

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

RESUMO

AGUIAR, C. F. **Papel das células NKT na homeostase e inflamação intestinal.** 2017. 124 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. 124 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.

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 imunoadjuvante presente em extratos da esponja marinha *Agelas mauritanus*, 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 invariantes¹⁴. 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 NKT¹⁷, e em células de Kupffer e células endoteliais nos sinusóides hepáticos, sendo no fígado encontrada a maior frequência de células NKT em camundongos¹⁸.

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 contêm um sítio de ligação hidrofóbica composta por dois bolsos A e F¹⁹, 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 ligação²⁰. 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 Th2²¹.

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 *folicular 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}.

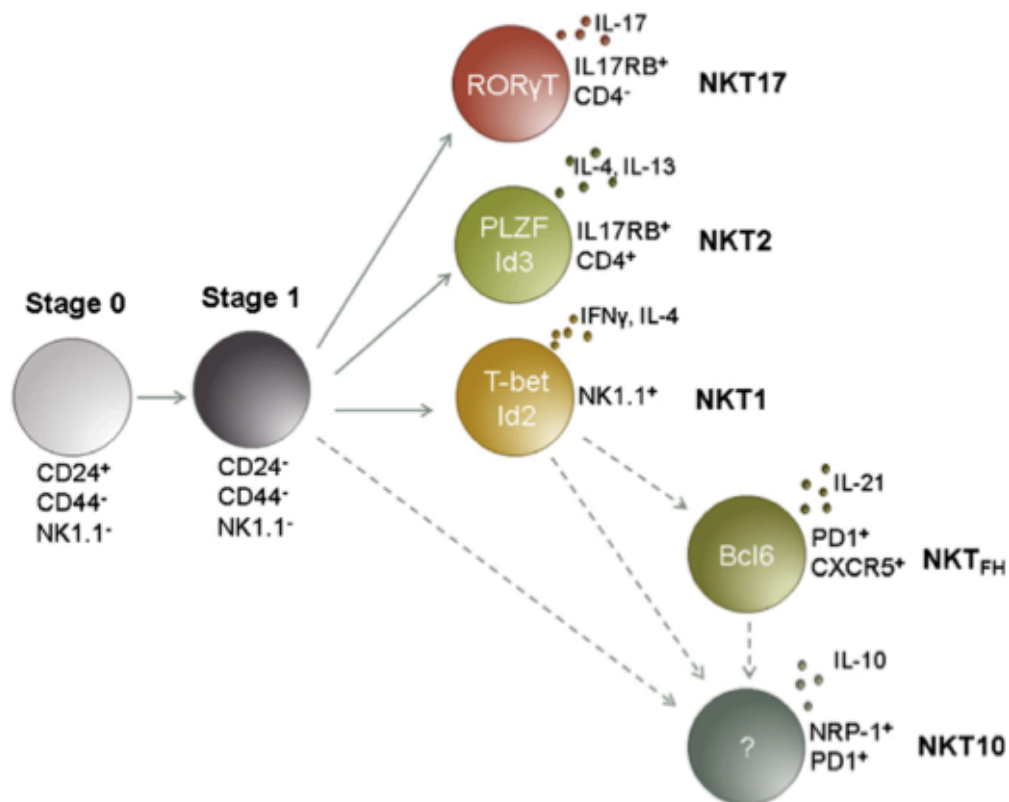


Figura 1 - Subtipos das células iNKT. Há pelo menos 5 subtipos distintos de células iNKT definidos pela expressão de fatores de transcrição e produção de citocinas características. Fonte: Buechel, HM (2015)⁷⁷.

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. Quimioatraentes 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.

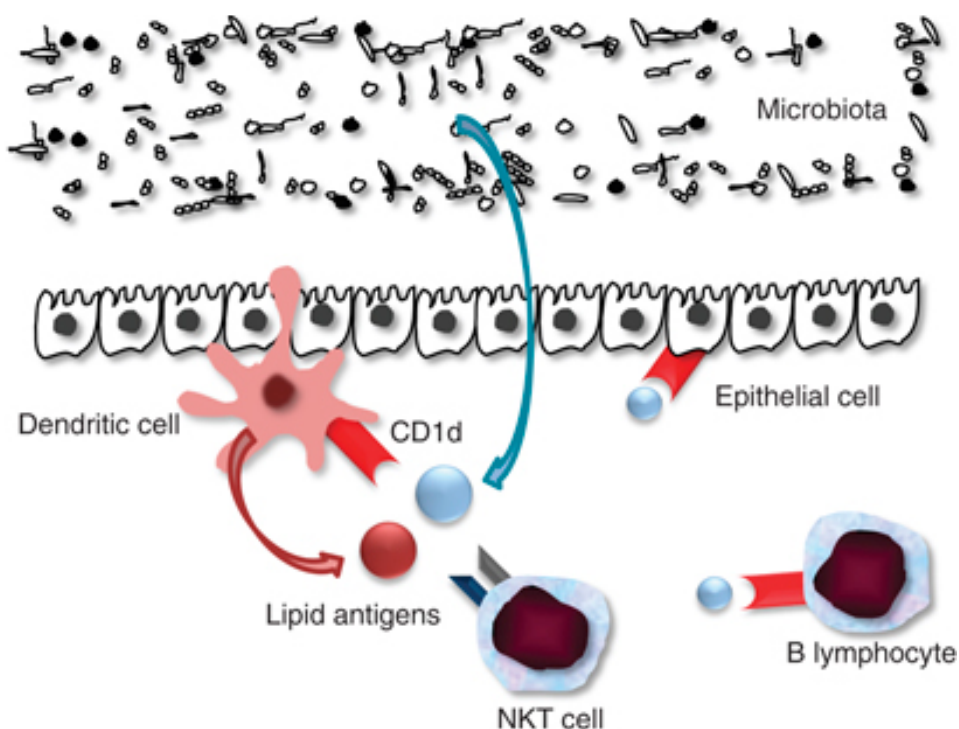


Figura 2 - Expressão de CD1d no intestino. Diversos tipos celulares na mucosa intestinal expressam a molécula apresentadora de antígeno CD1d, como as células epiteliais intestinais, células dendríticas e linfócitos B. Fonte: Middendorp e Nieuwenhuis (2009)⁸⁶.

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 20⁹⁴. 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 estresse⁹⁵. As DII afetam principalmente os jovens, e cerca de 4 milhões de pessoas no mundo todo sofrem desse tipo de doença⁹⁶.

A UC foi primeiramente descrita em meados de 1800⁹⁷ 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 complicações⁹⁸. 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 cólon⁹⁴. 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 doença⁹⁹.

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 granulócitos¹⁰⁰. Outras características típicas incluem a depleção de células caliciformes, alteração da arquitetura das criptas, diminuição da densidade das criptas e ulcerações⁹⁴. 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 suficiente¹⁰¹.

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 UC¹⁰². 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 interespecies 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 invariáveis, 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.

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 ¹

- 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.; GOLUMBEEK, 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.

¹ 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 ARRENBURG, 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 (γ)⁺ 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.