CRISTHIANE FAVERO DE AGUIAR

**Papel das células NKT na homeostase
e 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
2017

CRISTHIANE FAVERO DE AGUIAR

**Papel das células NKT na homeostase
e 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
2017

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)

Aguiar, Cristhiane Favero

Papel das células NKT na homeostase e inflamação
intestinal / Cristhiane Favero Aguiar; orientador
Niels Olsen Saraiva Câmara. -- São Paulo, 2017.
124 p.

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

1. Células NKT. 2. Intestino. 3. Inflamação. 4.
Colite. 5. Microbiota. I. Câmara, Niels Olsen
Saraiva, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): CRISTHIANE FAVERO DE AGUIAR

Título da Tese: PAPEL DAS CÉLULAS NKT NA HOMEOSTASE E INFLAMAÇÃO
INTESTINAL

Orientador(a): PROF. DR. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() 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 **191** nas fls. **143** do livro **02** 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 na participação e no perfil das células NKT num modelo experimental de colite"* do qual participam o(s) aluno(s), **Cristhiane Favero de Aguiar, Andrea Moro Caricilli**, e a pesquisadora **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 **21.01.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 24 de janeiro de 2013.

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.101.16

São Paulo, 25 de outubro de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "***Influência da microbiota intestinal na participação e no perfil das células NKT num modelo experimental de colite***", registrado sob o protocolo nº **191/2012** e aprovado em 21/01/2013 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 21/01/2021**.

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
Mus musculus	C56Bl/6	Macho	08-12 semanas	1º: 30

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. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador - CEUA-ICB/USP

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

*Aos meus pais, Sérgio e Teresa, e à minha irmã, Carol.
O amor e o apoio de vocês me fizeram chegar até aqui.*

“The only limit to our realization of tomorrow will be our doubts of today. Let us move forward with strong and active faith.”

Franklin D. Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Eu acredito que Deus tem Seus planos para cada um de nós. Portanto, eu só tenho a agradecer... a Ele por me dar a vida e a fé que me permitem seguir a cada dia e cumprir os planos que Ele tem para mim.

Agradeço aos meus pais, Sérgio e Teresa, por serem meus maiores exemplos, meus maiores apoiadores, minha maior fonte de amor, carinho e compreensão.

À minha irmã Carol, por ser “a única amiga que tem o mesmo sangue e o mesmo sobrenome, que saiu do mesmo lugar que eu e que mesmo se brigássemos, nunca ficaríamos distante”. E também ao Fábio, pelo incentivo e interesse nesse trabalho.

Aos meus familiares. Em especial, meus padrinhos Márcio e Roseli e meus primos Mateus e Rebeca, que são como pais e irmãos para mim.

Agradeço ao Niels por ter me recebido no laboratório e acreditado no meu potencial.

Agradeço pela orientação e por todas oportunidades que me proporcionou durante esses anos.

À Cris, pela amizade de tantos anos, que me faz saber que posso contar com ela para tudo. *“Together or apart, Always heart to heart”*. E ao Leandro, pela amizade sincera desde a graduação.

À Vanessa e Isadora (e Alê), por todas as conversas e desabafos na nossa Home Sweet Home, mas principalmente pela amizade verdadeira e companhia durante esses anos.

À Angela, por ser uma amiga pra todas as horas, mas também pela ajuda nos experimentos e orientação. Sua ajuda foi fundamental para a realização desse trabalho.

Ao Vinícius, pela amizade, pela ajuda nos experimentos, pelas sugestões sempre de grande valia e pelas risadas e descontração no laboratório.

À Aline, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Aos amigos que o laboratório me deu... Mary, Felizardo, Candinho, Reinaldo, Marcela, Matheus, Tércio, Marina Burgos.

À todos os velhos e novos litianos e liceanos pela companhia de todos os dias e sugestões sempre pertinentes nas reuniões. Fernanda Terra, Flávia Cunha, Lis, Tati, Amanda, Camila, Paulo, Thiago, Rafael, Raquel, Guilherme, Marina, Felipe, Marcelli.

À Meire e ao Marcos pela ajuda no laboratório e pelo zelo que tem conosco.

À Claudinha por ter ajudado durante grande parte desse trabalho e por continuar sendo uma companhia muito agradável no departamento.

À Greice pela ajuda no laboratório.

À Dra Denise Fonseca, pela ajuda com os protocolos do intestino, com as ILCs e probes.

Ao Paulo Albe, pela confecção das lâminas.

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

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

Ao Israel, pelo ajuda no biotério.

Ao pessoal da portaria, em especial Milton e Otacílio.

Ao pessoal da limpeza, em especial à Salete, por sua atenção e empenho.

I'm thankful for the time I spent at La Jolla Institute for Allergy and Immunology. I thank Dr. Mitch Kronenberg for having me at his lab and for all the experience and knowledge he shared. I also thank to all DI-1 and DI-2 members for all the kind moments at the lab and suggestions during our lab meetings. A special thank to Isaac, Gerhard, Shilpi, Meng, Goo-Young and Daisuke, who directly contributed to this work.

I also thank to Jenny and Steven for having me at their home and making me feel at home. I thank them for being my family in the US.

Agradeço ainda à Vivian e a Giuliana, pela amizade que começou em San Diego, mas que permanece apesar da distância.

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

Aos professores e funcionários do ICB-IV.

Ao apoio financeiro da FAPESP.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, pela contribuição à ciência.

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto é realidade”.

Obrigada a todos vocês, que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia dos Transplantes, no ICB-IV da Universidade de São Paulo e no Laboratório do Dr. Mitchell Kronenberg, da Divisão *Developmental Immunology* do *La Jolla Institute for Allergy and Immunology* e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Processos: 2012/02270-2, 2012/16794-3 e 2014/10828-9.

“No matter what a basic researcher discovers, it has been created by Mother Nature, and not a human being. Nevertheless, the beauty within attracts and moves scientists. A basic researcher should be satisfied when he or she discovers the beauty of nature, even though nobody praises them. If you can’t feel like this, you should not work in science.”

Kimi Ishizaka

RESUMO

AGUIAR, C. F. **Papel das células NKT na homeostase e inflamação intestinal.** 2017. 123 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As células NKT compreendem um grupo distinto de linfócitos caracterizados pela reatividade a glicolipídios apresentados pela molécula CD1d. Em nosso trabalho, nós investigamos a participação das células NKT na homeostase intestinal utilizando animais nocautes para essas células e também caracterizamos os subtipos de NKT no intestino. Nos animais nocautes observamos que a ausência de células NKT influencia a microbiota e a homeostase intestinal. Os animais nocautes possuem diminuição no filo *Firmicutes*, diminuição dos níveis de IgA nas fezes e de TGF- β no intestino. Esses animais também são mais suscetíveis à colite induzida por DSS, apresentando menor sobrevida, menor tamanho do cólon e aumento no score. Nos animais selvagens, a indução do subtipo NKT10 diminuiu a inflamação intestinal, não causou intensa redução do cólon e reduziu a frequência de células NKT e do subtipo NKT17 no intestino. Nossos resultados indicam que as células NKT intestinais são peças importantes para a homeostase intestinal e para a composição da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Células NKT. Intestino. Inflamação. Colite. Microbiota.

ABSTRACT

AGUIAR, C. F. **Role of NKT cells in intestinal homeostasis and inflammation.** 2017. 123 p. Thesis (Ph.D. – Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

NKT cells comprise a distinct group of lymphocytes characterized by their reactivity to glycolipids presented by CD1d. In our work, we investigated the involvement of NKT cells in intestinal homeostasis using knockout (KO) mice and we also characterized NKT subtypes in the intestine. The absence of NKT cells in KO mice influenced the intestinal microbiota and homeostasis. KO mice had a decrease in the *Firmicutes* phyla, in the levels of fecal IgA and TGF- β in the intestine. These mice are also more susceptible to DSS-induced colitis, exhibiting worse survival, severe shortening of the colon and higher score. In wild type mice, the induction of the NKT10 subtype decreased intestinal inflammation, did not cause intense reduction of colon and reduced the frequency of NKT cells and the NKT17 subtype in the intestine. Our results indicate that intestinal NKT cells are important for intestinal homeostasis and microbiota composition.

Keywords: NKT cells. Intestine. Inflammation. Colitis. Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subtipos das células iNKT	30
Figura 2 - Expressão de CD1d no intestino.....	32
Figura 3 - Esquema de indução do subtipo NKT10.....	41
Figura 4 - Frequência de células iNKT e seus subtipos no intestino.....	50
Figura 5 - Ativação das células iNKT intestinais	51
Figura 6 - Análise da frequência de células iNKT em animais germ-free	52
Figura 7 - Análise dos subtipos de células iNKT em animais <i>germ-free</i>	53
Figura 8 - Produção de citocinas pelas células iNKT em animais <i>germ-free</i>	54
Figura 9 - Análise do subtipo NKT10 no baço.....	55
Figura 10 - Análise do subtipo NKT10 no intestino delgado (íleo)	56
Figura 11 - Análise do subtipo NKT10 no intestino grosso	57
Figura 12 - Análise da indução de NKT10 em um modelo de colite	59
Figura 13 - Dosagem de IL-6 e TNF- α no intestino	60
Figura 14 - Frequência de células NKT e seus subtipos na lamina propria do cólon	61
Figura 15 - Frequência de células NKT e expressão de PD-1 no baço	62
Figura 16 - Frequência de células NKT, produção de IL-10 e expressão de PD-1 no intestino (dia 3).....	63
Figura 17 - Frequência de células NKT, produção de IL-10 e expressão de PD-1 no baço (dia 3)	64
Figura 18 - Frequência de células dendríticas e macrófagos na lamina propria.....	65
Figura 19 - Análise da indução de colite nos animais selvagens e nocautes	66
Figura 20 - Cortes histológicos do intestino de animais controle e com colite	68
Figura 21 - Quantificação de citocinas inflamatórias no intestino	69
Figura 22 - Análise da expressão gênica de IFN- γ e TNF- α no intestino.....	70

Figura 23 - Análise da permeabilidade intestinal e da proteína de junção ZO-1.....	71
Figura 24 - Análise de FISH das bactérias totais no cólon.....	72
Figura 25 - Análise de FISH dos filos <i>Bacteroidetes</i> e <i>Firmicutes</i> no cólon.....	72
Figura 26 - Presença de filamentos bacterianos nas fezes em estado basal	73
Figura 27 - Análise do sequenciamento do gene rRNA 16S da microbiota das fezes dos animais selvagens e nocautes	74
Figura 28 - Dosagem de IgA nas fezes	75
Figura 29 - Imunohistoquímica para IgA	76
Figura 30 - Frequência de células B e plasmócitos.....	77
Figura 31 - Número de células B e plasmócitos.....	78
Figura 32 - Análise do TGF- β 1 no intestino.....	79
Figura 33 - Análise da frequência de ILCs na lamina própria intestinal	80
Figura 34 - Expressão gênica de IL-5 no cólon.....	80
Figura 35 - Esquema proposto para o papel das células NKT na homeostase intestinal	86
Figura 36 - Esquema proposto para ilustrar a piora na colite nos animais J α 18 ^{-/-}	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α GalCer - α -Galactosilceramida
 α GC - α -Galactosilceramida
APC - célula apresentadora de antígeno
BCA-1 - quimiocina atraente de células B
CBA - *cytometric bead array*
CCR - receptor de quimiocina C-C
CD - grupo de diferenciação, do inglês: *Cluster of differentiation*
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
CXCL - ligante de quimiocina C-X-C
CXCR - receptor de quimiocina C-X-C
DAB - diaminobenzidina
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DC - célula dendrítica
DEFCR-1 - Defensina alpha, do inglês *Defensin-related cryptdin peptide-1*
DII - doenças inflamatórias intestinais
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNase - desoxiribonuclease
DNTP - desoxinucleotídeos fosfatados
DSS - dextran sulfato de sódio
DTT - ditioneitol
EAE - encefalomielite autoimune experimental
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*
FITC - isotiocianato de fluoresceína
FOXP3 - Fator de transcrição de células T reguladoras
FR-4 - receptor de folato-4
GF - livre de germes, do inglês *germ-free*
GFP - proteína fluorescente verde
GMCSF - fator estimulante de colônias de macrófagos/granulócitos
h - horas
H&E - hematoxilina & eosina
HBSS - *Hanks's Balanced Salt Solution*

HPRT - *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*
ICOS - coestimulador induzível de célula T
IFN - interferon
Ig - imunoglobulina
IHQ - Imunohistoquímica
IL - interleucina
iNKT - célula NKT invariante
ip - Intraperitoneal
iv - intravenoso
KO - Nocaute
LFA-1 - integrina, *Lymphocyte function-associated antigen*
LPS - Lipopolissacarídeo
MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 - proteína inflamatória de macrófago
mLN - Linfonodo mesentérico
NK - *natural killer*
NOD - *nucleotide-binding oligomerization domain*
NRP1 - neuropilina-1
PBS - tampão fosfato salino
PCR - reação em cadeia da polimerase
PD-1 - proteína de morte celular programada 1
PLZF - *promyelocytic leukaemia zinc finger*
PP - placas de Peyer
RANTES - *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*
REGIIIγ - Peptídeo antimicrobiano
RNA - Ácido ribonucléico
RORγt - *RAR-related orphan receptor gamma*
RPMI - meio *Roswell Park Memorial Institute*
SFB - soro fetal bovino
Slamf6 - receptor da família SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*)
SPF - livre de patógenos específicos, do inglês *specific-pathogen free*
T-bet - *T-box transcription factor*
TAP - transportador associado com o processamento de antígenos

TCR - receptor de célula T

TGF - fator de transformação de crescimento

Th - T *helper*

TJP1 - proteína de junção 1

TLR - Receptores similares ao *Toll*

TNF - fator de necrose tumoral

Treg - célula T reguladora

UC - colite ulcerativa

WT - selvagem, do inglês *wild type*

ZO-1 - proteína de oclusão paracelular (*Zonula occludens*).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Células NKT	23
1.1.1 Funções das células NKT	24
1.1.2 Tipos de células NKT	25
1.1.2.1 Subtipos de células iNKT	27
1.1.3 Distribuição das células NKT	30
1.1.4 Células NKT no Intestino.....	31
1.2 Doenças inflamatórias do intestino	32
1.3 Microbiota intestinal.....	34
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Animais	40
3.2 Indução de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)	40
3.3 Administração de agonistas de células NKT	41
3.4 Determinação da permeabilidade intestinal pela análise de FITC- Dextran	42
3.5 Quantificação de endotoxina	42
3.6 Análise da sobrevida	42
3.7 Citometria de fluxo – Lamina Propria intestinal.....	42
3.8 CBA (Cytometric Bead Array)	43
3.9 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	43
3.10 Extração de RNA e preparação do cDNA	44
3.11 PCR em tempo real	44
3.12 Análise da microbiota intestinal	45
3.13 Análise Histológica	46
3.14 Imunohistoquímica	46
3.15 Imunofluorescência	46
3.16 Análise estatística	47
4 RESULTADOS.....	48
4.1 PARTE I – Estudo das células NKT no intestino de animais selvagens	49
4.1.1 O subtipo de célula NKT predominante no intestino é o NKT1	49

4.1.2 As células iNKT intestinais respondem ao agonista α GalCer	50
4.1.3 Influência da microbiota no desenvolvimento e função das células iNKT.....	52
4.1.4 Identificação do subtipo NKT10 no intestino	54
4.2 <i>PARTE II – Estudo da indução do subtipo NKT10 em um modelo de colite</i>	58
4.2.1 Análise dos parâmetros da colite após indução do subtipo NKT10	58
4.2.2 A indução de NKT10 reduziu a inflamação intestinal em modelo de colite	59
4.2.3 Análise da frequência e dos subtipos de NKT na lamina própria	60
4.3 <i>PARTE III – Estudo nos animais nocautes para células iNKT</i>	66
4.3.1 Os animais $J\alpha 18^{-/-}$ são mais suscetíveis à colite induzida por DSS	66
4.3.2 A inflamação intestinal parece ser mais acentuada nos animais nocautes quando submetidos à colite	68
4.3.3 Os animais $J\alpha 18^{-/-}$ têm níveis aumentados de endotoxina no soro	70
4.3.4 A ausência de células iNKT causa alteração na microbiota intestinal	71
4.3.5 Os animais nocautes para células NKT apresentam redução nos níveis de IgA nas fezes	75
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	101
A - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino	102
B - Imagem representativa dos histogramas da produção de citocinas e marcadores de ativação das células NKT intestinais	103
C - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no baço dos animais GF e SPF	104
D - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no linfonodo mesentérico dos animais GF e SPF	105
E - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino delgado dos animais GF e SPF	106
F - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino grosso dos animais GF e SPF	107
G - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no baço dos animais	108

H - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino delgado dos animais	109
I - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino grosso dos animais	110
J - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite	111
K - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite	112
L - Estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterizar células dendríticas e macrófagos	113
M - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para frequência de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite (dia 3).....	114
N - Imagem representativa da estratégia de <i>gates</i> utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite (dia 3)	115
O - Estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterizar a frequência de células B e plasmócitos	116
P - Estratégia de <i>gates</i> utilizada para caracterizar as células ILC no intestino dos animais WT e J α 18 ^{-/-}	117
ANEXOS	118
A – Manuscritos publicados no período	119

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células NKT

O termo “células NKT” foi primeiramente publicado em 1995¹ e foi amplamente utilizado para definir um subtipo de células T de camundongos que compartilha algumas características das células *natural killer* (NK), particularmente a expressão do marcador NK1.1. O termo células NKT é agora bem aceito e aplicado a camundongos, humanos e outras espécies².

No entanto, as pesquisas que levaram à descoberta e definição das células NKT datam dos anos 80. Em 1987, estudos foram publicados demonstrando a existência de um subtipo distinto de células T que apresentavam: receptores de células T do tipo $\alpha\beta$ (TCR- $\alpha\beta$) menos expressos do que nas células T convencionais, alta frequência de expressão de V β 8 do que nas T convencionais e falta de expressão das moléculas acessórias CD4 e CD8^{3; 4; 5}. Na mesma época, outros grupos relataram a existência de um subtipo de células T TCR- $\alpha\beta^+$ que expressavam NK1.1, que era considerado ser somente expresso em células *natural killer* (NK)^{6; 7}. Juntos, esses estudos indicaram a existência de uma subpopulação de células T definidas pela expressão de NK1.1, que eram potentes produtoras de citocinas e portanto pareciam ser células imunoregulatórias efetivas².

Evidências adicionais que ajudaram a caracterizar as células TCR- $\alpha\beta^+$ NK1.1⁺ vieram de estudos que observaram que seu desenvolvimento era independente da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, mas exigia β 2-microglobulina^{8; 9; 10}. Isso levou a compreensão de que as células NKT são reativas a uma molécula semelhante a do MHC classe I, a molécula CD1d¹¹. Adicionalmente à tendência do uso cadeia V β 8.2 do TCR, a maioria das células T NK1.1⁺ também usavam uma cadeia α invariante do TCR, a região V α 14-J α 18, em camundongos¹². Além disso, a seleção dessas células era independente de TAP, que é essencial para a apresentação de peptídeos via MHC¹³, mas ainda não havia sido descoberto um ligante para as células NKT. Como essas células eram restritas à molécula de CD1d e já se sabia que a molécula CD1b, em humanos, apresentava glicolipídios, Kawano e colaboradores¹⁴ estudaram diversos glicolipídios como possíveis ligantes para essas células NKT V α 14. Descobriu-se então que

glicolípídios eram capazes de ativar as células NKT, via apresentação pela molécula CD1d. O glicolípídio com maior poder ativador era a α -Galactosilceramida (α GalCer). Inicialmente identificada como um imunoativador presente em extratos da esponja marinha *Agelas mauritianus*, o desenvolvimento de uma forma sintética da α GalCer, conhecida como KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanetriol] forneceu pela primeira vez um ligante que poderia ser usado para identificar e caracterizar virtualmente toda a população de células NKT invariantes ¹⁴. Esse glicolípídio forma um complexo de alta afinidade com o TCR da maioria das células NKT invariantes quando apresentado pela molécula CD1d.

A molécula CD1d é constitutivamente expressa por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas, macrófagos e células B ^{15; 16}. É também notavelmente expressa em timócitos corticais, onde é essencial para o desenvolvimento das células NKT ¹⁷, e em células de Kupffer e células endoteliais nos sinusóides hepáticos, sendo no fígado encontrada a maior frequência de células NKT em camundongos ¹⁸.

A estrutura da molécula CD1d em camundongos e humanos mostra o mecanismo básico pelo qual a molécula é capaz de ligar e apresentar uma variedade de lipídios. Os domínios de membrana α 1 e α 2 da molécula CD1d contém um sítio de ligação hidrofóbica composta por dois bolsos A e F ¹⁹, sendo que o sítio de ligação é ocupado pela cauda do lipídio e as interações hidrofóbicas entre a cauda lipídica e a superfície não polar da fenda são o que principalmente contribuem para a ligação ²⁰. Diversos estudos demonstraram que a α GalCer é um potente ativador tanto de células iNKT humanas quanto de murinas e promove a produção de uma complexa mistura de citocinas, incluindo aquelas tipicamente associadas com ambas respostas tipo Th1 e Th2 ²¹.

1.1.1 Funções das células NKT

Vários estudos caracterizaram os eventos da cascata de ativação que seguem à administração de ligantes das células NKT, como a α GalCer, sendo que as funções dessas células estão em grande parte relacionadas à produção de fatores quando ativadas. Células NKT maduras produzem grandes quantidades de IFN- γ , mas elas

são únicas entre os linfócitos com capacidade de liberação explosiva de IL-4 ²², assim como de outras citocinas Th2, como IL-13.

Um componente central na função das células NKT é a ativação recíproca das células NKT e das células dendríticas, que é iniciado com a apresentação de α GalCer por células dendríticas às células NKT, induzindo-as a aumentar a expressão de CD40L, quimiocinas e citocinas Th1 e Th2; a ligação com o CD40 induz as células dendríticas a aumentar CD40, B7.1 e B7.2 e IL-12, a qual aumenta a ativação das NKT e a produção de citocinas ^{23; 24}. A propagação dessa reação envolve a regulação positiva das propriedades co-estimulatórias das células dendríticas e a apresentação de antígenos mediada por MHC de classe I e II, servindo de ponte para a resposta imune adaptativa ^{25; 26; 27}. Dessa forma, as células NKT são capazes de regular a função de células dendríticas e também de outras APCs, como macrófagos e células B.

A produção de IFN- γ pelas células NKT também é capaz de induzir a secreção de IFN- γ e aumentar a atividade citotóxica de células NK ^{28; 29; 30; 31}.

As células NKT também são capazes de produzir proteínas citolíticas solúveis, como perforina e granzima, e expressam proteínas de membrana envolvidas na citotoxicidade, como o FasL ^{32; 33}. Portanto, essas células possuem função citotóxica dependente tanto de perforina quanto de FasL e tal função é dependente de ativação via reconhecimento de antígenos pelo TCR, diferente da atividade citotóxica clássica das células NK ²⁸.

Em adição às citocinas clássicas, IFN- γ e IL-4, as células NKT também podem produzir outras citocinas, como IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TGF- β , fatores de crescimento, como GM-CSF e quimiocinas, como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β ³². Dessa forma, essas células têm o potencial de regular a função de quase todas as células hematopoiéticas ³⁴. E por isso, as células NKT exercem papel importante em uma grande variedade de condições patológicas, como no transplante, em tumores, assim como em várias formas de autoimunidade, aterosclerose, alergia e infecções ^{35 36; 37}.

1.1.2 Tipos de células NKT

Dois principais tipos de células NKT são reconhecidos atualmente, as células NKT do tipo I e do tipo II ^{38 39}.

As células do tipo I expressam um TCR com rearranjo canônico formado pela combinação de uma cadeia α constante (V α 14J α 18, em camundongos e V α 24J α 18, em humanos) pareada com um repertório estrito de cadeias β (V β 8, V β 7 e V β 2 em camundongos; V β 11 em humanos) e, por esse motivo, são também denominadas invariantes (iNKT). As células NKT invariantes, que correspondem a cerca de 80% da população total de NKT, constituem o tipo mais amplamente estudado^{35; 40} e são reativas principalmente ao glicolípido α GalCer e alguns de seus análogos. Em humanos, essas células podem ser CD4⁺, CD8⁺, duplo-positivas ou duplo-negativas⁴¹, enquanto que em camundongos a existência de uma subpopulação de iNKT CD8⁺ ainda é controversa⁴². De acordo com essa expressão de CD4, CD8 e até mesmo NK1.1, as células NKT podem apresentar diferentes fenótipos funcionais. Em humanos, as células NKT CD4⁺ produzem níveis maiores de IL-4, IL-13, GM-CSF e IL-2 do que as CD4⁻, sendo que ambas as populações produzem IFN- γ e TNF em níveis elevados^{43; 44}.

Além disso, diversos ensaios *in vitro*, foram capazes de demonstrar a atividade citolítica dessas células³². Acredita-se que seja através dessa produção de diferentes mediadores que as células iNKT exerçam suas funções fisiológicas, sendo capazes de influenciar a atividade de outras células da imunidade inata e adquirida, tais como outros linfócitos T e B, células dendríticas e macrófagos, células NK e neutrófilos. Adicionalmente, algumas evidências indicam uma comunicação entre as células iNKT e os linfócitos T reguladores CD4⁺CD25⁺⁴⁵.

As células NKT do tipo II também estão presentes em humanos e camundongos e reconhecem uma variedade de antígenos hidrofóbicos, incluindo sulfatídeos⁴⁶, lisofosfatidilcolina⁴⁷ e até mesmo pequenas moléculas aromáticas (não-lipídicas)^{41; 48}. As células do tipo II incluem subpopulações que expressam repertórios de TCR comuns, por exemplo, V α 3.2J α 9 ou V α 8 com V β 8 da cadeia β do TCR⁴⁹. As células NKT do tipo II são geralmente difíceis de serem identificadas, embora tenham aumentado os estudos que usam antígenos, como o sulfatídeo, que ativam seletivamente esse subtipo, ou com tetrâmeros ligados ao sulfatídeo^{46; 50; 51}. Mesmo assim, um dos melhores modos de se estudar as funções dessas células *in vivo* é comparando camundongos deficientes da molécula CD1d (que não possuem os dois tipos de células NKT) com camundongos deficientes da região gênica J α 18 (que não possuem apenas as células do tipo I)⁵².

Em nosso trabalho, o principal enfoque será dado para as células NKT do tipo I, invariantes, e o termo NKT (ou iNKT) utilizado nos resultados se refere à esse tipo; caso contrário, o termo NKT do tipo II será empregado.

1.1.2.1 Subtipos de células iNKT

Por muito tempo, o esquema proposto para o desenvolvimento das células iNKT fundamentava-se na divisão em 4 estágios, baseados na expressão das moléculas CD44 e NK1.1. O estágio 0 compreende as células iNKT $CD24^+CD44^-NK1.1^-$, o estágio 1, as células $CD24^-CD44^-NK1.1^-$, o estágio 2, as células $CD44^+NK1.1^-$ e o estágio final 3, as células $CD44^+NK1.1^{+35}$. Contudo, recentemente foram descritos estudos que observaram que o desenvolvimento dessas células é mais complexo e que as células iNKT apresentam subtipos funcionais com diferentes padrões de expressão de fatores de transcrição e de secreção de citocinas. Essas células foram então classificadas em subtipos, que são análogos aos subtipos de células T *helper*, denominados NKT1, NKT2, NKT17, NKT10 e NKT_{FH} (Figura 1). Os subtipos NKT1, NKT2 e NKT17 se desenvolvem naturalmente no timo e migram para a periferia para popular os diversos órgãos com frequências diferentes desses subtipos em diferentes órgãos. Em relação aos subtipos NKT10 e NKT_{FH} ainda não se sabe muito a respeito de seu desenvolvimento pois não há evidências concretas que provem se esses subtipos se desenvolvam a partir de algum precursor no timo ou se eles são gerados a partir dos outros subtipos.

- *NKT1*

As células NKT1 compreendem o subtipo análogo às células Th1. Esse subtipo é caracterizado pela expressão do fator de transcrição T-bet e produção de IFN- γ após ativação. As NKT1 também podem produzir IL-4 em menor quantidade e em casos específicos. Esse subtipo seria o que caracterizava-se como o estágio 3 de maturação das células iNKT ($CD44^+NK1.1^+$). O fator de transcrição T-bet é importante para o desenvolvimento desse subtipo, sendo que animais deficientes para esse fator têm redução na frequência desse subtipo. Outros fatores importantes para o subtipo NKT1 são o receptor da IL-15 (CD122 ou IL-15R α), a IL-15 e proteínas Id2. Em camundongos C57BL/6, o subtipo NKT1 é o mais abundante e o local com maior frequência desse subtipo é o fígado^{53; 54; 55; 56}.

- *NKT2*

As células NKT2 são análogas às células Th2 e caracterizadas, portanto, pela produção de IL-4 e IL-13. Esse subtipo representaria um estágio final de maturação dentro da população antes conhecida como estágio 2 (CD44⁺NK1.1⁻)^{53; 57; 58}. O subtipo NKT2 é caracterizado pela manutenção de alta expressão do fator de transcrição PLZF, pela expressão de IL-17RB (o receptor para IL-25), CD4, GATA-3 e Id3. Em camundongos BALB/c, esse subtipo é mais abundante quando comparado à sua frequência em outras linhagens e é o subtipo predominante no baço e timo de animais dessa linhagem^{53; 59; 60; 61}.

- *NKT17*

As células que compreendem o subtipo NKT17 foram descritas em 2007, quando Michel e colaboradores⁶² identificaram uma população de células iNKT produtoras de IL-17 após ativação. Essas células eram NK1.1⁻ e participavam no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas. Estudos subsequentes ajudaram na caracterização desse subtipo, que expressa o fator de transcrição RORγt, neuropilina-1 (NRP1), o receptor IL-17RB e CCR7 e não expressa CD4. Assim como o subtipo NKT2, as NKT17 expressam GATA-3 e representariam uma população diferenciada no estágio 2 de maturação previamente descrito^{57; 62; 63; 64}. As células NKT17 maduras estão localizadas principalmente na periferia, em particular nos linfonodos, nos pulmões e na pele^{62; 65}. Já foi descrita a participação desse subtipo em modelos de doença como a hiperreatividade das vias aéreas, a artrite induzida por colágeno, a infecção por *Streptococcus pneumoniae*, entre outros^{66; 67; 68}.

- *NKT10*

O subtipo NKT10 foi descrito recentemente por Sag e colaboradores⁶⁹ e compreende as células iNKT produtoras de IL-10. Por muito tempo, acreditava-se que as células iNKT, após forte ativação, se tornavam “anérgicas” quando reestimuladas. Isso devia-se ao fato de essas células diminuírem drasticamente sua produção de IFN-γ e IL-4 após o novo estímulo⁷⁰. No entanto, o trabalho que caracterizou o subtipo NKT10 mostrou que, apesar de não produzirem grandes quantidades de IFN-γ e IL-4, as células iNKT ainda possuíam capacidade citotóxica e produziam citocina, no caso, IL-10, após reestimulação. O subtipo NKT10 foi então caracterizado pela produção de IL-10 e aumento na expressão de diversos marcadores, como, PD-1, NRP1, receptor de folato 4 (FR-4), Slamf6 entre outros. A indução desse subtipo com vários estímulos pelo agonista α-GalCer foi capaz de

proteger os animais da encefalite autoimune experimental (EAE). Apesar de ainda não se conhecer a origem desse subtipo, esse estudo demonstrou que as NKT10 ocorrem naturalmente em alguns órgãos, sendo enriquecidas no tecido adiposo subcutâneo, e podendo ser encontradas também no sangue periférico de humanos⁶⁹.

- NKT_{FH}

A interação entre as células iNKT e as células B já é conhecida^{71; 72; 73}, no entanto, dados recentes demonstraram a capacidade de diferenciação das células iNKT em um subtipo análogo às células T *follicular helper* (T_{FH}), denominado NKT_{FH} . Esse subtipo caracteriza-se pela expressão de fatores, como o Bcl-6, fator de transcrição associado às células T_{FH} . Além disso, esses estudos mostraram que em resposta a antígenos específicos para células B acoplados com α -GalCer, as células NKT se tornavam ativadas, aumentavam a expressão de PD-1 e CXCR5 e produziam IL-21. Tal produção de IL-21 era importante para a formação eficiente de centros germinativos, para a proliferação de células B e secreção de anticorpos. No entanto, apesar de as células NKT_{FH} serem capazes de desencadear uma resposta primária potente das células B, elas não são tão eficientes para iniciar uma resposta duradoura para desenvolvimento de células B de memória^{74; 75; 76}.

Figura 1 - Subtipos das células iNKT. Há pelo menos 5 subtipos distintos de células iNKT definidos pela expressão de fatores de transcrição e produção de citocinas características. Fonte: Buechel, HM (2015)⁷⁷.

1.1.3 Distribuição das células NKT

As células iNKT podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos com diferentes frequências entre esses locais. A maior frequência dessas células é encontrada no fígado, onde elas correspondem a 10-40% dos linfócitos totais. Em órgãos como o timo, baço e pulmão e na medula óssea e no sangue, elas são aproximadamente 1% ou menos dos linfócitos presentes nessas áreas^{2; 34; 36; 45}. Em outros locais, como nos linfonodos e no intestino, elas são menos prevalentes. No entanto, as células NKT podem aumentar em número nesses órgãos em condições de inflamação ou infecção, como nos pulmões durante a asma ou bronquite crônica^{78; 79} ou no pâncreas no diabetes tipo I^{80; 81}.

Vários fatores podem regular essa diferença na frequência e número de células iNKT nos diferentes órgãos.

As características adquiridas por essas células antes de entrarem no órgão e os efeitos do microambiente nessas células podem contribuir para as diferenças observadas. Químioatraentes específicos de cada órgão e integrinas ajudam a selecionar subtipos específicos de células iNKT e popular o órgão. Um exemplo é a diferença entre baço e fígado. No baço, as células iNKT respondem a BCA-1 (CXCL13) e essa interação ajuda no *homing* para esse órgão⁸². Por outro lado, células iNKT hepáticas não respondem a BCA-1, porém a expressão de LFA-1 é necessária para reter essas células nos sinusóides hepáticos mas não para dirigi-las para o baço^{83; 84}.

Outro fator, além do *homing*, que ajuda a regular a população de iNKTs nos órgãos é o equilíbrio entre a proliferação, recirculação e morte celular. As células iNKT têm um padrão de recirculação diferente dos linfócitos T. Em um modelo de parabiose, foi demonstrado que as células iNKT recirculam menos do que outras células T no fígado, pulmão, baço e tecido adiposo. Enquanto células B e T, após 2 semanas de parabiose, atingem o quimerismo completo nesses órgãos, cerca de 90% das células iNKT são endógenas e não provenientes do par parabiótico^{83; 85}.

1.1.4 Células NKT no Intestino

Células NKT variantes e invariantes são encontradas no intestino entre os linfócitos intraepiteliais e também na lamina própria. A ativação dessas células NKT intestinais por células apresentadoras de antígenos pode contribuir para a imunidade da mucosa contra bactérias patogênicas e comensais⁸⁶. Por outro lado, a ativação descontrolada ou insuficiente das células NKT pode ter papel importante na patogênese das doenças inflamatórias do intestino.

Ambas as células epiteliais intestinais e as células dendríticas expressam CD1d em sua superfície (Figura 2). Um estudo demonstrou um papel importante das células NKT restritas a CD1d na produção de citocinas Th2 na patogênese da colite ulcerativa⁸⁷. Em contraste, outros estudos em modelos murinos de colite sugerem que a ativação de células NKT restritas ao CD1d podem proteger da colite⁸⁸.

Recentemente, o grupo de Liao e colaboradores⁸⁹ demonstrou que as células NKT do tipo II podem ter papel patogênico no modelo de colite induzida por DSS.

Esses estudos demonstram que o papel das células NKT na inflamação intestinal ainda é controverso e que estudos adicionais ainda são necessários para melhor

entender a função dessas células e sua relação com a patogênese das doenças intestinais.

Estudos demonstraram também o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento das células NKT. Foi demonstrado que as células NKT estão aumentadas no intestino de animais *germ-free* e que a exposição ao microrganismo comensal *Bacteroides fragilis* (que possui um glicolípido semelhante a α GalCer) pode normalizar esse aumento nos animais *germ-free* e prevenir a suscetibilidade aumentada a asma.^{90; 91; 92; 93}. No entanto, ainda faltam estudos que relacionem a influência das células NKT na manutenção da microbiota intestinal e na homeostase intestinal.

Figura 2 - Expressão de CD1d no intestino. Diversos tipos celulares na mucosa intestinal expressam a molécula apresentadora de antígeno CD1d, como as células epiteliais intestinais, células dendríticas e linfócitos B. Fonte: Middendorp e Nieuwenhuis (2009)⁸⁶.

1.2 Doenças inflamatórias do intestino

As doenças inflamatórias do intestino (DII) são uma condição que afeta milhões de pessoas e compreende duas entidades distintas: a colite ulcerativa (UC) e a Doença de Crohn.

A UC e a Doença de Crohn podem ser consideradas doenças da sociedade moderna, e suas frequências em países desenvolvidos têm aumentado desde o

século 20 ⁹⁴. O estilo de vida ocidental está ligado ao aparecimento dessas doenças devido à associação com o fumo, dietas ricas em gordura e açúcares, o uso de medicamentos e o estresse ⁹⁵. As DII afetam principalmente os jovens, e cerca de 4 milhões de pessoas no mundo todo sofrem desse tipo de doença ⁹⁶.

A UC foi primeiramente descrita em meados de 1800 ⁹⁷ e é uma das formas mais comuns de DII no mundo todo. Diferentemente da Doença de Crohn, a UC é uma doença da mucosa que é menos propensa a complicações ⁹⁸. As manifestações clínicas da UC são variadas, mas a apresentação de diarreia sanguinolenta com ou sem muco é uma de suas principais características. Os primeiros sintomas geralmente aparecem gradualmente, com períodos de remissão espontânea e relapsos subsequentes. A doença ativa é manifestada como uma inflamação da mucosa começando no reto (proctite) e em alguns casos se espalhando para o restante do cólon ⁹⁴. Quando há proctosigmoidite, colite do lado esquerdo, colite extensa ou pancolite pode haver diarreia, evacuações frequentes de sangue e muco, urgência ou tenesmo, dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso, dependendo da extensão e severidade da doença ⁹⁹.

O processo inflamatório na UC é caracteristicamente restrito à camada mucosa, sendo que o infiltrado pode variar em densidade e composição durante a doença ativa ou estágios de remissão. Tal infiltrado é composto principalmente de linfócitos, plasmócitos e granulócitos ¹⁰⁰. Outras características típicas incluem a depleção de células caliciformes, alteração da arquitetura das criptas, diminuição da densidade das criptas e ulcerações ⁹⁴. No entanto, não há critérios exatos para o diagnóstico da colite ulcerativa, mas na maioria dos casos, a presença de duas ou três das características mencionadas é suficiente ¹⁰¹.

Anormalidades na imunidade humoral e celular também ocorrem na UC. Níveis elevados de IgM, IgA e IgG são comuns nas doenças inflamatórias do intestino, com maiores níveis de IgG1 na UC ¹⁰². A imunidade adaptativa também participa na UC, com uma resposta Th2 atípica, indicada pela presença de células NKT no cólon que secretam grande quantidade de IL-13, mediando a apoptose e disfunção da barreira epitelial ^{87 103}.

A homeostase intestinal requer que a resposta imune inata seja bem controlada, com a participação dos receptores semelhantes ao *Toll* (TLR) e dos receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) das

células epiteliais e imunes ¹⁰⁴. Esse processo de reconhecimento contribui para a tolerância, mas quando está desregulado, a inflamação se desenvolve.

Tem sido sugerido também que alterações na composição da microbiota intestinal e defeitos na imunidade da mucosa, ou os dois fatores combinados poderiam levar à UC ⁹⁴.

1.3 Microbiota intestinal

A primeira descrição abrangente da composição da microbiota intestinal humana foi feita em 2005 por Eckburg e colaboradores ¹⁰⁵, sendo baseada na análise da sequência de mais de 13.000 genes do RNA ribossomal 16S, obtidos do DNA bacteriano de amostras de mucosa do intestino e fezes. Apesar da microbiota ser variada e composta tanto por bactérias, fungos e vírus, os estudos são focados principalmente no conjunto de bactérias. Outros trabalhos se seguiram e ajudaram a consolidar os achados de Eckburg, formando uma descrição consistente da microbiota intestinal humana, que é estimada ser composta por cerca de 100 trilhões de microrganismos pertencentes, principalmente, aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* ^{106; 107; 108; 109; 110; 111; 112}.

A diversidade e composição da microbiota intestinal intra e interespecíes é influenciada pela variação topográfica e temporal nas comunidades microbianas, sendo que espécies bacterianas específicas ocupam nichos específicos ou estão associadas com fases específicas do crescimento do hospedeiro ^{113; 114}. Em humanos, a microbiota individual começa a ser formada através da troca materna no nascimento e na amamentação ^{115 116}. Subsequentemente, a microbiota vai sendo definida de acordo com a influência de diversas interações complexas durante a vida, como dieta, estilo de vida, doenças e uso de antibióticos ¹¹⁷.

As bactérias comensais que conseguiram com sucesso colonizar o intestino humano passaram por milhões de anos de coevolução, o que fez com que sua coexistência com o hospedeiro fornecesse claros benefícios mutualísticos e simbióticos ¹¹⁸. Esse mutualismo tem apoiado a expansão de populações bacterianas de tal forma que, numericamente, elas excedem as células eucarióticas por um fator de 10 e fornecem um complemento genético de 150 vezes mais do genoma humano ¹¹⁹.

A composição taxonômica de uma microbiota “ideal”, se é que ela existe, ainda está para ser definida. Alguns estudos corroboram a evidência de que não há apenas

uma composição específica de espécies que compõem a microbiota saudável, mas um número limitado de estados simbióticos balanceados entre hospedeiro e microbiota ¹²⁰. Embora a microbiota saudável ainda não esteja definida, há diversas condições associadas com a perturbação da microbiota, sendo que na maioria dos casos é difícil saber se a microbiota alterada é causa ou se correlacionaria-se com a doença ¹²¹.

O importante papel da microbiota intestinal na indução e progressão das doenças tem sido corroborado em pacientes e em modelos experimentais de inflamação intestinal ^{122 123}. De fato, foi demonstrado que a inflamação do intestino não pôde ser reproduzida em animais sob condições livre de germes (*germ-free*) ¹²⁴ e que o tratamento com antibióticos atenuava a gravidade da doença ¹²⁵.

O equilíbrio da microbiota intestinal parece estar alterado na doença inflamatória do intestino, sendo que níveis diminuídos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido encontrados em amostras fecais, enquanto que um aumento de espécies de *Enterococcus* e *Bacteroides* tem sido descrito na mucosa inflamada de pacientes ¹²⁶. As interações entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro começam no nascimento, sendo que a microbiota modula o desenvolvimento do sistema imune e esse modula a composição da microbiota ¹¹⁷.

As bactérias do intestino direcionam o desenvolvimento imune e orquestram a expansão de numerosas populações de células imunes no intestino, e também desenvolvem importante papel na manutenção da homeostase imune ¹¹⁸. Recentemente, algumas bactérias comensais têm sido apontadas como participantes ativas na diferenciação de células T. Elas incluem *Bacteroides fragilis*, bactérias filamentosas segmentadas e espécies de *Clostridium*, que induzem a expansão de células Th17 e T-reguladoras ^{127; 128; 129; 130; 131; 132}.

A microbiota também influencia o compartimento das células NKT invariantes, as quais representam uma importante população de linfócitos envolvida no reconhecimento de antígenos glicolipídicos ^{133; 134}. Em especial, as glicosilceramidas das *Sphingomonas* parecem ser ligantes específicos de CD1d envolvidos na expansão de células iNKT.

Dessa forma, sabendo da importância do eixo: sistema imune, microbiota e homeostase intestinal, seria interessante investigar o papel das células NKT para a homeostase intestinal através do uso de animais nocautes para essas células e relacionar a importância dessa influência num modelo de inflamação intestinal.

Assim nossa hipótese foi de que as células NKT no intestino contribuem para a composição da microbiota e para a homeostase intestinal, sendo que alterações na ativação ou a ausência dessas células seriam capazes de refletir no curso da doença inflamatória intestinal.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a participação e o perfil das células NKT no intestino em condições normais e durante processo inflamatório.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Caracterizar os subtipos de células NKT (NKT1, NKT2, NKT17 e NKT10) presentes na mucosa intestinal durante a homeostase, em animais *germ-free* e durante o processo inflamatório de colite;
- Avaliar o impacto da ausência de células NKT na microbiota, na homeostase e inflamação intestinal nos animais nocautes; e
- Relacionar a influência da ausência ou ativação das células NKT com o perfil das células imunes presentes na lamina propria do intestino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e J α 18^{-/-} machos, com 6-12 semanas, pesando de 20 a 28 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia - CEDEME da UNIFESP.

Anteriormente, os animais J α 18^{-/-} haviam sido cedidos pelo Dr. Masaru Taniguchi do RIKEN Research Center for Allergy and Immunology (Japão). Esses animais possuem uma deleção específica do segmento gênico J α 281, portanto, a cadeia V α 14J α 281 do TCR não é expressa, acarretando no não desenvolvimento de células NKT invariantes, mas deixando outras populações linfóides intactas¹³⁵.

Foram utilizados também camundongos IL-10GFP (Vert-X, The Jackson Laboratory, stock number: 014530). Esses animais foram fornecidos pelo biotério do departamento de Farmacologia da USP-Ribeirão Preto, sob os cuidados do Prof. José Carlos Alves Filho.

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 (USP), no ano de 2013. Protocolo registrado sob o nº 191 na folha 143 do livro 02.

Os animais foram mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Imunologia dos Transplantes, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 h, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suplemento de água e alimento disponíveis todo o tempo.

3.2 Indução de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)

A indução da colite foi feita através da ingestão de DSS (Peso Molecular Médio: 36000-50000, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) a 2,5% na água dos animais durante 7 dias. Os animais controle receberam água sem DSS. Após os 7 dias, os animais foram avaliados por um score clínico descrito por Maxwell¹³⁶.

A colite induzida por DSS é um modelo bem estabelecido e confiável de doença inflamatória do intestino, pois seu quadro clínico se assemelha à colite ulcerativa¹³⁷.

A colite aguda por DSS se inicia com uma disfunção da barreira de células epiteliais, o que leva os antígenos do lúmen a entrarem na lâmina própria e estimular a resposta imune. A disfunção da barreira epitelial começa desde o primeiro dia de tratamento com DSS devido a uma diminuição gradual da produção de proteínas de junção, o que leva a um aumento da permeabilidade intestinal^{138; 139}. A fase aguda desse modelo de colite é regida principalmente por células da imunidade inata¹⁴⁰, mas a imunidade adaptativa também tem papel importante no processo crônico¹⁴¹.

3.3 Administração de agonistas de células NKT

Para ativação das células NKT utilizamos o agonista α GalCer (KRN7000 – 1 mg Alexis Biochemicals/Alexis Corporation, Lausen, Suíça).

A α GalCer foi inicialmente diluída em uma solução clorofórmio: metanol (2:1) e aliquoteada em tubos de vidro, de forma que cada tubo contivesse 50 μ g da substância. A solução de metanol:clorofórmio foi seca em atmosfera de nitrogênio. Os tubos permaneceram estocados em freezer a -20 °C. No dia do uso, cada amostra foi ressuspensa em solução de PBS 1 x + Tween20 0,5% e colocada no sonificador por 60 minutos e aquecida a 60 °C.

Para indução do subtipo NKT10, o agonista α GalCer foi administrado aos animais conforme o esquema apresentado na figura, baseado no protocolo descrito por Sag⁶⁹.

Figura 3 Esquema de indução do subtipo NKT10. Diagrama representativo do protocolo de indução de NKT10. O grupo induzido (WT/αGC+DSS) recebeu duas doses de α GalCer, uma 4 semanas antes da indução da colite e outra no dia 3 da colite. d=dia. i.v.=intravenoso. i.p.=intraperitoneal.

3.4 Determinação da permeabilidade intestinal pela análise de FITC- Dextran

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela administração por gavagem de FITC dextran (DX-4000-FITC, SigmaAldrich, St Louis, MO, EUA), uma macromolécula não metabolizada que é utilizada como uma sonda de permeabilidade. Todos os camundongos foram tratados por gavagem com FITC-dextran (250 mg/Kg de peso corporal) após 4 h de jejum. Após 6 h da gavagem, o sangue foi coletado pela cauda. Diluições de FITC-dextran em PBS foram usadas como uma curva padrão, e absorção de 100 μ L de soro ou de padrão foi medida em um fluorímetro com excitação a 485 nm e a leitura em 535 nm.

3.5 Quantificação de endotoxina

A concentração de endotoxina no soro foi determinada usando um ensaio cromogênico baseado em um extrato de amebócitos de *Limulus* (kit LAL cromogênico - QCL1000 LONZA, Basel, Suíça). As amostras foram coletadas no momento da eutanásia através de punção cardíaca para tentar minimizar o máximo possível a chance de contaminações. O teste é quantitativo para endotoxina bacteriana gram-negativa e foi realizado conforme orientações do fabricante. Utilizamos 50 microlitros de amostra.

3.6 Análise da sobrevida

Para estudo da sobrevida os camundongos receberam DSS na água e foram monitorados todos os dias, durante 11 dias. Ao final de 11 dias, por questões éticas devido à intensa perda de peso, os animais restantes foram eutanasiados.

3.7 Citometria de fluxo – Lamina Propria intestinal

Os intestinos removidos dos animais eutanasiados foram abertos longitudinalmente, lavados com PBS para remoção das fezes e cortados em pedaços de cerca de 1 cm. Os pedaços foram incubados com meio RPMI contendo 3% de soro fetal bovino, EDTA e DTT, por 20 minutos a 37 °C, com agitação. Após incubação, os pedaços de intestino foram peneirados e lavados com meio contendo EDTA, para separação dos linfócitos intraepiteliais. A solução resultante das lavagens contém os linfócitos

intraepiteliais e foi descartada. Os pedaços restantes foram digeridos com meio contendo liberase (1/250 de uma solução a 25 mg/mL, Roche, Alemanha) e DNase I (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA), por 25 minutos, a 37 °C com agitação. Após digestão, a solução foi passada em uma peneira (70 µm), centrifugada, ressuspendida em PBS + 2% SFB e passada novamente por uma peneira (40 µm). As células da lamina propria obtidas foram marcadas com anticorpos monoclonais para análise da marcação das moléculas de superfície e intracelular, de acordo com a população de células a ser analisada. Para caracterização das células foram utilizados os seguintes marcadores: CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, CD25, CD40L, CD45, CD69, CD90.2, CD138, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, GM-CSF, TNF- α , B220, mCD1d-PBS57, TCR β , NK1.1, I^AE, PD-1, FR4, NRP1, ICOS, Slamf6, PLZF, ROR γ t, GATA-3, T-bet, mix de Linhagem e marcador de viabilidade (*live/dead*). O tetrâmero de mCD1d conjugado com PBS57 e seu respectivo controle não-conjugado foram fornecidos pelo NIH Tetramer Core Facility da Emory University, Atlanta, EUA.

As amostras foram analisadas no aparelho FACSCanto II e LSR Fortessa, utilizando o software FACSDIVA (BD Biosciences), e então analisadas com o software FLOWJO (Tree Star, San Carlo, CA, EUA).

3.8 CBA (*Cytometric Bead Array*)

O ensaio CBA Mouse Inflammation Kit (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para quantificar IL-6 e TNF- α no extrato do intestino como descrito pelo fabricante. As amostras de intestino foram lisadas com tampão RIPA contendo inibidores de protease e quantificadas com o kit Proteínas Totais da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) antes de serem utilizadas no ensaio.

3.9 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O ensaio de ELISA foi utilizado para quantificar a imunoglobulina A (IgA) no soro e nas fezes, e também as citocinas IL-17, IL-22 e TGF- β 1 e a quimiocina MCP-1 no extrato do tecido intestinal. Os kits utilizados foram das empresas R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), Promega (Madison, WI, EUA) e eBioscience (San Diego, CA, EUA) e realizados como descrito pelos fabricantes.

As amostras de intestino foram lisadas com tampão RIPA contendo inibidores de protease e quantificadas com o kit Proteínas Totais da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) antes de serem utilizadas no ensaio.

As amostras de fezes foram pesadas e lisadas com tampão PBS contendo inibidores de proteases antes da quantificação por ELISA. Os valores obtidos no ensaio foram corrigidos pelo peso das fezes e volume utilizado para extração.

3.10 Extração de RNA e preparação do cDNA

As amostras de intestino grosso obtidas na eutanásia e congeladas, foram submetidas à extração de RNA utilizando-se o reagente TRizol® (Life Technologies, Waltham, MA, EUA). A preparação do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando-se 1.0 µg RNA, transcriptase reversa M-MLV, 5 X Reaction Buffer para M-MLV, dNTPs 10 mM, primer oligo-dT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Esta mistura foi incubada a 37 °C, por 60 minutos, e em seguida a 65 °C, por 10 minutos.

3.11 PCR em tempo real

Após a preparação do DNA complementar (cDNA), foi realizada a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. A detecção dos genes de interesse foi realizada no aparelho QuantStudio (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Utilizamos primers TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para os seguintes transcritos: ZO-1, IFN-γ, TNF-α e TGF-β1 e primers Sybr para o HPRT (Tabela 1). O método de quantificação foi a análise comparativa através do cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$ com gene controle *HPRT* e grupo controle utilizado como calibrador.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados no qPCR.

Gene	Sequencia (5'→3')
<i>Hprt</i>	F: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3' R: 5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'
<i>Tjp1</i> (ZO-1)	Mm00493699_m1
<i>Ifng</i>	Mm 00801778_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>Tgfb1</i>	F: 5'-AACTATTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' R: 5'-AGTTGGATGGTAGCCCTTG-3'
<i>Il5</i>	Mm00439645_m1

3.12 Análise da microbiota intestinal

- Extração de DNA das fezes

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

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

A quantificação dos principais filos bacterianos foi determinada por PCR em tempo-real, sendo eles: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Fusobacteria*. A determinação relativa de cada filo foi calculada pelo método delta CT e normalizado pela presença de bactérias totais empregando um par de primers para 16S rRNA total. As reações de amplificação foram realizadas em duplicata, contendo 1 x do SYBR Green PCR Master Mix 2 x (Applied Biosystems), 5 µM de cada primer (forward e reverse) e 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador QuantStudio (Applied Biosystems). 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 da microbiota das fezes

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 Neopropecta Microbiome Technologies.

3.13 Análise Histológica

Um segmento do intestino foi retirado, fixado em metacarn (60% Metanol, 30% Clorofórmio e 10% Ácido Acético Glacial) por 24 h a 4 °C e posteriormente transferido para solução de álcool 70%. O material foi enviado para montagem em blocos de parafina e as lâminas confeccionadas foram coradas com H&E (Hematoxilina & Eosina). As imagens foram obtidas em microscópio Nikon, no aumento de 10 x e 20 x.

3.14 Imunohistoquímica

Fragmentos intestinais foram fixados em solução metacarn (60% Metanol, 30% Clorofórmio e 10% Ácido Acético Glacial) por 24 h a 4 °C e posteriormente transferido para solução de álcool 70%. O material foi emblocado em parafina e as lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 µm. As amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a tampão citrato a temperatura de 96 °C para recuperação antigênica. A atividade de peroxidase endógeno foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (3%) e solução de bloqueio de proteína (DAKO, Glostrup, Denmark) foi adicionada. Anticorpos primários (diluição 1:200) para IgA ou controle negativo foram incubados em câmara escura umidificada a 4 °C overnight, seguido por uma incubação com um polímero marcado (Dual Link System-HRP, DAKO, Glostrup, Denmark), usando duas incubações de 30 minutos a temperatura ambiente. A marcação com substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foi realizada por incubação de 1-3 minutos a temperatura ambiente (cor marrom) seguida por uma contra-coloração com hematoxilina. A análise da marcação positiva para estas moléculas foi realizada usando o programa de análise de imagens Fiji/ImageJ.

3.15 Imunofluorescência

Um segmento do intestino foi retirado, fixado em metacarn (60% Metanol, 30% Clorofórmio e 10% Ácido Acético Glacial) por 24 h a 4 °C e posteriormente transferido para solução de álcool 70%. O material foi enviado para montagem em blocos de parafina e as lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 µm.

Após desparafinização, os cortes foram lavados com um tampão de hibridização, contendo Tris-HCl, NaCl e SDS, a 50 °C. A probe para bactérias totais (Eubacteria, Sigma, AF488-conjugada – Tabela 2) foi diluída no mesmo tampão para atingir a concentração de uso de 100 nM. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 50 °C por 4 h. Após lavagem com tampão, adicionamos a Lectina - *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I) TRITC-conjugada (Sigma) e incubamos durante 2 h, a temperatura ambiente. Para identificação dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, as probes foram diluídas no mesmo tampão descrito acima para atingir as seguintes concentrações: 100 nM para a probe de *Bacteroidetes* e 200 nM para as probes de *Firmicutes* – Tabela 2). As sequências foram obtidas do trabalho de Brown ¹⁴³.

Após lavagem, as lâminas foram montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio confocal, no aumento de 40 x.

Tabela 2 – Probes utilizadas para marcação de bactérias

Probe	Concentração (nM)	Sequência (5'→3')
<i>Eubacteria</i>	100	[AF488]GCTGCCTCCCGTAGGAGT[AF488]
<i>Bacteroidetes</i>	100	[Tamra]CCAATGTGGGGGACCTT[Tamra]
<i>Firmicutes 1</i>	200	[6FAM]TGGAAGATTCCCTACTGC[6FAM]
<i>Firmicutes 2</i>	200	[6FAM]CGGAAGATTCCCTACTGC[6FAM]
<i>Firmicutes 3</i>	200	[6FAM]CCGAAGATTCCCTACTGC[6FAM]

3.16 Análise estatística

A análise estatística foi feita com recursos do software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA). Os dados apresentados nos gráficos estão representados em média± desvio padrão. Para comparação entre os grupos dos parâmetros avaliados foram aplicados os testes ANOVA (para comparação entre 3 grupos ou mais) com pós teste de Bonferroni ou o teste *t* (para comparação entre 2 grupos). O valor de *p* foi considerado significativo quando ≤ 0,05.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 PARTE I – Estudo das células NKT no intestino de animais selvagens

As células NKT representam uma população importante do sistema imune inato e adaptativo. Muitos estudos demonstram a importância dessas células para diversos modelos de doenças em diversos órgãos.

As células NKT estão presentes no intestino, mas pouco ainda se sabe sobre as características dessas células nesse órgão.

Nessa primeira parte, serão descritos os resultados relativos à análise das células iNKT no intestino de camundongos C57BL/6.

4.1.1 O subtipo de célula NKT predominante no intestino é o NKT1

As células iNKT estão presentes tanto no intestino delgado como no intestino grosso e sua frequência varia entre 0,5 e 1% no íleo e <0,5% no cólon (Figura 4A/Apêndice A). A frequência de células iNKT no intestino já havia sido descrita por Wingender e colaboradores⁹⁰ e nossos resultados estão de acordo com este estudo anterior.

A categorização das células iNKT em subtipos funcionais (NKT1, NKT2 e NKT17) foi descrita em diferentes órgãos, porém não no intestino. Nós observamos que as células NKT1 são o subtipo mais prevalente no íleo e no cólon, correspondendo a cerca de 60% das células iNKT ileais e mais de 30% das células iNKT colônicas (Figura 4B e C). As células NKT2 e NKT17 são menos prevalentes no íleo e sua frequência é inferior a 6%. Entre as células NKT do cólon observamos cerca de 20% de NKT17 e menos de 5% de NKT2.

Figura 4 - Frequência de células iNKT e seus subtipos no intestino. (A) Frequência de células iNKT (linfócitos vivos, não-B, $\text{TCR}\beta^+$, $\text{CD1d-}\alpha\text{GC}^+$) no intestino delgado (ID) - íleo e intestino grosso (IG). (B) Porcentagem de células iNKT ileais correspondente a cada subtipo. (C) Porcentagem de células iNKT no cólon em cada subtipo. Dados representativos de 4 experimentos independentes (3-4 animais por experimento). Os resultados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice A.

4.1.2 As células iNKT intestinais respondem ao agonista αGalCer

O glicolípídeo αGalCer é um agonista potente das células iNKT e pode ativar essas células para produzir citocinas, principalmente $\text{IFN-}\gamma$ e IL-4 . Para avaliar como as células iNKT do intestino reagem ao estímulo de um agonista, nós administramos 1 μg de αGalCer aos animais e coletamos o intestino após 3 h.

As células iNKT intestinais foram capazes de produzir, principalmente, $\text{IFN-}\gamma$ e GM-CSF (Figura 5B e D/Apêndice B). Essas células também aumentaram a expressão de marcadores de ativação, como CD154 (CD40L) e CD69 (Figura 5G e H). Nós observamos um aumento na produção de IL-4 , $\text{TNF-}\alpha$ e IL-13 (Figura 5C, E e F) e na expressão de CD25 (Figura 5I), porém sem diferença significativa. Esses achados corroboram nossos resultados de que as NKT1 são o subtipo mais prevalente no intestino e também demonstram que elas são funcionais e respondem ao agonista αGalCer .

Figura 5 - Ativação das células iNKT intestinais. (A) Frequência de células iNKT (linfócitos não-B, $\text{TCR}\beta^+\text{CD}1\text{d-}\alpha\text{GC}^+$) no intestino delgado controle e 3 h após administração do agonista αGalCer (αGC). As porcentagens de células iNKT produtoras de citocinas estão representadas de C-F (IFN- γ , IL-4, GM-CSF, TNF- α e IL-13, respectivamente). A média geométrica (GeoM) da expressão de marcadores de ativação está representada de G-I (CD40L, CD69 e CD25, respectivamente). Dados representativos de 2 experimentos independentes (3-4 animais por experimento). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t não pareado. * $p < 0.05$. Os histogramas representativos dos gráficos estão apresentados no Apêndice B.

4.1.3 Influência da microbiota no desenvolvimento e função das células iNKT

A microbiota é conhecida por influenciar o sistema imunológico de diversas maneiras. Aqui, nós usamos animais *germ-free* para estudar o papel da microbiota no desenvolvimento e na função das células iNKT intestinais.

Na análise da frequência de células iNKT no baço, linfonodos mesentéricos, íleo e cólon, pudemos observar uma tendência de aumento na frequência dessas células nos animais *germ-free*. Esse aumento foi significativo para as células iNKT no linfonodos mesentéricos dos animais *germ-free* controles e para as iNKT no baço e cólon de animais *germ-free* ativados com α GalCer (Figura 6/Apêndices C-F).

Para avaliarmos a influência da microbiota no desenvolvimento dos subtipos de células iNKT, nós caracterizamos essas subpopulações nos animais *germ-free*. Dentre os subtipos de iNKT no cólon, observamos diminuição de NKT1 nos animais *germ-free* (Figura 7A). No íleo houve aumento do subtipo NKT1 e diminuição de NKT17 nos animais *germ-free* (Figura 7B). Já no baço, houve aumento do subtipo NKT1 (Figura 7D). Os subtipos de NKT nos linfonodos mesentéricos não foram alterados pela ausência de microbiota (Figura 7C).

Figura 6 - Análise da frequência de células iNKT em animais *germ-free*. (A) Frequência de células iNKT (linfócitos não-B, $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d-}\alpha\text{GC}^+$) no baço, linfonodos mesentéricos, íleo e cólon de animais *germ-free* e SPF controles. (B) Frequência de células iNKT (linfócitos não-B, $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d-}\alpha\text{GC}^+$) no baço, linfonodos mesentéricos (mLN), íleo e cólon de animais *germ-free* e SPF injetados com 1 μg de α GalCer. Dados representativos de 2 experimentos com 2-3 animais por grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA. * $p < 0.05$. GF=*germ-free*. SPF=*specific pathogen free*. ID=intestino delgado. IG=intestino grosso. α GC= α GalCer. A estratégia de gates utilizada está representada nos Apêndices C a F.

Figura 7 - Análise dos subtipos de células iNKT em animais *germ-free*. Porcentagem dos subtipos de NKT no intestino grosso (A), no intestino delgado (B), nos linfonodos mesentéricos (C) e no baço (D) de animais *germ-free* e SPF controles. Dados representativos de 2 experimentos com 2-3 animais por grupo. Dados expressos em média±desvio padrão. Teste ANOVA. * $p < 0.05$. GF=*germ-free*. SPF=*specific pathogen free*. IG=intestino grosso. ID=intestino delgado. A estratégia de gates utilizada está representada nos Apêndices C a F.

Em relação à produção de citocinas pelas células iNKT intestinais, não foi possível observar diferenças significativas entre os animais *germ-free* e SPF (Figura 8A).

No baço, observamos que as células foram ativadas após injeção de α GalCer mas não houve diferença entre os grupos GF α GC e SPF α GC (Figura 8B).

Figura 8 - Produção de citocinas pelas células iNKT em animais *germ-free*. As porcentagens de células iNKT produtoras de IFN- γ , IL-4, IL-13 e IL-17 no intestino grosso estão apresentadas em (A). As porcentagens de células iNKT produtoras de IFN- γ , IL-4, IL-13 e IL-17 no baço estão apresentadas em (B). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0.05$ (SPFctr x SPF α GC) # $p < 0.05$ (GF ctr x GF α GC). IG=intestino grosso. SPF=*specific pathogen free*. GF=*germ-free*. α GC= grupo injetado com 1 μ g de α GalCer 3 h antes da eutanásia.

4.1.4 Identificação do subtipo NKT10 no intestino

Os três subtipos principais de células NKT são NKT1, NKT2 e NKT17, que são análogos aos subtipos *Helper* do tipo 1 (Th1), Th2 e Th17, respectivamente. No entanto, recentemente, um subtipo distinto foi descrito, o subtipo NKT10. As NKT10 compreendem as células NKT capazes de produzir IL-10 e expressar vários marcadores de superfície encontrados em células T reguladoras (Tregs)⁶⁹. Nós avaliamos se o subtipo NKT10 poderia ser induzidas no intestino.

Embora não se tenha observado aumento significativo na produção de IL-10, observou-se o mesmo padrão de ativação no baço como descrito no estudo anterior, com aumento significativo de marcadores de superfície, como FR4, NRP1, PD1,

ICOS e Slamf6 e diminuição da expressão de CD69 e da produção de IFN- γ (Figura 9/Apêndice G).

No intestino delgado, nós observamos aumento significativo de PD-1, NRP1 e IFN- γ (Figura 10/Apêndice H). Dentre os outros marcadores não houve diferença.

No intestino grosso, foi observado um aumento em IL-10, PD-1, FR4 e Slamf6, mas sem diferença estatisticamente significativa (Figura 11/Apêndice I). Os outros marcadores não mudaram com a indução.

Figura 9 - Análise do subtipo NKT10 no baço. (A) Porcentagem das células iNKT produtoras de IL-10. (B-G) Porcentagem das células iNKT que expressam PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1 e CD69, respectivamente. (H) Porcentagem das células iNKT produtoras de IFN- γ . Dados representativos de um experimento (n=2-4 animais/grupo). Dados expressos em média±desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. *p<0.05. B6 ctr= animais C57BL/6J controles. B6+αGC= animais C57BL/6J injetados com 1 μg de αGalCer 3 h antes da eutanásia. B6/αGC+αGC= animais C57BL/6J injetados com 4 μg de αGalCer 4 semanas antes da eutanásia e novamente com 1 μg de αGalCer 3 h antes da eutanásia. Os histogramas representativos dos gráficos estão apresentados no Apêndice G.

Figura 10 - Análise do subtipo NKT10 no intestino delgado (íleo). (A) Porcentagem das células iNKT produtoras de IL-10. (B-G) Porcentagem das células iNKT que expressam PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1 e CD69, respectivamente. (H) Porcentagem das células iNKT produtoras de IFN-γ. n=2-4animais/grupo. Dados expressos em média±desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. *p<0.05. B6 ctr= animais C57BL/6J controles. B6+αGC= animais C57BL/6J injetados com 1 µg de αGalCer 3 h antes da eutanásia. B6/αGC+αGC= animais C57BL/6J injetados com 4 µg de αGalCer 4 semanas antes da eutanásia e novamente com 1 µg de αGalCer 3 h antes da eutanásia. Os histogramas representativos dos gráficos estão apresentados no Apêndice H.

Figura 11 - Análise do subtipo NKT10 no intestino grosso. (A) Porcentagem das células iNKT produtoras de IL-10. (B-G) Porcentagem das células iNKT que expressam PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1 e CD69, respectivamente. (H) Porcentagem das células iNKT produtoras de IFN- γ . n=2-4animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. *p<0.05. B6 ctr= animais C57BL/6J controles. B6+ α GC= animais C57BL/6J injetados com 1 μ g de α GalCer 3 h antes da eutanásia. B6/ α GC+ α GC= animais C57BL/6J injetados com 4 μ g de α GalCer 4 semanas antes da eutanásia e novamente com 1 μ g de α GalCer 3 h antes da eutanásia. Os histogramas representativos dos gráficos estão apresentados no Apêndice I.

4.2 PARTE II – Estudo da indução do subtipo NKT10 em um modelo de colite

Tendo em vista nossos resultados anteriores que mostraram o aumento da expressão de marcadores do subtipo NKT10 no baço e no intestino, nós decidimos testar se a indução desse subtipo poderia ser benéfica em um modelo de colite.

O subtipo NKT10 foi descrito por Sag e colaboradores ⁶⁹ e compreende as células iNKT que podem ser induzidas a produzir IL-10.

A citocina IL-10 é importante para a homeostase intestinal, sendo que animais nocautes para essa interleucina desenvolvem colite espontânea. Outro estudo também demonstra a importância da produção de IL-10 pelas células epiteliais na proteção contra o desenvolvimento de colite ^{144; 145}.

4.2.1 Análise dos parâmetros da colite após indução do subtipo NKT10

Nós utilizamos o protocolo descrito para induzir o subtipo NKT10 durante a indução de colite por DSS (Figura 3).

Na análise dos parâmetros da colite nós observamos, em relação ao tamanho do cólon, que não houve redução intensa do cólon com a indução de NKT10 (Figura 12A), indicando uma melhora no desenvolvimento da colite. Em relação ao *score* e à perda de peso não houve diferença entre os grupos (Figura 12B-C).

Figura 12 - Análise da indução de NKT10 em um modelo de colite. Após 7 dias de indução de colite os animais foram avaliados quanto ao tamanho do cólon (A), score (B) e variação do peso em relação ao peso inicial (C). n= 3-5animais/grupo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0.05. ctr=controle. WT DSS=animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. WT/αGC+DSS= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS.

4.2.2 A indução de NKT10 reduziu a inflamação intestinal em modelo de colite

Para avaliar se a indução do subtipo NKT10 influenciaria na inflamação intestinal durante a colite, nós quantificamos os níveis de IL-6 e TNF-α no extrato do intestino grosso (Figura 13). Nós verificamos que os níveis de IL-6 e TNF-α estavam diminuídos significativamente nos animais injetados com αGalCer para indução de NKT10.

Figura 13 - Dosagem de IL-6 e TNF- α no intestino. Os níveis de IL-6 (A) e TNF- α (B) foram dosados no extrato do intestino grosso por CBA. $n=5-7$ /grupo. Dados representativos de 2 experimentos independentes. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0.05$. WT ctr= controles. WT DSS= animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. WT/ α GC+DSS= animais C57BL/6 tratados com α GalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS.

4.2.3 Análise da frequência e dos subtipos de NKT na lamina propria

Para verificar se a indução de NKT10 influenciaria a população de células iNKT intestinais, nós analisamos essas células dentre os linfócitos da lamina propria do intestino grosso (Figura 14/ Apêndice J). Nós observamos que durante a indução da colite há um aumento da frequência de células iNKT e que a indução de NKT10 foi capaz de reduzir essa frequência. Além disso, nós analisamos os subtipos das células iNKT e verificamos que após indução de colite há uma diminuição do subtipo NKT2 e um aumento do subtipo NKT17. Com a indução de NKT10 nós observamos redução no subtipo NKT17, que pode estar relacionada com a melhora na inflamação observada nos animais, já que a IL-17 no intestino pode ter caráter inflamatório e ser prejudicial na colite.

Para caracterizar a indução do subtipo NKT10 foram descritos vários marcadores, que estão aumentados nesse tipo e não nos outros, um deles é o PD-1. Nós analisamos, dentre as células iNKT, se havia aumento na expressão de PD-1 e observamos um aumento significativo desse marcador após indução de NKT10 (Figura 14B). Embora não tenha sido possível detectar a produção de IL-10 nas células iNKT intestinais no dia 7 da indução de colite/NKT10 (dado não mostrado),

nós pudemos observar aumento dessa citocina no baço utilizando animais IL-10GFP (Figura 15C). No baço também foi possível observar aumento de PD-1 e redução de frequência das células iNKT (Figura 15B e A).

Para tentarmos identificar uma população de células iNKT produtoras de IL-10, nós eutanasiámos animais WT e IL-10GFP no dia 3 da indução de colite. Nós observamos que no dia 3 já é possível observar aumento de IL-10 e PD-1 no intestino (Figura 16), porém sem diferença significativa. Já no baço dos animais IL-10GFP foi possível aumento significativo de IL-10 e PD-1 (Figura 17).

Nós também analisamos se a indução de NKT10 durante o curso da colite poderia influenciar outros tipos celulares. Nós observamos uma diminuição da frequência de células dendríticas na lamina própria no dia 7 (Figura 18A). A frequência de macrófagos na lamina própria estava aumentada com a indução de colite, mas não observamos redução com o tratamento com α GalCer (Figura 18B).

Figura 14 - Frequência de células NKT e seus subtipos na lamina própria do cólon. Análise da frequência de células iNKT ($\text{TCR}\beta^+\text{CD1d-PBS57}^+$) na lamina própria do intestino grosso (A). A porcentagem de células NKT que expressam PD-1 está descrita em (B). A porcentagem de células NKT de cada subtipo está representada de C a E. Dados representativos de 2 experimentos independentes. $n=5$ animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0.05$. WT ctr= controles. WT DSS= animais C57BL/6 submetidos à colite

com 2.5% de DSS. WT/ α GC+DSS= animais C57BL/6 tratados com α GalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice J.

Figura 15 - Frequência de células NKT e expressão de PD-1 no baço. (A) Análise da frequência de células iNKT (TCR β^+ CD1d-PBS57 $^+$) no baço. A porcentagem de células NKT que expressam PD-1 está descrita em (B). A porcentagem de células NKT GFP+(IL-10+) está representada em (C). Dados representativos de um experimento. n=5animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0.05. WT ctr= controles. WT DSS= animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. WT/ α GC+DSS= animais C57BL/6 tratados com α GalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice K.

Figura 16 - Frequência de células NKT, produção de IL-10 e expressão de PD-1 no intestino (dia 3). Análise da frequência de células iNKT ($\text{TCR}\beta^+\text{CD1d-PBS57}^+$) no intestino de animais WT (A) e IL-10GFP (D). A porcentagem de células NKT produtoras de IL-10 nos animais WT está descrita em (B). A porcentagem de células NKT que expressam PD-1 está descrita em (C e F). A porcentagem de células NKT GFP+(IL-10+) está representada em (E). $n=3$ animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p<0.05$. WT ctr= controles. WT/αGC+DSS= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. WT/αGC= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 (controle NKT10 sem colite). IL-10GFP/αGC+DSS= animais IL-10GFP tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. IL-10GFP+αGC= animais IL-10GFP tratados com αGalCer apenas no dia da eutanásia. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice M.

Figura 17 - Frequência de células NKT, produção de IL-10 e expressão de PD-1 no baço (dia 3). Análise da frequência de células iNKT ($\text{TCR}\beta^+\text{CD1d-PBS57}^+$) no baço de animais WT (A) e IL-10GFP (D). A porcentagem de células NKT produtoras de IL-10 nos animais WT está descrita em (B). A porcentagem de células NKT que expressam PD-1 está descrita em (C e F). A porcentagem de células NKT GFP+(IL-10+) está representada em (E). Dados representativos de um experimento. $n=3-4$ animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. $*p<0.05$. WT ctr= controles. WT/αGC+DSS= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. WT/αGC= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 (controle NKT10 sem colite). IL-10GFP/αGC+DSS= animais IL-10GFP tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. IL-10GFP+αGC= animais IL-10GFP tratados com αGalCer apenas no dia da eutanásia. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice N.

Figura 18 - Frequência de células dendríticas e macrófagos na lamina propria. (A) Análise da frequência de células dendríticas (DCs) (CD11c⁺I-E⁺⁺) na lamina propria. (B) Análise da frequência de macrófagos (CD11b⁺CD11c⁻) na lamina propria. n=5animais/grupo. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0.05. WT ctr= controles. WT DSS= animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. WT/αGC+DSS= animais C57BL/6 tratados com αGalCer 4 semanas antes da indução da colite e novamente no dia 3 da indução da colite com 2.5% de DSS. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice L.

4.3 PARTE III – Estudo nos animais nocautes para células iNKT

Como visto na 1ª parte dos resultados e de acordo com estudos já publicados^{90; 91}, as células iNKT estão presentes no intestino e são importantes componentes do sistema imune nessa região. Dessa forma, nós decidimos avaliar como a ausência das células iNKT poderia influenciar na homeostasia do intestino e em um modelo de inflamação intestinal.

4.3.1 Os animais $J\alpha 18^{-/-}$ são mais suscetíveis à colite induzida por DSS

Para analisarmos se havia diferença na sobrevivência dos animais selvagens (WT) e nocautes ($J\alpha 18^{-/-}$), esses animais foram submetidos à ingestão de água com DSS 2,5% e acompanhados por 11 dias (Figura 19A). Nesse período, pudemos observar que os animais $J\alpha 18^{-/-}$ morreram antes dos animais WT, indicando que a ausência das células iNKT agrava o quadro de colite.

Além da sobrevivência, outros parâmetros foram utilizados para avaliar o desenvolvimento da colite nos animais selvagens e nocautes, como: o *score* clínico da colite, o tamanho do cólon e a porcentagem de variação de peso no período da indução de colite (Figura 19B-D). O *score* foi analisado segundo os parâmetros descritos por Maxwell¹³⁶ que levam em consideração a consistência das fezes, a presença de sangue nas fezes e o estado geral do animal. Dentre os grupos de animais observados, os animais $J\alpha 18^{-/-}$ com colite apresentaram *score* significativamente maior que os animais selvagens. Em relação ao tamanho do cólon, o cólon dos animais $J\alpha 18^{-/-}$ apresentou maior redução quando comparado aos animais selvagens com colite. No entanto, em relação à perda de peso, não houve diferença significativa entre os grupos submetidos à colite.

Nos cortes histológicos do intestino, pudemos observar aumento de infiltrado na lamina própria e desarranjo das criptas nos animais selvagens com colite; já nos animais $J\alpha 18^{-/-}$ podemos observar destruição da camada mucosa e redução severa no número de criptas (Figura 20).

Figura 19 - Análise da indução de colite nos animais selvagens e nocautes. (A) Curva de sobrevivência em 11 dias de ingestão de DSS. n=8-9 animais/grupo. Log rank test. p=0.0017. Após 7 dias de indução de colite os animais foram avaliados quanto ao score (B), tamanho do cólon (C) e variação do peso em relação ao peso inicial (D). (E) Imagens representativas dos cólons dos animais. n= 5-8 animais/grupo. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste t não pareado. *p<0.05. **p<0.01. WT DSS=animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. Jα18^{-/-} DSS=animais Jα18^{-/-} submetidos à colite com 2.5% de DSS. Não houve diferença entre os animais WT ctr e Jα18^{-/-} ctr em relação ao tamanho do cólon (dado não apresentado).

Figura 20 - Cortes histológicos do intestino de animais controle e com colite. Imagens representativas de animais controles do grupo selvagem (WT ctr) e nocaute ($J\alpha 18^{-/-}$ ctr) e de animais com colite (WT DSS)($J\alpha 18^{-/-}$ DSS). Aumento de 10x nas quatro imagens da esquerda e de 20x nas duas imagens da direita.

4.3.2 A inflamação intestinal parece ser mais acentuada nos animais nocautes quando submetidos à colite

Na análise de citocinas pró-inflamatórias no extrato proteico do intestino, pudemos observar que os animais $J\alpha 18^{-/-}$ apresentavam níveis significativamente maiores de IL-6, em relação aos animais selvagens (Figura 21A). Os níveis de TNF- α e MCP-1 nos animais com colite estavam aumentados significativamente em relação aos controles, porém sem diferença significativa entre os grupos WT e KO com colite (Figura 21B e C). Outras duas citocinas foram analisadas, a IL-17 e a IL-22. Os níveis de IL-17 estavam diminuídos nos animais com colite em relação aos controles (Figura 21D) e os níveis de IL-22 não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 21E).

Figura 21 - Quantificação de citocinas inflamatórias no intestino. As citocinas pró-inflamatórias IL-6 (A), TNF- α (B), MCP-1 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) foram dosadas no extrato do intestino grosso. n=5-8/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. *p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001. WT ctr=animais C57BL/6 controles. WT DSS=animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. J α 18^{-/-} DSS=animais J α 18^{-/-} submetidos à colite com 2.5% de DSS. IG=intestino grosso. Não houve diferença entre os grupos WT ctr e J α 18^{-/-} ctr para os dados apresentados; optou-se por representar apenas os valores do grupo WT ctr.

A análise de citocinas pró-inflamatórias também foi feita a nível de expressão gênica. Nós pudemos observar aumento na expressão de IFN- γ e TNF- α nos animais com colite, porém sem diferença significativa (Figura 22A e B, respectivamente).

Figura 22 - Análise da expressão gênica de IFN- γ e TNF- α no intestino. A expressão gênica de IFN- γ (A) e TNF- α (B) foi analisada em fragmentos de intestino. n=3-5/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. WT ctr=animais C57BL/6 controles. WT DSS=animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. J α 18^{-/-} DSS=animais J α 18^{-/-} submetidos à colite com 2.5% de DSS. Não houve diferença entre os grupos WT ctr e J α 18^{-/-} ctr para os dados apresentados; optou-se por representar apenas os valores do grupo WT ctr.

4.3.3 Os animais J α 18^{-/-} têm níveis aumentados de endotoxina no soro

A indução de colite gera lesão no epitélio do intestino grosso, fazendo com que a permeabilidade intestinal aumente. O aumento da permeabilidade favorece a translocação de bactérias e produtos microbianos, sendo um parâmetro que ajuda a caracterizar a severidade da doença. A análise dos níveis de endotoxina no soro dos animais mostrou que os animais J α 18^{-/-} com colite apresentam quantidades significativamente maiores de endotoxina quando comparados aos animais selvagens (Figura 23A). O aumento da permeabilidade também foi avaliado pela presença de Dextran-FITC no soro dos animais e pudemos observar um aumento da fluorescência nos animais com colite, porém sem diferença entre os grupos (Figura 23B). Outro parâmetro que auxilia na análise da permeabilidade intestinal é a quantificação de proteínas de junção no intestino. Nós avaliamos a expressão gênica da proteína de junção ZO-1 e observamos diminuição significativa da expressão de ZO-1 nos animais com colite em relação aos controles, mas sem diferença entre os grupos colite (Figura 23C).

Figura 23 - Análise da permeabilidade intestinal e da proteína de junção ZO-1. A permeabilidade intestinal foi avaliada pela dosagem de endotoxina (A) e de Dextran-FITC (B) no soro dos animais. n=2-5 animais/grupo. (C) Análise da expressão gênica de ZO-1 no intestino grosso. n= 3-6 animais/grupo. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni. *p<0,05. ***p<0.001. WT ctr=animais C57BL/6 controles. WT DSS=animais C57BL/6 submetidos à colite com 2.5% de DSS. Jα18^{-/-} DSS=animais Jα18^{-/-} submetidos à colite com 2.5% de DSS. EU=unidades de endotoxina. TJP1= *tight junction protein 1* (ZO-1). Não houve diferença entre os grupos WT ctr e Jα18^{-/-} ctr para os dados apresentados; optou-se por representar apenas os valores do grupo WT ctr.

Tendo em vista que os animais Jα18^{-/-} apresentaram um grau de severidade maior na colite, nós buscamos investigar os fatores que poderiam contribuir para a gravidade da doença.

4.3.4 A ausência de células iNKT causa alteração na microbiota intestinal

A microbiota intestinal é um componente importante na manutenção da homeostase do intestino e alterações na composição da microbiota podem estar relacionadas com diversas doenças, inclusive a colite. Nós avaliamos, então, se a ausência das células iNKT nos animais Jα18^{-/-} poderia refletir no perfil de bactérias presentes no intestino.

Utilizando uma *probe* para DNA bacteriano universal, nós observamos que no cólon dos animais Jα18^{-/-} parece haver uma expansão de bactérias no lúmen (Figura 24). Ao utilizar sondas específicas para os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, nós pudemos verificar que os animais Jα18^{-/-} apresentam menos bactérias marcadas para o filo *Firmicutes* e maior marcação de *Bacteroidetes* (Figura 25).

Figura 24 - Análise de FISH das bactérias totais no cólon. Fragmentos do cólon contendo fezes foram marcados com probe para bactérias totais (Eubacteria – marcação em verde AF488). Em vermelho está marcado o muco (Lectina - UEA-I conjugada com TRITC). O núcleo das células epiteliais intestinais foi marcado com DAPI (azul). WT ctr: imagem da esquerda. Jα18^{-/-} ctr: imagem da direita.

Figura 25 - Análise de FISH dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* no cólon. Fragmentos do cólon contendo fezes foram marcados com probes específicas para os filos *Bacteroidetes* (marcação em vermelho – Tamra) e *Firmicutes* (marcação verde – 6FAM). As setas indicam marcação para *Firmicutes*. O núcleo das células epiteliais intestinais foi marcado com DAPI (azul). WT ctr: imagem da esquerda. Jα18^{-/-} ctr: imagem da direita.

Do mesmo modo, a análise quantitativa dos filios bacterianos por PCR quantitativo mostrou que os animais $J\alpha 18^{-/-}$ controles possuem aumento significativo de rRNA 16S (Figura 26A) e diminuição significativa de *Firmicutes* quando comparados aos animais selvagens (Figura 26B). Em relação aos outros filios, parece haver aumento de *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* e diminuição de γ -*Proteobacteria* nos animais nocautes (Figura 26C, D e E). Não houve diferença no filo *Fusobacterium* (Figura 26F).

Figura 26 - Presença de filios bacterianos nas fezes em estado basal. DNA genômico das bactérias intestinais foi extraído a partir das fezes e a presença dos filios acima foi analisada por PCR em tempo real. A quantificação relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta CT}$ e normalizada pela presença de bactérias totais (16S rRNA). O grupo WT foi utilizado como referência.

A análise da microbiota também foi feita pelo sequenciamento do DNA das fezes dos animais $J\alpha 18^{-/-}$ e WT controles. Corroborando os resultados anteriores, observamos no sequenciamento um aumento do filo *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* e diminuição de *Firmicutes* e *Proteobacteria* nos animais $J\alpha 18^{-/-}$ (Figura 27A). Nos animais WT também foi verificada maior proporção de bactérias da família *Lactobacillaceae* (Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Lactobacillales*) (Figura 27D).

Figura 27 - Análise do sequenciamento do gene rRNA 16S da microbiota das fezes dos animais selvagens e nocautes. Porcentagem da abundância dos Filos (A), das Classes (B), das Ordens (C) e das Famílias (D). Cada barra representa um pool das fezes de 2 animais. n=6/grupo.

4.3.5 Os animais nocautes para células NKT apresentam redução nos níveis de IgA nas fezes

A diferença na composição da microbiota intestinal dos animais $J\alpha 18^{-/-}$ nos instigou a investigar alguns fatores que interferem na constituição da microbiota.

A imunoglobulina A (IgA) é um fator importante para a manutenção da homeostase intestinal e controle da microbiota. Ela é produzida em grandes quantidades no intestino pelos plasmócitos presentes nos tecidos linfóides associados ao intestino e na lamina própria. No lúmen intestinal, a IgA liga-se a microrganismos e toxinas, neutralizando a ação desses e sendo uma das primeiras linhas de defesa no combate a bactérias patogênicas^{146; 147}.

Nós quantificamos a IgA presente nas fezes dos animais controles WT e nocautes e observamos que os animais nocautes apresentavam níveis significativamente diminuídos de IgA nas fezes (Figura 28A), apesar de não haver diferença nos níveis de IgA no soro (Figura 28B).

A análise por imunohistoquímica também apontou diminuição de células positivas para a marcação de IgA no intestino grosso (Figura 29).

Figura 28 - Dosagem de IgA nas fezes. Quantificação dos níveis de IgA em extrato das fezes dos animais selvagens (WT) e nocautes ($J\alpha 18^{-/-}$) sem colite. n=9-10/grupo. Dado representativo de 3 experimentos independentes. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste t não pareado. ***p<0.001.

Figura 29 - Imunohistoquímica para IgA. Marcação para IgA em cortes de intestino grosso. Imagens representativas de animais controles do grupo selvagem (WT)(A) e Jα18^{-/-}(B). Aumento de 20x. (C) Relação da quantificação das células positivas para IgA pelo número de criptas por campo. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste t não pareado. **p<0.01.

Dado o resultado anterior sobre os níveis de IgA, nós decidimos investigar a população de células B e de plasmócitos no intestino para compreender melhor a redução encontrada. Nós avaliamos a frequência de células B e de plasmócitos na lamina própria do intestino grosso, no intestino delgado, no baço e nas placas de Peyer (Figura 30/Apêndice O). Na análise das células B, nós observamos uma diminuição da frequência dessas células no intestino delgado e um aumento no baço. Apesar de não ter sido observada diferença na frequência de células B no intestino grosso, houve uma diminuição significativa de plasmócitos nessa região. Essa diminuição de plasmócitos também foi significativa na contagem do número absoluto (Figura 31D) e no intestino delgado. Não houve mudança na frequência de plasmócitos no baço nem nas placas de Peyer.

Figura 30 - Frequência de células B e plasmócitos. Análise da frequência de células B (B220⁺CD138⁻) (Painel superior) na lamina propria do intestino grosso IG (A) e do intestino delgado ID (B), no baço (C) e nas Placas de Peyer PP (D). N=5animais/grupo. A frequência se refere à porcentagem de células B220⁺CD138⁻ dentro do gate de células vivas. Análise da frequência de plasmócitos (B220⁻CD138⁺) (Painel inferior) na lamina propria do intestino grosso IG (E) e do intestino delgado ID (F), no baço (G) e nas Placas de Peyer PP (H). N=5animais/grupo. A frequência se refere à porcentagem de células B220⁺CD138⁻ dentro do gate de células vivas. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste t não pareado. *p<0.05. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice O.

Figura 31 - Número de células B e plasmócitos. Análise do número de células B ($B220^+CD138^-$) (Painel superior) na lamina própria do intestino grosso IG (A) e do intestino delgado ID (B) e no baço (C). $n=5$ animais/grupo. Análise do número de plasmócitos ($B220^+CD138^+$) (Painel inferior) na lamina própria do intestino grosso IG (D) e do intestino delgado ID (E) e no baço (F). $n=5$ animais/grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t não pareado. * $p<0.05$. ** $p<0.01$.

Outros fatores podem estar relacionados à redução de IgA nas fezes. A IgA é o anticorpo predominante no intestino, em parte devido à indução seletiva de troca de classe para esse isotipo. Essa indução depende de diversos fatores, mas a produção de citocinas relacionadas com esse processo, como o TGF- β , é fundamental. O TGF- β é produzido por células epiteliais e células dendríticas no intestino e já foi descrito que células NKT também podem produzi-lo^{146; 147}. Dessa forma, torna-se importante avaliar a contribuição do TGF- β para a produção de IgA. Nós dosamos os níveis de TGF- β 1 ativo no extrato do intestino dos animais (Figura 32A). Nós verificamos uma redução significativa nos níveis de TGF- β 1 ativo no intestino grosso dos animais $J\alpha 18^{-/-}$ em relação aos WT e também uma tendência à diminuição dos níveis de expressão gênica desse fator nos animais nocautes (Figura 32B). Os níveis de TGF- β 1 ativo no intestino delgado não apresentaram diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 32C).

Figura 32 - Análise do TGF-β1 no intestino. (A) Quantificação da citocina TGF-β1 ativo no extrato do intestino grosso por ELISA. (B) Expressão gênica relativa de TGF-β1 no intestino grosso (IG). (C) Quantificação da citocina TGF-β1 ativo no extrato do intestino delgado (ID) por ELISA. n=3-7/grupo. Dados expressos em média± desvio padrão. Teste t não pareado. *p<0.05.

Outras células também poderiam influenciar a produção de IgA. As células linfóides inatas (ILC) compreendem um grupo heterogêneo de células derivadas de um precursor linfóide comum, mas que não possuem receptores imunes somaticamente arranjados, como as células B e T. As ILCs foram classificadas, de acordo com suas características fenotípicas e funcionais, em três grupos: ILC1, ILC2 e ILC3. As ILCs do grupo 2 produzem IL-5, IL-13, IL-6, IL-9 e são importantes na resistência do hospedeiro contra nematódeos^{148; 149}. A citocina IL-5 também é um fator importante para a produção de IgA¹⁵⁰. Nós observamos uma diminuição na frequência de células ILC2 no cólon dos animais Jα18^{-/-}. Apesar de não termos verificado diminuição da expressão gênica de IL-5 (Figura 33) no cólon, a redução de ILC2 pode ter relação com a diminuição da IgA.

Figura 33 - Análise da frequência de ILCs na lamina propria intestinal. (A) Análise da porcentagem de ILCs totais (Lin⁻CD90.2⁺). A análise da porcentagem dos subtipos de ILC demonstra o grupo de ILC1 (T-bet⁺) (B), ILC2 (GATA-3⁺) (C) e ILC3 (RORγt⁺) (D). Os valores dos subtipos correspondem à porcentagem de células dentro do gate de células Lin⁻CD90.2⁺; n=7-11 amostras/grupo. Dados expressos em média±desvio padrão. Teste t não pareado. ***p<0.001. A estratégia de gates utilizada está representada no Apêndice P.

Figura 34 - Expressão gênica de IL-5 no cólon. Expressão gênica relativa de IL-5 no intestino grosso. n=4-5/grupo. Dados expressos em média± desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Na primeira parte do nosso trabalho, nós decidimos avaliar as características das células iNKT no intestino. A literatura possui trabalhos que ajudam a evidenciar a importância dessas células no microambiente intestinal. No entanto, ainda há diversas particularidades das células iNKT que ainda não foram descritas no intestino. A classificação dessas células em subtipos é uma delas. Sabe-se que de um modo geral, as células iNKT dos camundongos C57BL/6 são em sua maioria NKT1 na periferia, mas as frequências variam de órgão para órgão ⁵³. Nosso trabalho nos forneceu evidências de que esse é o subtipo mais comum também no intestino. Além disso, nós verificamos que as células iNKT no intestino também respondem ao agonista α GalCer e produzem citocinas, principalmente IFN- γ , o que corrobora com o perfil NKT1, produtor de grandes quantidades de IFN- γ .

Dada a importância da microbiota no perfil de células do sistema imune, nós também investigamos se haveria alteração na frequência dos subtipos e na produção de citocinas nas células iNKT dos animais *germ-free*. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa na frequência de células iNKT nos órgãos analisados (exceto no linfonodo mesentérico), parece haver aumento da frequência dessas células nos animais *germ-free*. O trabalho de Wingender e colaboradores ⁹⁰ já havia mostrado que há expansão das células iNKT no intestino de animais *germ-free*, sendo que no intestino delgado a frequência dessas células passaria de cerca de 1% para 10% na lamina propria. Também foi verificado no trabalho citado, que as células iNKT do baço são hiporresponsivas ao estímulo com α GalCer, resultado que não fomos capazes de reproduzir. No entanto, o tempo pós-estímulo utilizado em nosso trabalho foi diferente. Na tentativa de observarmos uma ativação no intestino, nós injetamos o agonista e aguardamos 3 h, como havíamos testado anteriormente; já o trabalho de Wingender utiliza o tempo de 90 minutos. No baço, a ativação das células iNKT ocorre rapidamente, com grande produção de citocinas já na primeira hora. Porém, no intestino, nós acreditamos que essa ativação seja mais tardia já que esse órgão é menos vascularizado que o baço e que as células estão dispersas na lamina propria. Dessa forma, após 3 h do estímulo *in vivo* com o agonista podemos ter perdido a diferença. Entretanto, nós também não conseguimos verificar diferença na produção de citocinas pelas células iNKT intestinais nos animais *germ-free*.

Dando continuidade à análise das características das células iNKT no intestino, nós investigamos se o subtipo NKT10 poderia ser induzido nesse órgão. Dada a importância da citocina IL-10 para a homeostase intestinal e na proteção contra a inflamação gerada em modelos de colite, nós, primeiramente, caracterizamos a indução desse subtipo no intestino de animais controle. Como parâmetro, a análise da indução de NKT10 no baço nos mostrou resultados semelhantes ao apresentado pelo grupo de Sag⁶⁹. No entanto, no intestino pudemos observar diferença apenas na expressão de PD-1 e de NRP1 no íleo; embora os níveis de IL-10 e dos outros parâmetros analisados pareçam estar aumentados.

Tendo em vista que a indução do subtipo NKT10 é um método que induz a produção de IL-10 por células iNKT e que elas são importantes componentes do sistema imune no intestino, na segunda parte do trabalho nós decidimos avaliar o potencial terapêutico dessa indução em um modelo de colite. Nossos resultados indicaram uma melhora no tamanho do cólon, na inflamação intestinal e no infiltrado de células iNKT e do subtipo NKT17. Apesar de não ter sido possível detectar diferenças significativas na produção de IL-10 no intestino, nós pudemos verificar aumento na produção dessa citocina no baço de animais IL-10GFP nos dia 3 e 7. Mesmo que não tenha sido observado aumento significativo de IL-10 no intestino nos tempos analisados, nós acreditamos que ela esteja sendo produzida nesse local, dado que a expressão de PD-1 estava aumentada. Além disso, não só a produção intestinal mas a produção de IL-10 no baço poderiam contribuir para os efeitos observados.

Na terceira parte do nosso trabalho, nós avaliamos animais nocautes para células iNKT a fim de entender como a ausência dessas células impacta no ambiente intestinal. Nós verificamos que os animais $J\alpha18^{-/-}$ eram mais suscetíveis à colite induzida por DSS, apresentando menor sobrevida, aumento no *score*, diminuição acentuada do tamanho do cólon, aumento de endotoxina no soro e aumento da inflamação. Estudos anteriores já demonstraram que animais $J\alpha18^{-/-}$ e também animais $CD1d^{-/-}$ (que não possuem NKT do tipo I e do tipo II) desenvolvem um quadro de colite mais grave. O grupo de Kim¹⁵¹, evidenciou em animais $J\alpha18^{-/-}$ no modelo de DSS que as células iNKT eram importantes produtoras de IL-9, de maneira dependente de IL-4 e tal produção de IL-9 pelas iNKT era capaz de atenuar a colite ao suprimir IFN- γ e IL-17 e induzir IL-10 e TGF- β . Selvanantham e colaboradores¹⁵² também mostraram que animais $CD1d^{-/-}$ apresentavam maior severidade na colite. No entanto, anteriormente, utilizando o modelo de colite

induzida por oxazolona, que medeia uma resposta de caráter Th2, Heller e colegas¹⁵³ haviam demonstrado que a produção de IL-13 pelas células NKT era prejudicial e que a severidade da doença não era visualizada em animais CD1d^{-/-}.

Apesar de parecerem contraditórios, os estudos demonstram que as células NKT são importantes no sistema imune do microambiente intestinal e que a plasticidade dessas células permitem que elas sejam influenciadas pelo microambiente. Dessa forma, dependendo do perfil do modelo de doença e das outras células envolvidas na resposta, as células NKT podem responder de forma diferente, protegendo ou sendo deletérias. Assim, acreditamos que há mais fatores envolvidos na resposta das células NKT do que os já descritos na literatura.

A análise dos animais nocautes para células iNKT nos forneceu dados interessantes sobre a importância dessas células para a homeostase intestinal. Nós verificamos que os animais nocautes apresentavam uma composição diferenciada da microbiota intestinal quando comparada à dos animais selvagens. Alguns estudos já haviam relacionado a importância da microbiota para o desenvolvimento das células NKT mas pouco ainda havia sido descrito sobre a influência da ausência dessas células na microbiota. Em 2009, um grupo havia analisado que a colonização de bactérias patogênicas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, era maior em animais CD1d^{-/-}¹⁵⁴. E recentemente, foi publicado que animais CD1d^{-/-} também apresentam alterações na microbiota¹⁵².

Em nosso trabalho, verificamos que os animais Jα18^{-/-} tem aumento no número de bactérias, diminuição na proporção de *Firmicutes* e de *γ-Proteobacteria*. Na análise das famílias, os animais nocautes apresentaram redução dos *Lactobacillaceae*. Essa redução pode ser um dos fatores pelo qual esses animais desenvolvem um quadro pior de colite. Os *Lactobacillus* são um grupo de bactérias importantes para a homeostase intestinal e diversos estudos apontam sua importância como probióticos e auxiliares no tratamento das doenças inflamatórias intestinais^{155; 156; 157}. Apesar de não termos realizado o sequenciamento da microbiota após a colite por razões técnicas, o microambiente antes da indução da colite já nos revela dados importantes para antecipar o prognóstico da doença, dando base para possíveis ações preventivas que alterem a composição das bactérias no intestino.

Outro fator que observamos estar alterado nos animais Jα18^{-/-} e que está relacionado com a alteração na microbiota é a quantidade de IgA nas fezes. Os animais nocautes tinham redução nos níveis de IgA nas fezes, mas níveis normais

no soro. Como mencionado anteriormente, a IgA é um fator importante para a manutenção da homeostase intestinal e controle da microbiota, o que corrobora nossos resultados, já que encontramos expansão de bactérias no intestino dos animais nocautes. Trabalhos utilizando animais AID^{-/-} (que não possuem IgA) demonstraram aumento de bactérias anaeróbicas e SFB no intestino delgado^{158; 159}. Além disso, recentemente, um estudo demonstrou que havia diferenças nos níveis de IgA nas fezes de animais WT, e que os animais que apresentavam níveis diminuídos de IgA eram mais suscetíveis à colite do que aqueles com níveis maiores desse anticorpo¹⁶⁰. No trabalho citado, os níveis variáveis de IgA estavam relacionados com alterações na microbiota; tendo sido encontrado nos animais com baixos níveis de IgA, um gênero de bactéria (*Sutterella*) capaz de degradar o componente secretório da IgA e portanto reduzir os níveis dessa imunoglobulina nas fezes. Apesar de não termos encontrado esse gênero na análise do sequenciamento (dado não mostrado), nós acreditamos que a redução dos níveis de IgA se devam à influência de outros fatores, como a diminuição da frequência de plasmócitos no intestino e a produção de TGF- β pelas células iNKT. Nós encontramos redução na frequência de plasmócitos no cólon e no íleo. A relação entre células B e NKT tem sido estudada e sabe-se que células B expressam CD1d. A interação entre essas células pode ser feita de modo direto ou indireto, sendo que ambas induzem respostas humorais primárias, mas apenas a ajuda não-cognata é capaz de induzir memória¹⁶¹. Além disso, o estudo de Velázquez¹⁶² também encontrou diminuição na frequência de células B no intestino delgado de animais nocautes para células NKT, porém não havia sido feito relação entre essa diminuição e os níveis de IgA e/ou alterações na microbiota.

Nosso trabalho ainda analisou um outro grupo de células importantes para o sistema imune no intestino, as ILCs. Nós encontramos uma diminuição na frequência das ILC2 na lamina própria do intestino dos animais J α 18^{-/-}. As ILC2 podem produzir diversas citocinas, entre elas a IL-5, que é importante para a produção de IgA. Ademais, recentemente foi mostrado que as ILC também expressam CD1d e são capazes de ativar as células iNKT¹⁶³. Havia sido demonstrado também que as células NKT podem ser fonte da IL-33 necessária para a produção de IL-5 pelas ILC2 na infecção por *Influenza A*¹⁶⁴.

Com base em nossos resultados, podemos propor que a ausência das células iNKT leve a alterações na microbiota intestinal de diversas maneiras. As células iNKT

poderiam atuar nas células B/Plasmócitos através da secreção de TGF- β ou mesmo pela ligação direta entre o TCR da NKT e o CD1d da célula B. Ou ainda, a relação entre as células iNKT e as ILCs seja importante para a produção de IL-5, que estimula a produção de IgA. A deficiência de IgA, por sua vez, permite a expansão de bactérias no lúmen, mas diminuição de famílias de bactérias importantes como os *Lactobacillus*, o que faz com que os animais nocautes sejam mais suscetíveis à colite.

Figura 35 - Esquema proposto para o papel das células NKT na homeostase intestinal.

Figura 36 - Esquema proposto para ilustrar a piora na colite nos animais nocautes.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os subtipos de células iNKT estão presentes na lamina própria do intestino, com predominância do subtipo NKT1. A indução de colite altera a frequência dos subtipos, com diminuição de NKT2 e aumento de NKT17;
- A indução do subtipo NKT10 durante a colite protegeu o cólon do encurtamento, diminuiu os níveis de IL-6 e TNF- α no intestino e diminuiu a frequência do subtipo NKT17;
- A ausência de células NKT nos animais nocautes influencia na abundância dos filos da microbiota intestinal; e
- Os animais nocautes para NKT tem níveis diminuídos de IgA nas fezes e de TGF- β no intestino, que podem estar relacionados com o pior curso da colite nesses animais.

Juntos, nossos resultados ressaltam a importância das células iNKT para a composição da microbiota, para a homeostase intestinal em um modelo de inflamação intestinal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

- 1 MAKINO, Y. et al. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. **Int Immunol.**, v. 7, n. 7, p. 1157-1161, 1995.
- 2 GODFREY, D. I. et al. NKT cells: what's in a name? **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 231-237, 2004.
- 3 BUDD, R. C. et al. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. **J Exp Med.**, v. 166, n. 2, p. 577-582, 1987.
- 4 FOWLKES, B. J. et al. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. **Nature**, v. 329, n. 6136, p. 251-254, 1987.
- 5 CEREDIG, R.; LYNCH, F.; NEWMAN, P. Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a "mature" subpopulation of Lyt-2- L3T4-mouse thymocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 23, p. 8578-8582, 1987.
- 6 SYKES, M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. **J Immunol.**, v. 145, n. 10, p. 3209-3215, 1990.
- 7 LEVITSKY, H. I.; GOLUMBEK, P. T.; PARDOLL, D. M. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. **J Immunol.**, v. 146, n. 4, p. 1113-1117, 1991.
- 8 OHTEKI, T.; MACDONALD, H. R. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. **J Exp Med.**, v. 180, n. 2, p. 699-704, 1994.
- 9 BIX, M.; COLES, M.; RAULET, D. Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. **J Exp Med.**, v. 178, n. 3, p. 901-908, 1993.
- 10 BENDELAC, A. et al. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. **Science**, v. 263, n. 5154, p. 1774-1778, 1994.
- 11 BENDELAC, A. et al. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. **Science**, v. 268, n. 5212, p. 863-865, 1995.
- 12 IMAI, K. et al. Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor alpha-chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 22, p. 8708-8712, 1986.
- 13 ADACHI, Y. et al. Positive selection of invariant V alpha 14+ T cells by non-major histocompatibility complex-encoded class I-like molecules expressed on bone marrow-derived cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 4, p. 1200-1204, 1995.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 14 KAWANO, T. et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1626-1629, 1997.
- 15 ROARK, J. H. et al. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. **J Immunol.**, v. 160, n. 7, p. 3121-3127, 1998.
- 16 BROSSAY, L. et al. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. **J Immunol.**, v. 159, n. 3, p. 1216-1224, 1997.
- 17 BENDELAC, A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. **J Exp Med.**, v. 182, n. 6, p. 2091-2096, 1995.
- 18 GEISSMANN, F. et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 4, p. e113, 2005.
- 19 ZENG, Z. et al. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 339-345, 1997.
- 20 KOCH, M. et al. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. **Nat Immunol.**, v. 6, n. 8, p. 819-826, 2005.
- 21 VAN KAER, L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, n. 1, p. 31-42, 2005.
- 22 YOSHIMOTO, T.; PAUL, W. E. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. **J Exp Med.**, v. 179, n. 4, p. 1285-1295, 1994.
- 23 TOMURA, M. et al. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. **J Immunol.**, v. 163, n. 1, p. 93-101, 1999.
- 24 KITAMURA, H. et al. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. **J Exp Med.**, v. 189, n. 7, p. 1121-1128, 1999.
- 25 GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. **J Exp Med.**, v. 195, n. 5, p. 617-624, 2002.
- 26 FUJII, S. et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. **J Exp Med.**, v. 198, n. 2, p. 267-279, 2003.
- 27 FUJII, S. et al. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. **J Exp Med.**, v. 199, n. 12, p. 1607-1618, 2004.
- 28 METELITSA, L. S. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. **J Immunol.**, v. 167, n. 6, p. 3114-3122, 2001.

- 29 MATSUDA, J. L. et al. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8395-8400, 2003.
- 30 CARNAUD, C. et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 4647-4650, 1999.
- 31 EBERL, G.; MACDONALD, H. R. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. **Eur J Immunol.**, v. 30, n. 4, p. 985-992, 2000.
- 32 MATSUDA, J. L. et al. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. **Curr Opin Immunol.**, v. 20, n. 3, p. 358-368, 2008.
- 33 GANSERT, J. L. et al. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. **J Immunol.**, v. 170, n. 6, p. 3154-3161, 2003.
- 34 KRONENBERG, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. **Annu Rev Immunol.**, v. 23, p. 877-900, 2005.
- 35 BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The biology of NKT cells. **Annu Rev Immunol.**, v. 25, p. 297-336, 2007.
- 36 TANIGUCHI, M. et al. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. **Annu Rev Immunol.**, v. 21, p. 483-513, 2003.
- 37 TUPIN, E. et al. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. **J Exp Med.**, v. 199, n. 3, p. 417-422, 2004.
- 38 CHIU, Y. H. et al. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. **J Exp Med.**, v. 189, n. 1, p. 103-110, 1999.
- 39 ARRENERG, P.; HALDER, R.; KUMAR, V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. **J Cell Physiol.**, v. 218, n. 2, p. 246-250, 2009.
- 40 WANG, L. et al. Induction of alpha-catenin, integrin alpha3, integrin beta6, and PDGF-B by 2,8-dihydroxyadenine crystals in cultured kidney epithelial cells. **Exp Nephrol.**, v. 10, n. 5-6, p. 365-373, 2002.
- 41 GODFREY, D. I.; KRONENBERG, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. **J Clin Invest.**, v. 114, n. 10, p. 1379-1388, 2004.
- 42 LEE, H. et al. The presence of CD8+ invariant NKT cells in mice. **Exp Mol Med.**, v. 41, n. 12, p. 866-872, 2009.
- 43 GUMPERZ, J. E. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **J Exp Med.**, v. 195, n. 5, p. 625-636, 2002.
- 44 LEE, P. T. et al. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. **J Exp Med.**, v. 195, n. 5, p. 637-641, 2002.
- 45 KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nat Rev Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 557-568, 2002.

- 46 JAHNG, A. et al. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. **J Exp Med.**, v. 199, n. 7, p. 947-957, 2004.
- 47 CHANG, D. H. et al. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. **Blood.**, v. 112, n. 4, p. 1308-1316, 2008.
- 48 VAN RHIJN, I. et al. CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 37, p. 13578-13583, 2004.
- 49 PARK, S. H. et al. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. **J Exp Med.**, v. 193, n. 8, p. 893-904, 2001.
- 50 AMBROSINO, E. et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. **J Immunol.**, v. 179, n. 8, p. 5126-5136, 2007.
- 51 HALDER, R. C. et al. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. **J Clin Invest.**, v. 117, n. 8, p. 2302-2312, 2007.
- 52 TERABE, M. et al. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. **J Exp Med.**, v. 202, n. 12, p. 1627-1633, 2005.
- 53 LEE, Y. J. et al. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. **Nat Immunol.**, v. 14, n. 11, p. 1146-1154, 2013.
- 54 TOWNSEND, M. J. et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 477-494, 2004.
- 55 MATSUDA, J. L. et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. **Nat Immunol.**, v. 3, n. 10, p. 966-974, 2002.
- 56 D'CRUZ, L. M. et al. E and Id proteins influence invariant NKT cell sublineage differentiation and proliferation. **J Immunol.**, v. 192, n. 5, p. 2227-2236, 2014.
- 57 WATARAI, H. et al. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. **PLoS Biol.**, v. 10, n. 2, p. e1001255, 2012.
- 58 TERASHIMA, A. et al. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. **J Exp Med.**, v. 205, n. 12, p. 2727-2733, 2008.
- 59 BRENNAN, P. J.; BRIGL, M.; BRENNER, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 101-117, 2013.
- 60 CONSTANTINIDES, M. G.; BENDELAC, A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. **Curr Opin Immunol.**, v. 25, n. 2, p. 161-167, 2013.
- 61 KIM, P. J. et al. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. **J Immunol.**, v. 177, n. 10, p. 6650-6659, 2006.

- 62 MICHEL, M. L. et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **J Exp Med.**, v. 204, n. 5, p. 995-1001, 2007.
- 63 MILPIED, P. et al. IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression. **Blood**, v. 118, n. 11, p. 2993-3002, 2011.
- 64 RACHITSKAYA, A. V. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. **J Immunol.**, v. 180, n. 8, p. 5167-5171, 2008.
- 65 DOISNE, J. M. et al. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t⁺ and respond preferentially under inflammatory conditions. **J Immunol.**, v. 183, n. 3, p. 2142-2149, 2009.
- 66 YOSHIGA, Y. et al. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. **Int J Mol Med.**, v. 22, n. 3, p. 369-374, 2008.
- 67 DOISNE, J. M. et al. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. **J Immunol.**, v. 186, n. 2, p. 662-666, 2011.
- 68 KINJO, Y. et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. **Nat Immunol.**, v. 12, n. 10, p. 966-974, 2011.
- 69 SAG, D. et al. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. **J Clin Invest.**, v. 124, n. 9, p. 3725-3740, 2014.
- 70 PAREKH, V. V. et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 9, p. 2572-2583, 2005.
- 71 BARRAL, P. et al. B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 24, p. 8345-8350, 2008.
- 72 LEADBETTER, E. A. et al. NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 24, p. 8339-8344, 2008.
- 73 TONTI, E. et al. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. **Blood**, v. 113, n. 2, p. 370-376, 2009.
- 74 CHANG, P. P. et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. **Nat Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 35-43, 2012.
- 75 KING, I. L. et al. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. **Nat Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 44-50, 2012.
- 76 LEHUEN, A.; FAZILLEAU, N. Innate iNKT cell help to B cells: fast but does not last. **Nat Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 11-13, 2012.
- 77 BUECHEL, H. M.; STRADNER, M. H.; D'CRUZ, L. M. Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 204-209, 2015.

- 78 AKBARI, O. et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. **Nat Med.**, v. 9, n. 5, p. 582-588, 2003.
- 79 KIM, E. Y. et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. **Nat Med.**, v. 14, n. 6, p. 633-640, 2008.
- 80 HONG, S. et al. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. **Nat Med.**, v. 7, n. 9, p. 1052-1056, 2001.
- 81 SHARIF, S. et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. **Nat Med.**, v. 7, n. 9, p. 1057-1062, 2001.
- 82 JOHNSTON, B. et al. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. **J Immunol.**, v. 171, n. 6, p. 2960-2969, 2003.
- 83 THOMAS, S. Y. et al. PLZF induces an intravascular surveillance program mediated by long-lived LFA-1-ICAM-1 interactions. **J Exp Med.**, v. 208, n. 6, p. 1179-1188, 2011.
- 84 OHTEKI, T. et al. Cutting edge: LFA-1 is required for liver NK1.1+TCR alpha beta+ cell development: evidence that liver NK1.1+TCR alpha beta+ cells originate from multiple pathways. **J Immunol.**, v. 162, n. 7, p. 3753-3756, 1999.
- 85 LYNCH, L. et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. **Nat Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 85-95, 2015.
- 86 MIDDENDORP, S.; NIEUWENHUIS, E. E. NKT cells in mucosal immunity. **Mucosal Immunol.**, v. 2, n. 5, p. 393-402, 2009.
- 87 FUSS, I. J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **J Clin Invest.**, v. 113, n. 10, p. 1490-1497, 2004.
- 88 SAUBERMANN, L. J. et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 119-128, 2000.
- 89 LIAO, C. M. et al. dysregulation of CD1d-restricted type ii natural killer T cells leads to spontaneous development of colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, p. 326-334 e321-322, 2012.
- 90 WINGENDER, G. et al. Intestinal microbes affect phenotypes and functions of invariant natural killer T cells in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 2, p. 418-428, 2012.
- 91 OLSZAK, T. et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 489-493, 2012.

- 92 AN, D. et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 123-133, 2014.
- 93 WIELAND BROWN, L. C. et al. Production of alpha-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. **PLoS Biol.**, v. 11, n. 7, p. e1001610, 2013.
- 94 DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **N Engl J Med.**, v. 365, n. 18, p. 1713-1725, 2011.
- 95 DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun Rev.**, v. 3, n. 5, p. 394-400, 2004.
- 96 PHILIPPE, D. et al. Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. **World J Gastroenterol.**, v. 17, n. 4, p. 459-469, 2011.
- 97 WILKS. Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. **Med Times Gazette**, v. 2, p. 264-265, 1859.
- 98 SOLBERG, I. C. et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). **Scand J Gastroenterol.**, v. 44, n. 4, p. 431-440, 2009.
- 99 STANGE, E. F. et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. **J Crohns Colitis**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2008.
- 100 LODDENKEMPER, C. Diagnostic standards in the pathology of inflammatory bowel disease. **Dig Dis.**, v. 27, n. 4, p. 576-583, 2009.
- 101 NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 133, n. 5, p. 1670-1689, 2007.
- 102 TAKAHASHI, F.; DAS, K. M. Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. **J Clin Invest.**, v. 76, n. 1, p. 311-318, 1985.
- 103 HELLER, F. et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 550-564, 2005.
- 104 ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nat Rev Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 131-144, 2010.
- 105 ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.
- 106 QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.
- 107 LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 31, p. 11070-11075, 2005.

- 108 LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006.
- 109 MANICHANH, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 205-211, 2006.
- 110 ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.
- 111 KOENIG, J. E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108 Suppl 1, p. 4578-4585, 2011.
- 112 ELINAV, E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 745-757, 2011.
- 113 GORDON, J. I. Honor thy gut symbionts redux. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1251-1253, 2012.
- 114 DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010.
- 115 RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108 Suppl 1, p. 4680-4687, 2010.
- 116 MURGAS TORRAZZA, R.; NEU, J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. **J Perinatol.**, v. 31 Suppl 1, p. S29-34, 2011.
- 117 NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 2012.
- 118 KELLY, D.; DELDAY, M. I.; MULDER, I. Microbes and microbial effector molecules in treatment of inflammatory disorders. **Immunol Rev.**, v. 245, n. 1, p. 27-44, 2012.
- 119 WALTER, J.; LEY, R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. **Annu Rev Microbiol.**, v. 65, p. 411-429, 2011.
- 120 ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.
- 121 SANDERS, M. E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. **J Clin Gastroenterol.**, v. 45 Suppl, p. S115-119, 2011.
- 122 BLUMBERG, R. S.; SAUBERMANN, L. J.; STROBER, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr Opin Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 648-656, 1999.
- 123 LINSKENS, R. K. et al. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, n. 234, p. 29-40, 2001.
- 124 STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu Rev Immunol.**, v. 20, p. 495-549, 2002.

- 125 BAMIAS, G. et al. Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. **J Immunol.**, v. 169, n. 9, p. 5308-5314, 2002.
- 126 KENNEDY, R. J.; KIRK, S. J.; GARDINER, K. R. Promotion of a favorable gut flora in inflammatory bowel disease. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 24, n. 3, p. 189-195, 2000.
- 127 GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677-689, 2009.
- 128 JARCHUM, I.; PAMER, E. G. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. **Curr Opin Immunol.**, v. 23, n. 3, p. 353-360, 2011.
- 129 GEUKING, M. B. et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 794-806, 2011.
- 130 IVANOV, II et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-498, 2009.
- 131 ATARASHI, K.; TANOUE, T.; HONDA, K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 8036-8038, 2010.
- 132 ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12204-12209, 2010.
- 133 KINJO, Y. et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 520-525, 2005.
- 134 MATTNER, J. et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 525-529, 2005.
- 135 CUI, J. et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1623-1626, 1997.
- 136 MAXWELL, J. R. et al. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. **Curr Protoc Pharmacol.**, v. Chapter 5, p. Unit5 58, 2009.
- 137 OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.
- 138 PORITZ, L. S. et al. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. **J Surg Res.**, v. 140, n. 1, p. 12-19, 2007.
- 139 YAN, Y. et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e6073, 2009.
- 140 DIELEMAN, L. A. et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1643-1652, 1994.

- 141 ZAKOSTELSKA, Z. 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**, v. 6, n. 11, p. e27961, 2011.
- 142 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- 143 BROWN, E. M. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nat Commun.**, v. 6, p. 7806, 2015.
- 144 KUHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.
- 145 OLSZAK, T. et al. Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 497-502, 2014.
- 146 ABBAS, A. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 536p.
- 147 MANTIS, N. J.; ROL, N.; CORTHESEY, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. **Mucosal Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 603-611, 2011.
- 148 WILHELM, C. et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. **Nat Immunol.**, v. 12, n. 11, p. 1071-1077, 2011.
- 149 FALLON, P. G. et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. **J Exp Med.**, v. 203, n. 4, p. 1105-1116, 2006.
- 150 HARRIMAN, G. R. et al. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. **J Immunol.**, v. 140, n. 9, p. 3033-3039, 1988.
- 151 KIM, H. S.; CHUNG, D. H. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. **Mucosal Immunol.**, v. 6, n. 2, p. 347-357, 2013.
- 152 SELVANANTHAM, T. et al. NKT Cell-Deficient Mice Harbor an Altered Microbiota That Fuels Intestinal Inflammation during Chemically Induced Colitis. **J Immunol.**, v. 197, n. 11, p. 4464-4472, 2016.
- 153 HELLER, F. et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 629-638, 2002.
- 154 NIEUWENHUIS, E. E. et al. Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. **J Clin Invest.**, v. 119, n. 5, p. 1241-1250, 2009.
- 155 MADSEN, K. et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 580-591, 2001.
- 156 MADSEN, K. L. et al. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. **Gastroenterology**, v. 116, n. 5, p. 1107-1114, 1999.

- 157 SCHULTZ, M. et al. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 8, n. 2, p. 71-80, 2002.
- 158 FAGARASAN, S. et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. **Science**, v. 298, n. 5597, p. 1424-1427, 2002.
- 159 SUZUKI, K. et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 1981-1986, 2004.
- 160 MOON, C. et al. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 90-U209, 2015.
- 161 VOMHOF-DEKREY, E. E. et al. Cognate interaction with iNKT cells expands IL-10-producing B regulatory cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 40, p. 12474-12479, 2015.
- 162 VELAZQUEZ, P. et al. Villous B cells of the small intestine are specialized for invariant NK T cell dependence. **J Immunol.**, v. 180, n. 7, p. 4629-4638, 2008.
- 163 SAEZ DE GUINOA, J. et al. CD1d-mediated activation of group 3 innate lymphoid cells drives IL-22 production. **EMBO Rep.**, v. 18, n. 1, p. 39-47, 2017.
- 164 GORSKI, S. A.; HAHN, Y. S.; BRACIALE, T. J. Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 9, p. e1003615, 2013.

APÊNDICES

A - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino

Apêndice A – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino. As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+ \text{CD1d}\alpha\text{GC}^+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células iNKT T-bet^+ , as NKT2, como $\text{PLZF}^{\text{high}} \text{CD4}^+$ e as NKT17, como as $\text{T-bet}^+ \text{PLZF}^{\text{low}} \text{CD4}^+$.

B - Imagem representativa dos histogramas da produção de citocinas e marcadores de ativação das células NKT intestinais

Apêndice B - Imagem representativa dos histogramas da produção de citocinas e marcadores de ativação das células NKT intestinais. Do alto da esquerda para baixo e direita: IFN- γ , IL-4, GM-CSF, TNF- α , IL-13, CD154 (CD40L), CD69 e CD25. As linhas escuras representam animais controles (não ativados) e as linhas rosas mais claras, os animais injetados com 1 μ g de α GalCer 3 h antes da eutanásia.

C - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no baço dos animais GF e SPF

Apêndice C - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no baço dos animais GF e SPF. As células iNKT foram definidas como as células TCRβ⁺CD1dαGC⁺, entre os linfócitos vivos CD45⁺. As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células iNKT T-bet⁺RORγt⁻, as NKT2, como PLZF^{high}CD4⁺ e as NKT17, como as RORγt⁺PLZF^{int}CD4⁻.

D - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no linfonodo mesentérico dos animais GF e SPF

Apêndice D - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no linfonodo mesentérico dos animais GF e SPF. As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d}^{\text{aGC}}+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células $\text{iNKT T-bet}^+\text{ROR}\gamma^+$, as NKT2, como $\text{PLZF}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ e as NKT17, como as $\text{ROR}\gamma^+\text{PLZF}^{\text{int}}\text{CD4}^-$.

E - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino delgado dos animais GF e SPF

Apêndice E – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino delgado dos animais GF e SPF. As células iNKT foram definidas como as células TCRβ⁺CD1dαGC⁺, entre os linfócitos vivos CD45⁺. As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células iNKT T-bet⁺RORγt⁺, as NKT2, como PLZF^{high}CD4⁺ e as NKT17, como as RORγt⁺PLZF^{int}CD4⁺.

F - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino grosso dos animais GF e SPF

Apêndice F – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino grosso dos animais GF e SPF. As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d}\alpha\text{GC}^+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células iNKT $\text{T-bet}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$, as NKT2, como $\text{PLZF}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ e as NKT17, como as $\text{ROR}\gamma\text{t}^+\text{PLZF}^{\text{int}}\text{CD4}^+$.

G - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no baço dos animais

Apêndice G – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no baço dos animais. No painel superior estão as imagens que representam as frequências das células após indução do subtipo. As células iNKT foram definidas como as células TCRβ⁺CD1dαGC⁺, entre os linfócitos vivos CD45⁺. Dentre essas células, caracterizamos a expressão dos seguintes marcadores (histogramas da esquerda superior para direita e inferior): IL-10, PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1, CD69, IFN-γ. As linhas pretas sem preenchimento representam animais controles, as linhas azuis, animais injetados com 1μg de αGalCer 3 h antes da eutanásia (WT+αGC) e as linhas cinzas preenchidas, os animais induzidos para o subtipo NKT10 (WT/αGC+αGC) (ver figura 3).

H - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino delgado dos animais

Apêndice H – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino delgado dos animais. No painel superior estão as imagens que representam as frequências das células após indução do subtipo. As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d}\alpha\text{GC}^+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . Dentre essa células, caracterizamos a expressão dos seguintes marcadores (histogramas da esquerda superior para direita e inferior): IL-10, PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1, CD69, IFN- γ . As linhas pretas sem preenchimento representam animais controles, as linhas azuis, animais injetados com 1 μg de αGalCer 3 h antes da eutanásia (WT+ αGC) e as linhas cinzas preenchidas, os animais induzidos para o subtipo NKT10 (WT/ αGC + αGC) (ver figura 3).

I - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino grosso dos animais

Apêndice I – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização do subtipo NKT10 no intestino grosso dos animais. No painel superior estão as imagens que representam as frequências das células após indução do subtipo. As células iNKT foram definidas como as células $TCR\beta^+CD1d\alpha GC^+$, entre os linfócitos vivos $CD45^+$. Dentre essa células, caracterizamos a expressão dos seguintes marcadores (histogramas da esquerda superior para direita e inferior): IL-10, PD-1, FR-4, ICOS, Slamf6, NRP1, CD69, IFN- γ . As linhas pretas sem preenchimento representam animais controles, as linhas azuis, animais injetados com 1 μ g de α GalCer 3 h antes da eutanásia (WT+ α GC) e as linhas cinzas preenchidas, os animais induzidos para o subtipo NKT10 (WT/ α GC+ α GC) (ver figura 3).

J - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite

Apêndice J – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para caracterização dos subtipos de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite. As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d}\alpha\text{GC}^+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . As NKT1 foram caracterizadas como sendo as células iNKT T-bet^+ , as NKT2, como $\text{PLZF}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ e as NKT17, como as $\text{T-bet}^-\text{PLZF}^{\text{low}}\text{CD4}^+$. A expressão de PD-1 também foi verificada.

K - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite

Apêndice K – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite. As células iNKT foram definidas como as células TCR β ⁺CD1d α GC⁺, entre os linfócitos vivos CD45⁺. Os histogramas representativos da expressão de PD-1 e produção de IL-10 estão no painel inferior.

L - Estratégia de gates utilizada para caracterizar células dendríticas e macrófagos

Apêndice L – Estratégia de gates utilizada para caracterizar células dendríticas (painel superior) e macrófagos (painel inferior) na lamina propria intestinal de animais com colite e induzidos para NKT10. As células dendríticas foram definidas como $CD11c^{+}I\alpha^{E++}$ e os macrófagos como $CD11b^{+}CD11c^{-}$.

M - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite (dia 3)

Apêndice M – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no intestino após indução de NKT10 e colite (dia 3). As células iNKT foram definidas como as células TCR β ⁺CD1d α GC⁺, entre os linfócitos vivos CD45⁺. Os histogramas representativos da expressão de PD-1 e produção de IL-10 estão no painel inferior.

N - Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite (dia 3)

Apêndice N – Imagem representativa da estratégia de gates utilizada para frequência de células iNKT no baço após indução de NKT10 e colite (dia 3). As células iNKT foram definidas como as células $\text{TCR}\beta^+\text{CD1d}\alpha\text{GC}^+$, entre os linfócitos vivos CD45^+ . Os histogramas representativos da expressão de PD-1 e produção de IL-10 estão no painel inferior.

O - Estratégia de gates utilizada para caracterizar a frequência de células B e plasmócitos

Apêndice O – Estratégia de gates utilizada para caracterizar a frequência de células B e plasmócitos no cólon, íleo, baço e placas de Peyer nos animais WT (painel superior) e Jα18^{-/-} (painel inferior). As células B foram definidas pela marcação B220⁺CD138⁻, dentre os linfócitos vivos. Os plasmócitos foram caracterizados como B220⁻CD138⁺.

P - Estratégia de gates utilizada para caracterizar as células ILC no intestino dos animais WT e $J\alpha 18^{-/-}$

Apêndice P – Estratégia de gates utilizada para caracterizar as células ILC no intestino dos animais WT (painel superior) e $J\alpha 18^{-/-}$ (painel inferior). As células ILC foram definidas como $CD90.2^{+}Lin^{-}$. Dentro dessa população, os subtipos foram caracterizados como ILC1 ($T-bet^{+}$, $GATA-3^{-}$, $ROR\gamma t^{-}$), ILC2 ($GATA-3^{+}$) e ILC3 ($ROR\gamma t^{+}$).

ANEXOS

A – Manuscritos publicados nesse período

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Protein and Peptide Science, 2015, 16, 000-000

1

They Must Hold Tight: Junction Proteins, Microbiota And Immunity In Intestinal Mucosa

Angela Castoldi^{1,†}, Cristhiane Favero de Aguiar^{1,‡}, Pedro Manoel Moraes-Vieira^{2,*} and Niels Olsen Saraiva Câmara^{1,3,*}

¹Department of Immunology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ²Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, United States; ³Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

N.O.S. Câmara

Abstract: Homeostasis of the immune system depends on several factors. The gastrointestinal tract plays an important role in maintaining our immune system. With this aim, the intestinal immune system interacts with epithelial barrier molecules, especially tight junction proteins, that are key molecules involved in controlling paracellular permeability to increase the protection barrier against external antigens or possibly to respond to commensal microorganisms. During intestinal inflammatory diseases, the expression of innate immune receptors in intestinal epithelial cells and infiltration of immune cells are related, but it is still unclear how the immune system induces modulation of paracellular permeability. In this review, we provide an overview of the understanding of how the immune system modulates the expression of tight junctions to maintain the mucosal immune system.

Keywords: Gut microbiota, immune system, intestinal epithelium, intestinal permeability, tight junctions.

1. INTRODUCTION

Maintenance of intestinal homeostasis depends on several factors, including physical barriers - such as the mucus layer, epithelial cells, and intercellular tight-junction proteins (TJs) [1]; chemical barriers, which include antimicrobial peptides; and immune barriers composed of secretory IgA and various immune cells [2]. In the case of an imbalance in this microenvironment or when a barrier failure occurs, translocation of bacteria or bacterial products into the gut will activate immune cells and trigger an inflammatory response.

The TJs are the most important component of the physical paracellular barrier, which is responsible for maintenance of the sterile environment [3]. Together, these factors form complex protein systems organized by the TJs and adherent junction proteins. These proteins include occludins, claudins, zonula occludens (ZO-1), junctional adhesion molecule (JAM), and the adherent junctional protein E-cadherin, which binds to the actin cytoskeleton [4]. These intestinal

structures are responsible for supporting paracellular transport of water, ions, and nutrients, while providing a barrier to prevent microbial translocation [5].

In Inflammatory Bowel Disease (IBD), there is a decreased expression and distribution of TJs due to increased expression of several pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) [6]. Moreover, the gut microbiota also has an important role in the regulation of TJs and mucosal barrier integrity [7]. Enteric pathogens are able to alter the barrier function by increasing intestinal permeability by inducing pro-inflammatory cytokines and immune cell infiltration [8]. In contrast, commensal microbiota can protect the integrity of TJs [9] (Fig. 1).

The innate and adaptive immune systems are involved in the maintenance of homeostasis in the gut microenvironment. The secretion of cytokines in response to microbiota or another stimulus starts a cascade of events that culminates in activation of several types of immune cells, including lymphocytes, dendritic cells and macrophages that are close to the mucosal surface. In this environment, the epithelium has an important role as a communicator between the gut microbiota and these immune cells [10]. This connection acts to protect the host from several diseases and to maintain tolerance against self-antigens.

Here, we review the importance of interactions between immune cells, epithelial cells, microbiota and tight junctions for intestinal immune system homeostasis in health and disease.

*Address correspondence to these authors at the Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo. Avenida Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brazil; Tel: ????????????; Fax: ????????????; E-mail: niels@icb.usp.br and Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, 3 Blackfan Circle, room 724, Boston, MA, USA, 02205; Tel: ????????????; Fax: ????????????; E-mail: pvieira@bidmc.harvard.edu.

[†]Angela Castoldi and Cristhiane Favero de Aguiar contributed equally in the writing of this manuscript.

Administration of α -Galactosylceramide Improves Adenine-Induced Renal Injury

Cristhiane Favero Aguiar,^{1,2} Cristiane Naffah-de-Souza,² Angela Castoldi,² Matheus Corrêa-Costa,² Tárzio T Braga,² Érika L Naka,¹ Mariane T Amano,² Débora T R S Abate,² Meire I Hiyane,² Marcos A Cenedeze,¹ Alvaro Pacheco e Silva Filho,^{1,3} and Niels O S Câmara^{1,2}

¹Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Nephrology Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and ³Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Renal Transplantation Unit, Albert Einstein Hospital, São Paulo, Brazil

Natural killer T (NKT) cells are a subset of lymphocytes that reacts to glycolipids presented by CD1d. Invariant NKT cells (iNKT) correspond to >90% of the total population of NKTs and reacts to α -galactosylceramide (α GalCer). α GalCer promotes a complex mixture of Th1 and Th2 cytokines, as interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-4. NKT cells and IFN- γ are known to participate in some models of renal diseases, but further studies are still necessary to elucidate their mechanisms. The aim of our study was to analyze the participation of iNKT cells in an experimental model of tubule-interstitial nephritis. We used 8-wk-old C57BL/6j, J α 18KO and IFN- γ KO mice. They were fed a 0.25% adenine diet for 10 d. Both adenine-fed wild-type (WT) and J α 18KO mice exhibited renal dysfunction, but adenine-fed J α 18KO mice presented higher expression of kidney injury molecule-1 (KIM-1), tumor necrosis factor (TNF)- α and type I collagen. To analyze the role of activated iNKT cells in our model, we administered α GalCer in WT mice during adenine ingestion. After α GalCer injection, we observed a significant reduction in serum creatinine, proinflammatory cytokines and renal fibrosis. However, this improvement in renal function was not observed in IFN- γ KO mice after α GalCer treatment and adenine feeding, illustrating that this cytokine plays a role in our model. Our findings may suggest that IFN- γ production is one of the factors contributing to improved renal function after α GalCer administration.

Online address: <http://www.molmed.org>
doi: 10.2119/molmed.2014.00090

INTRODUCTION

Chronic kidney diseases (CKDs) are progressive scarring conditions characterized by a decrease in renal function over time affecting millions of people worldwide. A common final pathway of CKD is tubule-interstitial fibrosis, caused by excessive extracellular matrix deposition after chronic insults (1,2).

Independently of which renal compartment is affected, an inflammatory process is usually present in kidney diseases, and such a process can be resumed

in some steps. First, a physical or chemical injury (for example, hypertension, drugs and obstruction) may cause a release of inflammatory mediators, which recruit inflammatory cells to the site. Such an inflammatory process affects tubular cells and may lead to apoptosis, necrosis or activation of interstitial fibroblasts, which produce collagens leading to a fibrotic scar (3–5).

In 1985, Yokozawa *et al.* (6) demonstrated that an excessive intake of adenine would lead to renal injury. Adenine

is produced endogenously but its long-term ingestion results in 2,8-dihydroxyadenine precipitation inside the renal tubules, leading to the formation of kidney stones, with extensive tubular dilation, inflammation, necrosis and fibrosis. The inflammatory process in this model is known to comprise the activation of toll-like receptors, inflammasome and nuclear factor (NF)- κ B (2,7–9).

Furthermore, the involvement of immune cells is also a central step in the development of renal diseases. Various cell types infiltrate the kidney during the inflammatory process, for example, neutrophils, macrophages, T cells and others. A distinct subtype of T cells, called natural killer T (NKT) cells, might also be present in some kidney diseases.

NKT cells constitute a distinct population of lymphocytes found at low frequency (<1% in the peripheral blood of mice and humans) and characterized by

Address correspondence to Niels O S Câmara, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP Brazil. Phone: +55-11-30917388; Fax: +55-11-30917224; E-mail: niels@icb.usp.br.

Submitted April 28, 2014; Accepted for publication June 12, 2015; Published Online (www.molmed.org) June 18, 2015.

The Feinstein Institute
for Medical Research
Empowering Imagination. Pioneering Discovery.®

Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion

Vinicius Andrade-Oliveira,* Mariane T. Amano,* Matheus Correa-Costa,* Angela Castoldi,* Raphael J.F. Felizardo,[†] Danilo C. de Almeida,[†] Enio J. Bassi,* Pedro M. Moraes-Vieira,* Meire I. Hiyane,* Andrea C.D. Rodas,* Jean P.S. Peron,[‡] Cristhiane F. Aguiar,* Marlene A. Reis,[§] Willian R. Ribeiro,^{||} Claudete J. Valduga,^{||} Rui Curi,^{||} Marco Aurelio Ramirez Vinolo,** Caroline M. Ferreira,^{||} and Niels Olsen Saraiva Câmara*[†]

*Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [†]Nephrology Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [‡]Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [§]Division of Pathology, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil; ^{||}Department of Pharmacy and Biotechnology, Universidade Anhanguera de São Paulo UNIAN-SP, São Paulo, Brazil; ^{||}Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and **Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Short-chain fatty acids (SCFAs) are fermentation end products produced by the intestinal microbiota and have anti-inflammatory and histone deacetylase-inhibiting properties. Recently, a dual relationship between the intestine and kidneys has been unraveled. Therefore, we evaluated the role of SCFA in an AKI model in which the inflammatory process has a detrimental role. We observed that therapy with the three main SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) improved renal dysfunction caused by injury. This protection was associated with low levels of local and systemic inflammation, oxidative cellular stress, cell infiltration/activation, and apoptosis. However, it was also associated with an increase in autophagy. Moreover, SCFAs inhibited histone deacetylase activity and modulated the expression levels of enzymes involved in chromatin modification. *In vitro* analyses showed that SCFAs modulated the inflammatory process, decreasing the maturation of dendritic cells and inhibiting the capacity of these cells to induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation. Furthermore, SCFAs ameliorated the effects of hypoxia in kidney epithelial cells by improving mitochondrial biogenesis. Notably, mice treated with acetate-producing bacteria also had better outcomes after AKI. Thus, we demonstrate that SCFAs improve organ function and viability after an injury through modulation of the inflammatory process, most likely via epigenetic modification.

J Am Soc Nephrol 26: ●●●-●●●, 2015. doi: 10.1681/ASN.2014030288

AKI is an inflammatory process frequently observed in hospitalized patients. AKI is associated with the development of CKD and causes distress to the patient.^{1,2} AKI induced by ischemia and reperfusion injury (IRI) is closely linked to the activation of tubular epithelial and endothelial cells by endogenous danger signals released after cell stress and death due to enhanced production of reactive oxygen species (ROS), among other inducers.³ Additionally, IRI involves the migration and activation of innate and adaptive immune cells into the kidneys.

Increased ROS production disrupts the ratio of oxidant/antioxidant enzymes, leading to mitochondrial-mediated apoptotic cell death. Activation of endothelial

Received March 19, 2014. Accepted October 2, 2014.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Cid. Universitária, São Paulo 05508-000, Brazil. Email: niels@icb.usp.br

Copyright © 2015 by the American Society of Nephrology

Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis

Matheus Correa-Costa¹, Vinicius Andrade-Oliveira¹, Tarcio T Braga¹, Angela Castoldi¹, Cristhiane F Aguiar¹, Clarice ST Origassa², Andrea CD Rodas¹, Meire I Hiyane¹, Denise MAC Malheiros³, Francisco JO Rios^{1,4}, Sonia Jancar¹ and Niels OS Câmara^{1,2}

Platelet-activating factor (PAF) is a lipid mediator with important pro-inflammatory effects, being synthesized by several cell types including kidney cells. Although there is evidence of its involvement in acute renal dysfunction, its role in progressive kidney injury is not completely known. In the present study, we investigated the role of PAF receptor (PAFR) in an experimental model of chronic renal disease. Wild-type (WT) and PAFR knockout (KO) mice underwent unilateral ureter obstruction (UUO), and at kill time, urine and kidney tissue was collected. PAFR KO animals compared with WT mice present: (a) less renal dysfunction, evaluated by urine protein/creatinine ratio; (b) less fibrosis evaluated by collagen deposition, type I collagen, Lysyl Oxidase-1 (LOX-1) and transforming growth factor β (TGF- β) gene expression, and higher expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) (3.3-fold lower TGF- β /BMP-7 ratio); (c) downregulation of extracellular matrix (ECM) and adhesion molecule-related machinery genes; and (d) lower levels of pro-inflammatory cytokines. These indicate that PAFR engagement by PAF or PAF-like molecules generated during UUO potentiates renal dysfunction and fibrosis and might promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Also, early blockade of PAFR after UUO leads to a protective effect, with less fibrosis deposition. In conclusion, PAFR signaling contributes to a pro-inflammatory environment in the model of obstructive nephropathy, favoring the fibrotic process, which lately will generate renal dysfunction and progressive organ failure.

Laboratory Investigation (2014) **94**, 455–466; doi:10.1038/labinvest.2013.155; published online 3 February 2014

KEYWORDS: chronic kidney disease; platelet activating factor receptor; renal fibrosis; renal inflammation

Renal fibrosis is considered as the hallmark of chronic kidney disease (CKD), and epidemiological studies have shown that the prevalence of patients with progressive renal failure is increasing worldwide. As a consequence, CKD has become not only a global health issue, but also an economic problem, affecting individuals, families and societies.^{1–5} Under normal conditions, the renal interstitial space is formed of few cells (fibroblasts and resident immune cells) and peritubular capillaries. These structures are incorporated in the extracellular matrix (ECM), and the production of its components is well controlled to keep tissue homeostasis. In a fibrotic situation, the interstitial space is filled with numerous cells (fibroblasts, myofibroblasts, infiltrating immune cells and atrophic tubular cells), there is rarefaction of peritubular

capillaries and concomitant excessive production of ECM proteins.⁶

A suggested mechanism that contributes to the fibrotic process is the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), in which epithelial cells undergo differentiation and start to express mesenchymal markers, changing their phenotype and producing ECM compounds.⁷ In this sense, fibroblast-specific protein 1 (FSP-1), a filament-associated molecule, present in fibroblast, but not in epithelium, mesangial cells or embryonic endoderm, can be used as a marker of EMT.⁸ Such process has been described in a variety of different tissues, such as kidney, liver, lung, colon and heart, although the molecular mechanisms involved are not yet completely understood.^{3,9–13}

¹Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Nephrology Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Pathology Department, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁴British Heart Foundation, Glasgow Cardiovascular Research Centre, Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK
Correspondence: Dr M Correa-Costa, PhD, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Cidade Universitária, Av Professor Lineu Prestes, 173, São Paulo 05508-900, Brazil.
E-mail: matheusccosta@usp.br

Received 2 June 2013; revised 20 November 2013; accepted 19 December 2013

www.laboratoryinvestigation.org | *Laboratory Investigation* | Volume 94 April 2014

RESEARCH ARTICLE

Balance between the two kinin receptors in the progression of experimental focal and segmental glomerulosclerosis in mice

Rafael Luiz Pereira^{1,2}, Raphael José Ferreira Felizardo¹, Marcos Antônio Cenedeze¹, Meire Ioshie Hiyane², Ênio José Bassi¹, Mariane Tami Amano¹, Clarice Sylvia Taemi Origassa¹, Reinaldo Correia Silva³, Cristhiane Fávero Aguiar², Sylvia Mendes Carneiro⁴, João Bosco Pesquero⁵, Ronaldo Carvalho Araújo⁵, Alexandre de Castro Keller⁶, Renato C. Monteiro⁷, Ivan Cruz Moura⁷, Alvaro Pacheco-Silva^{1,8} and Niels Olsen Saraiva Câmara^{1,2,*}

ABSTRACT

Focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) is one of the most important renal diseases related to end-stage renal failure. Bradykinin has been implicated in the pathogenesis of renal inflammation, whereas the role of its receptor 2 (B2RBK; also known as BDKRB2) in FSGS has not been studied. FSGS was induced in wild-type and B2RBK-knockout mice by a single intravenous injection of Adriamycin (ADM). In order to further modulate the kinin receptors, the animals were also treated with the B2RBK antagonist HOE-140 and the B1RBK antagonist DALBK. Here, we show that the blockage of B2RBK with HOE-140 protects mice from the development of FSGS, including podocyte foot process effacement and the re-establishment of slit-diaphragm-related proteins. However, B2RBK-knockout mice were not protected from FSGS. These opposite results were due to B1RBK expression. B1RBK was upregulated after the injection of ADM and this upregulation was exacerbated in B2RBK-knockout animals. Furthermore, treatment with HOE-140 downregulated the B1RBK receptor. The blockage of B1RBK in B2RBK-knockout animals promoted FSGS regression, with a less-inflammatory phenotype. These results indicate a deleterious role of both kinin receptors in an FSGS model and suggest a possible cross-talk between them in the progression of disease.

KEY WORDS: Focal and segmental glomerulosclerosis, Bradykinin receptors, Inflammation, Podocyte, Fibrosis

INTRODUCTION

Kinins are powerful pro-inflammatory peptides (Bhoola et al., 1992; Campos and Calixto, 1995; Kang et al., 2004). Kinins are generated

by the action of kallikrein enzymes on kininogen substrates. Two types of kallikrein enzymes are known, tissue and plasmatic kallikreins, which act on low-molecular-mass kininogens and high-molecular-mass kininogens, respectively (Regoli and Barabé, 1980; Campbell, 2001). The actions of these enzymes on their substrates generate bradykinin and kallidin, active peptides that signal through a constitutive G-protein-coupled receptor called the B2 receptor (B2RBK; also known as BDKRB2) (Bhoola et al., 1992; Marin Castaño et al., 1998). B2RBK is responsible for many of the physiological actions of kinins – such as decreasing blood pressure (Campos and Calixto, 1995), regulating blood flow, relaxing smooth muscle, enabling vascular permeability and nitric oxide release (Roman-Campos et al., 2010) and reducing oxidative stress (Xia et al., 2006). Despite its physiological role, B2RBK can also induce the activation of pro-inflammatory (Campos and Calixto, 1995; Marceau and Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000) and pro-fibrotic (Douillet et al., 2000; Stadnicki et al., 2005) cascades, which can, in turn, induce tissue damage.

Although B2RBK plays an important role in renal physiology per se, in some circumstances, the upregulation of B2RBK can lead to heterodimerization with the inducible B1 bradykinin receptor (B1RBK; also known as BDKRB1) (Barki-Harrington et al., 2003; Kang et al., 2004) and/or angiotensin type-1 receptor (Abdalla et al., 2000; Abdalla et al., 2001), contributing to the activation of these already known renal disease-related receptors (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009; Pereira et al., 2011; Tunçdemir et al., 2011).

In the literature, we found different results concerning the role of B2RBK on fibrosis-related diseases, especially in renal tissue. Several papers describe a protective role for B2RBK (Wang et al., 2000a; Schanstra et al., 2002; Kakoki et al., 2010), whereas others describe a deleterious one (Dos Santos et al., 2008; Naito et al., 2010). Additionally, some groups report a dual role for B2RBK (Marin Castaño et al., 1998), which acts in physiological and inflammatory responses that are associated with cAMP and the release of phospholipase C, suggesting that there are different binding sites for the B2RBK ligand bradykinin, which could subsequently affect the signal transduction of this receptor. Our group has recently demonstrated the deleterious role of B1RBK in a focal and segmental glomerular sclerosis (FSGS) experimental model (Pereira et al., 2011). We also observed an upregulation of B2RBK. FSGS is one of the most important renal diseases that is related to end-stage renal failure; furthermore, an individual that is diagnosed with FSGS has a poor prognosis, which worsens when they present with high proteinuria. Most cases lead to end-stage renal disease within 5 years after the first signs of the illness (LeBrun et al., 2000; Seikaly et al., 2001; Franceschini et al., 2003; Deegens et al., 2008).

¹Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Nephrology Division, Federal University of São Paulo, São Paulo 04023-900, Brazil. ²Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ³Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Translational Medicine Division, Federal University of São Paulo, São Paulo 04039-002, Brazil. ⁴Laboratory of Cellular Biology, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, São Paulo 05503-900, Brazil. ⁵Department of Biophysics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo 04023-062, Brazil. ⁶Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo 04023-062, Brazil. ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 699, Paris 75870, France. ⁸Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Renal Transplantation Unit, Albert Einstein Hospital, São Paulo 05521-000, Brazil.

*Author for correspondence (Niels@icb.usp.br)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 15 October 2013; Accepted 1 April 2014