D) nos animais *Rictor^{flox/flox}* (n=7-8/experimento) e *Rictor^{DC-/-}* (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, pool de três experimentos independentes. Teste t de Student * p < 0,05, ** p < 0,01, ****p<0,0001.

Após ativação, DCs da cLP adquirem um fenótipo migratório caracterizado pela regulação positiva da expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, necessárias para a ativação de células T *naive* nos órgãos linfóides secundários (77). Assim, outro ponto relevante a ser levado em consideração é a capacidade dessas

células adquirirem um fenótipo ativado e regular em forma apropriada a expressão de moléculas necessárias para a apresentação de antígenos e ativação de células T. Nos nossos resultados observamos que a frequência de células expressando CD40, CD80 e CD86 não está diminuída em nenhuma das subpopulações de DCs da cLP nos animais *Rictor*^{DC-/-}, assim como essas células não apresentam níveis reduzidos na expressão dessas moléculas. Observamos, no entanto, que as populações de DC CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺ e CD103⁻CD11b⁺ do grupo *Rictor*^{DC-/-} apresentaram maior frequência de células CD86⁺ em relação ao grupo *Rictor*^{flox/flox} (Figura 26A-C).

Figura 26. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) da lamina própria do cólon (cLP). Após a indução da colite por 7 dias com DSS (3%) os animais foram eutanasiados e as células da cLP isoladas. A expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 foi analisada para cada subpopulação de DC: (A) CD103+CD11b-, (B) CD103+ CD11b+, (C) CD103-CD11b+ e (D) CD103-CD11b- nos animais Rictor^{flax/flax} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, *pool* de três experimentos independentes. Teste t de Student * p < 0,05, ** p < 0,01. FMO – Fluorescence Minus One.

Verificamos também se juntamente à redução no número de células, a expressão de CD40, CD80 e CD86 também estariam alterados nas DCs nos MLNs. Como mostra a Figura 27, apenas a população DC CD103+CD11b- migratória apresentou diminuição significativa na frequência de células positiva para CD80, mas sem alteração nos níveis de expressão dessa molécula (Figura 27A). Da mesma forma, as DCs residentes não mostraram comprometimento na expressão das moléculas co-estimuladoras (Figura 28) e apenas na subpopulação de DC CD103+CD11b- encontramos redução significativa na expressão de CD86 (Figura 28A).

Figura 27. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) migratórias no linfonodo mesentérico (MLN). Após a indução da colite por 7 dias com DSS (3%) os animais foram eutanasiados e as células dos MLNs isoladas. A expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 foi analisada para cada subpopulação de DC migratória: (A) CD103+CD11b-, (B) CD103+ CD11b+, (C) CD103-CD11b+ e (D) CD103-CD11b- nos animais Rictor^{flx/flx} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, *pool* de três experimentos independentes. Teste t de Student * p < 0,05, **** p < 0,01. FMO – Fluorescence Minus One.

Figura 28. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN). Após a indução da colite por 7 dias com DSS (3%) os animais foram eutanasiados e as células dos MLNs isoladas. A expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 foi analisada para cada subpopulação de DC residente: (A) CD103+CD11b-, (B) CD103+ CD11b+, (C) CD103-CD11b+ e (D) CD103-CD11b- nos animais Rictor^{flx/flx} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, pool de três experimentos independentes. Teste t de Student * p < 0,05, **** p < 0,01. FMO – Fluorescence Minus One.

Os dados acima sugerem que o impacto de mTORC2 nas DCs não está na regulação de moléculas co-estimuladoras, mas sim sobre a migração celular. Assim, nós avaliamos se a presença das DCs na cLP e nos MLNs em condição de homeostase estavam alteradas. Como mostra a Figura 29A, os animais Rictor^{flx/flx} e Rictor^{DC-/-} não apresentam diferenças quanto a frequência e número de DC totais na cLP em condições

de homeostase, ainda que eles apresentem alterações quanto as subpopulações (Figura 29B-D).

Figura 29. Análise das células dendríticas (DCs) na lamina própria do colon (cLP) na homeostase. Os animais foram eutanasiados e a cLP foi digerida para isolamento das células. (A) Dentro do total de DCs [singlets, vivas, CD45+, Lin-(CD3-, B220-Ly6G-, siglecF-, Nkp46-, CD4-), CD11c+MHCII+] avaliamos as subpopulações CD103+CD11b- (B), CD103+ CD11b+ (C), CD103-CD11b+ (D) e CD103-CD11b- (E) nos animais Rictor^{fllox/fllox} (n=5) e Rictor^{DC-/-} (n=6). Dados expressos em média±SEM, de um experimento. Teste t de Student * p < 0,05.

Reforçando nossa hipótese, nenhuma diferença foi observada no número de DCs migratórias quando na homeostase (Figura 30), assim como também não observamos alterações no compartimento de DCs residentes (Figura 31).

Figura 30. Análise das células dendríticas (DCs) migratória no linfonodo mesentérico (MLN) durante a homeostase. Os animais foram eutanasiados e os MLNs foram digeridos. (A) Dentro do total

de DCs migratórias [singlets, vivas, CD45+, Lin-(CD3-, B220-Ly6G-, siglecF-, Nkp46-, CD4-), CD11c+MHCII^{high}] avaliamos as subpopulações CD103+CD11b- (B), CD103+ CD11b+ (C), CD103-CD11b+ (D) e CD103-CD11b- (E) nos animais Rictor^{flox/flox} (n=5) e Rictor^{DC-/-} (n=6). Dados expressos em média±SEM, de um experimento. Teste t de Student.

Figura 31. Análise das células dendríticas (DCs) residentes no linfonodo mesentérico (MLN) durante a homeostase. Os animais foram eutanasiados e os MLNs foram digeridos. (A) Dentro do total de DCs residentes [singlets, vivas, CD45+, Lin-(CD3-, B220-Ly6G-, siglecF-, Nkp46-, CD4-), CD11c+MHCII^{low}] avaliamos as subpopulações CD103+CD11b- (B), CD103+ CD11b+ (C), CD103-CD11b+ (D) e CD103-CD11b- (E) nos animais Rictor^{flox/flox} (n=5) e Rictor^{DC-/-} (n=6). Dados expressos em média±SEM, de um experimento. Teste t de Student.

Desta forma, nossos dados sugerem que a ausência de mTORC2 nas DCs afeta a migração dessas células da cLP para o MLN durante a inflamação, mas também pode participar na migração dos precursores de DCs provenientes da medula óssea.

5.8 Animais Rictor^{DC-/-} apresentam redução no infiltrado de células T na cLP e no MLN

Trabalhos recentes mostraram que DCs produtoras de IL-23 e células Th17 produtoras de IL-17 são importantes na patogênese da colite (17). Sabe-se que a citocina IL-23 secretada pelas DCs atua como molécula chave na homeostase intestinal por participar na defesa contra microrganismos invasivos e estabelecer conexão entre a imunidade inata e a adaptativa. Sua síntese em excesso favorece a proliferação de linfócitos T efetores, diminuição de Treg e expansão de células produtoras de IL-17 e IFN- γ . (17, 20).

Na tentativa de elucidar as células envolvidas com a produção de citocinas no cólon dos animais com colite (Figura 18B), e investigar o impacto da perda da via mTORC2 na função das DCs, nós analisamos a presença de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas, presentes na cLP e s MLNs. Como mostra a Figura 32A, embora a frequência de linfócitos T na cLP não esteja alterada, o número dessas células encontra-se significativamente reduzido nos animais *knockout* em Rictor nas DCs. Esses animais também mostraram aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺, porém sem alteração no número de células (Figura 32B), e redução no número de linfócitos T CD8⁺ (Figura 32C).

Figura 32. Infiltrado de linfócitos T na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e cLP digerida. (A) Infiltrado de células T (vivas, CD45⁺, CD3⁺), (B) T CD4⁺ (vivas, CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺CD8⁻) e (C) T CD8⁺ (vivas, CD45⁺, CD3⁺, CD⁻CD8⁺) foi avaliado nos animais *Rictor^{flox/flox}* (n=8) e *Rictor^{DC-/-}* (n=13). Dados expressos em média±SEM, um único experimento. Teste t de Student *p<0,05, *** p< 0,01.

Corroborando os demais dados, o grupo *Rictor^{DC-/-}* também mostrou redução no número de células T CD4⁺ produtoras de IL17 (Figura 33C), mas nenhuma alteração foi

encontrada para linfócitos T CD4⁺IFN γ ⁺ (Figura 33A). Interessantemente, a deficiência de Rictor nas DCs também foi acompanhada pela redução de células de Treg na cLP (Figura 33D).

Figura 33. Análise de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocina e de T reg na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e cLP digerida. Após estímulo com PMA e ionomicina, células T CD4⁺ foram analisadas quanto a produção de IFN γ e IL-17 (A-C) e para presença de T regs (D). Animais *Rictor^{flox/flox}* (n=8) e *Rictor^{DC-/-}* (n=13). Dados expressos em média $\pm$ SEM, um único experimento. Teste t de Student *** p< 0,01

No modelo de colite induzido por DSS observa-se também um aumento no número de linfócitos T CD8+. Avaliamos a presença destas células produtoras de citocinas e vimos que os animais $Rictor^{DC-/-}$ apresentam uma tendência de redução no número de $CD8^{+}IFN\gamma^{+}$ na cLP (Figura 34A).

Figura 34. Análise de linfócitos T CD8⁺ produtores de citocina na lâmina própria do cólon (cLP) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e cLP digerida. Após estímulo com PMA e ionomicina, células T CD8⁺ foram analisadas quanto a produção de IFN γ e IL-17 (A-C). Dados expressos em média $\pm$ SEM de um experimento. Teste t de Student *** p < 0,01.

Semelhante à cLP, os MLNs dos animais $Rictor^{DC-/-}$ não mostraram diferença quanto à frequência de células T, mas sim redução significativa quanto ao número de células (Figura 35A). Juntamente com este dado, observamos diminuição significativa no número de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 35B e C, respectivamente). Embora o número de linfócitos T CD4⁺ na cLP não tenha apresentado redução, a queda no número total de linfócitos infiltrantes reflete a redução dessas células nos MLNs, que por sua vez pode ser resultado da diminuição de DCs migratórias para este tecido.

Figura 35. Linfócitos T no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs digeridos. (A) Infiltrado de células T (vivas, CD45+, CD3+), (B) T CD4+ (vivas, CD45+, CD3+, CD4+CD8-) e (C) T CD8+ (vivas, CD45+, CD3+, CD-CD8+) foi avaliado nos animais Rictor^{flox/flox} (n=7-8/experimento) e Rictor^{DC-/-} (n=8-13/experimento). Dados expressos em média±SEM, *pool* de dois experimentos independentes. Teste t de Student *p<0,05, ** p< 0,01.

Ao estimular o *pool* de células para produção de citocinas, corroborando novamente os resultados da cLP, identificamos queda significativa no número de linfócitos T CD4+ produtores de IL-17 (Figura 36C) e positivos para Foxp3 (Figura 36D). Para células T CD4+ IFN γ + e duplo positivas IL-17+IFN γ +, observamos apenas uma tendência de diminuição quanto ao número de células (Figuras 36A e B, respectivamente).

Figura 36. Análise de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocina e T reg no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs digeridos. Após estímulo com PMA e ionomicina, células T CD4⁺ foram analisadas quanto a produção de IFN γ e IL-17 (A-C) e para presença de T regs (D). Animais Rictor^{flx/flx} (n=8) e Rictor^{DC-/-} (n=13). Dados expressos em média $\pm$ SEM, um único experimento. Teste t de Student *** p< 0,01.

Os animais Rictor^{DC-/-} também mostraram redução no número de linfócitos T CD8⁺ IFN γ ⁺ no do duplo positivo IL17⁺IFN γ ⁺, como mostra a Figura 37A e B, respectivamente.

Figura 37. Análise de linfócitos T CD8+ produtores de citocina no linfonodo mesentérico (MLN) após a colite. No dia 7 após início da inflamação induzida por DSS (3%), os animais foram eutanasiados e os MLNs digeridos. Após estímulo com PMA e ionomicina, células T CD8+ foram analisadas quanto a produção de IFNγ e IL-17 (A-C). Animais Rictor^{flox/flox} (n=8) e Rictor^{DC-/-} (n=13). Dados expressos em média±SEM, um único experimento. Teste t de Student *** p<0,01

Assim, nossos dados apontam para uma deficiência no número de células T produtoras de citocinas decorrente da queda no número de DCs migratórias nos MLNs dos animais Rictor^{DC-/-}.

5.9 Análise preliminar da microbiota intestinal sugere que a inflamação atenuada em Rictor^{DC-/-} é independente da sua composição

Nos últimos anos a relação entre o estado de saúde do hospedeiro e sua microbiota intestinal tem sido intensamente estudada (17, 25). Sabe-se que a composição da microbiota é um fator influenciador da produção de muco, da

manutenção da integridade do epitélio e do início da resposta inflamatória. Foi demonstrado que a inflamação do intestino não pode ser reproduzida em animais sob condições livre de germes (*germ free*) (28) e que o tratamento com antibióticos atenua a gravidade da doença (54). Sendo assim, para avaliar se a deleção de Rictor impacta sobre a composição da microbiota intestinal e se esta diferença está relacionada com os resultados até então obtidos, nós coletamos as fezes dos animais antes do início da colite para análises.

A fim de eliminar quaisquer efeitos ambientais (efeito caixa, ninhadas diferentes), animais de pelo menos duas ninhadas diferentes foram misturados, de forma que cada caixa continha animais Rictor^{flox/flox} e Rictor^{DC-/-}. Coletamos as fezes formadas, extraímos o DNA bacteriano e empregamos a técnica de PCR em tempo real usando pares de primers específicos para o gene 16S rRNA para avaliar a quantidade total de bactérias. Também, realizamos o sequenciamento do gene 16S rRNA a fim de identificar as espécies constituintes da microbiota.

Como pode ser visto na Figura 38A, as fezes dos animais Rictor^{DC-/-} apresentam menor quantidade de bactérias comparados com o grupo Rictor^{flox/flox}. Entretanto, em análise preliminar quanto as espécies que compõe a microbiota, os animais parecem não apresentar diferenças (Figura 38B).

Figura 38. Análise da microbiota intestinal anterior ao início da colite. DNA genômico das bactérias intestinais foi extraído a partir das fezes. (A) A quantificação relativa das bactérias totais foi realizada por PCR em tempo real para o gene 16S rRNA e calculada pelo método delta CT; (B) Beta-diversidade para espécies. Teste t de Student, * $p < 0,05$.

Portanto, a inflamação reduzida observada em $\text{Rictor}^{\text{DC-/-}}$ parece ser independente da modulação via microrganismos específicos presentes na sua microbiota.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO *in vitro*

Na tentativa de compreender como a ausência de mTORC2 impacta sobre a biologia e o metabolismo das DCs, realizamos alguns experimentos *in vitro* empregando DC derivadas da medula óssea (*Bone Marrow-Derived Dendritic Cell – BMDC*) de animais $\text{Rictor}^{\text{flx/flx}}$ e $\text{Rictor}^{\text{DC-/-}}$. Aqui, também purificamos as células CD11c+ das nossas culturas.

5.10 Ausência de mTORC2 não impede a maturação *in vitro* das DCs

Visto nos experimentos *in vivo* que DCs deficientes em mTORC2 isoladas da cLP e MLN não apresentam prejuízo da regulação positiva das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 e de MHC classe II quando induzimos inflamação, avaliamos se o

mesmo acontece nas BMDCs ativadas *in vitro*. Observamos que assim como *in vivo*, a ausência de mTORC2 não impede a maturação das DCs estimuladas *in vitro* (Figura 39).

Figura 39. Expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs). BMDCs foram derivadas com mGM-CSF (20 ng/mL). Ao dia 6 células CD11c+ foram purificadas em plaqueta em IMDM por 24 horas antes de serem estimuladas com LPS (100 ng/mL). A expressão das moléculas co-estimuladoras CD40 (A), CD86 (B) e CD80 (C) e de MHC-II (D) foi analisada 24 horas após-estímulo. Dados expressos em média±SEM da triplicata de um experimento. Experimento representativo de três independentes com dados similares. Teste de Mann-Whitney, * p < 0,05. FMO – Fluorescence Minus One. UNS - unstimulated

Curiosamente, observamos DCs maduras derivadas de Rictor^{DC-/-} apresentam aumento da frequência e expressão de CD80 e MHC de classe II em relação ao grupo Rictor^{flox/flox}.

5.11 mTORC2 regula a produção de citocinas em DCs

Além de regular positivamente a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras, a produção de citocinas pelas DCs é um sinal determinante na indução de resposta imune mediada por células T. Usando BMDCs nós verificamos se a ausência de mTORC2 regularia a síntese de citocinas. Como mostra a figura abaixo, as DCs maduras derivadas de Rictor^{DC-/-} apresentam deficiência significativa na síntese de IL-6 (Figura 40A) e tendência de diminuição para síntese de TNF- α (Figura 40C).

Figura 40. Síntese de citocinas em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs). BMDCs foram derivadas com mGM-CSF (20 ng/mL). Ao dia 6 células CD11c⁺ foram purificadas em plaqueadas em IMDM por 24 horas antes de serem estimuladas com LPS (100 ng/mL) na presença de Brefeldina (1x). A expressão das citocinas IL-6 (A), IL-12p30 (B) e TNF- α (C) e IL-10 (D) foi analisada 6 horas após-estímulo. Dados expressos em média $\pm$ SEM da triplicata de um experimento. Dados representativos de três experimentos independentes com resultados similares. Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$. UNS - unstimulated

Novamente, nossos dados sugerem que DCs provenientes de Rictor^{DC-/-} são funcionalmente distintas daquelas em que mTORC2 está presente.

5.12 Deficiência de mTORC2 nas DCs são eficientes na indução de proliferação de linfócitos T CD4⁺

Nossos resultados dos experimentos *in vivo* sugerem que a ausência de mTORC2 afeta a migração das DCs mediante estímulo inflamatório. Tal deficiência está associada a redução no número de linfócitos na cLP e nos MLNs. Com base também nos experimentos *in vitro* até então apresentados, formulamos a hipótese de que a ausência de mTORC2 afeta migração celular sem afetar a capacidade destas células em ativar linfócitos T *naive*. A diminuição no número de DCs migratórias resulta em um menor número de células T ativadas e por consequência, infiltrantes na cLP. A fim de verificar esta hipótese, realizamos um ensaio de proliferação antígeno-específico com BMDCs derivas de Rictor^{flox/flox} e Rictor^{DC-/-} pulsadas com ovalbumina (OVA) co-cultivadas com linfócitos T CD4⁺ *naive* de animal OT-II.

Como mostra a Figura 41, DCs deficientes em mTORC2 não apresentam comprometimento na capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T e parecem apresentar maior capacidade para tanto. Este experimento foi realizado apenas uma vez e será repetido para confirmação dos resultados.

Figura 41. Ensaio de proliferação. Células CD11c+ foram purificadas de culturas de BMDCs e pulsadas com OVA (1mg/mL) por 24 horas. No dia seguinte, linfócitos T CD4+ *naïve* isolados de animal OT-II foram marcados com Cell Trace e co-cultivados com as DCs por 4 dias. Dados expressos em média±SEM da quadruplicata de um experimento. Teste de Mann-Whitney.

5.13 mTORC2 é necessário para polarização de células T CD4+em Th17

Tendo observado alterações na síntese de citocinas nas DCs derivadas da medula, nós avaliamos juntamente com a proliferação o destino fenotípico das células T CD4+. Assim, vimos que a ausência de parece aumentar a diferenciação para Treg (Figura 42A), não afeta a diferenciação para Th1 (Figura 42B) e diminui a capacidade dessas células induzirem a diferenciação para Th17 (Figura 42C).

Figura 42. Diferenciação de linfócitos T CD4⁺. Células CD11c⁺ foram purificadas de culturas de BMDCs e pulsadas com OVA (1mg/mL) por 24 horas. No dia seguinte, linfócitos T CD4⁺ *naive* isolados de animal OT-II foram marcados com Cell Trace e co-cultivados com as DCs por 4 dias. No quarto dia parte das células foi estimulada com PMA/ionomicina na presença de Brefeldina (1X) por 4 horas e marcados para IFNγ e IL-17. As células não estimuladas foram marcadas para Foxp3. Dados expressos em média±SEM da quadruplicata de um experimento. Test t de Student.

Portanto, além de interferir sobre a migração celular mTORC2 também parece regular o perfil de citocinas produzidas pelas DCs o que impacta sobre a perfil de células T CD4⁺ ativados por essas células. Também estamos repetindo este experimento.

5.14 DCs deficientes em mTORC2 apresentam aumento na respiração mitocondrial e da glicólise

Como já mencionado, a ativação de DCs, incluindo BMDCs, por ligantes de TLRs induz alterações metabólicas essenciais para a atividade funcional dessas células. Dentre estas alterações, o aumento da glicólise e queda da respiração mitocondrial para produção rápida de ATP é determinante (61). Desta forma, avaliamos por respirometria em células intactas (Seahorse, Agilent) se DCs derivadas de animais deficientes em

mTORC2 teriam prejuízo em realizar o “shift” metabólico necessário para que estas células sejam ativadas. Para isso, empregamos células CD11c+ purificadas de culturas de BMDCs e ativamos com LPS por 24 horas. Observamos que ambas a células estimuladas com LPS reduzem o oxigênio consumido (Figura 43A), indicada pelo OCR (*Oxygen consumption rate*), e aumentam o metabolismo glicolítico (Figura 43B), indicado pela acidificação derivada da produção de lactato ou ECAR (*Extracellular acidification rate*). Interessantemente, já em condições basais (sem estímulo com LPS) as células CD11c+ derivadas de Rictor^{DC-/-} apresentaram maior respiração mitocondrial, e maior atividade glicolítica que os animais suficientes para mTORC2.

Figura 43. Ativação via TLR induz aumento do metabolismo glicolítico nas DCs. Alterações na respiração mitocondrial (A) e no metabolismo da glicólise (B) em DCs estimuladas ou não com LPS (100ng/mL) por 24 horas. Dados expressos em média±SEM da sextuplicata de um experimento. N=1/grupo. OCR – Oxygen consumption rate; ECAR – Extracellular acidification rate, FCCP (fluorocarbonyl cyanide phenylhydrazine).

A reprogramação metabólica observada em DCs ativadas pode ser dividida em duas fases: (1) fase aguda da indução da glicólise, que tem início minutos após a ativação via TLRs e dura em média 6-8 horas; (2) fase tardia, em que o comprometimento com a via glicolítica ocorre devido a produção de óxido nítrico (NO) que inibe a cadeia de transporte de elétrons, especificamente o complexo IV (78). Foi demonstrado que o aumento da via glicolítica logo após a ativação garante que essas células sejam capazes de sintetizar ácidos graxos necessários para a expansão do

retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, requeridos para a síntese e secreção de proteínas envolvidas com a ativação funcional das DCs. Assim, nós também investigamos a reprogramação metabólicas das DCs 6 horas após estímulo com LPS. Neste experimento nós também aumentamos o número de animais por grupo e como mostrado na Figura 44A e B, DCs deficientes em mTORC1 apresentam maior atividade mitocondrial e metabolismo glicolítico, respectivamente.

Figura 44. Metabolismo glicolítico nas DCs poucas horas pós ativação. Alterações na respiração mitocondrial (A), (B) consumo de oxigênio não mitocondrial, (C) respiração basal, (D) capacidade máxima de respiração, (E) reserva respiratória, (F) vazamento de prótons, (G) produção de ATP dependente da mitocondria e (H) metabolismo da glicólise em DCs estimuladas com LPS (100ng/mL) por 6 horas. Dados expressos em média±SEM de um experimento. N=4/grupo, avaliados em triplicata. FCCP - *carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*; AA - *antimycin A*.

Quanto ao consumo oxigênio pudemos observar que a ausência de Rictor aumenta a seu consumo basal pela mitocôndria (Figura 44C), assim como também a capacidade respiratória máxima (Figura 44D), e a produção de ATP dependente da mitocôndria (Figura 44G). Desta forma, esses dados indicam a ausência de mTORC2 não compromete a reprogramação metabólica necessária para que DCs ativadas se tornem funcionais e indica que ela está acentuada.

DISCUSSÃO

6 Discussão

Nas últimas décadas, o número de indivíduos acometidos com colite ulcerativa vem crescendo vertiginosamente. Esta doença crônica caracterizada por episódios agudos e de remissão de inflamação intestinal, está associada ao desenvolvimento do câncer colorretal (79) e, portanto, os fatores que contribuem na sua patogênese devem ser investigados a fim contribuírem nos avanços terapêuticos. As DCs intestinais constituem um grupo heterogêneo de células prontamente responsivo aos estímulos do microambiente, e por serem a “ponte” entre a imunidade inata e adquirida, representam um ponto chave na compreensão da homeostase intestinal.

Trabalhos recentes apontam para a importância do metabolismo na manutenção e determinação das funções celulares (80). No nosso estudo, nós avaliamos o papel da via de sinalização do complexo 2 da mTOR (mTORC2) sob o fenótipo e funções da DCs intestinais. Em células da imunidade inata mTORC2 tem sido relacionado com a organização do citoesqueleto e síntese de citocinas (75), no entanto seu papel ainda precisa ser estudado. Para tanto, escolhemos o modelo de colite ulcerativa induzida por DSS em animais cre-lox suficientes para a via (Rictor^{flox/flox}) e especificamente deficientes nas DCs (Rictor^{DC-/-}).

Após verificar que a deleção de Rictor ocorreu especificamente nas células CD11c+ e que a frequência das demais populações celulares não é alterada, nós iniciamos os experimentos *in vivo* com a inflamação intestinal. Primeiramente, avaliamos os aspectos clínicos da doença e vimos que os animais deficientes em Rictor apresentam score clínico atenuado e menores níveis de mediadores inflamatórios. Assim como nos nossos resultados, em um trabalho de colite induzida por DSS em camundongos C57Bl/6 foi visto que a via de sinalização das JNK estava ativada no cólon inflamado dos animais. A sinalização via JNK estava associada à severidade da perda de peso, do score histológico e a produção local das citocinas TNF- α , IL-6 e INF- γ (81). A redução da inflamação também foi acompanhada por menor comprometimento da barreira epitelial, revelada pela menor expressão de claudina-2, e redução da invasão bacteriana no grupo Rictor^{DC-/-}. A associação entre disfunção da barreira intestinal e doenças intestinais foi primeiramente documentada em estudos com pacientes que sofrem de DIIs, em que se observou alteração na estrutura e composição das *tight junctions* juntamente com aumento da permeabilidade intestinal nesses indivíduos(82). O aumento da expressão

de claudina-2 foi relatado anterior ao surgimento de ulcerações em pacientes com DIIs (83) sugerindo que alterações na expressão dessa proteína podem estar envolvidas com a patogênese da doença. Sabendo que o DSS é reconhecidamente um agente tóxico agressor dos colonócitos, e que a camada de muco e células epiteliais impede que bactérias do lúmen entrem em contato com as células da mucosa, estes dados podem indicar um possível papel de mTORC2 no eixo “DC-epitélio-muco”.

O TGI de um indivíduo saudável conta com a sinalização da citocina imunoregulatória TGF- β , que suprime respostas inflamatórias e contribui para manutenção da tolerância periférica. Sabe-se que o comprometimento ou impedimento da via de sinalização do TGF- β está associada com o desenvolvimento de DIIs (6, 84, 85). Em murinos, a deleção do receptor de TGF- β especificamente nas DCs resulta no desenvolvimento espontâneo de colite, caracterizado pela perda das células caliciformes (86). Dados consolidados da literatura mostram que a diferenciação das células caliciformes é regulada pela via Notch, que induz a expressão do fator de transcrição Hes-1 e que atua como inibidor da diferenciação destas células. Um trabalho com células tronco humanas mostrou que a inibição de PI3K/mTORC2 regula positivamente a atividade de Smad2/3 (87). Assim, embora não tenhamos investigado este aspecto, a ligação de TGF- β em DCs deficientes em mTORC2 poderia regular a expressão de proteínas sinalizadoras da diferenciação celular o que por sua vez contribuiria na manutenção da integridade da barreira epitelial.

Em seguida, avaliamos a presença das DCs intestinais no cLP e nos MLNs após indução da colite. Vimos que a cLP dos animais *Rictor^{DC-/-}* apresentaram aumento significativo no número de DCs, independente do subtipo, sendo a população CD103⁻CD11b⁻ a que se mostrou com números elevados. A cLP desses animais também mostrou redução na frequência das células CD103⁺CD11b⁺. Conjuntamente, verificamos no grupo *Rictor^{DC-/-}* diminuição drástica no número de todas as subpopulações de DCs migratórias nos MLNs, destacando mais uma vez redução na frequência das CD103⁺CD11b⁺ e aumento na frequência das CD103⁻CD11b⁻. Nossa primeira interpretação desses dados foi a de que mTORC2 modula a migração das DCs do intestino em direção aos MLNs e que sua ausência compromete esse fenômeno.

Além disso, observamos que após a indução da colite, o número das populações de DCs residentes também estavam significativamente diminuídos. Nos MLNs, pode-se

encontrar as DCs originadas de precursores da medula óssea que entram no linfonodo pelo sangue, as chamadas de residentes; e as DCs que migram do intestino em direção ao linfonodo através dos vasos linfáticos aferentes, chamadas migratórias (88). Classicamente, as DCs migratórias carregam antígenos adquiridos na lamina própria e são as principais responsáveis por apresentarem este antígeno e induzir a diferenciação de células T *naive*. Entretanto, alguns estudos mostraram que DCs residentes podem adquirir o antígeno das células migratórias e eficientemente ativar linfócitos T. Os mecanismos pelos quais essa transferência ocorre ainda não estão bem elucidados, mas evidências sugerem que a transferência do antígeno se dá a partir de exossomos (89), secreção de antígenos solúveis pela DC migratória infectada (90) e transferência do complexo MHC-antígeno (91). A relevância biológica desse mecanismo já foi demonstrada em um trabalho em que animais infectados com o vírus da Herpes Simplex, induziram resposta T CD8⁺ eficiente somente a partir da transferência do antígeno para DCs residentes do linfonodo drenante (92). No contexto da mucosa intestinal muitos estudos exploram o papel das DCs migratórias, tanto em condições de homeostase quanto durante a inflamação, e pouco se sabe a respeito do papel das DCs residentes. Até o presente momento, a transferência de antígeno reportada acima não foi descrita em DCs intestinais. Ainda que no nosso trabalho nós não tenhamos investigado a ocorrência deste fenômeno, não descartamos que as DCs residentes possam ter um papel relevante no nosso modelo.

Sabendo que migração das DCs intestinais em direção aos MLNs é classicamente mediada por mecanismo dependente de CCR7 (88). Na tentativa de investigar o papel de mTORC2 sob a expressão desse receptor, tentamos avaliar por citometria de fluxo a expressão de CCR7 nas DCs após a indução da colite. Infelizmente não obtivemos sucesso na marcação dessa molécula. Alternativamente, avaliamos a distribuição dos subtipos de DCs em condições de homeostase e nenhuma diferença quanto à frequência e número total de células na cLP foi detectada. Da mesma forma, os animais *Rictor*^{DC-/-} não apresentaram redução no número de DCs migratórias nos MLNs, sugerindo que ausência de mTORC2 afeta a migração das DCs quando no insulto inflamatório.

Em condições de homeostase, DCs migram constantemente para os MLNs carregando antígenos adquiridos no lúmen, mas sem apresentar fenótipo ativado, o que impossibilita a diferenciação de células T efectoras. Instalada infecção por

microrganismos patogênicos ou invasão por membros da microbiota, estas células adquirem fenótipo maduro e aumentam a taxa de migração em resposta a estímulos inflamatórios. Nos nossos resultados vimos que durante a homeostase os animais *Rictor^{flox/flox}* e *Rictor^{DC-/-}* não apresentam diferenças quanto número de DCs residentes. No entanto, os animais deficientes em mTORC2 nas DCs mostraram números reduzidos de todas as subpopulações de DCs residentes após a colite. Uma possível explicação para estes achados seria a deficiência de entrada dos progenitores de DC nos linfonodos. Sabemos que as pré-DCs na medula óssea também expressam TLRs responsivos a seus ligantes. A chegada de ligantes de TLRs na medula regula negativamente o receptor de quimiocina CXCR4, que retém os progenitores na medula, e induz a expressão de CCR7, necessário para migração em direção aos linfonodos (93). Desta forma, a ausência de mTORC2 poderia também prejudicar a migração de progenitores provindas da medula óssea.

A aquisição de fenótipo maduro, com o aumento da expressão de MHC de classe II e moléculas estimuladoras é fundamental para o processo de ativação de linfócitos T naive. Assim, nós avaliamos a expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86 e não identificamos redução na expressão dessas moléculas quando mTORC2 está ausente nas DCs. Um trabalho com BMDCs mostrou que DCs deficientes em mTORC2 não apresentam redução na expressão de MHC-II, CD86 e CD40 quando estimuladas com LPS (94), o que também sugere ausência de comprometimento na apresentação de antígeno.

Trabalhos recentes mostraram que DCs produtoras de IL-23 e células Th17 produtoras de IL-17 são importantes na patogênese da colite (95, 96). O aumento de IL-23 também contribui para o aumento no número de células produtoras de IL-17 e IFN- γ . A IL-17 por sua vez pode ativar as células epiteliais, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos e induzir a secreção de TNF- α , IL-6 e enzimas metaloproteinases que causam lesões na mucosa (20, 68). Assim, verificamos a produção de IL-17 e IFN- γ por células T CD4⁺ como estratégia de análise funcional das DCs. Como esperado, os animais *Rictor^{DC-/-}* apresentaram redução no número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 na cLP e nos MLNs. Além disso, observamos redução no número de Treg em ambos tecidos, cLP e MLNs, nesses animais.

Diversos trabalhos apontam para funções não redundantes entre os subtipos de DCs intestinais. As DCs CD103⁺CD11b⁺ são fundamentais para a polarização de linfócitos T

CD4⁺ em Th17. Animais com redução seletiva das DCs CD103⁺CD11b⁺ no intestino delgado e nos MLNs apresentam níveis reduzidos de linfócitos Th17, independente do número total de células T CD4⁺ e de Th1 (97, 98). Corroborando os nossos dados, o mecanismo envolvido para ser independente de CD40 e MHC-II (97). Já as DCs CD103⁺CD11b⁻ foram descritas como o subtipo produtor de IL-12, requerido na indução da produção de IFN γ por células T e NK durante infecção por *Toxoplasma gondii* (63) e por induzirem a diferenciação de Treg nos MLN, devido a excelente produção de ácido retinóico e TGF- β (86). Ainda que o número desta população esteja reduzido nos MLNs dos animais deficientes em mTORC2 nós não observamos redução significativa de células produtora de IFN γ , podendo sugerir produção de níveis elevados da citocina IL-12 pelas DCs, compensando o menor número de células. Entretanto a redução de Tregs sugere que os níveis de diferenciação destas células estão correlacionados positivamente com o número de células indutoras, o que pode indicar que mTORC2 regula diferentemente a produção de fatores necessário para a polarização de cada subtipo de linfócito T.

Ainda sobre o papel das DCs CD103⁺CD11b⁻, elas são consideradas dominantes no processo de apresentação cruzada e essenciais para a indução de resposta via T CD8⁺ em resposta à administração de antígenos orais (99). Assim, a redução de linfócitos T CD8⁺ observada no cLP e nos MLNs em Rictor^{DC-/-} é possivelmente consequência da deficiência de migração dessas DCs para os linfonodos. De maneira geral, nossos resultados indicam que a via mTORC2 participa na modulação da migração de todas as subpopulações de DCs intestinais diante de estímulo inflamatório e que o número reduzido delas nos MLNs impacta preferencialmente a diferenciação de linfócitos Th17, Foxp3⁺ e CD8⁺.

Sabemos que as DCs possuem fenótipos e funções específicas para cada sítio anatômico. Da mesma forma, os diferentes subtipos de DCs possuem assinaturas metabólicas que dão suporte às suas funções especializadas. Portanto, no nosso entendimento, a elucidação dos mecanismos envolvidos com os dados obtidos no nosso modelo *in vivo* seria melhor compreendida com experimentos empregando DCs intestinais purificadas por FACS sorting. Dadas as dificuldades em se obter essas células (número de células, manutenção da viabilidade celular em cultura, etc.) nós optamos por empregar DCs derivadas da medula óssea.

Para aumentar a pureza dos nossos resultados, nós purificamos as células CD11c⁺ das culturas de medula óssea para caracterização celular quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas, na presença e ausência de estímulo, e investigação do “*shift*” metabólico. Primeiramente, vimos que diante do estímulo por LPS, a ausência de mTORC2 leva ao aumento da expressão de MHC-II e CD80. Em contrapartida, vimos que estas DCs quando estimuladas sintetizam níveis reduzidos de IL-6 e TNF- α . A importância do complexo mTORC2 na imunidade inata é pouco conhecida e os resultados obtidos ainda são controversos. Em um trabalho com fibroblastos e células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongo deficientes em Rictor foi visto que o estímulo com LPS leva a um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL12p40. Os autores também mostram que a ausência de Rictor é acompanhada da diminuição da atividade de AKT, que por sua vez não fosforila o fator de transcrição FoxO1, deixando-o livre para ligar-se ao DNA e regular positivamente a expressão de citocinas (100). Já Raich-Regué e colaboradores (94) observaram que DCs derivadas da medula de animais deficientes em mTORC2 não apresentam alteração na atividade de AKT mas também expressam maiores níveis de IL12p40, IL-6, TNF- α e IL-23 após estímulo por ligante de TLR4. Entretanto, em um trabalho com DCs de humanos, foi visto que a deficiência da atividade de mTORC2 suprime a produção de IL12p40 por estas células devido a redução da atividade de AKT e consequente inibição da ativação de NF κ B (101), que também está envolvido com a regulação da expressão de citocinas em DCs estimuladas com LPS (102).

Embora não tenhamos avaliado a síntese de citocinas pelas DCs intestinais ficamos confiantes em usar as DCs geradas *in vitro* para explorar a capacidade de ativação e diferenciação de linfócitos T CD4 *naive*, uma vez que o mecanismo envolvido na polarização para Th17 requer a síntese de IL-6 pelas DCs (98). A partir da co-cultura estaríamos normalizando o número de DCs entre os dois grupos e com isso poderíamos investigar se nossos dados *in vivo* são consequência apenas da quantidade de células reduzidas em Rictor^{DC-/-}. No ensaio de proliferação vimos que DCs deficientes em Rictor parecem ser mais eficientes na indução da proliferação. Uma vez que realizamos um ensaio antígeno-específico, este resultado indica que a ausência de mTORC2 nas DCs não compromete a captura, processamento e apresentação do antígeno.

De acordo com a nossa hipótese, DCs deficientes em mTORC2 não induziram polarização para Th17. Além disso, essas DCs parecem aumentar a diferenciação de Treg, e nenhuma diferença foi observada para diferenciação de Th1, assim como também não observamos diferença na síntese de IL12p40 pelas DCs. Dados recentes da literatura mostraram que além do subtipo CD103⁺CD11b⁺, as DCs CD103⁻CD11b⁺ isoladas da lâmina própria são potentes indutoras da diferenciação para Th17 *in vitro*, por um mecanismo também dependente de IL-6 (103). No entanto, nenhum trabalho abordou a importância dessa população para geração de Th17 *in vivo*.

A fim de elucidar o impacto da ausência de mTORC2 sob o metabolismo celular nós avaliamos por respirometria a capacidade dessas células realizarem o “*shift*” metabólico, ou seja, queda da respiração mitocondrial e aumento da glicólise, descrita como essencial para sua ativação e função efetora (61). Vimos que DCs deficientes em mTORC2 ativadas com LPS são capazes de diminuir a produção de ATP dependente da mitocôndria e aumentar o metabolismo glicolítico. Curiosamente, elas apresentaram níveis de respiração mitocondrial superiores ao das células em que a via está ativa, na ausência como na presença de estímulo. Estes dados podem ser indicativos DCs deficientes em mTORC2 apresentam maior massa mitocondrial (104). Como esse processo poderia impactar a apresentação de antígeno e a capacidade de ativação ainda não é claro na literatura, mas poderia ser um diferencial importante uma vez que maior conteúdo de massa mitocondrial poderia levar à uma melhor homeostase energética nessas células.

Ainda que os resultados com as BMDCs tenham que ser interpretados com cautela, nossos dados *in vitro* suportam e ajudam a elucidar nossos resultados *in vivo*, sugerindo que em DCs a via de sinalização de mTORC2 regula mecanismos conservados envolvidos com a migração celular e síntese de citocinas por essas células.

7. Conclusões

Baseado nos resultados adquiridos, podemos concluir que:

- a ausência de mTORC2 nas DCs reduz a susceptibilidade à colite induzida por DSS;
- a magnitude da perda de peso e do score clínico da doença estão correlacionados com o grau de inflamação no cólon dos animais;
- a ausência de mTORC2 prejudica a migração de todas as subpopulações de DCs intestinais durante a inflamação, o que leva à redução no número de linfócitos T efetores, que por sua vez atenua a inflamação;
- a ativação e modulação das DCs parece ser independente da composição da microbiota microbiana intestinal;
- mTORC2 possui um papel modulador sobre as funções das DCs: a redução na síntese de IL-6 por essas células prejudica a geração de linfócitos Th17; e
- a ausência de mTORC2 aumenta o consumo de oxigênio mitocondrial em DCs imaturas e maduras, e acentua metabolismo glicolítico pós estímulo dessas células.

8 Referências Bibliográficas

1. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1713-25.
2. Danese S, Fiorino G, Peyrin-Biroulet L, Lucenteforte E, Virgili G, Moja L, et al. Biological agents for moderately to severely active ulcerative colitis: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014;160(10):704-11.
3. Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(4):431-40.
4. Loddenkemper C. Diagnostic standards in the pathology of inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2009;27(4):576-83.
5. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1670-89.
6. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(1):3-10.
7. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2004;3(5):394-400.
8. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1004-9.
9. Kufer TA, Sansonetti PJ. Sensing of bacteria: NOD a lonely job. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(1):62-9.
10. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):131-44.
11. Elshaer D, Begun J. The role of barrier function, autophagy, and cytokines in maintaining intestinal homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2016.
12. Sedhom MA, Pichery M, Murdoch JR, Foligné B, Ortega N, Normand S, et al. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut*. 2013;62(12):1714-23.
13. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, et al. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(4):R1264-73.
14. Takahashi F, Das KM. Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 1985;76(1):311-8.
15. Joeris T, Muller-Luda K, Agace WW, Mowat AM. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunol*. 2017;10(4):845-64.
16. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
17. Owen JL, Mohamadzadeh M. Microbial activation of gut dendritic cells and the control of mucosal immunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33(11):619-31.
18. Rescigno M. Intestinal dendritic cells. *Adv Immunol*. 2010;107:109-38.
19. Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. *Immunity*. 2014;40(2):248-61.
20. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):6-21.
21. Atarashi K, Tanoue T, Honda K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. *Vaccine*. 2010;28(50):8036-8.

22. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008;9(7):769-76.
23. Hooper LV, Bry L, Falk PG, Gordon JI. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays.* 1998;20(4):336-43.
24. Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res.* 2010;61(3):219-25.
25. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):39-58.
26. Bajzer M, Seeley RJ. Physiology: obesity and gut flora. *Nature.* 444. England 2006. p. 1009-10.
27. Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe.* 2011;17(6):369-74.
28. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(4):435-54.
29. Kelly D, Delday MI, Mulder I. Microbes and microbial effector molecules in treatment of inflammatory disorders. *Immunological reviews.* 2012;245(1):27-44.
30. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity.* 2009;31(4):677-89.
31. Jarchum I, Pamer EG. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. *Current opinion in immunology.* 2011;23(3):353-60.
32. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity.* 2011;34(5):794-806.
33. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009;139(3):485-98.
34. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(27):12204-9.
35. Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Promotion of a favorable gut flora in inflammatory bowel disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(3):189-95.
36. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004;18(16):1926-45.
37. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.
38. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):324-37.
39. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity.* 2008;29(4):565-77.
40. Salmond RJ, Zamoyska R. The influence of mTOR on T helper cell differentiation and dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 2011;41(8):2137-41.
41. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity.* 2009;30(6):832-44.
42. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol.* 2011;12(4):295-303.

43. Lee K, Gudapati P, Dragovic S, Spencer C, Joyce S, Killeen N, et al. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity*. 2010;32(6):743-53.
44. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, Kasturi S, Zeyda M, Zlabinger GJ, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J Immunol*. 2010;185(7):3919-31.
45. Lehman JA, Calvo V, Gomez-Cambronero J. Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, m-TOR-related THR389 kinase. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28130-8.
46. Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*. 2011;117(16):4273-83.
47. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, et al. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood*. 2003;101(11):4457-63.
48. Monti P, Mercalli A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation*. 2003;75(1):137-45.
49. Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood*. 2008;112(3):635-43.
50. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jèze G, Guernonprez P, Ginhoux F, Merad M, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2008;9(6):676-83.
51. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 2000;95(11):3489-97.
52. Sathaliyawala T, O'Gorman WE, Greter M, Bogunovic M, Konjufca V, Hou ZE, et al. Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. *Immunity*. 2010;33(4):597-606.
53. Turnquist HR, Sumpter TL, Tsung A, Zahorchak AF, Nakao A, Nau GJ, et al. IL-1 β -driven ST2L expression promotes maturation resistance in rapamycin-conditioned dendritic cells. *J Immunol*. 2008;181(1):62-72.
54. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495-549.
55. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(6):754-9.
56. Dai C, Zheng CQ, Meng FJ, Zhou Z, Sang LX, Jiang M. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- κ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. *Mol Cell Biochem*. 2013;374(1-2):1-11.
57. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1643-52.
58. Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecký J, et al. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PloS one*. 2011;6(11):e27961.
59. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993;69(2):238-49.

60. Maxwell JR, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Viney JL. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. *Curr Protoc Pharmacol*. 2009;Chapter 5:Unit5.58.
61. Everts B, Amiel E, Huang SCC, Smith AM, Chang CH, Lam WY, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKe supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol*. 2014;15(4):323-32.
62. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(5):690-6.
63. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014;104:Unit 15.25.
64. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(5):L1166-78.
65. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1490-7.
66. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.
67. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(1):9-21.
68. Bates J, Diehl L. Dendritic cells in IBD pathogenesis: an area of therapeutic opportunity? *J Pathol*. 2014;232(2):112-20.
69. Pizarro TT, Cominelli F. Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. *Annu Rev Med*. 2007;58:433-44.
70. Bickston SJ, Comerford LW, Cominelli F. Future therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2003;5(6):518-23.
71. Vlahopoulos S, Zoumpouris VC. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(8):844-54.
72. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-9.
73. Waetzig GH, Seeger D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2002;168(10):5342-51.
74. Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Tsuruta O, Kitazaki S, Takeda T, et al. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med*. 2006;17(3):449-55.
75. Weichhart T, Hengstschlager M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(10):599-614.
76. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate in lymph nodes for efficient CD4+ T cell priming. *Immunity*. 2008;29(5):795-806.
77. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-42.
78. Torres J, Darley-Usmar V, Wilson MT. Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem J*. 1995;312(Pt 1):169-73.
79. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16389-97.
80. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:609-34.

81. Assi K, Pillai R, Gómez-Muñoz A, Owen D, Salh B. The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor- α production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology*. 2006;118(1):112-21.
82. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1165:294-300.
83. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*. 2008;88(10):1110-20.
84. Di Sabatino A, Pickard KM, Rampton D, Kruidenier L, Rovedatti L, Leakey NA, et al. Blockade of transforming growth factor β upregulates T-box transcription factor T-bet, and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. *Gut*. 2008;57(5):605-12.
85. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2001;108(4):601-9.
86. Ihara S, Hirata Y, Serizawa T, Suzuki N, Sakitani K, Kinoshita H, et al. TGF- β Signaling in Dendritic Cells Governs Colonic Homeostasis by Controlling Epithelial Differentiation and the Luminal Microbiota. *J Immunol*. 2016;196(11):4603-13.
87. Yu JS, Ramasamy TS, Murphy N, Holt MK, Czapiewski R, Wei SK, et al. PI3K/mTORC2 regulates TGF- β /Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat Commun*. 2015;6:7212.
88. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, et al. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol*. 2006;176(2):803-10.
89. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naive CD4 $^{+}$ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1156-62.
90. Srivastava S, Ernst JD. Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):741-52.
91. Wakim LM, Bevan MJ. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8 $^{+}$ T-cell activation after viral infection. *Nature*. 2011;471(7340):629-32.
92. Allan RS, The Department of Microbiology and Immunology TUoM, Parkville 3010, Victoria, Australia, Waithman J, The Department of Microbiology and Immunology TUoM, Parkville 3010, Victoria, Australia, Bedoui S, Immunology Division TWaEHloMR, Parkville 3050, Victoria, Australia, et al. Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity*. 2006;25(1):153-62.
93. Schmid MA, Takizawa H, Baumjohann DR, Saito Y, Manz MG. Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood*. 2011;118(18):4829-40.
94. Raïch-Regué D, Rosborough BR, Watson AR, McGeachy MJ, Turnquist HR, Thomson AW. mTORC2 Deficiency in Myeloid Dendritic Cells Enhances Their Allogeneic Th1 and Th17 Stimulatory Ability after TLR4 Ligation In Vitro and In Vivo. *J Immunol*. 2015;194(10):4767-76.
95. Maloy KJ, Kullberg MC. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2008;1(5):339-49.
96. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, et al. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*. 2010;33(2):279-88.
97. Bachem A, Hartung E, Güttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, et al. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol*. 2012;3.

98. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*. 38:2013. p. 970-83.
 99. Luda KM, Joeris T, Persson EK, Rivollier A, Demiri M, Sitnik KM, et al. IRF8 Transcription-Factor-Dependent Classical Dendritic Cells Are Essential for Intestinal T Cell Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(4):860-74.
 100. Brown J, Wang H, Suttles J, Graves DT, Martin M. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) negatively regulates Toll-like receptor 4-mediated inflammatory response via FoxO1. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44295-305.
 101. Wei WC, Liu CP, Yang WC, Shyur LF, Sheu JH, Chen SS, et al. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) regulates LPS-induced expression of IL-12 and IL-23 in human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2015;97(6):1071-80.
 102. Ma W, Gee K, Lim W, Chambers K, Angel JB, Kozlowski M, et al. Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol*. 2004;172(1):318-30.
 103. Scott CL, Bain CC, Wright PB, Sichien D, Kotarsky K, Persson EK, et al. CCR2+CD103⁺ intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal Immunol*. 2015. p. 327-39.
 104. Picard M, Shirihaï OS, Gentil BJ, Burelle Y. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304:2013. p. R393-406.
- FAVERO DE AGUIAR, Cristhiane. Papel das células NKT na homeostase e inflamação intestinal. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, USP. 2017.