

MARÍLIA GARCIA DE OLIVEIRA

**PAPEL DO RECEPTOR IONOTRÓPICO DE GLUTAMATO NMDAR EM
CÉLULAS T $\alpha\beta$ DA MUCOSA INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO**

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

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

MARÍLIA GARCIA DE OLIVEIRA

**PAPEL DO RECEPTOR IONOTRÓPICO DE GLUTAMATO NMDAR EM
CÉLULAS T $\alpha\beta$ DA MUCOSA INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo

2023

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)

Garcia de Oliveira, Marília
Papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR
em células T ab da mucosa intestinal em modelo
experimental murino / Marília Garcia de Oliveira;
orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São
Paulo, 2023.
99 p.

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

1. Linfócitos T. 2. Glutamato. 3. NMDAR. 4.
Mucosa intestinal. 5. colite. I. Schatzmann Peron,
Jean Pierre, orientador. II. Título.

Aos meus pais, meus irmãos, minhas cunhadas e meu sobrinho. Com todo amor por nossa família e gratidão por tê-los em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Mauro e Vera, por todos os ensinamentos e valores. Por proporcionarem a mim e aos meus irmãos a educação que vocês não tiveram a oportunidade de ter e o caráter que sempre carregaram junto a vocês. Vocês são a base de nossa linda família.

Aos meus irmãos Willian e Leonardo, por serem a parte mais doce de minhas lembranças. Por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, por toda a torcida e pelo extremo cuidado. Não vejo a hora de estarmos juntos novamente.

As minhas cunhadas Gabriela e Ana Paula, por todas as risadas e momentos de descontração. Por cuidarem tão bem de meus irmãos e por trazerem muita felicidade a nossa família.

Ao meu sobrinho Maurício, meu grande amor, por ser a pessoa mais especial em minha vida. Por me ensinar tanto desde o dia em que chegou a este mundo. Por todo o amor e felicidade que me traz e por me inspirar a ser alguém melhor a cada dia. Não tem um dia em que eu não penso em você. Obrigada por trazer a melhor parte de mim. Estaremos sempre juntos, mesmo com a atual distância de cidade e país. Eu te amo!

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, meu orientador e grande amigo, pela oportunidade única de aprender com sua mente brilhante, por todo o apoio e incentivo científico e pessoal. Serei eternamente grata por todos os anos de aprendizado com você e por essa linda amizade que construímos há anos. Te levarei para sempre comigo.

Aos meus avós Eurípedes e Terezinha, nossos anjos, por trazerem meu pai a este mundo. Por todos os esforços em tornar a vida de uma família tão grande mais leve e digna. Por sempre buscarem o melhor a seus filhos e por todo o amor com seus netos e bisnetos. Eu nunca me esquecerei de vocês e gostaria que estivessem aqui neste momento.

Aos meus avós Mariano e Olga, por todo o carinho e amor. Por sempre desejarem o melhor a mim e por estarem sempre presentes, mesmo com a distância em que enfrentamos. Obrigada por todas as conversas, brincadeiras, histórias e comidas. Torço para ter vocês aqui por muitos e muitos mais anos.

Aos meus padrinhos Jorge e Silvia, pelo sentimento de amor, carinho e cuidado. Obrigada por serem meus segundos pais e meus tios favoritos. A vida é muito mais feliz com vocês.

A minha prima Beatriz, por ser como uma irmã e por estar presente em todos os momentos bons ou ruins de minha vida. Por tudo o que vivemos em nossa infância e adolescência e por toda a vida adulta que temos pela frente. Estaremos sempre juntas!

Aos meus primos Mariane, Daniela, Matheus, Douglas e Andrews, por tornarem a infância mais leve e alegre. Por todas as brincadeiras e desavenças, importantes para nos tornamos pessoas melhores.

A minha prima Gabriela e toda sua família, por terem me recebido tão bem na casa de vocês e por tornarem os Estados Unidos uma extensão de casa.

À Carolina, Lilian e Nagela, por todos os momentos juntas e pela parceria. Tive muita sorte de ter a amizade de vocês desde antes do início do doutorado e por tê-las em minha vida durante todo este período. Obrigada pelos ensinamentos científicos, pela companhia em dias difíceis e em todos os congressos, e por todos os conselhos de vida. Estaremos sempre juntas e, agora, em outro país. Que venham muito mais churrascos, pizzas, viagens e bebedeiras internacionais.

À Ariana, minha grande amiga, Lucas, seu marido e Heitor, o fruto dessa união, pela amizade em todos estes anos e por todos os finais de semana e feriados especiais. Por fazerem parte de toda a minha vida pessoal e profissional. Por sempre estarmos juntos, mesmo com a distância. Tenho certeza de que será assim por toda a vida.

Aos meus amigos Mayara e João, que se tornaram especiais e que trazem o bem. É sempre muito bom estar com vocês.

Ao Prof. Dr. Rafael Machado Rezende, por acreditar em mim desde o primeiro dia. Por me receber tão bem em seu laboratório e por me ensinar a pensar como uma grande cientista. Obrigada por ser quem você é, com sua simplicidade, carinho e alegria. Obrigada pela oportunidade de estar com você novamente, não vejo a hora de voltar e iniciarmos a próxima etapa juntos.

Ao Prof. Dr. Howard Liu Weiner, por ceder o espaço de seu laboratório para eu desenvolver nossa pesquisa. Por todas as reuniões e apoio financeiro.

Ao meu grande amigo e irmãozinho Gabriel, por ter contribuído tanto em tão pouco tempo de amizade. Por ter me trazido paz em meio a tantos experimentos e novidades. Por ter grande parte de meu coração e minhas lembranças em Boston. Você foi essencial para esta experiência ter sido única e incrível. Com você eu me senti em casa e, não é à toa, pois compartilhamos o mesmo teto, as mesmas comidas e o mesmo laboratório. Obrigada por ter me acolhido, me ouvido e por estar sempre presente em minha vida até os dias de hoje. Esta amizade eu levarei por toda a vida.

À Kassiana, por toda sua leveza e delicadeza. Por também termos compartilhado o mesmo teto e por fazermos parte da rotina e vida uma da outra. Aprendi muito com você e seu jeito calmo e sereno de ser e conduzir sua pesquisa. Espero muito estarmos juntas em Boston novamente.

Aos gringos Danielle e Taha, por serem como irmãos e por toda a amizade e companheirismo nestes últimos anos. Boston não seria a mesma cidade sem vocês. Team Bro Forever!

À Thais, por sua amizade e pensamento positivo. Por sua ajuda e aconselhamentos. Eu aprendi tanto com você, cientificamente e pessoalmente. Você é uma pessoa incrível e eu tive a sorte de dividir a vida em Boston com você.

Aos meus colegas do laboratório do Prof. Dr. Howard, Liam, Mathijs, Mary, Ella, Christine, Tian, Millecent, Kusha, Estefania, Megha, Caroline, Luke e Mahsa por todo o apoio e ajuda. Desejo tudo de mais especial na vida de cada um e espero nos reencontrarmos no futuro.

A todos os alunos e amigos que passaram pelo laboratório do Prof. Rafael, Gabriela, Felipe, Maria Júlia, Isabelly, Júlia, Roberta, Lívia, Ana Clara, Toby e Patrick por tornarem o dia a dia divertido e por toda a ajuda em dias caóticos de experimento. Vocês foram essenciais no desenvolvimento de grande parte desta tese.

Aos colegas de mundo em Boston, Camilo, Melissa, Kylynne, Xiaoming, Ana Brandão, Michael, Kilian, Nico e Udbov por tornarem o laboratório mais divertido.

Aos melhores 'roommates', Anderson, Maria, Michele, Salvatore, Federica e Miyuki por todas as conversas, refeições e companhia. Por tornarem minha primeira casa longe do ninho extremamente feliz e agradável. Levarei vocês sempre comigo.

Aos colegas do laboratório de Interações Neuroimunes, Wesley, Rafaela, Beatriz, Laura, Tiago, Brendo, Yan, Jonathan e Sandra, por toda a discussão de resultados e pela agradável companhia em todos estes anos.

Aos colegas que tive o prazer de dividir o Departamento de Imunologia da USP por anos, Igor, Rafael, Aline, Thiago, João e Flávia, pela companhia e por tornar a ciência mais alegre e divertida.

À banca de qualificação, Profa. Dra. Patrícia, Dra. Luana e Prof. Dr. Vinícius, por todas as sugestões e conselhos.

A todos funcionários do Departamento de Imunologia do ICB, em especial à Maria Eni, Claudia, Aurea, Sandra e João, por estarem sempre dispostos a ajudar a todos os alunos.

APOIO FINANCEIRO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do primeiro ano de doutorado (2018-2019).

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do restante do doutorado (2019-2023, Processo Doutorado/Fluxo Contínuo-FAPESP: 2018/10242-5), incluindo o estágio de pesquisa no exterior (2021-2022, Processo BEPE-FAPESP: 2021/06508-2).

“É precisamente na fronteira do conhecimento que a imaginação tem seu papel mais importante; o que ontem foi apenas um sonho, amanhã poderá se tornar realidade.” – Marcelo Gleiser

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do NMDAR.....	21
Figura 2: Células imunes da mucosa intestinal na homeostase e inflamação.....	27
Figura 3: Interações neuro-imunes nos intestinos.....	31
Figura 4: Avaliação da expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais.....	42
Figura 5: Avaliação da expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial do intestino delgado e cólon.....	43
Figura 6: Expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ no intestino delgado.....	44
Figura 7: Expressão gênica das isoformas NR2a, NR2b, NR2c e NR2d do NMDAR no baço, linfonodos mesentéricos e intestino delgado.....	46
Figura 8: Expressão gênica de Il2, Il6, Il17, Foxp3 e Tbx21 no baço, linfonodos mesentéricos e intestino delgado.....	47
Figura 9: Avaliação da permeabilidade e trânsito intestinal.....	48
Figura 10: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ em órgãos linfoides primários e secundários de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	50
Figura 11: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ na lâmina própria e compartimento epitelial dos intestinos de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	51
Figura 12: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ intraepiteliais típicos e atípicos de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	52
Figura 13: Sinais e sintomas da colite aguda induzida por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	53
Figura 14: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ nos tecidos afetados pelo modelo de colite aguda induzido por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	54
Figura 15: Produção intracelular de Il-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite aguda induzido por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	55
Figura 16: Sinais e sintomas da colite crônica induzida por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	56
Figura 17: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	57

Figura 18: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por DSS em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	58
Figura 19: Sinais e sintomas da colite crônica induzida por transferência de células T de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	59
Figura 20: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por transferência de células T de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	61
Figura 21: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por transferência de células T de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	62
Figura 22: Avaliação da tolerância oral em camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	63
Figura 23: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ no baço de camundongos Cd4CrexGrin1f/f em modelo de tolerância oral.....	64
Figura 24: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ no baço de camundongos Cd4CrexGrin1f/f em modelo de tolerância oral.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de primers utilizados para avaliação de mRNA dos genes em interesse.....	39
Tabela 2: Frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4+ e CD8+) e T $\gamma\delta$ nos órgãos linfoides de camundongos Cd4CrexGrin1f/f naïve.....	72
Tabela 3: Frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4+ e CD8+) e linfócitos T $\gamma\delta$ e expressão de CD25, FoxP3 e CD103 por linfócitos T CD4+ nos órgãos linfoides de camundongos Cd4CrexGrin1f/f submetidos a três modelos distintos de colite.....	73
Tabela 4: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T CD4+ de camundongos Cd4CrexGrin1f/f submetidos a três modelos distintos de colite.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - do inglês, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*

AMPs - do inglês, *Antimicrobial Peptides*

APRIL - do inglês, *a proliferation-inducing ligand*

BAFF - do inglês, *B-cell-activating factor of the TNF family*

BSA - do inglês, *Bovine serum albumin*

Ca²⁺ - Cálcio

cDNA - DNA complementar

CFA - do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*

ChAT - do inglês, *Choline Acetyltransferase*

DCs - do inglês, *Dendritic Cells*

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSS - do inglês, *Dextran Sulfate Sodium*

DTT - do inglês, *DL-Dithiotreitol*

EAAC1 - do inglês, *Excitatory Amino Acid Carrier 1*

EAE - do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

GABA - do inglês, *Gamma-Aminobutyric Acid*

GAD - do inglês, *Glutamic Acid Decarboxylase*

GALT - do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

Grin1 - do inglês, *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1*

Grin2 - do inglês, *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2*

Grin3 - do inglês, *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 3*

H&E - do inglês, *hematoxylin and eosin*

HBSS - do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*

HEPES - do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HIV - do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

IBD - do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*

IEC - do inglês, *Intestinal Epithelial Cell*

IEL - do inglês, *Intraepithelial Lymphocytes*

IFN - interferon

iGluRs - do inglês, *ionotropic Glutamate Receptors*

IL - Interleucina

ILC - do inglês, *Innate Lymphoid Cells*

iNKT - do inglês, *invariant Natural Killer T cells*

iTreg - do inglês, *Induced regulatory T cell*
K⁺ - Potássio
KA - do inglês, *Kainate Receptor*
LP - Lâmina Própria
LTi - do inglês, *Lymphoid tissue inducer*
mg - miligramas
Mg²⁺ - Magnésio
mGluRs - do inglês, *metabotropic Glutamate Receptors*
mL - mililitros
mM - milimolar
MOG - do inglês, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*
mRNA - RNA mensageiro
Na⁺ - Sódio
NHS - do inglês, *normal horse serum*
NK - do inglês, *Natural Killer Cells*
nM - nanomolar
NMDA - N-metil-D-aspartato
NMDAR - do inglês, *N-methyl-D-aspartate Receptor*
NO - do inglês, *Nitric Oxide*
NR1 - do inglês, *NMDA receptor subunit 1*
NR2 - do inglês, *NMDA receptor subunit 2*
NR3 - do inglês, *NMDA receptor subunit 3*
OT - do inglês, *Oral tolerance*
OVA - do inglês, *ovalbumin*
PACAP - do inglês, *Pituitary Adenylyl Cyclase Activating Peptide*
PFA - paraformaldeído
PMA - do inglês, *Phorbol myristate acetate*
qPCR - PCR quantitativo
RA - do inglês, *Retinoic Acid*
RNA – ácido ribonucleico
RPMI - do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*
s.c. - subcutâneo
SBF - Soro Bovino Fetal
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNS - Sistema Nervoso Somático

SP - do inglês, *Substance P*

TECs - do inglês, *Thymic Epithelial Cells*

TGF- β - do inglês, *transforming growth factor β*

Th - do inglês, *T helper cell*

TLR2 - do inglês, *Toll-like receptor 2*

TLR4 - do inglês, *Toll-like receptor 5*

TNF - do inglês, *Tumor necrosis fator*

Treg - Linfócitos T reguladores

Trm - do inglês, *T resident memory cells*

TSLP - do inglês, *Thymic Stromal Lymphopoietin*

VIP - do inglês, *Vasoactive Intestinal Peptide*

μg - microgramas

μL - microlitros

μM - micromolar

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Glutamato e NMDAR.....	19
1.2. Microbiota e o sistema imune no GALT.....	23
1.3. Doenças inflamatórias intestinais.....	26
1.4. O sistema nervoso entérico.....	29
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Animais.....	34
3.2. Tolerância Oral.....	34
3.3. Colite induzida com DSS.....	34
3.4. Colite induzida por transferência de linfócitos T.....	35
3.5. Separação magnética de células T CD4+ e CD8+ do baço.....	35
3.6. Obtenção de células do baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais.....	36
3.7. Obtenção de células da mucosa intestinal.....	36
3.7.1 Linfócitos intraepiteliais intestinais.....	37
3.7.2 Linfócitos da lâmina própria intestinal.....	37
3.8. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	38
3.9. Quantificação de mRNA por PCR em Tempo Real.....	39
3.10. Citometria de fluxo.....	39
3.11. Permeabilidade e trânsito intestinal.....	40
3.12. Histologia do cólon.....	41
3.13. Imunofluorescência do intestino delgado.....	41
3.14. Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$	43
4.2. Alteração na expressão de genes relacionados ao fenótipo Th1, Th17 e Treg no baço, linfonodos mesentéricos e compartimento intraepitelial do intestino delgado de camundongos Cd4CrexGrin1f/f.....	46
4.3. A deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ não prejudica a permeabilidade e o trânsito intestinal.....	48

4.4	A deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ leva a distribuição alterada das subpopulações CD4+ e CD8+ em tecidos linfoides de camundongos naïve.....	50
4.5	Papel do NMDAR na inflamação intestinal.....	53
4.6	Papel do NMDAR na tolerância oral.....	64
5.	DISCUSSÃO	67
6.	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	APÊNDICES	82
	ANEXOS	85

RESUMO

DE OLIVEIRA, M.G. **Papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em células T $\alpha\beta$ da mucosa intestinal em modelo experimental murino.** Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2023.

Plexos ganglionares formados por redes de interconexão entre neurônios do sistema nervoso entérico estão presentes nas camadas muscular e submucosa dos intestinos delgado e grosso. Estes neurônios secretam diversos neurotransmissores inibitórios e excitatórios, como o glutamato, e suas inervações atingem a lâmina própria da mucosa intestinal. Estes neurotransmissores desempenham papel fundamental na motilidade e homeostase intestinal através de suas interações com as células epiteliais intestinais. Recentemente, foi descoberto que linfócitos T expressam receptores para neurotransmissores, incluindo o receptor ionotrópico de glutamato NMDAR. A maioria dos linfócitos encontrados no corpo estão localizados na mucosa intestinal e estes desempenham funções importantes na tolerância local à microbiota e à antígenos alimentares. Porém, pouco se sabe sobre o papel do NMDAR em linfócitos T, especialmente na mucosa intestinal. Portanto, definimos por investigar inicialmente o papel do NMDAR em linfócitos T, através de sua deleção específica, na homeostase intestinal. Conceitualmente, mostramos neste trabalho a eficiência da deleção específica do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ e CD8⁺ em tecidos linfoides como no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, assim como na lâmina própria e compartimento intraepitelial dos intestinos delgado e grosso em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. Tal deleção favorece a expressão gênica de outras subunidades do NMDAR, como NR2c e NR2d no baço e linfonodos mesentéricos, sem interferir na permeabilidade e no trânsito intestinal. Além disso, mostramos que camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* possuem distribuição alterada de células T CD4⁺ e CD8⁺, até mesmo células T $\gamma\delta$, no timo, baço e linfonodos mesentéricos e cecais. Embora não tenhamos observado diferenças na lâmina própria e compartimento intraepitelial dos intestinos em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* na condição naïve, definimos por investigar também o papel do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ mediante estímulo inflamatório através de modelos experimentais de colite aguda e crônica. Na colite aguda induzida por DSS, observou-se um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ e redução na frequência de linfócitos T CD8⁺ na lâmina própria do ceco e compartimento intraepitelial do cólon em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. Por sua vez, os linfócitos T CD4⁺ da lâmina própria do ceco destes animais produziram mais IL-17. Além disto, mostramos também alterações na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ na lâmina própria do ceco e cólon de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. No modelo de colite crônica induzido por múltiplos ciclos de DSS, a deleção específica de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ resultou na redução da frequência de células T CD4⁺ e no aumento da produção de IFN- γ por estas células na lâmina própria do cólon. Finalmente, também avaliamos o modelo de colite crônica induzido pela transferência adotiva de células T CD4⁺ naïve à camundongos *Rag1^{-/-}*. A transferência de células T CD4⁺ depletadas de NMDAR gerou um aumento na frequência de células T CD4⁺, assim como a redução na expressão de CD103 e na produção de IL-17 e IFN- γ por estas células nos linfonodos mesentéricos e cecais quando comparados ao grupo controle. Embora estas alterações sejam sugestivas da perda da homeostase intestinal, assim como no modelo de colite aguda e crônica induzidos por DSS, também não observamos diferenças nos parâmetros macro e microscópicos referentes a inflamação crônica em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. Nossos dados sugerem a participação do NMDAR expresso por linfócitos T $\alpha\beta$ no controle da homeostase intestinal e durante doenças inflamatórias intestinais, principalmente a colite aguda sem comprometer a indução da tolerância oral a Ovalbumina.

Palavras-chave: linfócitos T, glutamato, NMDAR, mucosa intestinal, colite.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, M.G. **The role of the ionotropic glutamate receptor NMDAR on $\alpha\beta$ T cells of the intestinal mucosa in an experimental murine model.** PhD Thesis (Immunology) – Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, 2023.

Ganglionic plexuses formed by interconnecting networks between neurons of the enteric nervous system are present in the muscular and submucosal layers of the small and large intestines. These neurons secrete several inhibitory and excitatory neurotransmitters, including glutamate, and their innervations reach the lamina propria of intestinal mucosa. Such neurotransmitters play a key role in intestinal motility and homeostasis through their interactions with intestinal epithelial cells. Recently, it has been discovered that T cells express receptors for neurotransmitters, including the ionotropic glutamate receptor NMDAR. Most lymphocytes found in the body are located within the intestinal mucosa and these cells play important roles in local tolerance to microbiota and food antigens. However, little is known about the role of NMDAR on T cells, especially in the intestinal mucosa. Therefore, we decided to initially investigate the role of NMDAR in T lymphocytes, through its specific deletion, in intestinal homeostasis. Conceptually, we show in this work the efficiency of the specific deletion of NMDAR on CD4⁺ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells in lymphoid tissues such as the spleen, thymus, mesenteric and cecal lymph nodes, as well as in the lamina propria and intraepithelial compartment of both intestines of *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mice. Such deletion favors gene expression of other NMDAR subunits, such as NR2c and NR2d in the spleen and mesenteric lymph nodes, without interfering with intestinal permeability and transit. Furthermore, we demonstrate that naïve *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mice have altered distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, even $\gamma\delta$ T cells, in the thymus, spleen, and mesenteric and cecal lymph nodes. Although we did not observe differences in the lamina propria and intraepithelial compartment of the intestines in *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mice in the naïve condition, we decided to also investigate the role of NMDAR in $\alpha\beta$ T cells upon inflammatory stimulus through experimental models of acute and chronic colitis. In acute DSS-induced colitis, an increase of CD4⁺ T cells and a decrease of CD8⁺ T cells frequencies in the lamina propria of the cecum and colonic intraepithelial compartment were observed in *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mice. In turn, CD4⁺ T cells from the lamina propria of the cecum of these mice produced more IL-17. In addition, we also showed changes in the frequency of $\gamma\delta$ T cells in cecum and colon lamina propria, dependent on this deletion. In chronic colitis model induced by multiple cycles of DSS, specific deletion of NMDAR in $\alpha\beta$ T cells resulted in reduced frequency of CD4⁺ T cells and increased IFN- γ production by these cells in the colonic lamina propria. Finally, we also evaluated a chronic colitis model caused by adoptive transfer of naïve CD4⁺ T cells to *Rag1^{-/-}* mice. The transfer of NMDAR-depleted CD4⁺ T cells generated an increase in the frequency of CD4⁺ T cells, as well as a reduction in the expression of CD103 and in the consecutive production of IL-17 and IFN- γ by these cells in the mesenteric and cecal lymph nodes when compared to control group. Although these alterations are suggestive of loss of intestinal homeostasis, as well as in the model of acute and chronic colitis induced by DSS, we also did not observe differences in the macroscopic and microscopic parameters referring to chronic inflammation in *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mice. Taken together, our data suggest the involvement of NMDAR expressed by $\alpha\beta$ T cells in controlling the intestinal homeostasis and during inflammatory bowel diseases, mainly acute colitis, without compromising the induction of oral tolerance to Ovalbumin.

Keywords: T cells, glutamate, NMDAR, intestinal mucosa, colitis.

1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos nosso grupo vem estudando o papel do receptor ionotrópico de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDAR) na biologia das células do sistema imune utilizando o modelo murino de encefalomielite autoimune experimental (EAE) induzido pela imunização de camundongos com a glicoproteína de mielina produzida por oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅).

Mais recentemente, nosso grupo também tem visado entender o papel dos receptores NMDAR na ontogenia tímica de linfócitos T CD4+. Para tanto, realizamos o cruzamento entre camundongos C57BL/6 *Cd4^{Cre}* com camundongos C57BL/6 *Grin1^{flox}*, promovendo a deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+, devido à expressão do coestimulador CD4 juntamente com a expressão do CD8 no estágio imaturo ou duplo positivo do desenvolvimento de timócitos no timo.

Dando continuidade nesses estudos, no presente projeto investigamos o papel do NMDAR na imunobiologia dos linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+ presentes no tecido linfóide associado ao intestino (GALT), um dos sítios de maior abundância de linfócitos T no organismo, onde estas células apresentam ações fundamentais na manutenção da tolerância à microbiota, assim como na manutenção da homeostase intestinal.

1.1 Glutamato e NMDAR

O aminoácido não-essencial glutamato é o neurotransmissor mais importante como mediador de sinapses excitatórias no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. É considerado um neurotransmissor, pois é encontrado em vesículas de neurônios pré-sinápticos e, após a despolarização da membrana, é liberado na fenda sináptica em concentrações altas suficiente para provocar resposta em neurônios pós-sinápticos (Fonnum, 1984). Sua função excitatória já é conhecida desde a década de 50, em estudos envolvendo o cérebro e medula espinhal em modelos experimentais de epilepsia e excitação e depressão de neurônios, respectivamente (Hayashi, 1952; Curtis e Watkins, 1960).

O glutamato está envolvido nos principais aspectos funcionais de neurônios encontrados no cérebro, como cognição, consolidação da memória, plasticidade e aprendizado (Fonnum, 1984; Ottersen e Storm-Mathisen, 1984; Collingridge e Lester, 1989; Headley e Grillner, 1990). O mesmo também atua no desenvolvimento do SNC, agindo na indução e eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação, sobrevivência e morte de células neuronais (Mcentee e Crook, 1993; Hack e Balázs, 1994; Yano *et al.*, 1998;

Hertz, 2006). Durante processos inflamatórios do SNC, o glutamato é responsável por causar morte neuronal por excitotoxicidade, como já foi observado durante o acidente vascular cerebral (Farooqui e Horrocks, 1991) e, também, em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Huntington (Choi, 1994).

Além disso, o glutamato pode exercer funções periféricas por ser encontrado dentro de microvesículas presentes na glândula pineal, participando do processo de produção da melatonina. Também foi sugerida a possível participação do glutamato em outra glândula endócrina fora do SNC, o pâncreas, pois as células das ilhotas de Langerhans expressam receptores para esse neurotransmissor (Moriyama *et al.*, 2000).

Outras funções importantes do glutamato fora do SNC podem ser encontradas no trato gastrointestinal, levando em consideração que o glutamato é o principal combustível para homeostase do tecido intestinal. Suas fontes são: ingestão principalmente de dietas proteicas (8-10% dos aminoácidos consumidos), metabolização por componentes da microbiota (*Lactobacillus*) (Tomé, 2018) ou ainda pode ser secretado por grandes populações de neurônios do sistema nervoso entérico (SNE), como será descrito mais à frente no item 1.3.

O glutamato proveniente da dieta e da microbiota é absorvido do lúmen intestinal e metabolizado principalmente pelos enterócitos (células epiteliais dos intestinos delgado e grosso) por diferentes vias que culminam na produção de energia para sustentar a motilidade intestinal e outras funções como, o metabolismo de proteínas e a produção de diferentes moléculas que utilizam o glutamato como precursor. Algumas bactérias da microbiota (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) possuem a enzima glutamato descarboxilase (GAD) que sintetiza o principal neurotransmissor inibidor, ácido γ -aminobutírico (GABA), através da descarboxilação do glutamato, também envolvendo a participação de neurônios glutamatérgicos e outras células presentes nos intestinos que expressam o transportador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1) (Kirchgessner, 2001; Tomé, 2018).

As primeiras especulações de que o glutamato poderia ter papel regulador sobre o sistema imune vieram de estudos clínicos que reportaram altas concentrações plasmáticas de glutamato em condições associadas à imunodeficiência, como em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pacientes com câncer (Eck *et al.*, 1989; Ollenschläger *et al.*, 1989; Eck *et al.*, 1990).

Recentemente, foi demonstrado que células dendríticas (DCs) esplênicas secretam quantidades significativas de glutamato durante a apresentação antigênica, o que foi capaz de modular a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos T ativadas *in vitro* (Pacheco *et al.*, 2006). Tais resultados evidenciam o papel imunomodulador do glutamato também

durante sua ativação em órgãos linfóides secundários, e não somente quando essas células infiltram o SNC. Trabalhos recentes demonstraram que DCs tímicas podem ser consideradas fontes fisiológicas de glutamato assim como as células epiteliais tímicas (TECs), o que sugere um possível papel do glutamato também em órgão linfóides primários, atuando principalmente na seleção tímica levando em consideração que timócitos em desenvolvimento expressam os receptores de glutamato do tipo NMDAR em altas concentrações (Storto *et al.*, 2000; Affaticati *et al.*, 2011).

Como já citado, a função biológica do glutamato é exercida pela ativação de transportadores e de duas famílias de receptores de membrana encontrados principalmente em neurônios pós-sinápticos, chamados de receptores metabotrópicos (mGluRs) e receptores ionotrópicos (iGluRs). Existem oito receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (mGluRs1-8), classificados em três subgrupos com base nas sequências homólogas de seus aminoácidos. São eles: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3), grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Schoepp e Conn, 1993; Pin e Duvoisin, 1995; Conn e Pin, 1997). Já os receptores ionotrópicos, são assim denominados por ativarem canais iônicos, e são subdivididos em três subfamílias: os receptores AMPA (do inglês, *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*), os receptores KA (do inglês, *kainate receptor*) e os receptores NMDAR (do inglês, *N-methyl-D-aspartate receptor*). Estes receptores são assim nomeados pois, seus agonistas mais seletivos são: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA), cainato (do inglês, *kainate* - KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), respectivamente (Kew e Kemp, 2005).

Os receptores ionotrópicos são multímeros proteicos transmembrânicos arranjados na forma tetramérica (Laube *et al.*, 1998) ou pentamérica (Dingledine e Conn, 2000). Todos constituem canais iônicos permeáveis a cátions, como por exemplo sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}), sendo que essa permeabilidade pode variar dependendo das famílias e das subunidades que compõem cada receptor (Danbolt, 2001; Kew e Kemp, 2005; Hertz, 2006; Watkins e Jane, 2006). Os receptores AMPA e Cainato são permeáveis ao sódio (Na^+) e potássio (K^+) e responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC. Já o receptor NMDA é altamente permeável a cálcio (Ca^{2+}), liberando o potássio (K^+) extracelular, tendo sua função baseada na potenciação de longo prazo (Segovia *et al.*, 2001).

Como já discutido, o receptor NMDAR é formado por quatro subunidades codificadas por três famílias de genes diferentes: NR1 (*Grin1*), NR2 (*Grin2*) e NR3 (*Grin3*). A subunidade NR1 possui um só gene, porém com oito variantes de *splycing* (Nakanishi *et al.*, 1992). A subunidade NR2 possui quatro isoformas denominadas NR2a, NR2b, NR2c e

NR2d e a subunidade NR3 possui duas isoformas, NR3a e NR2b. O NMDAR é formado por duas subunidades invariantes NR1, as quais se ligam ao co-agonista glicina, e outras duas subunidades variantes que se ligam ao glutamato, podendo ter seis opções, as subunidades NR2a, NR2b, NR2c, NR2d ou as subunidades NR3a ou NR3b. As subunidades NR2a-d são comumente expressas nas porções anteriores do cérebro, diencéfalo, mesencéfalo e nas células granulares do cerebelo. Já as subunidades NR3a-b, menos comumente encontradas, são expressas principalmente nos períodos iniciais do desenvolvimento fetal (Monyer *et al.*, 1994; Danysz e Parsons, 1998).

Quando em repouso, o receptor NMDA está bloqueado por íons de magnésio (Mg^{2+}) e, para sua ativação, é necessária uma despolarização para a abertura do canal iônico através da saída dos íons de Mg^{2+} e da ligação dos agonistas, glicina e glutamato. Essa despolarização pode ser dependente da ativação de outros iGluRs (Mcbain e Mayer, 1994).

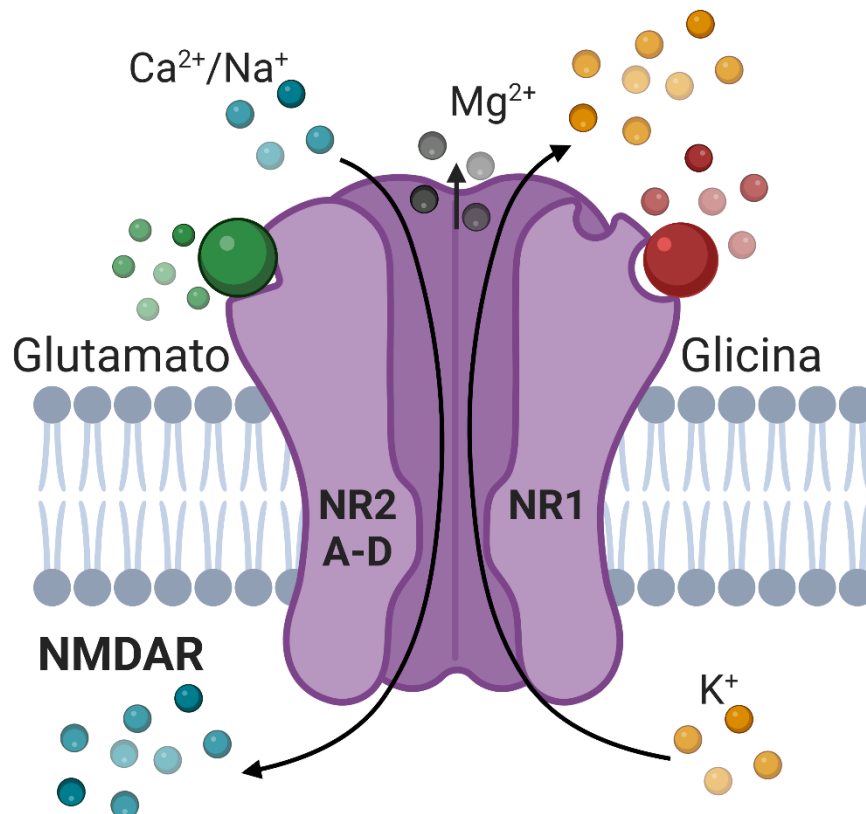


Figura 1: Estrutura do NMDAR. O receptor ionotrópico de glutamato NMDAR está representado acima, possuindo seu sítio de ligação ao agonista glutamato (esferas verdes) nas subunidades NR2 (A-D) e seu sítio de ligação ao co-agonista glicina (esferas vermelhas) na subunidade invariante NR1. Quando em repouso, o canal iônico está bloqueado por íons de magnésio (esferas cinzas). Após sua ativação e despolarização da membrana, os íons de magnésio são liberados, promovendo a abertura do canal iônico com o influxo de íons de cálcio e sódio (esferas azuis) e efluxo de íons de potássio (esferas laranjas). Figura criada no BioRender.com.

Recentemente, tem se observado que determinadas conformações do NMDAR podem levar tanto à sobrevivência das células neurais quanto à morte das mesmas (Luo *et*

al., 2011). De fato, altas concentrações de glutamato fora da fenda sináptica podem induzir uma ativação excessiva de seus receptores, com grande influxo de Ca^{2+} e posterior morte celular por apoptose, num processo conhecido por excitotoxicidade (McDonald *et al.*, 1998; Matute *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2013).

De forma interessante, os receptores de glutamato, principalmente o NMDAR, além de serem expressos em células neuronais também são encontrados em células da glia em modelos experimentais e em humanos, porém suas funções ainda não são bem compreendidas (Hösli e Hösli, 1993; Steinhäuser e Gallo, 1996; Vernadakis, 1996; Conti *et al.*, 1999; Shelton e McCarthy, 1999; Bergles *et al.*, 2000).

Desde a década de 90, diversos estudos demonstraram que receptores para neurotransmissores também são expressos por células do sistema imune, como por exemplo os linfócitos T e B de camundongos e humanos. Dentre eles podemos citar receptores para dopamina, das diferentes subfamílias (Santambrogio *et al.*, 1993; Barbanti *et al.*, 1996; Ricci *et al.*, 1998), receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ (Rosas-Ballina *et al.*, 2011), receptores $\beta 2$ adrenérgicos expressos por linfócitos T reguladores (Guereschi *et al.*, 2013) e receptores serotoninérgicos 5-HT₁ (Young *et al.*, 1993; Laberge *et al.*, 1996). Mais recentemente, a expressão de receptores de glutamato também foi observada em macrófagos (Mantuano *et al.*, 2017) e em linfócitos T (Lombardi *et al.*, 2001; Kvaratskhelia *et al.*, 2009; Fallarino *et al.*, 2010; Mashkina *et al.*, 2010; Kahlfuß *et al.*, 2014), sendo possível ainda observar o bloqueio de NMDAR em linfócitos T através da utilização do antagonista memantina (Kahlfuß *et al.*, 2014). De fato, tanto células da resposta imune inata como células da resposta imune adaptativa expressam receptores de glutamato de ambas as famílias (Storto *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2006).

Apesar da atuação do glutamato fora do SNC e da presença dos NMDAR em células do sistema imune, mais precisamente os linfócitos T, poucos trabalhos na literatura buscaram compreender sua biologia e, tampouco é sabida sua função em diferentes contextos da resposta imune, como por exemplo no GALT.

1.2 Microbiota e o sistema imune no GALT

A interface entre o meio externo e interno de todos os vertebrados abriga comunidades complexas e dinâmicas de microrganismos chamados de microbiota. Os intestinos de mamíferos abrigam a maior parte da microbiota de todo o corpo, contendo trilhões de comunidades microbianas comensais presentes no lúmen intestinal que estabelecem relações simbióticas com o hospedeiro. Essas comunidades bacterianas intestinais são altamente benéficas ao hospedeiro e desempenham funções importantes

como, digestão de compostos da dieta para aumentar posteriormente a absorção do conteúdo nos intestinos, degradação de xenobióticos e competição com agentes patogênicos (Hooper *et al.*, 2001; Hooper e Macpherson, 2010).

Somente em 2005 foi realizado o primeiro método molecular (sequenciamento genético de RNA ribossomal 16S) para identificar o perfil da microbiota intestinal de humanos, uma vez que 80% das espécies da microbiota intestinal não são cultiváveis, o que permitiu identificar a diversidade das comunidades microbianas e, até mesmo, novas espécies (Eckburg *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2008). A metodologia consiste em identificar a sequência constante do gene que codifica o RNA ribossomal 16S contido na subunidade 30S dos ribossomos de todos os procariotos, diferenciando as bactérias da microbiota e agrupando-as em espécies de acordo com as regiões variáveis e hipervariáveis do gene RNAr 16S (Furrie, 2006). A análise é chamada de metagenômica por identificar comunidades de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo (Hugenholtz e Tyson, 2008) e posteriormente são realizadas análises filogenéticas baseadas em uma biblioteca genômica de RNAr 16S para a identificação e o agrupamento das espécies (Hayashi *et al.*, 2005).

Devido ao grande número de bactérias intestinais, o hospedeiro apresenta uma persistente e constante ameaça a infecção, levando também em consideração a enorme área de superfície intestinal (aproximadamente 200 m² em humanos) que é protegida apenas por uma simples camada de células epiteliais colunares intestinais. Alterações quali ou quantitativas da microbiota decorrentes, por exemplo, do uso de antibióticos e outros medicamentos com efeito direto sobre seus componentes alteram o equilíbrio entre microbiota e hospedeiro, resultando em disbiose e contribuindo para o desenvolvimento de diversas patologias intestinais, sendo as mais comuns doenças inflamatórias intestinais agudas e crônicas. Para minimizar o contato entre os microrganismos luminiais e as células epiteliais, evolutivamente foram criadas barreiras físicas e químicas formadas por muco, peptídeos antimicrobianos e anticorpos IgA transportados ao lúmen. Porém, ocasionalmente, algumas bactérias invadem o tecido intestinal através das barreiras, o que demanda respostas antimicrobianas mais eficientes e específicas oferecidas por células do sistema imune presentes na lâmina própria intestinal (Hooper e Macpherson, 2010).

Os intestinos delgado e grosso são organizados em quatro camadas, do lúmen externo ao tecido interno, as camadas mucosa, submucosa, muscular e membrana serosa. A mucosa é a região que apresenta maior contato com os microrganismos luminiais e é formada pela camada simples de células colunares epiteliais, os enterócitos ou colonócitos, formados por sua vez pelo conjunto de células heterogêneas que desempenham diferentes

funções, as células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth, células M e células em tufo, que são organizadas em projeções semelhantes a dedos chamadas de vilos. Além disso, a região mucosa também é formada pelo tecido conjuntivo subjacente ao epitélio chamado de lâmina própria (LP), onde estão presentes células estromais, capilares sanguíneos e linfáticos, células imunes e folículos linfóides organizados chamados de placas de Peyer, responsáveis principalmente pela vigilância imunológica do lúmen intestinal. As diferentes células do sistema imune se encontram nas regiões mucosa e submucosa (Drolia *et al.*, 2018; Mestecky *et al.*, 2015).

Os tecidos linfóides associados à mucosa intestinal recebem o nome de GALT e abrigam as células do sistema imune que desempenham um papel fundamental na mucosa intestinal, promovendo não só a manutenção e o reparo tecidual, como também a tolerância aos microrganismos comensais da microbiota e aos antígenos alimentares. Esse papel tolerogênico é exercido tanto por células da imunidade inata, células dendríticas e macrófagos M2, quanto por células da imunidade adaptativa, linfócitos T reguladores (Treg) entre outros. As células do sistema imune presentes na mucosa intestinal são responsáveis principalmente pela tolerância local à componentes da microbiota, mas também iniciam processos inflamatórios após a invasão do epitélio por estes (Abbas *et al.* 2015).

Dispersas pela lâmina própria são encontradas células da imunidade inata, como células dendríticas (Becker *et al.*, 2003), macrófagos (Lee *et al.*, 1985), células NK (do inglês, *Natural Killer cells*) (Sanos *et al.*, 2009), células linfóides inatas (ILCs) (Ebbo *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017) e linfócitos T $\gamma\delta$ (Hoytema Van Konijnenburg *et al.*, 2017), e também células da imunidade adaptativa, dentre estas os linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ efetores (Neurath *et al.*, 2002) e reguladores (Barnes e Powrie, 2009), linfócitos B produtores de anticorpos IgA (Macpherson *et al.*, 2000) e células iNKT (do inglês, *invariant Natural Killer T cells*) (Olszak *et al.*, 2012).

Além das células encontradas na lâmina própria uma série linfócitos atípicos são encontrados entre as células epiteliais intestinais (compartimento intraepitelial do intestino), chamados de linfócitos intraepiteliais (IELs), e desempenham funções diretamente contra os microrganismos do lúmen intestinal, como os linfócitos TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻CD8⁻ (Mayans *et al.*, 2014), linfócitos TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ (Poussier *et al.*, 2002), linfócitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ (Konijnenburg *et al.*, 2017), entre muitos outros (Cheroutre, 2004; Cheroutre *et al.*, 2011).

No intestino delgado de camundongos, os linfócitos T $\gamma\delta$ intraepiteliais se localizam e possuem padrões de motilidade dependentes de microrganismos da microbiota, comportamento que é alterado em camundongos germ-free após infecção oral por

Salmonella enterica Typhimurium e também é dependente de interações com células epiteliais intestinais (Konijnenburg *et al.*, 2017).

Apesar de bem caracterizados fenotipicamente, ainda há muitas lacunas acerca da função destes linfócitos na imunobiologia da mucosa intestinal, tanto no contexto de tolerância como na vigência de processos inflamatórios ou infecciosos, tampouco se sabe sobre a dependência do glutamato nesse fenômeno (Hooper *et al.*, 2012).

1.3 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (do inglês, *Inflammatory Bowel Disease* - IBD) são distúrbios crônicos que causam inflamação no trato gastrointestinal de humanos, tendo etiologias multifatoriais (Baumgart and Carding, 2007). Na década passada, as IBDs emergiram como um desafio de saúde pública mundial devido ao acometimento de mais de 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos e mais de 2 milhões na Europa (Burisch *et al.*, 2013; Kaplan, 2015). Sendo tradicionalmente considerada como uma doença da cultura ocidentalizada (Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia e todos os países da Europa Ocidental), sua epidemiologia está em mudança desde o final do século 20 e início do século 21 com a recém industrialização nos países da Ásia, América do Sul e África, os quais aumentam a incidência de IBD (Molodecky *et al.*, 2012; Kaplan and Ng, 2017).

Dentre os sintomas mais comuns estão dor abdominal, diarreia, perda de peso e sangramento retal (Sands, 2007). Já as análises de biópsia de pacientes com a doença ativa mostram infiltração de células mono e polimorfonucleares (neutrófilos), erosão de enterócitos, perda de células caliciformes, abscessos de criptas e hiperplasia de células epiteliais intestinais (Morson and Patk, no date). A patogênese das IBDs é complexa e dependente de diversos fatores, sendo os principais envolvidos a pré-disposição genética, o meio ambiente e a microbiota, que culminam na ativação desregulada de células imunes contra a microbiota intestinal (De Souza and Fiocchi, 2016). Resumidamente, o primeiro evento que ocorre durante a IBD é a perda de integridade da barreira epitelial intestinal, o que leva a penetração de microrganismos para dentro do tecido intestinal. Em seguida, células do sistema imune presentes entre o epitélio e na lâmina própria dos intestinos, principalmente células imunes inatas como granulócitos e macrófagos, geram uma resposta inflamatória do hospedeiro que leva a disbiose da microbiota intestinal (Ni *et al.*, 2017).

Dentre as IBDs, as formas mais comumente encontradas são a doença de Crohn e a Colite ulcerativa. Suas etiologias e manifestações são distintas, sendo que a doença de Crohn é mais esparsa e acomete qualquer região do trato gastrointestinal e a Colite ulcerativa acomete principalmente a região do cólon (Ng *et al.*, 2017).

Diversas células do sistema imune participam do processo de patogênese nas IBD, tendo como as principais as células da imunidade inata. O infiltrado característico de neutrófilos contribuem para a perda da integridade e função de barreira intestinal, destruição tecidual através do dano oxidativo e proteolítico e a constante inflamação devido a liberação de diversos mediadores inflamatórios (Brazil, Louis and Parkos, 2013). Os macrófagos participam, principalmente, do processo inflamatório presente na doença de Crohn, onde possuem um fenótipo misto de macrófagos (CD14, CD33 e CD68) e células dendríticas (CD205 e CD209), produzindo as seguintes citocinas em abundância IL-6, IL-23 e TNF. Contribuem também com a produção de IFN- γ por células mononucleares (Kamada *et al.*, 2008). Já as DCs presentes na mucosa intestinal de humanos com doença de Crohn e Colite ulcerativa, expressam níveis aumentados de TLR2 e TLR4. Durante a doença de Crohn, as DCs ainda apresentam níveis reduzidos de RNA mensageiro para linfopoetina estromal tímica (TSLP), o que contribui com o estado inflamatório destas células, e um aumento na expressão de CD40 e CCR7 e produção de IL-6 e IL-12. Todos estes fatores contribuem para a retenção destas células no sítio de inflamação da mucosa intestinal, provendo a inflamação local (Hart *et al.*, 2005; Rimoldi *et al.*, 2005; Middel *et al.*, 2006).

Linfócitos T também participam da patogênese de IBD. Os subtipos mais encontrados na doença de Crohn são Th1 e Th17, onde são produzidas simultaneamente as citocinas IL-17 e IFN- γ por estas células, acreditando-se ser uma condição de fenótipo misto de células Th1/Th17 (Annunziato *et al.*, 2007; Globig *et al.*, 2014; Ramesh *et al.*, 2014). Ainda assim, níveis aumentados de IL-17 também são encontrados na mucosa e no soro de pacientes com Colite ulcerativa, porém, em menores quantidades que pacientes com doença de Crohn (Fujino *et al.*, 2003). Recentemente, também foi relato o envolvimento de células Th9 em pacientes com Colite ulcerativa, as quais produzem a citocina IL-9 e são poucos estudadas nesse contexto (Gerlach *et al.*, 2014). Células Treg (CD4+CD25+FoxP3+) possuem sua atividade reguladora prejudicada em pacientes com IBD. Apesar de estarem expandidas na lâmina própria intestinal, sua capacidade e função supressora não é o suficiente para controlar o processo inflamatório causado por células Th1/Th17 durante a patogênese em IBD (Maul *et al.*, 2005; Huijbrechtse, Van Lent and Van Deventer, 2007). Diversas terapias, como o uso de anti-TNF, visam expandir e estimular a função de células Treg presentes na mucosa de crianças e indivíduos adultos com IBD ativa (Ricciardelli *et al.*, 2008; Veltkamp *et al.*, 2011).

O estudo do envolvimento de células T em IBD se dá, principalmente, através de modelos experimentais de colite aguda e crônica. Estes são agrupados, em geral, em três,

sendo eles: colite induzida por químicos (Wirtz *et al.*, 2007; Neurath, 2012), modelo de colite de transferência de células T (Powrie, 1995) e modelo de colite crônica espontâneo. Existem pelo menos três tipos de reagentes químicos utilizados no primeiro modelo citado acima, sendo o dextran sulfato de sódio (DSS) o principal e mais utilizado na literatura podendo gerar manifestações agudas ou crônicas e envolvendo, principalmente células imunes inatas, seguido pelo hapteno ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e pela oxazolona (Boismenu and Chen, 2000). O modelo de colite de transferência de células T é o segundo modelo mais estudado, causado pela transferência adotiva de células T naïve ($CD4+CD45RB^{high}$) a animais deficientes de células T e B ($Rag1^{-/-}$), possibilitando assim a investigação de bases imunológicas tanto na indução quanto na progressão da inflamação intestinal, por ser um modelo crônico mediado por células T (Powrie, 1995; Leach *et al.*, 1996).

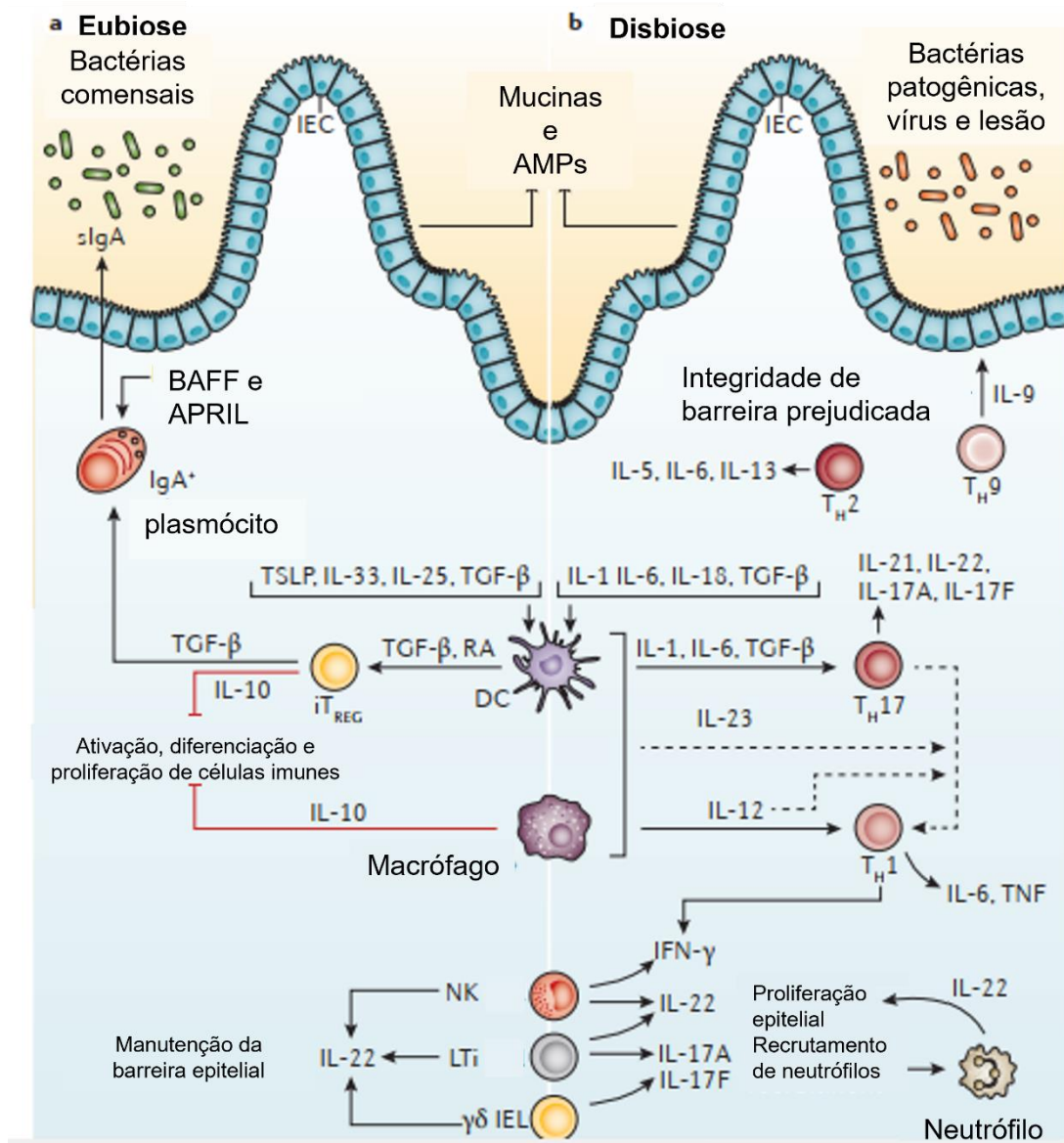


Figura 2: Células imunes da mucosa intestinal na homeostase e inflamação. **a)** Na presença de uma microbiota balanceada (eubiose), as células epiteliais intestinais secretam mucinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs), induzindo a produção de TSLP, IL-33, IL-25 e TGF- β , o que promove o desenvolvimento de DCs e macrófagos tolerogênicos. DCs induzem iTregs através de TGF- β e ácido retinóico (RA). Os plasmócitos produtores de IgA⁺ são gerados a partir do TGF- β produzidos por iTregs e BAFF e APRIL produzidos pelas células epiteliais intestinais. O fenômeno chamado de tolerância é induzido e mantido a partir dessa homeostase e da produção de TGF- β e IL-10 por iTregs e IL-10 também produzida pelos macrófagos. **b)** Com a disbiose e/ou lesões teciduais, as células epiteliais intestinais produzem citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-18) e DCs e macrófagos produzem IL-6, IL-12 e IL-23, que levam a diferenciação de células Th1 e Th17. Células Th2 e Th9 também podem ser diferenciadas dependendo das citocinas no meio, levando a perda da integridade de barreira. Células linfoides inatas (NK, LTi e IEL T $\gamma\delta$) são ativadas através das citocinas pró-inflamatórias, produzindo por sua vez IL-22, IL-17A e IL-17F e promovendo o recrutamento de neutrófilos e proteção da barreira epitelial. Adaptado de De Souza, H. S. P. e Fiocchi, C. Nature Reviews, 2016.

Contudo, considerando o papel de células T na patogênese de IBD, muito pouco se sabe sobre a participação do glutamato no agravamento ou melhora da inflamação intestinal nessas doenças.

1.4 O sistema nervoso entérico

A divisão anatômica classifica o sistema nervoso em SNC e sistema nervoso periférico (SNP), este último por sua vez é ainda dividido por sua funcionalidade em sistema nervoso somático (SNS) e sistema nervoso autônomo (SNA). O SNA ainda possui duas subdivisões, a divisão simpática e a divisão parassimpática. Ambas as divisões regulam as funções de todos os sistemas e órgãos de mamíferos, involuntariamente. O sistema nervoso entérico é uma das principais divisões do SNA que é encontrado na parede de todo o trato gastrointestinal, desde o esôfago até o ânus (Mai e Paxinos, 2011).

O sistema nervoso entérico é o único local onde se encontram grupamentos de neurônios fora do SNC. Em humanos, o SNE contém aproximadamente 500 milhões de neurônios, classificados funcionalmente em cerca de 20 classes. É constituído por células neuronais e por células da glia agrupadas em gânglios interligados uns aos outros por feixes de fibras nervosas. Os gânglios são relativamente pequenos, porém muito numerosos, o que condiz com a enorme quantidade de células nervosas encontradas nesse sistema. Como os gânglios encontrados normalmente no SNP, os gânglios do SNE também promovem o encontro de dois ou mais neurônios o que gera inervações para todos os componentes do tubo digestivo, desde a musculatura até o epitélio e vasos sanguíneos. Outro aspecto que torna o SNE especial, é que seus reflexos independem de comandos do SNC, o que é controlado pelo intercâmbio de sinais entre os dois sistemas (Furness, 2008).

As primeiras descrições de plexos ganglionares no trato gastrointestinal foram realizadas pelos médicos e anatomistas Georg Meissner em 1857, Theodor Billroth em 1858 e Leopold Auerbach em 1862. Foram descritos dois tipos de plexos principais

encontrados nos intestinos delgados e grosso: o plexo mioentérico ou plexo de Auerbach; e o plexo submucoso ou plexo de Meissner. O plexo mioentérico é encontrado entre as camadas musculares longitudinais e circulares do músculo que reveste os intestinos e apresentam a maior concentração de neurônios. Já o plexo submucoso é encontrado na camada submucosa que se situa mais internamente em todo o intestino, apresentando a minoria dos neurônios (Wood *et al.*, 1999); Furness, 2008).

O primeiro mapeamento do SNE utilizando diversas técnicas foi realizado em 2002 (Schemann *et al.*, 2002). Pequenos grupos de corpos de neurônios foram encontrados na submucosa e mucosa, mais especificamente na lâmina própria do intestino delgado de humanos e porcos (Fang *et al.*, 1993; Balemba *et al.*, 1998). A inervação da mucosa do intestino delgado é dividida em quatro componentes: plexo subglandular, plexo periglandular, plexo subepitelial e plexo viloso. As fibras nervosas que inervam a mucosa do intestino delgado penetram apenas o tecido conjuntivo da lâmina própria, não penetrando o epitélio. Por esse motivo, as fibras nervosas interagem com células do sistema imune ali presentes, o que nos leva a inferir a presença de mecanismos neuroimunes importantes (Furness, 2008).

A interação entre os neurônios entéricos e o intestino ocorre através da secreção de neurotransmissores que se ligam à receptores específicos encontrados em diversas células presentes nas camadas mucosa, submucosa e muscular, incluindo aquelas do sistema imune. Os primeiros neurotransmissores descritos, secretados por neurônios motores entéricos excitatórios, foram as taquicininas, como a neuroquinina A, os neuropeptídeos K e γ , a substância P, e a acetilcolina (Taylor e Bywater, 1986; Holzer *et al.*, 1993).

Ainda na década de 80, foi demonstrada a expressão de receptores para aminoácidos excitatórios, possivelmente do tipo ionotrópico NMDAR, no plexo mioentérico em cobaias (Moroni *et al.*, 1986). Outros neurotransmissores também foram relatados, são estes: ATP, óxido nítrico (NO), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo ativador da adenilato ciclase da hipófise (PACAP) (Porter *et al.*, 1997; Lecci *et al.*, 2002). Sabe-se que existe uma relação direta entre a regulação dos neurotransmissores inibidores, em que o NO regula a liberação de VIP e PACAP, e VIP e PACAP por sua vez estimulam a produção de NO durante o peristaltismo (Grider *et al.*, 1994).

Mais recentemente foi relatado o papel do glutamato na detecção química de nutrientes envolvendo nervos gustativos e as vias humoral e neural (vagal) de conexão entre o intestino e o cérebro que impactam a função intestinal, o comportamento e a preferência alimentar. Sendo assim, o glutamato age como molécula sinalizadora do sistema nervoso entérico e modula os reflexos neuroendócrinos do trato gastrointestinal

através de sua ligação a neurônios sensores locais que aumentam os processos digestivos através do reflexo vago-vagal (Tomé, 2018).

Desde a década de 90 estudos relatam a presença de neurônios secretores de glutamato nos gânglios dos plexos mioentérico e submucoso de porquinhos-da-índia e ratos (Kirchgessner *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Foi demonstrado que fibras nervosas glutamatérgicas são abundantes em ambos os plexos ganglionares e na região mucosa. No íleo de cobaias, todos os neurônios glutamatérgicos co-expressam colina acetiltransferase (ChAT) e substância P (SP) (Liu *et al.*, 1997). Estes neurônios presentes no plexo submucoso de cobaias que expressam ChAT e SP são considerados neurônios aferentes primários que se projetam para a mucosa e respondem a estímulos sensoriais do intestino (Kirchgessner *et al.*, 1992).

As evidências de receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato no sistema nervoso entérico se deram por imunohistoquímica e hibridização *in situ* também na década de 90, onde foi relatado a expressão do RNA mensageiro para NR1 em neurônios do intestino de ratos (Burns *et al.*, 1994; Burns e Stephens, 1995). Além da subunidade NR1, as subunidades NR2a e NR2b do receptor NMDA também foram encontradas em neurônios dos plexos mioentéricos e submucoso do íleo de porquinhos-da-índia (Liu *et al.*, 1997) e do cólon de ratos, onde também encontraram a subunidade NR1 em fibras nervosas na mucosa. Sendo assim, o NMDAR pode estar presente tanto em neurônios primários aferentes espinhais (McRoberts *et al.*, 2001) quanto vagais (Hornby, 2001).

A concepção de que o sistema nervoso e o sistema imune podem influenciar um ao outro de maneira sofisticada foi proposta pelo menos há duas décadas atrás (Ader *et al.*, 1990). Recentemente, sabe-se que o sistema nervoso entérico e o sistema imune estão intimamente relacionados, pois se associam para manter a homeostase entre o corpo e a microbiota. Foi demonstrado, por exemplo, que microrganismos comensais regulam a motilidade intestinal através da interação de neurônios entéricos e macrófagos encontrados na camada externa da musculatura do intestino grosso (Muller *et al.*, 2014). Além disso, as fibras nervosas que inervam a mucosa do intestino delgado penetram apenas o tecido conjuntivo da lâmina própria, local, como já mencionado, de grande abundância de células do sistema imune e, que, de forma inquestionável devem interagir para promover a homeostase tecidual (Furness, 2008).

Sendo assim, levando-se em consideração a importância do GALT na modulação da resposta imune local, associada à presença do neurotransmissor glutamato, seja advindo do SNE, seja de células dendríticas teciduais ou da dieta, no presente projeto, investigamos os fenômenos celulares e moleculares presentes nesta interação. Mais especificamente,

estudamos o papel do NMDAR na imunobiologia de linfócitos T da lâmina própria intestinal em modelo murino, tanto na manutenção da homeostase fisiológica, como no advento de modelos de doenças inflamatórias intestinais, como a colite aguda e crônica, assim como, na tolerância oral.

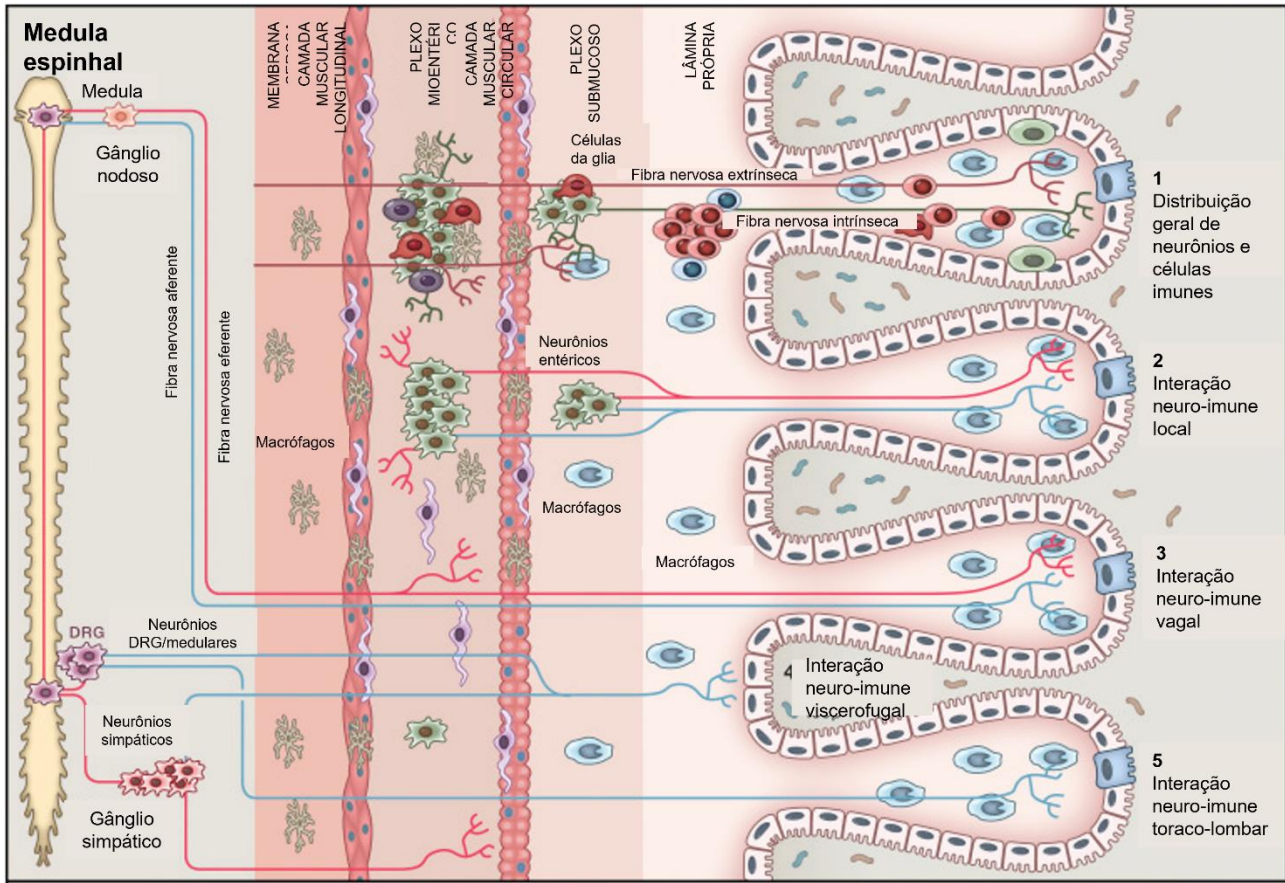


Figura 3: Interações neuro-imunes nos intestinos. 1) A maioria das células imunes são encontradas na região da lâmina própria intestinal, enquanto os corpos celulares neuronais são restritos aos plexos mioentérico e submucoso, regiões onde também se encontram macrófagos musculares e mastócitos. Processos neuronais extrínsecos e intrínsecos inervam todas as camadas de ambos os intestinos. Perturbações no lúmen intestinal são sentidas inicialmente por IECs, células imunes inatas ou diretamente por neurônios. Entre vários possíveis circuitos neuro-imunes, quatro são descritos: 2) circuito neuro-imune local curto entre a lâmina própria e células imunes presentes na camada muscular, assim como o sistema nervoso intrínseco e extrínseco. 3) Interações neuro-imunes vagas envolvendo fibras nervosas aferentes e eferentes originadas da medula oblonga. 4) a- Interações neuro-imunes de longo alcance com fibras intestino-fugais projetadas da medula espinhal ou de gânglios b- fibras aferentes e eferentes originadas no gânglio da raiz dorsal ou medula espinhal, respectivamente. Adaptado de Fernandes, H. V. e Mucida, D. Cell, 2017.

Levando em consideração que fibras nervosas dos plexos submucoso e mioentérico inervam a mucosa do intestino delgado, penetrando principalmente a lâmina própria, os neurônios ali presentes interagem com as células do sistema imune encontradas nessa região através da secreção de neurotransmissores. Como já se sabe, células da imunidade inata e adaptativa expressam receptores para neurotransmissores excitatórios, como por exemplo receptores ionotrópicos de glutamato do tipo NMDAR. Na mucosa intestinal são encontrados linfócitos T abundantemente sendo esses bem caracterizados

fenotipicamente, porém com poucas descrições sobre suas funções na imunobiologia da lâmina própria. Considerando ainda que o glutamato também pode ser absorvido pela dieta e metabolizado por algumas bactérias comensais da microbiota, nossa hipótese foi que a deficiência de NMDAR especificamente em linfócitos $T\alpha\beta$ poderia desempenhar um papel importante na interação entre a microbiota e o hospedeiro, o que poderia levar ao agravamento de doenças inflamatórias intestinais.

2. OBJETIVOS

Investigar o papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR presente em células $T\alpha\beta$ na modulação da homeostase e inflamação intestinal.

2.1. Objetivos específicos

- Confirmar a deleção específica do NMDAR em células $T\alpha\beta$ $CD4^+$ e $CD8^+$ no baço, timo, lâmina própria e compartimento intraepitelial intestinais, assim como seus respectivos linfonodos drenantes por citometria de fluxo e no intestino delgado por imunofluorescência em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$;
- Quantificar a expressão gênica das isoformas NR2a, NR2b, NR2c e NR2d do NMDAR em células do baço, linfonodos mesentéricos e compartimento intraepitelial do intestino delgado em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$;
- Avaliar a integridade e permeabilidade da barreira mucosa do intestino delgado em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$;
- Caracterizar fenotipicamente os linfócitos $T\alpha\beta$ $CD4^+$ e $CD8^+$ e linfócitos $T\gamma\delta$ na lâmina própria e compartimento intraepitelial intestinais e seus respectivos linfonodos drenantes em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ naïve e após colite por citometria de fluxo;
- Avaliar a produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos $T\alpha\beta$ $CD4^+$ na lâmina própria e compartimento intraepitelial intestinais e seus respectivos linfonodos drenantes em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ naïve e após colite por citometria de fluxo;
- Avaliar fenotipicamente os linfócitos $T\alpha\beta$ $CD4^+$ e $CD8^+$ e linfócitos $T\gamma\delta$ e a produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos $T\alpha\beta$ $CD4^+$ no baço de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ após tolerância oral por citometria de fluxo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$, de ambos os sexos, com 8 a 10 semanas de idade. Ambos os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro) no Biotério do Departamento de Imunologia. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP) em 12/11/2018, nº de protocolo 1287040618 (**Anexo 1**). Para o experimento de colite através da transferência de células T, foram utilizados camundongos machos $Rag1^{-/-}$ de 8 semanas de idade obtidos do Jackson Laboratory e mantidos no Biotério do Brigham and Women's Hospital na Harvard Medical School aprovados pela Comissão de Animais, segundo protocolo 2016N000230 (**Anexo 2**).

3.2 Tolerância Oral

Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade foram alimentados continuamente com 8 mg/mL de ovalbumina (OVA) em sua água por 5 dias. Animais controles de ambas as linhagens receberam apenas água comum. Três dias após a ingestão de OVA, todos os grupos foram imunizados com 50 µg de OVA no adjuvante completo de Freund (CFA - BD Biosciences, 231131) em seus flancos ventrais, pela via subcutânea (s.c.). Respostas in vitro e in vivo foram avaliadas 10 dias após a imunização. Para a análise in vitro, células do baço foram estimuladas com 100 µg/mL de OVA (livre de LPS) ou com 1 µg/mL de anti-CD3, para a avaliação antígeno-específica ou não, respectivamente, através da dosagem da incorporação de timidina trifosfato (Sigma, T0251). Além disso, para as análises in vivo, células do baço também foram avaliadas por citometria de fluxo, conforme o item 3.10.

3.8 Colite induzida com DSS

Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade foram submetidos ao modelo experimental de colite aguda através da administração de 2.5% de DSS (Colitis grade, 36.000-50.000, MP Biomedicals, 9011-18-1) em sua água por sete dias e, após este período, este foi substituído por água normal pelos próximos três dias. No dia 10 após o início do tratamento, os animais foram sacrificados para as análises de histologia intestinal, conforme o item 3.12, e de células do cólon e linfonodos cecais por citometria de

fluxo, conforme o item 3.10. O peso corporal e os seguintes sinais e sintomas clínicos e macroscópicos foram monitorados diariamente: perda de peso, diarreia, sangue oculto nas fezes, sangramento retal, comprimento do intestino grosso, adesões e obstruções intestinais. Para o modelo experimental de colite aguda, camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade ingeriram 2.5% de DSS em sua água por sete dias, em três ciclos. O primeiro e segundo ciclo incluíram sete dias de DSS seguido de 14 dias de repouso, através da substituição por água normal, e o terceiro ciclo consistiu em sete dias de DSS seguido por três dias de repouso com água normal. Os animais foram sacrificados no dia 52 para as mesmas análises do modelo de colite aguda.

3.9 Colite induzida por transferência de linfócitos T

Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ foram sacrificados e o baço e linfonodos foram coletados para o enriquecimento de células T CD4+ com as microbeads de isolamento CD4 mouse (MACS, 130-117-043, clone L3T4), seguido pelo *cell sorting* de células T CD4+ naïve (CD4+CD45RB^{high}CD25-) em citômetro FACS Aria II cell sorter (BD Bioscience). Após a separação, as células T CD4+ naïve de ambos os grupos foram processadas, individualmente e contadas. 0.6×10^6 células, de cada grupo, foram transferidas ao camundongo receptor $Rag1^{-/-}$ no dia 0 de tratamento. Nas primeiras três semanas, ambos os grupos receptores $Rag1^{-/-}$ foram monitorados quanto a perda de peso uma vez por semana. Após a terceira semana da transferência adotiva, os animais passaram a ser monitorados quanto a perda de peso diariamente, assim também foram monitorados os sinais e sintomas clínicos da colite crônica. Ambos os grupos foram sacrificados 12 semanas após a transferência adotiva de células T CD4+ naïve para as análises de histopatologia e citometria de fluxo, conforme descritas anteriormente.

3.5 Separação magnética de células T CD4+ e CD8+ do baço

Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ foram sacrificados e o baço foi coletado e depositado em peneiras de 70 μ m (Cell Strainer) para posterior maceração com êmbolo de seringa de 1 mL em meio RPMI1640 (LGC Biotecnologia). As células em suspensão foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão de lise celular e aguardamos um minuto para a lise das hemácias. Em seguida, foi adicionado 9 mL de PBS 1x e o tubo foi novamente centrifugado a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI completo (1% l-glutamina, 1% aminoácidos não-essenciais, 1% penicilina/streptomicina, 1% piruvato de sódio, 1% MEM-

vitamina e 10% de soro bovino fetal - SBF) para a contagem celular. Para o enriquecimento e separação de células CD4+ ou CD8+ foram utilizados os kits MagniSort™ Mouse CD4 T Cell Enrichment Kit e MagniSort™ Mouse CD8 T Cell Enrichment Kit, separadamente. Parte das células foram ressuspensas na concentração de 1×10^7 células/100 μ L e depositadas em tubo de 5 mL. Em seguida, foi adicionado 20 μ L do coquetel de anticorpos de cada kit, separadamente, a cada 100 μ L de suspensão celular e o tubo foi vortexado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). As células foram lavadas e seus sobrenadantes descartados. A seguir, foi adicionado a mesma proporção das beads de seleção negativa e as amostras foram novamente incubadas por 5 minutos a TA. Foi adicionado até 2.5 mL do volume total do tampão de separação e foi homogeneizado por pipetagem. O tubo foi inserido dentro do magneto e as amostras foram incubadas por mais 5 minutos a TA. O sobrenadante foi passado para um novo tubo, vertendo cuidadosamente por 1 segundo. Nesse sobrenadante estavam contidas as células negativamente selecionadas, CD4+ ou CD8+. As células foram passadas para novos tubos de 1.5 mL e armazenadas em TRIzol para posterior análise por PCR em tempo real.

3.6 Obtenção de células do baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais

Após o sacrifício dos animais, o baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais foram coletados e depositados em peneiras de 70 μ m dentro de placas de Petri para maceração com êmbolo de seringa de 1 mL em meio RPMI. As células em suspensão foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As hemácias provenientes apenas do baço foram lisadas conforme descrito no item acima. Após isso o pellet foi ressuspensado em 1 mL de meio RPMI completo para a contagem de células viáveis coradas com 0,5% de azul de tripan em câmara de Neubauer. Posteriormente, as células foram ou armazenadas em TRIzol® (Invitrogen, EUA) para posterior análise por PCR em tempo real ou submetidas ao protocolo de marcação extra e intracelular para determinar sua frequência e fenótipo por citometria de fluxo.

3.7 Obtenção de células da mucosa do intestinal

Após a retirada dos linfonodos mesentéricos, foram coletados o intestino delgado e grosso. Ambos os intestinos foram depositados em uma placa de Petri contendo 10 mL de HBSS livre de cálcio e magnésio (-/-) gelado com 5% de SBF e 25 mM de HEPES. Primeiramente, realizamos a limpeza do tecido através da remoção de todo o tecido conjuntivo e a gordura do mesentério. Após isso, todas as placas de Peyer foram removidas do intestino delgado e, ambos os intestinos, foram abertos através de um corte longitudinal.

Com os intestinos abertos, as fezes e muco foram removidos. Foram realizados cortes de 1,5 a 2 cm e os pedaços de tecido foram adicionados a um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de HBSS +/- com 10% de SBF, 15 mM de HEPES, 5 mM de EDTA e 1 mM de DL-Dithiotreitol (DTT). O tubo foi incubado por 20 minutos em um agitador aquecido à 37 °C. As células do epitélio e da lâmina própria foram separadas de acordo com as etapas 3.7.1 e 3.7.2, respectivamente. Passamos os pedaços de intestino delgado sobre uma peneira de aço inoxidável depositada em um becker de 500 mL para a remoção do sobrenadante, onde estão contidas as células epiteliais e linfócitos intraepiteliais. Os pedaços do tecido foram transferidos a um novo tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de HBSS +/- com 2 mM de EDTA e 25 mM de HEPES, livre de SBF e agitados por aproximadamente 30 segundos. O conteúdo foi novamente depositado sobre a peneira. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, para a separação completa das células epiteliais e intraepiteliais.

3.7.1 Linfócitos intraepiteliais intestinais

A suspensão celular contida no sobrenadante foi filtrada em peneira de 70 µm sobre de um novo tubo cônico de 50 mL e centrifugada a 500 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 5 mL de Percoll a 37% e, em seguida, transferido para um novo tubo de 15 mL e centrifugado a 800 g por 20 minutos, a 22 °C com o freio desligado. Após isso, o sobrenadante foi removido cuidadosamente por aspiração e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI e, novamente, transferido para um novo tubo de 15 mL. Foi adicionado mais 9 mL do meio ao tubo e este foi centrifugado a 500 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1 mL de meio RPMI completo para posterior contagem de células e armazenagem em TRIzol para posterior análise por PCR em tempo real ou marcação para análise por citometria de fluxo.

3.7.2 Linfócitos da lâmina própria intestinal

Após a separação de células epiteliais e linfócitos intraepiteliais, os pedaços de intestino delgado e grosso foram transferidos para um novo tubo de 2 mL contendo 1 mL de HBSS +/- com 2 mM de EDTA e 25 mM de HEPES, livre de SBF. Os tecidos foram novamente cortados em pedaços menores e os tubos centrifugados a 2000 g por 1 minuto, a 4 °C. O sobrenadante, contendo o restante de gordura, foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os pellets foram ressuscitados em 1 mL da solução de digestão recém-preparada contendo meio X-Vivo, 0.5 mg de Liberase TL Research Grade (Roche-Sigma Aldrich, 5401020001) e 0.2 mg de DNase do tipo I (Sigma) e, em seguida, transferidos para

um novo tubo cônico de 50 mL. Adicionamos mais 9 mL da solução de digestão a cada tubo e estes foram incubados por 35 minutos em um agitador aquecido à 37 °C. Foi adicionado 10 mL de HBSS com 5 mM de EDTA após a incubação, para estacionar a ação enzimática da Liberase e DNase, e o conteúdo foi depositado em uma peneira de 100 µm sobre um novo tubo cônico de 50 mL. O tecido sobre a peneira foi macerado com o auxílio de um êmbolo de seringa de 1 mL e, em seguida, adicionamos mais 10 mL de HBSS (-/-) com 5% de SBF e 25 mM de HEPES sobre o tecido. A suspensão foi centrifugada a 500 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 5 mL de Percoll a 37%e, em seguida, transferido para um novo tubo de 15 mL e centrifugado a 800 g por 20 minutos, a 22 °C com o freio desligado. Após isso, o sobrenadante foi removido cuidadosamente por aspiração e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI e, novamente, transferido para um novo tubo de 15 mL. Foi adicionado mais 9 mL do meio ao tubo e este foi centrifugado a 500 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1 mL de meio RPMI completo para posterior contagem de células e marcação para análise por citometria de fluxo.

3.8 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

O mRNA foi extraído utilizando a técnica de TRIzol seguindo especificações do fabricante. Brevemente, foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol sobre a suspensão celular de cada tecido analisado. Posteriormente adicionou-se 500 µL de clorofórmio, após centrifugação, a fase aquosa foi retirada e transferida para outro tubo seguido da adição de 500 µL de isopropanol. Após 10 minutos a T.A. as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Ao pellet, foi adicionado 1 mL etanol 75% e centrifugado, o etanol foi retirado. A última etapa foi realizada 3x para se obter RNA livre de contaminações. Por final, após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo mantido invertido na bancada até a secagem total do pellet. Ao final, adicionou-se ao pellet água ultrapura e a concentração de RNA total foi determinada em NanoDrop (Thermo) dentro dos parâmetros de 260/280nm. Para a extração de RNA do soro foi utilizado o kit de extração QIAmp viral RNA mini (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

Para a síntese de cDNA, foi realizada uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 2,0 µg de RNA diluídos em 10 µL de água ultrapura foram adicionados a 10 µL de mix (2 µL RT buffer, 2 µL de RT random primers, 1 µL de multscribe e 0,8 µL de dNTPs e 4,2 µL de água ultrapura). A síntese de cDNA foi realizada no termociclador da Applied Biosystems seguindo os seguintes parâmetros: 25°C por 10 minutos; 37° C por 120 minutos; e 85° C por 5 minutos.

3.9 Quantificação de mRNA por PCR em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, foi avaliada a expressão de mRNA por PCR em tempo real (pPCR). A cada reação de PCR, foi adicionado 200 µM do primer forward, 200 µM do primer reverse sintetizados, 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4309155) e 46 ng de cada amostra de cDNA totalizando um volume final da reação de 10 µL. A reação de qPCR foi realizada no aparelho QuantStudio3 (Applied Biosystems) e submetidas aos seguintes ciclos: 1 - 50°C por 2 minutos; 2 - 95°C por 2 minutos; 3 - 95°C por 15 segundos e 4 - 60°C por 1 minutos. Os passos 3 e 4 foram repetidos 40 vezes. As curvas foram normalizadas pela expressão da β-actina. A expressão gênica foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fold change), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (experimental) – ΔCt (controle), e ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno. Segue abaixo a lista dos genes e as sequências dos primers utilizados para avaliação dos genes que compõem a subunidade NR2 (*Grin2*) do NMDAR e genes relacionados as subpopulações de linfócitos T helper (**Tabela 1**).

Gene	Espécie	Sequência Forward	Sequência Reverse
<i>Actb</i>	camundongo	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Grin2a</i>	camundongo	ACGTGACAGAACGCGAACTT	TCAGTGCGGTTTCATCAATAACG
<i>Grin2b</i>	camundongo	GCCATGAACGAGACTGACCC	GCTTCCTGGTCCGTGTCATC
<i>Grin2c</i>	camundongo	GCCCTGCTTCTCACTTCACTC	GTTGGTATTGTTGACCCCGAT
<i>Grin2d</i>	camundongo	TGGAGGAGTACGACTGGACAT	CGCACTGACACTACGGAGC
<i>Il2</i>	camundongo	TGAGCAGGATGGAGAATTACAGG	GTCCAAGTTCATCTTCTAGGCAC
<i>Il6</i>	camundongo	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
<i>Il17</i>	camundongo	TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA	CTTTCCTCCGCATTGACAC
<i>Foxp3</i>	camundongo	CCCATCCCCAGGAGTCTTG	ACCATGACTAGGGGCACTGTA
<i>Tbx21</i>	camundongo	AGCAAGGACGGCGAATGTT	GGGTGGACATATAAGCGGTTC

Tabela 1. Lista de primers utilizados para avaliação de mRNA dos genes em interesse.

3.10 Citometria de fluxo

As suspensões celulares do baço, timo, lâmina própria (LP) e linfócitos intraepiteliais (IEL) do intestino delgado, cólon-LP e IEL, céco-LP, linfonodos mesentéricos e linfonodos cecais foram submetidas ao protocolo de marcação de superfície ou estimuladas por 3 horas com 50 ng/mL de PMA (Sigma), 1 µM de ionomicina (Sigma-Aldrich) e 1 mg/mL de monensina ou Golgi Stop (BD Biosciences) em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂, para marcação de citocinas intracelulares. Para a marcação de superfície, as células foram

incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com 1:1000 de Zombie Aqua Fixable Viability (Biolegend), para exclusão de células mortas. Em seguida, as células foram lavadas com FACS Buffer (HBSS -/-, 2% de SBF, 2 mM de EDTA e 25 mM de HEPES) e incubadas com o coquetel de anticorpos anti-mouse: CD4 (1:300 - BV605), CD8a (1:300 - BV711), CD8b (1:300 - APC-Cy7), CD25 (1:200 - PE), CD45 (1:300 - BUV395), CD103 (1:200 - BUV496), TCR β (1:200 - PE-Cy7) e TCR $\gamma\delta$ (1:200 - PercP) (Biolegend) por 30 minutos a 4 °C, diluídos em FACS Buffer. Para a marcação do NMDAR foi utilizado 1:100 do anticorpo biotinelado anti-NMDAR1 (Biolegend, 818606), junto com os marcadores de superfície, seguido pela incubação por mais 30 minutos a 4 °C com 1:300 da estreptavidina (BV421, Biolegend, 405226). Após as incubações relatadas, as células foram novamente lavadas com FACS Buffer e o sobrenadante removido. As suspensões utilizadas para o painel de marcação de NMDAR1 foram em seguida adquiridas, sem fixação. As demais células foram fixadas por 20 minutos a temperatura ambiente com o fixador Cytoperm/Cytofix Transcriptional Factor Staining Buffer Set (eBioscience-Invitrogen, 00-5523-00) e lavadas e ressuspensas em FACS Buffer para então serem adquiridas. Para a marcação intracelular, após a incubação de três horas as células passaram pelas mesmas etapas descritas acima (marcação de viabilidade, coquetel de anticorpos de superfície e fixação). As células foram permeabilizadas com Perm/Wash Buffer (eBioscience) e lavadas em seguida a fixação. O sobrenadante foi removido e, em seguida, foi adicionado o seguinte coquetel de anticorpos intracelulares anti-mouse: IL-10 (1:100 - PE-TexasRed), IL-17 (1:100 - BV711), IFN- γ (1:100 - BV421) e FoxP3 (1:100 - AlexaFluor 488) (Biolegend) diluídos em Perm/Wash, e as células foram incubadas de 30 minutos a 1 hora a 4 °C. A seguir, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em FACS ou Perm/Wash Buffer. As aquisições de citometria de fluxo foram realizadas no citômetro FortessaLSR ou Symphony (BD Biosciences) utilizando o software DIVA (BD Biosciences). Todos os dados foram analisados no software FlowJo versão X.07 (TreeStar Inc.).

3.11 Permeabilidade e trânsito intestinal

Os animais foram mantidos em jejum absoluto por 6 horas e, após este período, foi administrado 150 μ L (120 μ g) de Dextran-FITC 4-kDa diluído em água via intragástrica por gavagem e a água e ração repostas. Os animais foram sacrificados após 2 horas da administração por deslocamento cervical e o sangue total foi coletado por punção cardíaca, adicionado a um tubo de 1.5 mL e o soro foi separado após centrifugação a 2000 g por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado a perfusão do animal com PBS 1x e o intestino delgado foi coletado e posicionado em uma placa de Petri contendo

aproximadamente 10 mL de PBS 1x gelado. Com o intestino ainda inteiro, os segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo foram separados e colocados em seus respectivos tubos de 1.5 mL contendo 1 mL de PBS 1x. O tecido intestinal foi cortado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica em pedaços pequenos, os conteúdos luminais liberados foram homogeneizados por 45 segundos e as partículas grossas foram removidas por centrifugação a 300 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para mensurar o Dextran-FITC. Para a mensuração por fluorescência, o soro foi diluído 1:5 em água Milli-Q e o sobrenadante dos conteúdos intestinais foi diluído 1:100 também em água Milli-Q. A fluorescência foi medida pelo espectrofotômetro em placa de 96 wells branca na excitação de 485 nm e emissão em 525 nm. As concentrações de Dextran-FITC foram determinadas de acordo com a curva padrão também diluída em água Milli-Q de 0 a 500 µg/mL. Os sinais de emissão no plasma e no sobrenadante dos conteúdos intestinais de animais tratados apenas com água foram subtraídos dos camundongos tratados com Dextran-FITC 4-kDa.

3.12 Histologia do cólon

O cólon dos animais provenientes dos modelos de colite aguda e crônica, através da administração de DSS e transferência adotiva de células T, foram extraídos e, em seguida, realizamos a abertura e limpeza das fezes e muco. Em seguida, o tecido intestinal foi fixado em paraformaldeído 4% gelado diluído em PBS 1x durante 24 a 48 horas a 4 °C. Após a fixação, foi utilizada a técnica de Swiss Roll para enrolar o cólon e os tecidos foram adicionados ao álcool 70%. As amostras foram enviadas ao serviço de histologia da Harvard Medical School para serem seccionadas em 5 µm de espessura em micrótomo automático (Leica Biosystems). Lá, as lâminas também foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e avaliadas por patologistas treinados quanto aos seguintes parâmetros para a análise do escore histológico da colite através do dano tecidual: 0 - normal; 1 - foco isolado de dano epitelial e presença de neutrófilos na lâmina própria; 2 - erosões e ulcerações na mucosa, com infiltrado mononuclear; 3 - dano tecidual extenso, hiperplasia de epitélio, perda de células caliciformes e abscessos nas criptas; 4 - inflamação transmural. Em seguida, realizamos o escaneamento das lâminas em microscópio DMi8 Widefield (Leica Biosystems) no aumento de 20X. As imagens foram analisadas através da plataforma online eSlide Manager (Aperio).

3.13 Imunofluorescência do intestino delgado

O intestino delgado de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e seus controles *Grin1^{fl/fl}* naïve foram e, em seguida, realizamos a abertura e limpeza das fezes e muco. Em seguida, o

tecido intestinal foi segmentado em duodeno, jejuno e íleo e fixado em paraformaldeído 4% gelado diluído em PBS 1x durante 24 a 48 horas a 4 °C. Após a fixação, foi utilizada a técnica de Swiss Roll para enrolar cada segmento individualmente e os tecidos foram então desidratados em um gradiente de sacarose, sendo a primeira concentração a 15% por 12 horas e a segunda concentração a 30% por 24 a 36 horas a 4 °C, em tubos cônicos de 15 mL. Após isso, as amostras foram congeladas em OCT TissueTek (Sakura) com gelo seco e mantidas no freezer -80 °C. Em seguida, as amostras foram seccionadas em micrótomo automático (Leica Biosystems) em 18 µm de espessura e posicionadas sobre lâminas polarizadas SuperFrost Plus (VWR International). Após a secagem das lâminas, foi adicionado acetona para fixação dos segmentos intestinais, até sua total evaporação. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas com PBS 1x por 5 minutos a temperatura ambiente três vezes. Em seguida, foi realizado o bloqueio com a solução de PBS 1x contendo 10% de soro normal de cavalo (NHS), 2% de albumina sérica bovina (BSA), 1% de glicina e 0.1% de Triton X-100 por 1 hora a temperatura ambiente. Foram adicionados os anticorpos primários hamster anti-mouse CD3e (BD Pharmingen, 553057, 1:300) e rabbit anti-mouse NMDAR1 (Abcam, ab109182, 1:100) diluídos em PBS 1x com 5% de NHS e 2% de BSA, e as lâmina foram incubadas overnight a 4 °C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS 1x por 5 minutos a temperatura ambiente três vezes e os anticorpos secundários goat anti-rabbit AlexaFluor488 (Abcam, ab150077, 1:500) e goat anti-hamster Cy5 (Jackson ImmunoResearch, 112-175-143, 1:500) foram adicionados e as lâminas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, removemos os anticorpos secundários, as lâminas foram secas e adicionamos o meio de montagem com DAPI (Invitrogen), para a marcação dos núcleos celulares. Em seguida, foram adicionadas lamínulas sobre as lâminas e o escaneamento foi realizado através do microscópio confocal LSM710 (Zeiss). As imagens foram analisadas no software ImageJ.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional *GraphPad Prism* (GraphPad Software Incorporation) versão 8.0. O método utilizado para comparação entre duas condições foi o teste t-Student e a significância entre os grupos foi estatisticamente considerada quando $P \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$

Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram gerados através do cruzamento das linhagens $Cd4^{Cre}$ e $Grin1^{fl/fl}$. Vale ressaltar que a linhagem $Cd4^{Cre}$ promove a deleção do gene floxeado ($Grin1$ - NMDAR) não somente em linfócitos T CD4+, mas também em linfócitos T CD8+. Isto se deve ao fato de timócitos expressarem ambos os correceptores (CD4+ e CD8+) no estágio duplo positivo de seu desenvolvimento no timo.

Inicialmente, avaliamos a expressão de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ (**Figura 4**) e CD8+ (**Figura 5**) do baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial dos intestinos delgado e cólon em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ e seus controles $Grin1^{fl/fl}$ através da técnica de citometria de fluxo.

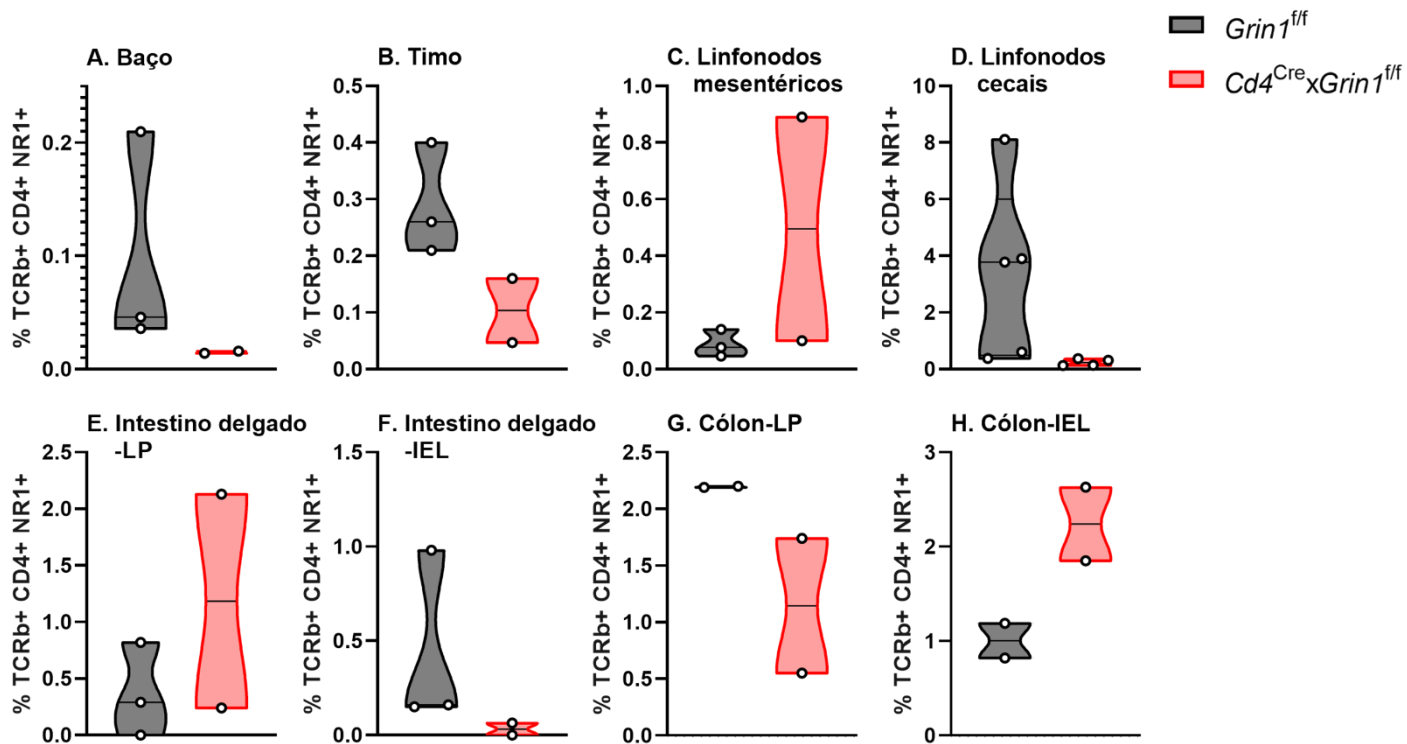


Figura 4: Avaliação da expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial do intestino delgado e cólon. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram sacrificados com 8 semanas de idade e todos os tecidos citados foram removidos. O percentual da subunidade NR1 do NMDAR em células T $\alpha\beta$ CD4+ foi avaliado por citometria de fluxo. Foram utilizados de 2 a 5 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes.

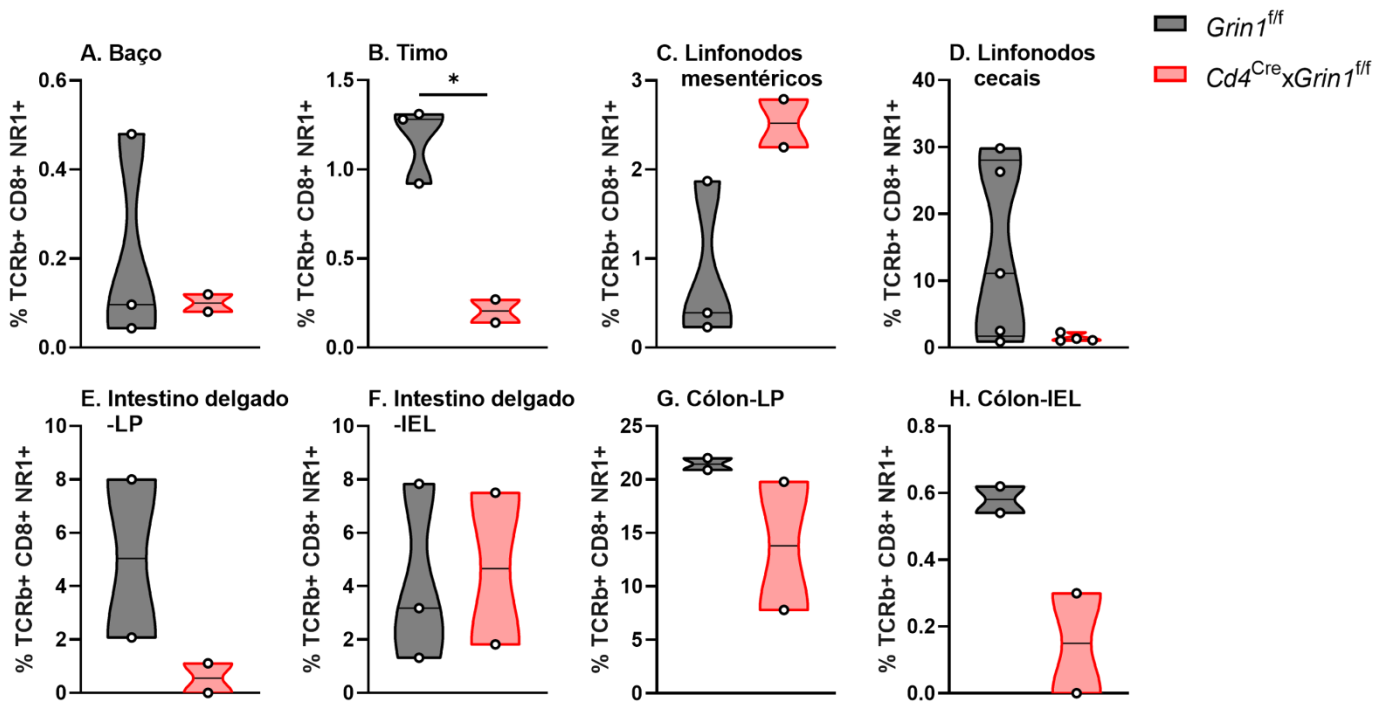


Figura 5: Avaliação da expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial do intestino delgado e cólon. Camundongos *Grin1^{ff}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* foram sacrificados com 8 semanas de idade e todos os tecidos citados foram removidos. O percentual da subunidade NR1 do NMDAR em células T $\alpha\beta$ CD8+ foi avaliado por citometria de fluxo. Foram utilizados de 2 a 5 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Todos os tecidos linfoides de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*, com exceção dos linfonodos mesentéricos (**Figura 1C e 2C**) apresentaram níveis reduzidos, mas não estatisticamente diferentes, da proteína NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+ quando comparados ao grupo controle *Grin1^{ff}*. Apenas a expressão de NMDAR em linfócitos T CD8+ presentes no timo se mostrou estatisticamente reduzida no grupo experimental (**Figura 2B**).

Devido ao fato de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+ expressarem em maiores níveis o NMDAR quando encontrados em ambos os compartimentos (lâmina própria e linfócitos intraepiteliais) dos intestinos delgado e cólon, também avaliamos a expressão do NMDAR por células T $\alpha\beta$ presentes nos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado por imunofluorescência (**Figura 3**). É possível notar que células T $\alpha\beta$ (CD3 - marcação em vermelho) expressam NMDAR (NR1 - marcação em verde), representados em laranja através das setas brancas, apenas em camundongos do grupo controle *Grin1^{ff}* (**Figura 3A**) e não em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* (**Figura 3B**). Assim sendo, observamos a deleção condicional de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8.

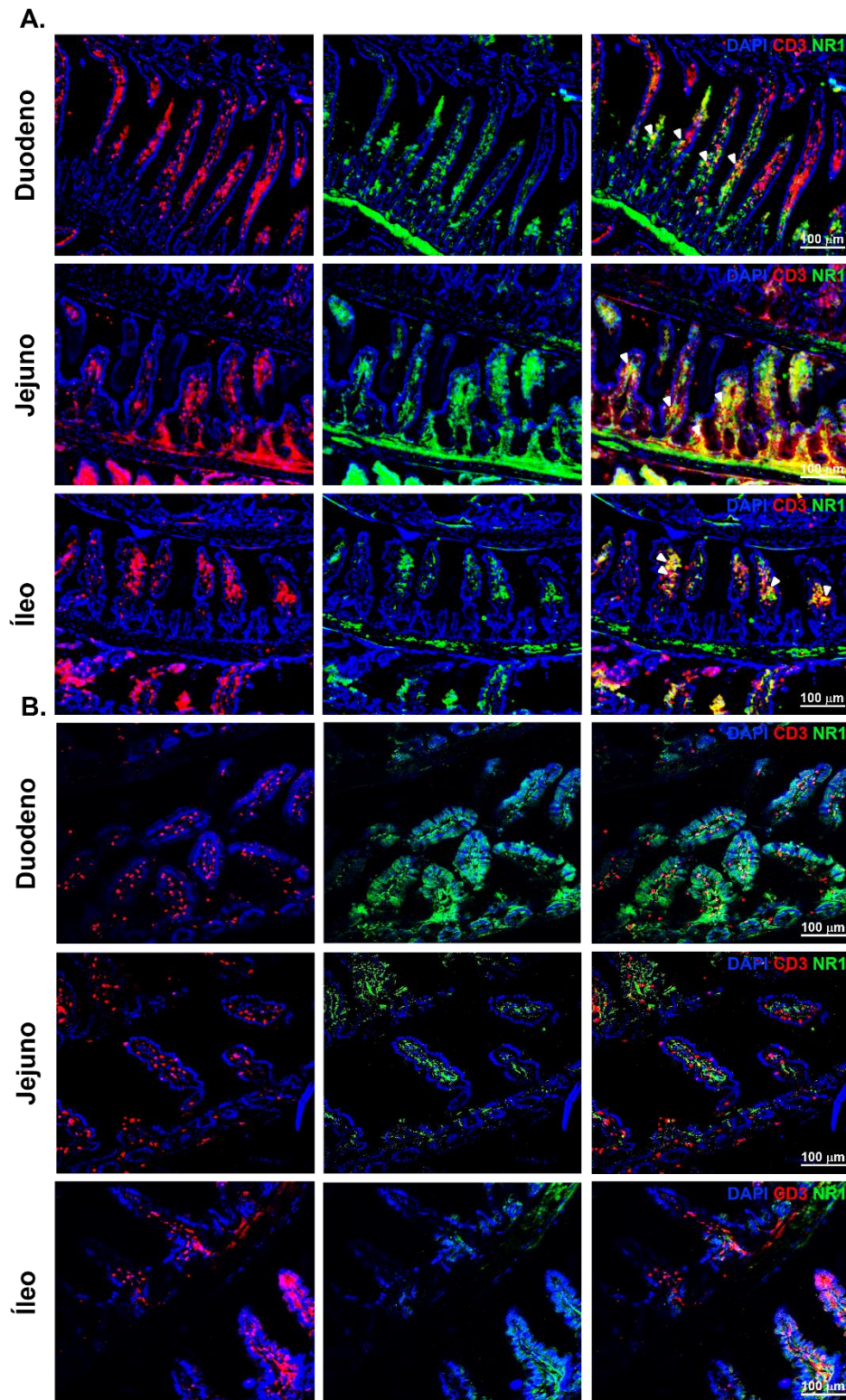


Figura 6: Expressão de NMDAR por linfócitos T $\alpha\beta$ no intestino delgado. Camundongos *Grin1^{fl/fl}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* foram sacrificados com 8 semanas de idade e o intestino delgado foi removido e processado para histologia, conforme descrito no item 3.13 de materiais e métodos. A expressão de NMDAR em células T $\alpha\beta$ totais presentes no duodeno, jejuno e íleo foi avaliada por imunofluorescência. A subunidade NR1 (e verde) do NMDAR, as células T $\alpha\beta$ totais CD3+ (em vermelho) e a co-expressão de ambos os marcadores apontados pelas setas brancas (em laranja) estão representados acima. Sendo A representativo do camundongo controle *Grin1^{fl/fl}* e B representativo do grupo experimental *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal LSM710 (Leica) e analisadas através do software ImageJ.

A fim de compreendermos se a deleção do NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ pode interferir na expressão gênica das outras subunidades que compõem este receptor, avaliamos a expressão gênica das isoformas NR2 (*Grin2a*, *b*, *c* e *d*) no baço, linfonodos mesentéricos e intestino delgado de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* e seus controles *Grin1^{ff}* por qPCR (**Figura 7**). Não foi possível identificar a expressão gênica das subunidades NR2a (*Grin2a*) nas subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ provenientes do baço de ambos os grupos. Observamos um aumento na expressão gênica da subunidade NR2d (*Grin2d*) em linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ do baço e em células totais dos linfonodos mesentéricos de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* em comparação a seus controles *Grin1^{ff}* (**Figura 7C e K**). Além disso, células totais dos linfonodos mesentéricos de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* também expressam o gene da subunidade NR2c (*Grin2c*) em níveis aumentados (**Figura 7J**). Não notamos alterações na expressão gênica das isoformas NR2 em células T $\alpha\beta$ CD8⁺ derivadas do baço e em linfócitos intraepiteliais do intestino delgado entre os grupos.

4.2 Alteração na expressão de genes relacionados ao fenótipo Th1, Th17 e Treg no baço, linfonodos mesentéricos e compartimento intraepitelial do intestino delgado de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*

Com o intuito de determinar o fenótipo das células T $\alpha\beta$ CD4⁺ do baço, linfonodos mesentéricos e compartimento intraepitelial do intestino delgado, avaliamos a expressão de genes para citocinas e fatores de transcrição envolvidos com as subpopulações de linfócitos Th1 (*Il2*, *Tbx21*), Th17 (*Il6*, *Il17*) e Treg (*Foxp3*) em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* e seus controles *Grin1^{ff}* através da técnica de PCR em tempo real (**Figura 8**). Foi possível observar que linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ do baço e células totais dos linfonodos mesentéricos de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* expressam *Tbx21* em níveis aumentados (**Figura 8E e J**), sugerindo um aumento do fator de transcrição Tbet responsável pela diferenciação da subpopulação Th1.

Além disso, células totais derivadas dos linfonodos mesentéricos também apresentaram um aumento na expressão dos genes *Il6* (**Figura 8G**) e *Il17* (**Figura 8H**) em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* quando comparados ao grupo controle, sugerindo também um aumento na diferenciação da subpopulação Th17.

Já os linfócitos intraepiteliais do intestino delgado de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* mostraram um aumento na expressão gênica de *Il2* (**Figura 8K**) e *Il6* (**Figura 8L**), sugerindo uma possível modulação das subpopulações Th1 e Th17.

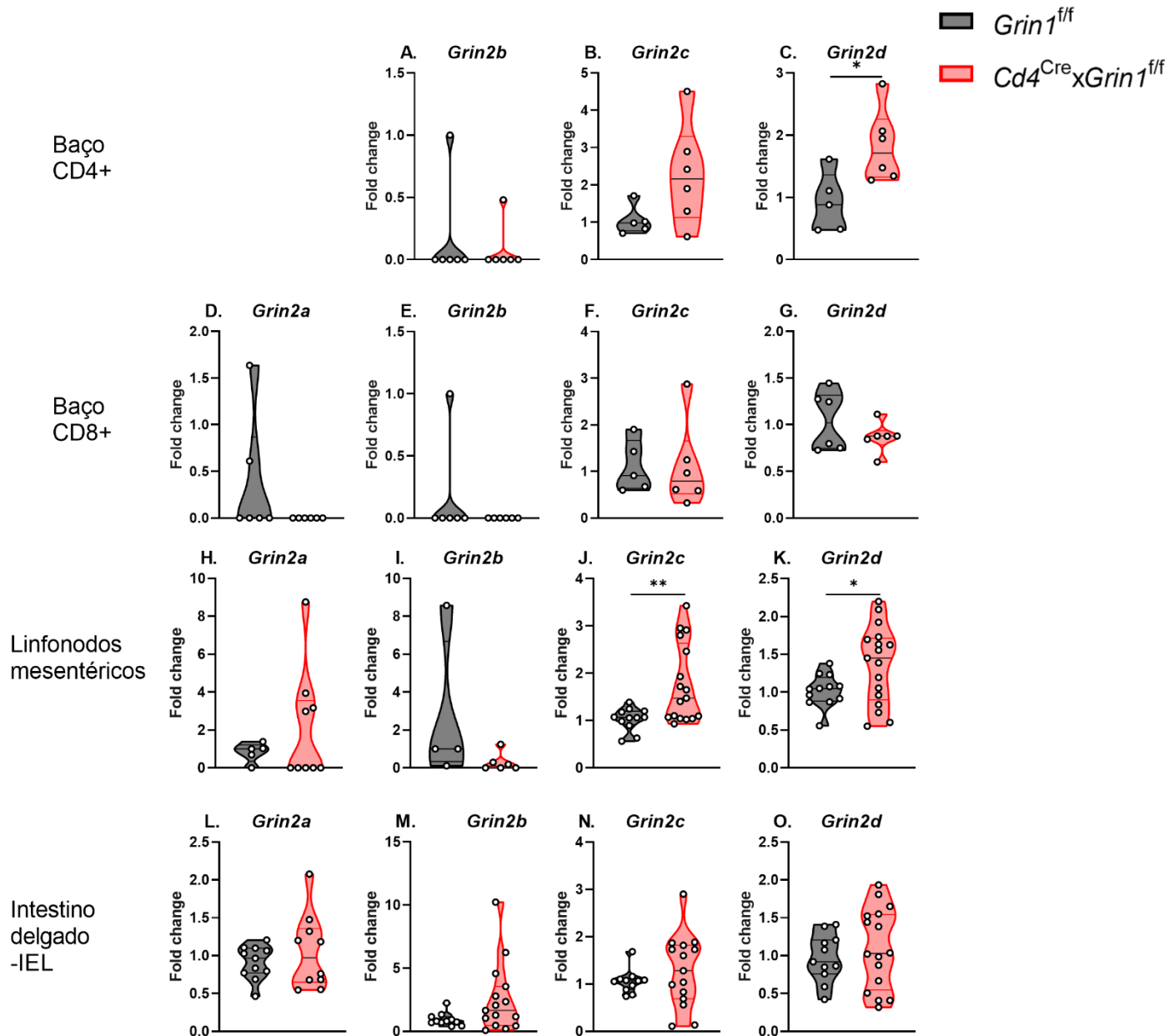


Figura 7: Expressão gênica das isoformas NR2a, NR2b, NR2c e NR2d do NMDAR no baço, linfonodos mesentéricos e intestino delgado. Camundongos *Grin1^{fl/fl}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* foram sacrificados com 8 semanas de idade e foram removidos o baço, os linfonodos mesentéricos e o intestino delgado. Os linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+ do baço foram separados por coluna magnética, enquanto foram avaliadas as suspensões celulares totais dos linfonodos mesentéricos e do compartimento intraepitelial do intestino delgado. As suspensões celulares de cada tecido foram armazenadas em TRIzol para posterior extração do mRNA. Em seguida, foi realizado a síntese do cDNA de cada respectiva amostra e o PCR em tempo real para a análise dos genes *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c* e *Grin2d*. Foram utilizados de 6 a 17 camundongos por grupo, provenientes de três experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

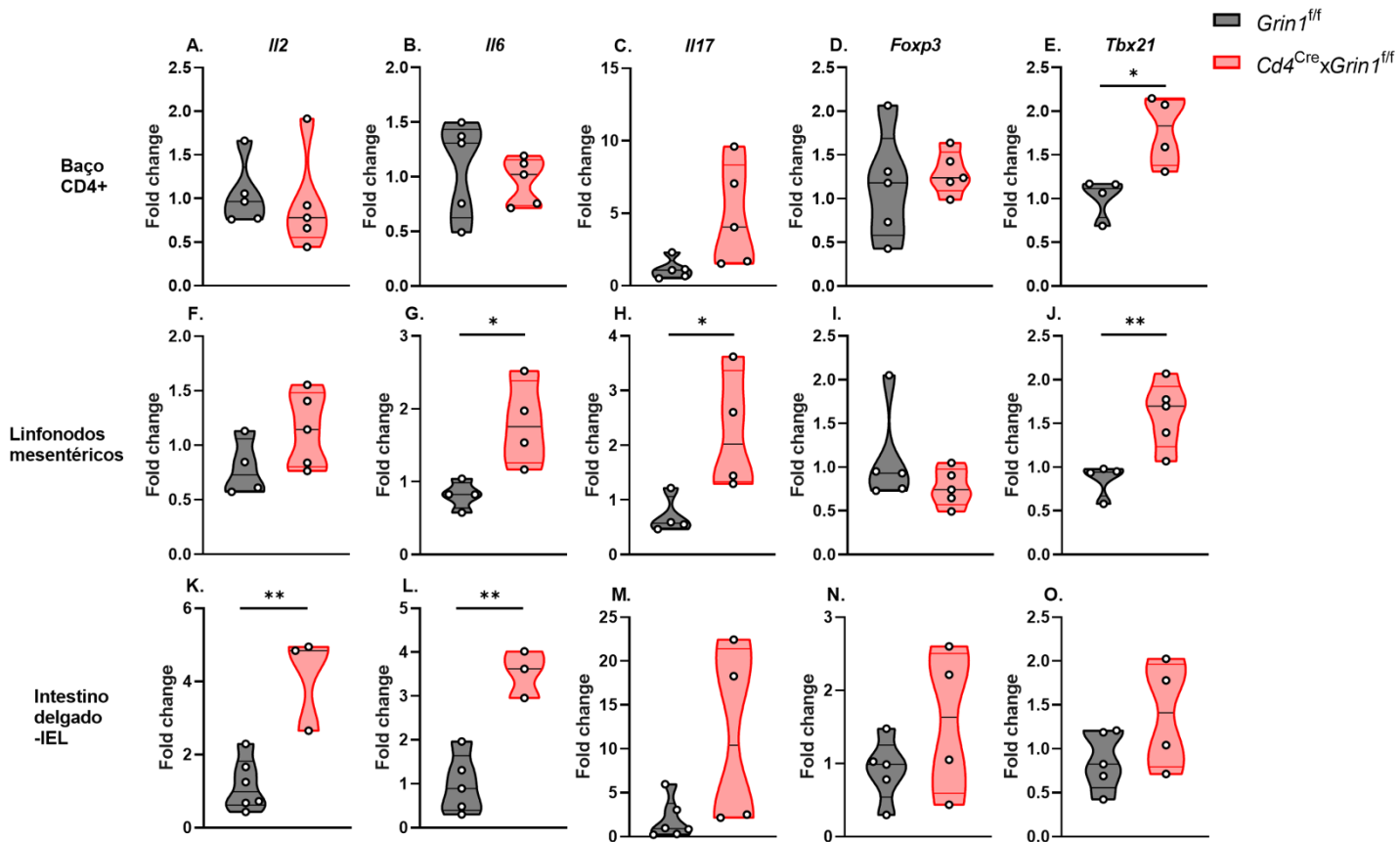


Figura 8: Expressão gênica de *IL2*, *IL6*, *IL17*, *Foxp3* e *Tbx21* no baço, linfonodos mesentéricos e intestino delgado. Camundongos *Grin1^{fl/fl}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* foram sacrificados com 8 semanas de idade e foram removidos o baço, os linfonodos mesentéricos e o intestino delgado. Os linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ do baço foram separados por coluna magnética, enquanto foram avaliadas as suspensões celulares totais dos linfonodos mesentéricos e do compartimento intraepitelial do intestino delgado. As suspensões celulares de cada tecido foram armazenadas em TRIzol para posterior extração do mRNA. Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA de cada respectiva amostra e o PCR em tempo real para a análise dos genes *IL2*, *IL6*, *IL17*, *Foxp3* e *Tbx21*. Foram utilizados de 4 a 6 camundongos por grupo, provenientes de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

4.3 A deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ não prejudica a permeabilidade e o trânsito intestinal

Em seguida, investigamos o papel do NMDAR expresso por linfócitos T $\alpha\beta$ no controle da barreira mucosa intestinal, uma vez que o glutamato desempenha funções na homeostase de células epiteliais intestinais. Para tanto, realizamos análises de permeabilidade e trânsito intestinal em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e seus controles *Grin1^{fl/fl}*. Ambos os grupos foram submetidos ao jejum absoluto por 6 horas e, em seguida, foi administrado 12 μ g Dextran-FITC/animal. Após o período de duas horas, o qual coincide com o pico de Dextran-FITC no sangue, foram coletados o sangue total por punção cardíaca e o intestino delgado. O intestino delgado foi segmentado nas porções duodeno, jejuno e

íleo e seu conteúdo luminal foi quantificado por fluorescência, determinando assim o trânsito intestinal. Na **Figura 9A** está ilustrado o desenho experimental. Foi possível notar uma concentração de Dextran-FITC semelhante no soro dos animais de ambos os grupos, sugerindo assim que não houve alterações na permeabilidade intestinal (**Figura 9B**), em decorrência da deleção do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$. O mesmo foi notado na concentração de Dextran-FITC presente no conteúdo luminal dos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado avaliados (**Figura 9C**), novamente sugerindo que não houve mudanças no trânsito intestinal entre os grupos.

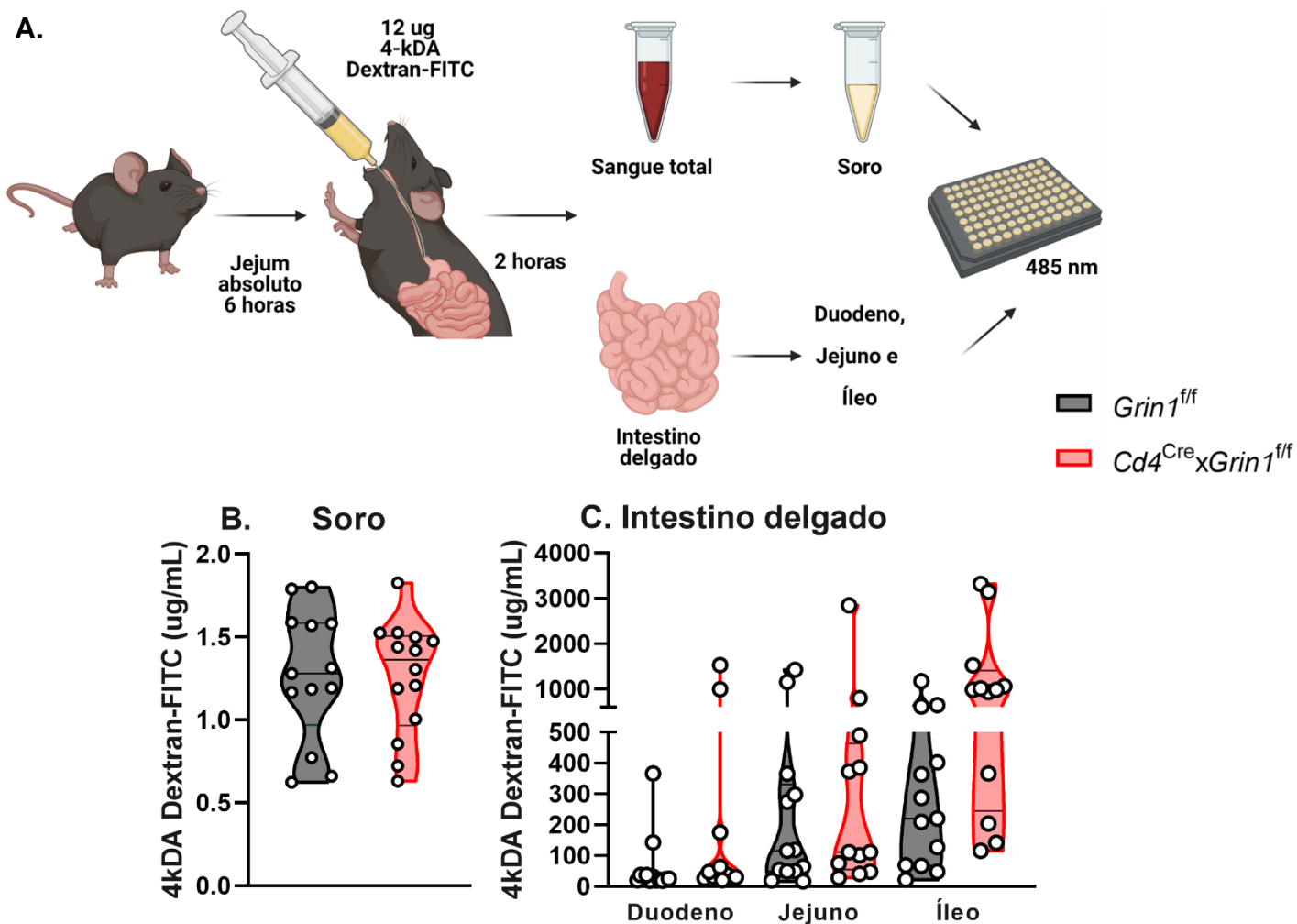


Figura 9: Avaliação da permeabilidade e trânsito intestinal. Camundongos *Grin1^{f/f}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{f/f}* de 8 semanas de idade foram mantidos em jejum por 6 horas. Foi administrado via intragástrica (gavagem) 12 µg de Dextran-FITC 4-kDA por animal e a água e ração foram repostas. Após duas horas, os camundongos foram sacrificados e o sangue total e intestino delgado foram removidos. O soro e o conteúdo luminal dos segmentos duodeno, jejuno e íleo intestinais foram analisados quanto a concentração de Dextran-FITC pelo ensaio fluorescência através de espectrofotometria. Foram utilizados de 12 a 14 camundongos por grupo, provenientes de três experimentos independentes.

4.4 A deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ leva a distribuição alterada das subpopulações CD4+ e CD8+ em tecidos linfoides de camundongos naïve

Avaliamos o efeito da deleção do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ na distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+, assim como linfócitos T $\gamma\delta$, nos tecidos linfoides primário (timo) e secundários (linfonodos mesentéricos e cecais) de camundongos naïve. No timo de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*, encontramos uma redução na frequência de ambas as subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ (**Figura 10B**) e CD8+ (**Figura 10C**), seguido de um aumento na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ (**Figura 10D**). Já nos órgãos linfoides secundários de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*, notamos uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4+ nos linfonodos mesentéricos (**Figura 10J**), porém esta mesma população celular se encontra aumentada nos linfonodos cecais (**Figura 10N**). Enquanto isso, a frequência de linfócitos T CD8+ de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* encontra-se reduzida no baço (**Figura 10G**) e aumentada nos linfonodos mesentéricos (**Figura 10K**) em comparação ao grupo controle. Como observado no timo, a frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ também se encontra aumentada no baço de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* (**Figura 10H**).

Em seguida, avaliamos as mesmas populações celulares presentes na lâmina própria e no compartimento intraepitelial do intestino delgado e cólon de camundongos naïve *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e seu grupo controle *Grin1^{fl/fl}*. Não observamos diferenças entre os grupos avaliados na frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (TCR β +), assim como nas subpopulações CD4+ e CD8+, e na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ (**Figura 11**).

Também avaliamos as subpopulações de linfócitos T CD8+ intraepiteliais típicos (CD8ab+) e atípicos (CD8aa+) no intestino delgado e cólon. Nenhuma diferença foi encontrada entre os camundongos naïve *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e seu grupo controle *Grin1^{fl/fl}* (**Figura 12**).

Em conjunto, estes achados mostram um padrão alterado na distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ e CD8+ e linfócitos T $\gamma\delta$ nos tecidos linfoides, mas não nos compartimentos da mucosa em decorrência da deleção do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$.

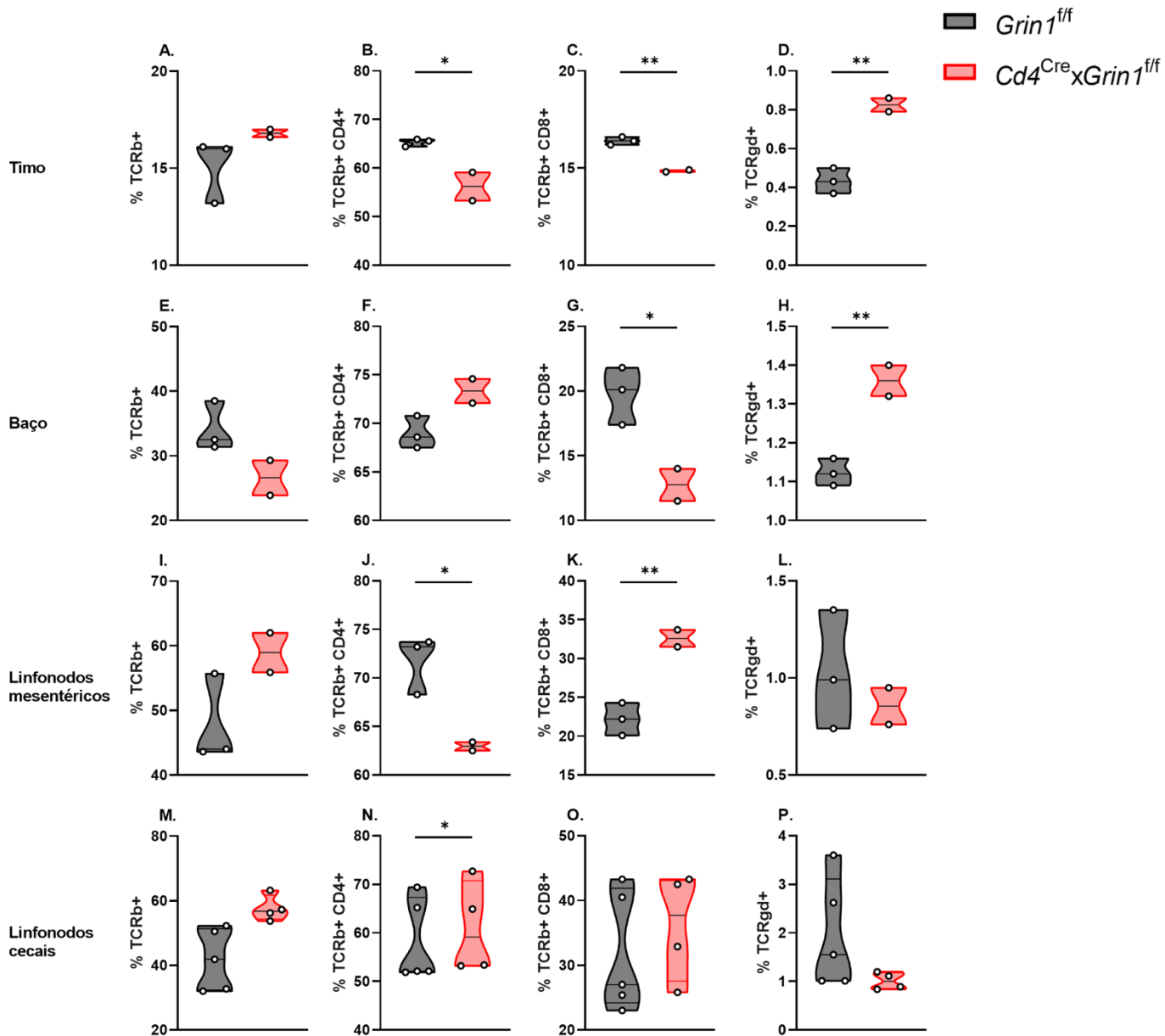


Figura 10: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ em órgãos linfoides primários e secundários de camundongos $Cd4^{Cre}Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre}Grin1^{fl/fl}$ foram sacrificados com 8 semanas de idade e foram removidos o timo, baço, os linfonodos mesentéricos e cecais. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (A, E, I e M), CD4+ (B, F, J e N), CD8+ (C, G, K e O) e linfócitos T $\gamma\delta$ (D, H, L e P) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com cada tecido linfóide. Foram utilizados de 2 a 5 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

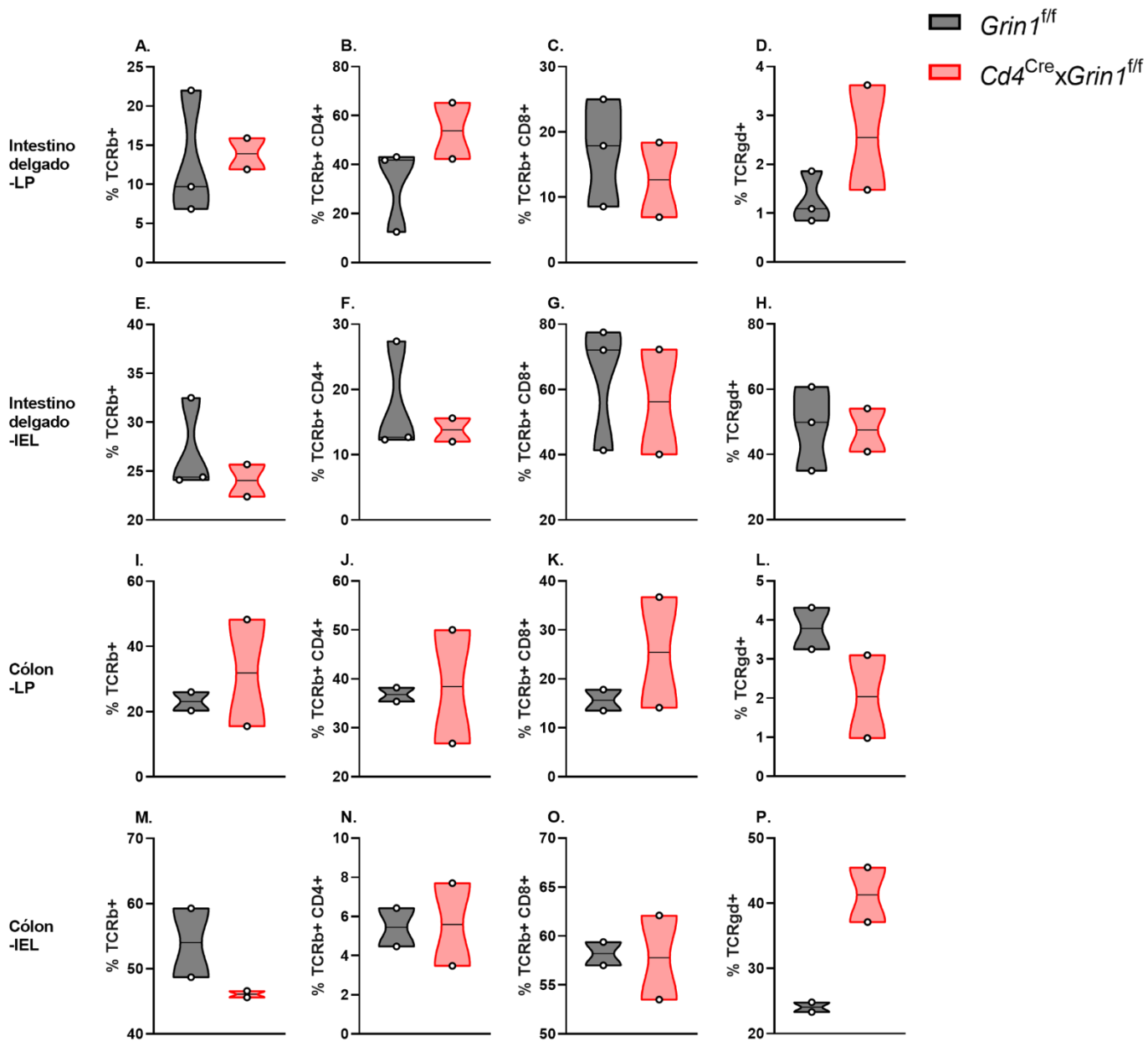


Figura 11: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ na lâmina própria e compartimento epitelial dos intestinos de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram sacrificados com 8 semanas de idade e o intestino delgado e cólon foram removidos. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (A, E, I e M), CD4+ (B, F, J e N), CD8+ (C, G, K e O) e linfócitos T $\gamma\delta$ (D, H, L e P) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com cada compartimento intestinal. Foram utilizados de 2 a 5 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes.

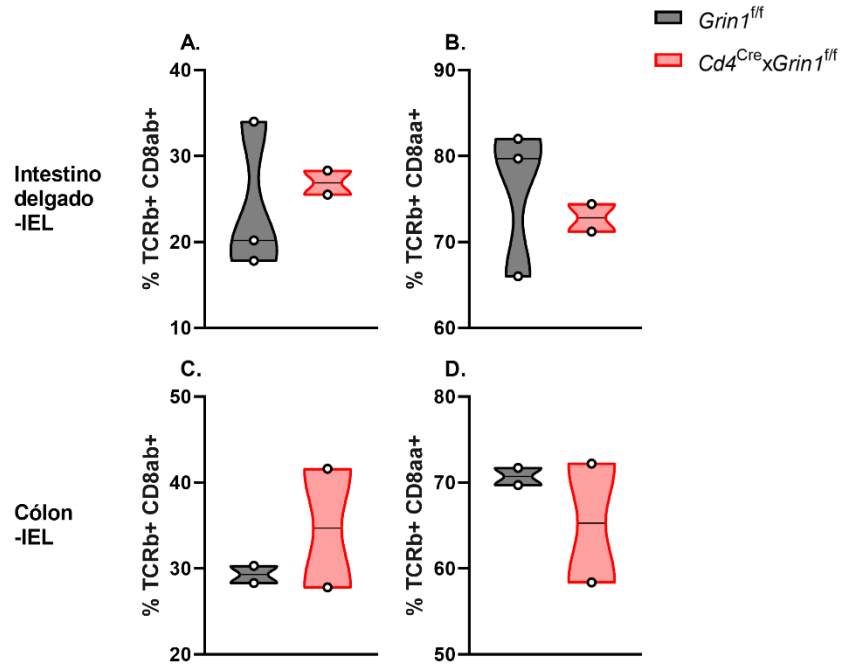


Figura 12: Distribuição de linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ intraepiteliais típicos e atípicos de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$. Camundongos $Grin1^{ff}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ foram sacrificados com 8 semanas de idade e o intestino delgado e cólon foram removidos. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ CD8ab+ típicos (A e C) e CD8aa+ atípicos (B e D) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com cada compartimento do intestino delgado e cólon. Foram utilizados de 2 a 5 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes.

4.5 Papel do NMDAR na inflamação intestinal

Seguindo as investigações em camundongos naïve, ou livre da indução de doenças, definimos por investigar se a deleção de NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ afetaria a patogênese das doenças inflamatórias intestinais (IBD), uma vez que observamos que os compartimentos do intestino possuem a maior expressão destes receptores quando comparados aos tecidos linfoides avaliados. Camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seu grupo controle $Grin1^{ff}$ foram tratados com DSS por 7 dias, de acordo com o item 3.3 de materiais e métodos. Ambos os grupos foram sacrificados no dia 10 de tratamento e, como mostrado na **Figura 13A**, a perda de peso iniciou no dia 5 do tratamento com DSS em ambos os grupos avaliados. Coletamos o intestino grosso (céco e cólon) de todos os animais, como representado na **Figura 13B**, e medimos seu peso (**Figura 13C**) em g, assim como o comprimento do cólon (**Figura 13D**) em cm. Também observamos a atividade da colite pela histologia do cólon (**Figura 13E**) e pelo escore histológico (**Figura 13F**), conforme descrito em detalhes no item 3.3. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados com DSS.

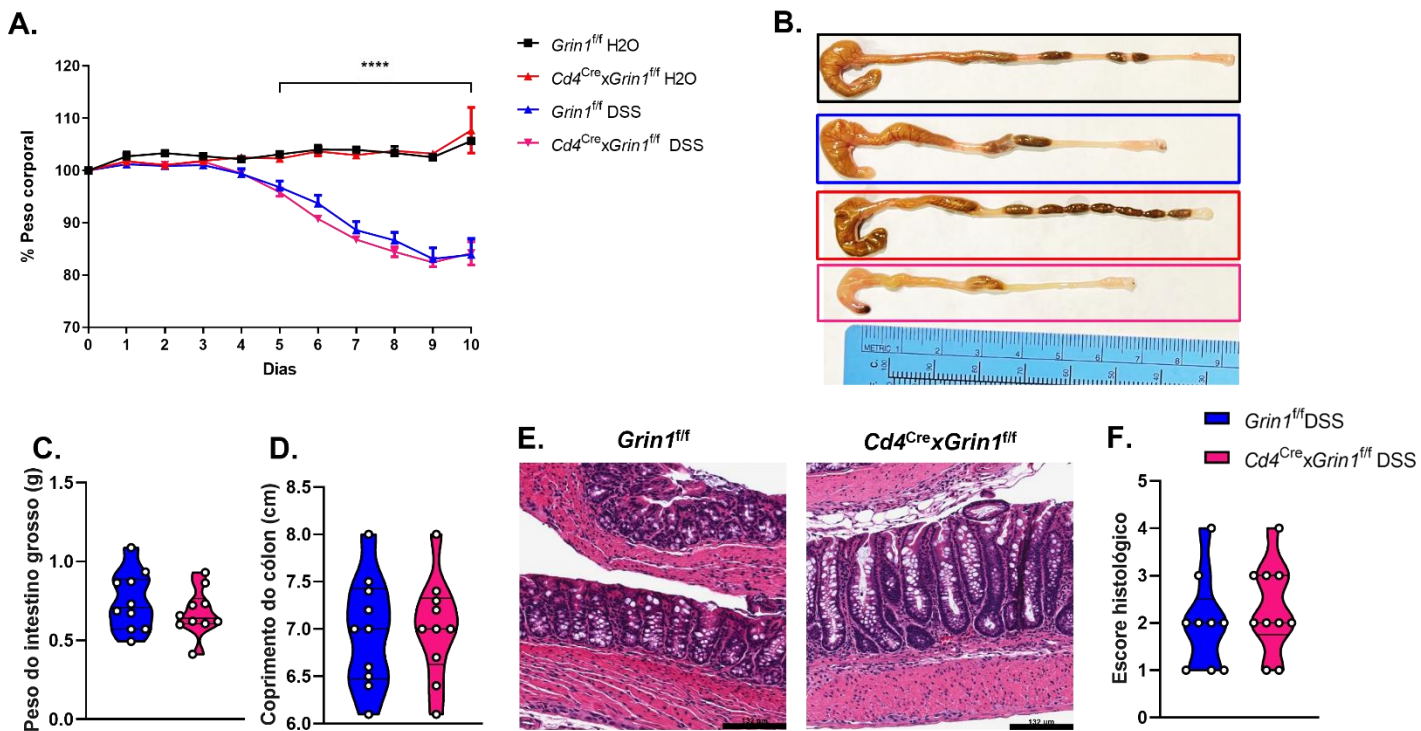


Figura 13: Sinais e sintomas da colite aguda induzida por DSS em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{flf}*. Camundongos *Grin1^{flf}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{flf}* foram tratados ou não com DSS a 2.5% por 7 dias e sacrificados no dia 10 de tratamento para a coleta do intestino grosso. O percentual de perda de peso está representado em A e os intestinos grossos de todos os grupos representados em B. As análises de peso do intestino grosso e comprimento do cólon encontram-se em C e D, respectivamente. Em E a representação histológica do cólon distal de ambos os grupos tratados com DSS e em F está representado o escore histológico da colite aguda de acordo com as classificações relatadas no item 3.12 de materiais e métodos. Foram utilizados 10 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Logo após as análises macro e microscópicas, também avaliamos a distribuição e fenótipo de linfócitos T nos órgãos afetados pelo modelo de colite aguda, que são os linfonodos cecais (ceLN), lâmina própria (cólon-LP) e linfócitos intraepiteliais do cólon (cólon-IEL) por citometria de fluxo (**Figura 14**). Não encontramos diferença na frequência de células T $\alpha\beta$ totais nos tecidos avaliados de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{flf}* em comparação ao grupo controle *Grin1^{flf}* (**Figura 14A, M e S**). O percentual de linfócitos T CD4⁺ encontra-se aumentado apenas no compartimento intraepitelial do cólon de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{flf}* (**Figura 14T**). Também avaliamos a expressão da molécula CD25 e do fator de transcrição FoxP3, como marcadores de células Treg. Não foram observadas diferenças na expressão de CD25 nos tecidos avaliados, porém notamos uma tendência na redução de FoxP3 nos ceLN e cólon-LP, sendo significativamente reduzido no cólon-IEL (**Figura 14V**). Os linfócitos T CD8⁺ intraepiteliais do cólon (cólon-IEL) encontram-se extremamente reduzidos (**Figura 14W**), sem diferenças nos ceLN e cólon-

LP. No entanto, também observamos uma redução na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ presentes na lâmina própria do cólon (cólon-LP) de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl/fl}$ (**Figura 14R**). Os dados do modelo de colite aguda aqui mostrados e discutidos derivam-se de dois experimentos distintos. No primeiro experimento notamos uma diferença na morfologia do ceco nos camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ quando comparados ao grupo controle. Em razão disso, no segundo experimento realizado também avaliamos as células presentes na lâmina própria do ceco (ceco-LP) de ambos os grupos tratados com DSS. Os linfócitos T $\alpha\beta$ totais (**Figura 14G**), assim como a subpopulação CD4+ (**Figura 14H**) e a expressão de CD25 por estas células (**Figura 14I**) derivados do ceco-LP de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ encontram-se aumentados em comparação com o grupo controle. Também notamos um aumento na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ (**Figura 14L**) e uma redução na frequência de linfócitos T CD8+ (**Figura 14K**) na lâmina própria do ceco destes animais.

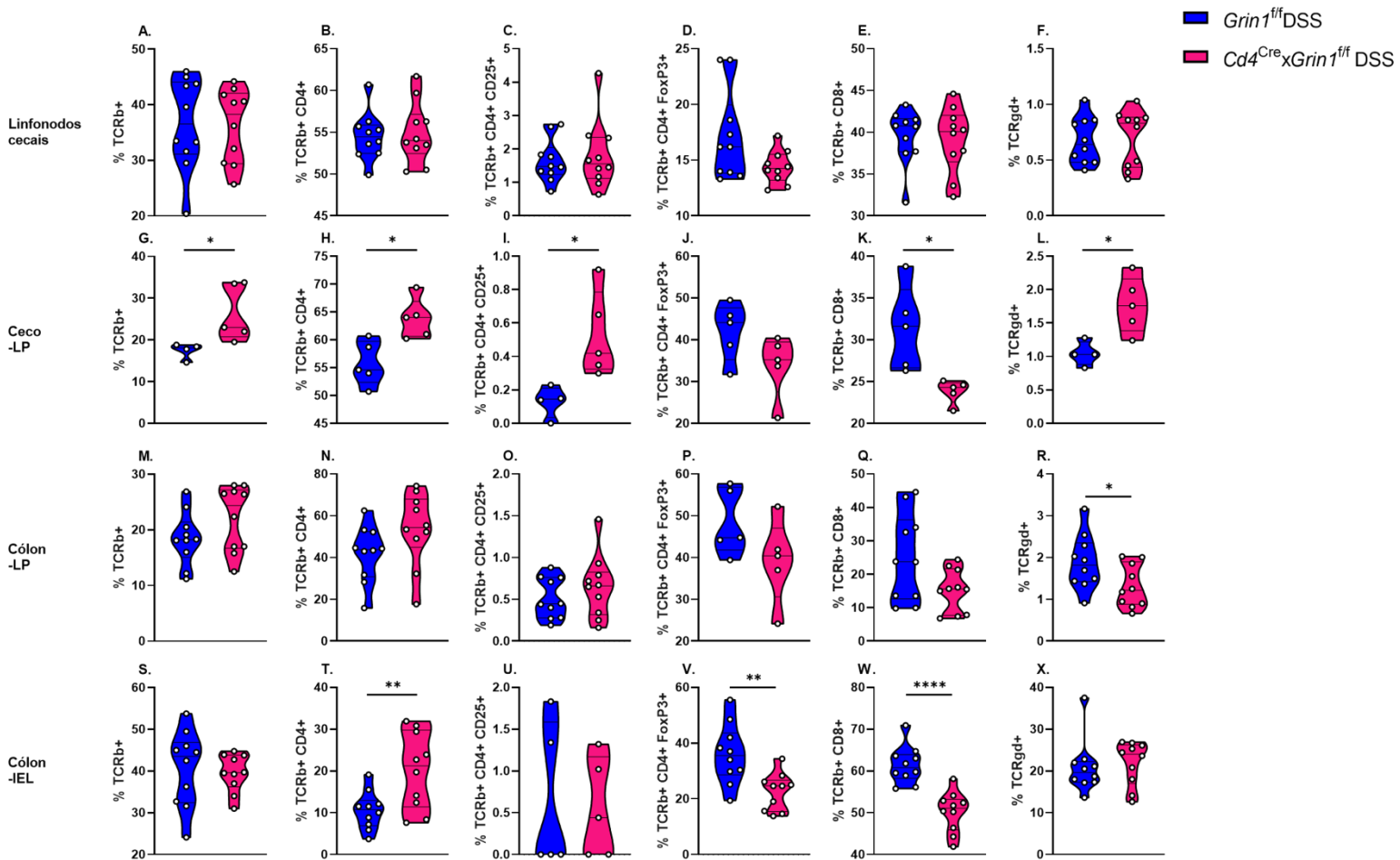


Figura 14: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ nos tecidos afetados pelo modelo de colite aguda induzido por DSS em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram sacrificados com 8 semanas de idade e foram tratados com DSS a 2.5% por 7 dias e sacrificados no dia 10 de tratamento. Os linfonodos cecais, ceco e cólon foram coletados. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (A, G, M e S), CD4+ (B, H, N e T), CD4+CD25+ (C, I, O e U), CD4+FoxP3+ (D, J, P e V), CD8+ (E, K, G e W) e linfócitos T $\gamma\delta$ (F, L, R e X) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com ceLN, ceco-LP, cólon-LP e cólon-IEL. Foram utilizados de 5 a 10 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Também avaliamos a produção intracelular das citocinas anti e pró-inflamatórias, IL-10, IL-17 e IFN- γ , por linfócitos T CD4+ dos linfonodos cecais, lâmina própria do ceco e cólon e compartimento intraepitelial do cólon de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ após indução de colite aguda através da técnica de citometria de fluxo (**Figura 15**). Nenhuma alteração foi observada, por exceção de um aumento na produção de IL-17 por linfócitos T CD4+ do ceco-LP em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ quando comparados ao grupo controle (**Figura 15E**),

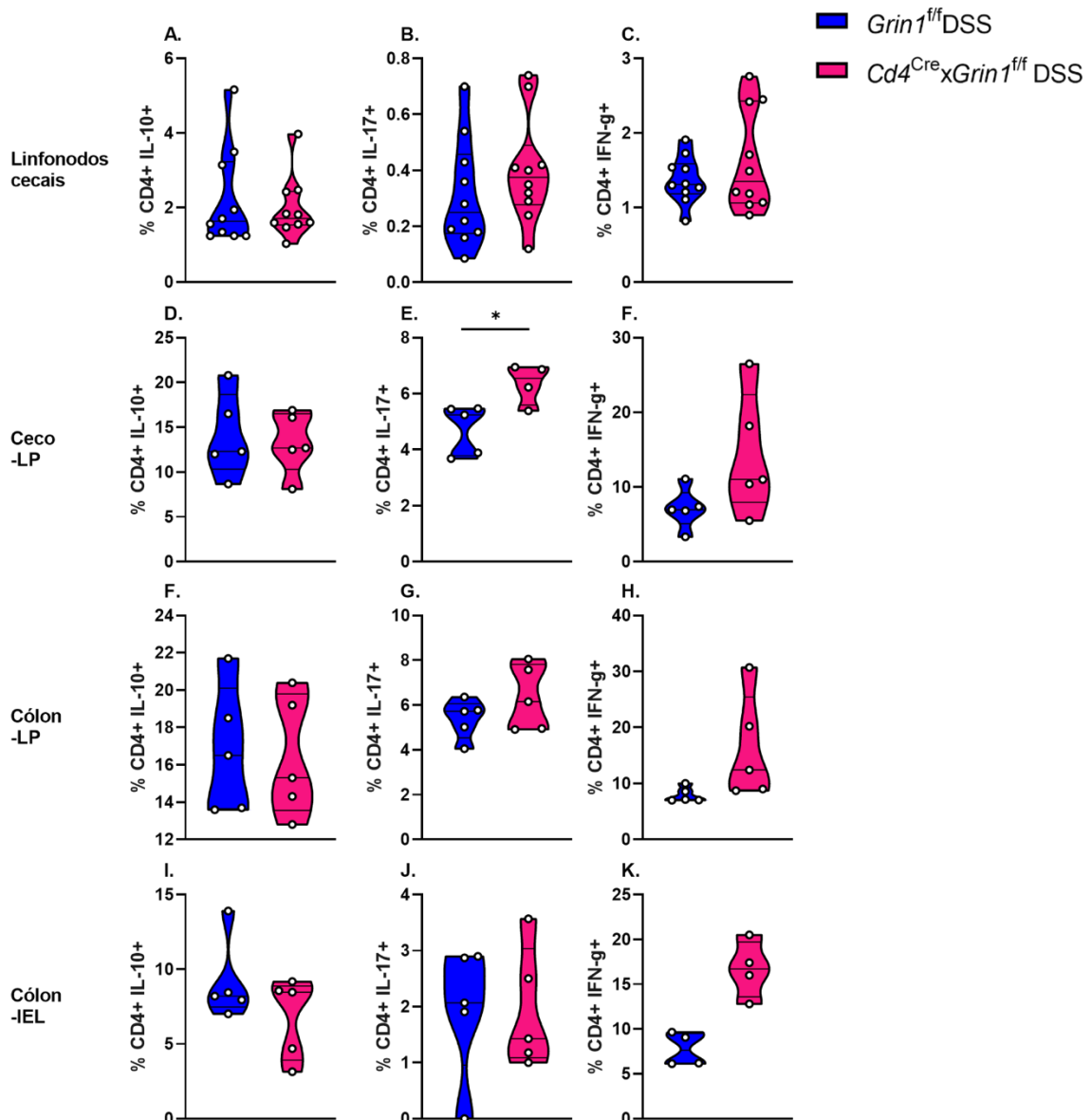


Figura 15: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ nos tecidos afetados pelo modelo de colite aguda induzido por DSS em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*. Camundongos *Grin1^{fl/fl}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* foram sacrificados com 8 semanas de idade e foram tratados com DSS a 2.5% por 7 dias e sacrificados no dia 10 de tratamento. Os linfonodos cecais, ceco e cólon foram coletados. As células totais dos ceLN, ceco-LP, cólon-LP e cólon-IEL foram estimuladas com PMA, ionomicina e monensina por três horas e, em seguida, avaliadas quanto a produção de IL-10 (A, D, G e J), IL-17 (B, E, H e K) e IFN- γ (C, F, I e L) por citometria de fluxo. Foram utilizados de 5 a 10 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

O modelo de colite aguda induzida por DSS é mediado principalmente por células imunes inatas. Assim sendo, avaliamos o papel da deleção do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ em um modelo de colite crônica também induzido por DSS, onde células T desempenham um papel importante na patogênese da inflamação intestinal. Para isso, camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e seu grupo controle *Grin1^{fl/fl}* foram tratados com DSS por 7 dias, de acordo com o item 3.3 de materiais e métodos, seguidos por 14 dias de repouso e então novamente tratados com DSS por mais dois ciclos. Os camundongos foram sacrificados no dia 52 de tratamento. Como mostrado na **Figura 16A**, apesar de ambos os grupos de camundongos tratados com DSS perderem peso em todos os ciclos, não foram observadas diferenças entre os camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* e o grupo controle *Grin1^{fl/fl}*. Em conjunto, também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao peso do intestino grosso (**Figura 16C**) e comprimento do cólon (**Figura 16D**), nem mesmo diferenças no escore histológico (**Figura 16E**).

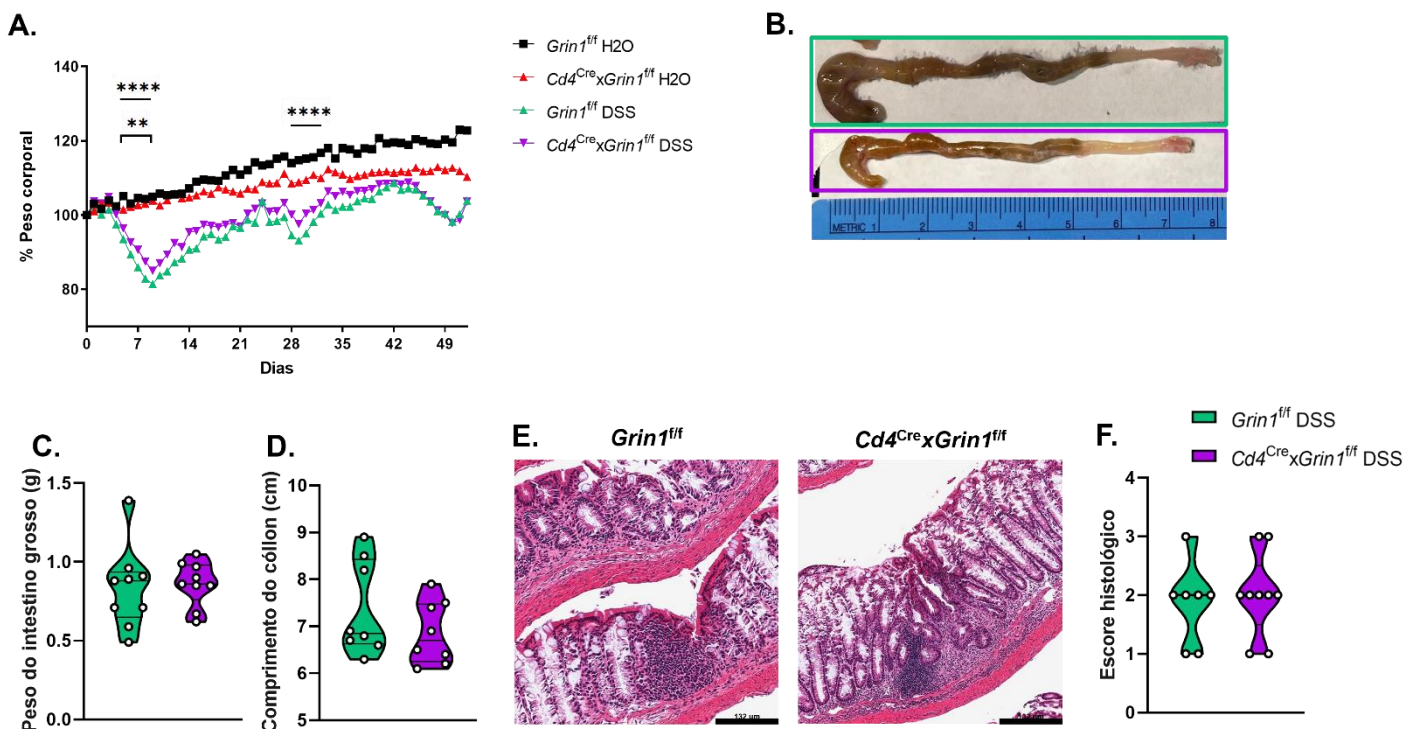


Figura 16: Sinais e sintomas da colite crônica induzida por DSS em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram tratados ou não com DSS a 2.5% por 7 dias durante três ciclos e sacrificados no dia 52 de tratamento para a coleta do intestino grosso. O percentual de perda de peso está representado em A e os intestinos grossos de ambos os grupos representados em B. As análises de peso do intestino grosso e comprimento do cólon encontram-se em C e D, respectivamente. Em E a representação histológica do cólon distal de ambos os grupos tratados com DSS e em F está representado o escore histológico da colite crônica de acordo com as classificações relacionadas no item 3.12 de materiais e métodos. Foram utilizados 9 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Em seguida, avaliamos a distribuição e fenótipo de linfócitos T nos tecidos afetados pela colite crônica e não foram observadas diferenças entre os grupos na frequência de células T $\alpha\beta$ totais (TCR β +), linfócitos Treg (CD4+FoxP3+), linfócitos T CD8+ e linfócitos T $\gamma\delta$ em todos os tecidos avaliados (**Figura 17**). A única diferença encontrada no modelo de colite crônica induzido por múltiplos ciclos de DSS foi uma redução na frequência de linfócitos T CD4+ (**Figura 17N**), assim como a expressão de CD25 também se encontra reduzida nestas células (**Figura 17O**) em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl/fl}$.

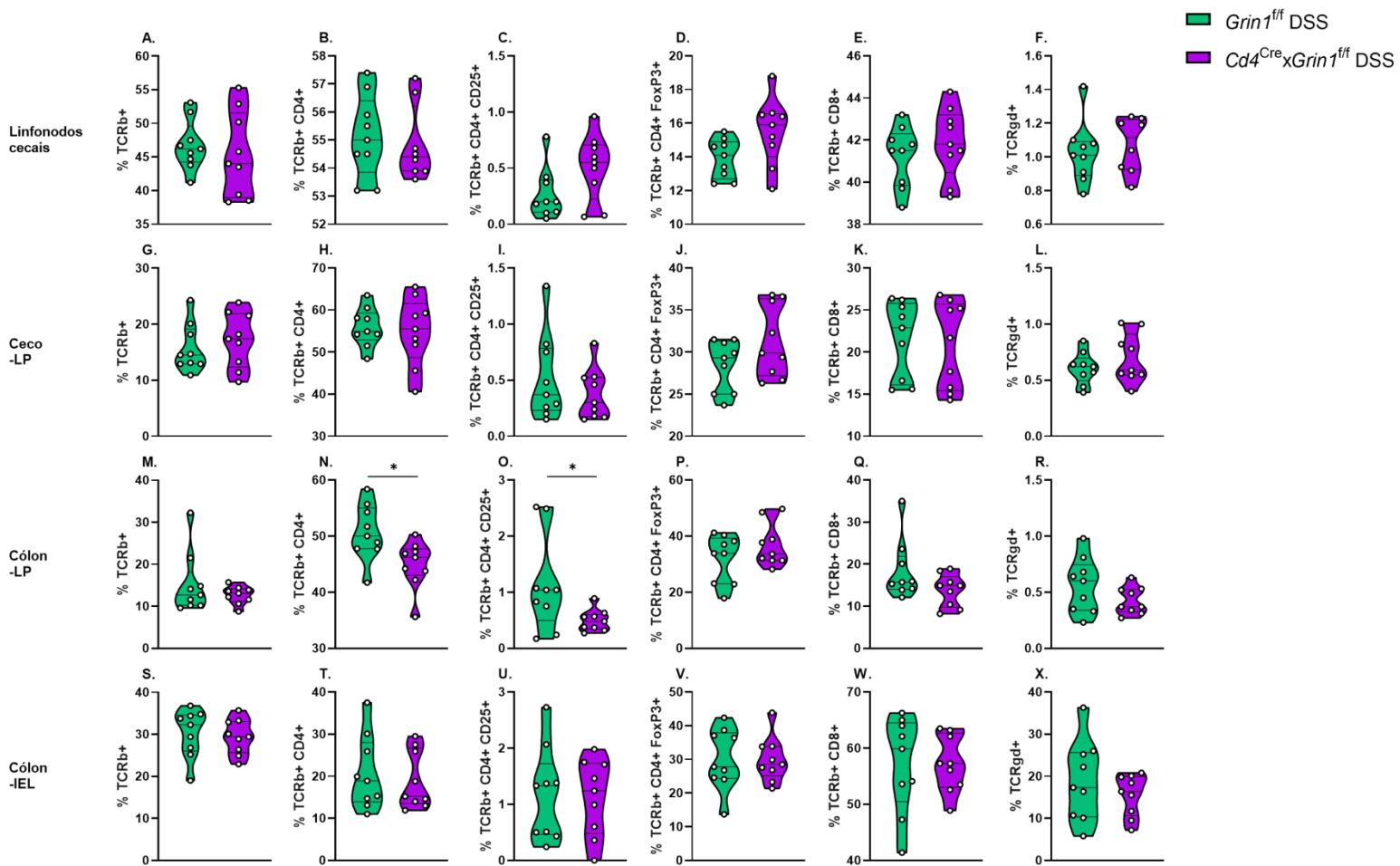


Figura 17: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por DSS em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram tratados ou não com DSS a 2.5% por 7 dias durante três ciclos e sacrificados no dia 52 de tratamento. Os linfonodos cecais, ceco e cólon foram coletados. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (A, G, M e S), CD4+ (B, H, N e T), CD4+CD25+ (C, I, O e U), CD4+FoxP3+ (D, J, P e V), CD8+ (E, K, G e W) e linfócitos T $\gamma\delta$ (F, L, R e X) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com ceLN, ceco-LP, cólon-LP e cólon-IEL. Foram utilizados 9 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Também investigamos a produção intracelular das citocinas IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T CD4+ dos linfonodos cecais, lâmina própria do ceco e cólon, e compartimento intraepitelial do cólon no modelo de colite crônica através da técnica de citometria de fluxo (**Figura 18**). Por conta dos baixos números de linfócitos intraepiteliais do cólon, as análises não foram satisfatórias e não serão mostradas a seguir. Nenhuma diferença foi observada a não ser pelo aumento na produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ presentes na lâmina própria do cólon de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl/fl}$ (**Figura 18I**).

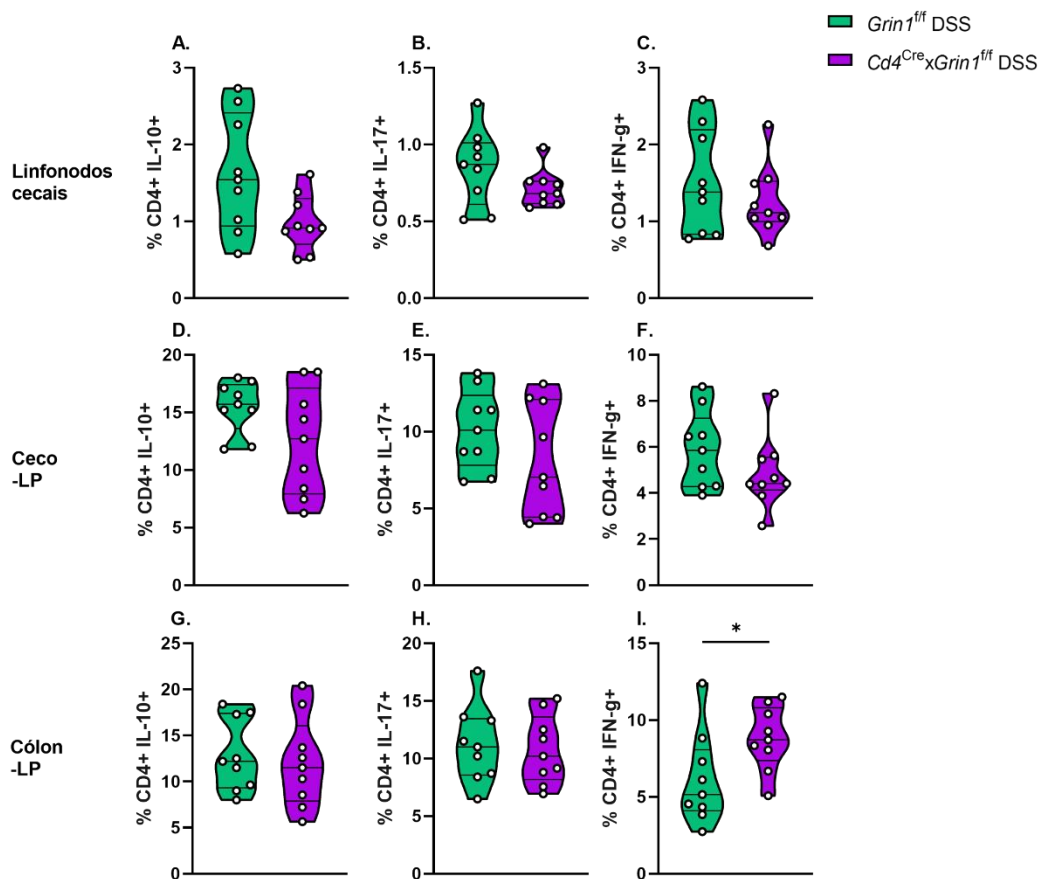


Figura 18: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por DSS em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ foram tratados ou não com DSS a 2.5% por 7 dias durante três ciclos e sacrificados no dia 52 de tratamento. Os linfonodos cecais, ceco e cólon foram coletados. As células totais dos ceLN, ceco-LP e cólon-LP foram estimuladas com PMA, ionomicina e monensina por três horas e, em seguida, avaliadas quanto a produção de IL-10 (A, D e G), IL-17 (B, E e H) e IFN- γ (C, F e I) por citometria de fluxo. Foram utilizados 9 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Investigamos também o papel da deleção de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ no modelo conhecido de colite mediada pela transferência de células T, conforme descrito no item 3.4 de materiais e métodos. Este modelo consiste na transferência adotiva de células T $\alpha\beta$ CD4+CD45RB^{high} (linfócitos T CD4+ naïve) para camundongos receptores deficientes de linfócitos T e B (*Rag1*^{-/-}), o que permite a investigação de células imunes adaptativas durante a indução e progressão da inflamação intestinal. Resumidamente, camundongos doadores de ambos os grupos (*Cd4*^{Cre}*xGrin1*^{fl/fl} ou controles *Grin1*^{fl/fl}) foram sacrificados e os linfócitos T CD4+ naïve do baço e linfonodos foram separados através de FACS *cell sorting*. Por fim, células T de ambos os grupos doadores foram transferidas a camundongos receptores *Rag1*^{-/-}, individualmente.

Como mostrado na **Figura 19A**, ambos os grupos receptores *Rag1*^{-/-} iniciaram a perda de peso corporal a partir da terceira semana após a transferência adotiva de células T. No final do período avaliado, total de 12 semanas, notamos que os camundongos *Rag1*^{-/-} que receberam células T do grupo controle *Grin1*^{fl/fl} perderam mais peso que os camundongos *Rag1*^{-/-} receptores de células T do grupo experimental *Cd4*^{Cre}*xGrin1*^{fl/fl}. Porém, nenhuma diferença foi encontrada nas análises de peso do intestino grosso (**Figura 19C**), comprimento do cólon (**Figura 19D**) e, até mesmo, no escore histológico (**Figura 19F**).

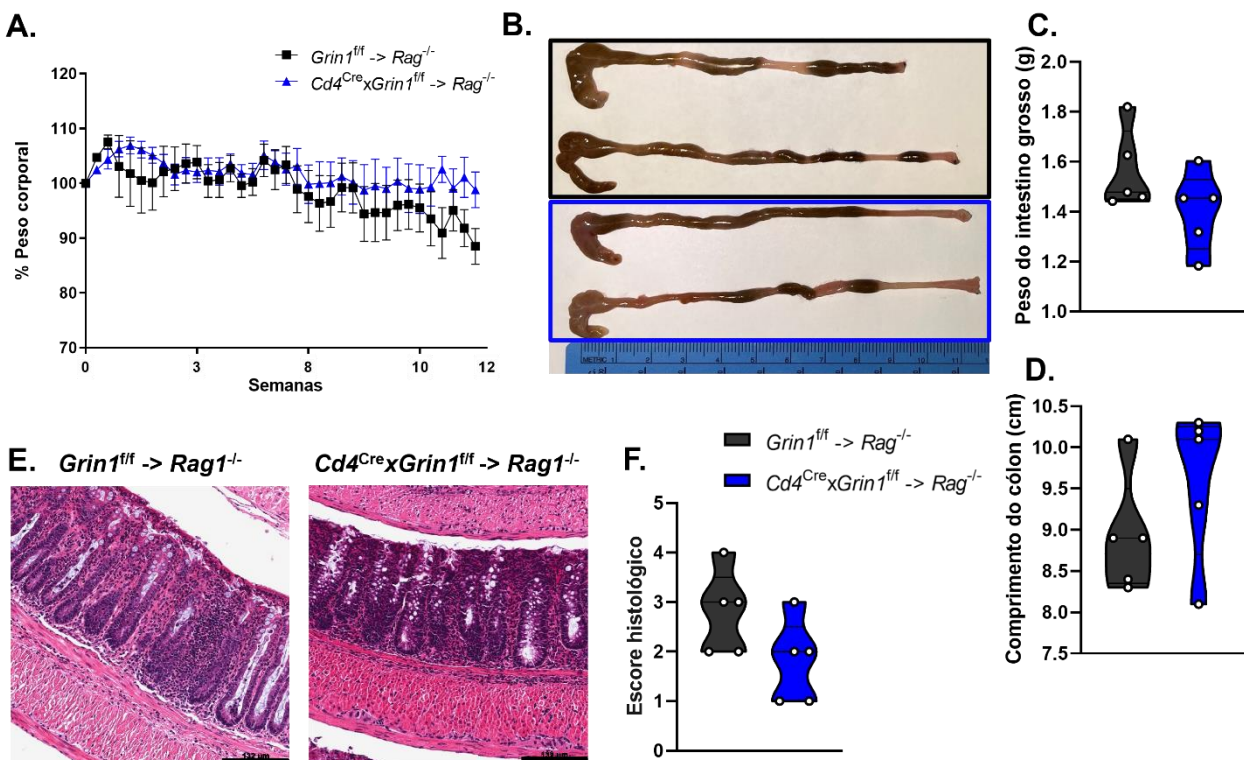


Figura 19: Sinais e sintomas da colite crônica induzida por transferência de células T de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grn1^{ff}$. Camundongos $Grn1^{ff}$ e $Cd4^{Cre} \times Grn1^{ff}$ de 8 semanas de idade foram sacrificados e o baço e linfonodos inguinais, axilares e cervicais foram coletados. Após *cell sorting*, células T CD4+ naïve de ambos os grupos foram transferidas adotivamente a camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores. Camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores foram sacrificados 12 semanas após a transferência e o intestino grosso foi coletado. O percentual de perda de peso está representado em A e os intestinos grossos de ambos os grupos representados em B. As análises de peso do intestino grosso e comprimento do cólon encontram-se em C e D, respectivamente. Em E a representação histológica do cólon distal de ambos os grupos e em F está representado o escore histológico da colite crônica de acordo com as classificações relatadas no item 3.12 de materiais e métodos. Foram utilizados 5 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento.

Em seguida, analisamos a frequência e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos acometidos pelo modelo de colite crônica induzido pela transferência adotiva de células T. Foi observado que os camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores de células T do grupo experimental $Cd4^{Cre} \times Grn1^{ff}$ possuem uma redução marcante de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (TCR β +) em ambos os compartimentos avaliados do cólon, LP (**Figura 20K**) e IEL (**Figura 20P**), em comparação com camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores de células T do grupo controle $Grn1^{ff}$. Em contrapartida, os linfonodos mesentéricos (mLN) e cecais (ceLN) de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grn1^{ff} \rightarrow Rag1^{-/-}$ mostraram um aumento na frequência de linfócitos T CD4+ (**Figura 20B e G**), em comparação ao grupo controle. Não foram observadas alterações na expressão de CD25 (**Figura 20C, H, M e R**) e FoxP3 (**Figura 20D, I, N e S**), em todos os tecidos avaliados. O que mostra que não houve modulação de células Treg neste modelo de colite crônica induzido pela transferência de células T. Investigamos também a expressão da molécula CD103, integrina $\alpha E\beta 7$ expressa por linfócitos T que se liga a E-caderina expressa por células epiteliais intestinais, promovendo assim, a retenção de linfócitos T residentes de memória (T_{rm}) no intestino. Observamos que os linfócitos T CD4+ presentes nos mLN (**Figura 20E**), ceLN (**Figura 20J**) e lâmina própria do cólon (**Figura 20O**) de animais $Cd4^{Cre} \times Grn1^{ff} \rightarrow Rag1^{-/-}$ expressam níveis extremamente baixos de CD103 quando comparados ao grupo controle $Grn1^{ff} \rightarrow Rag1^{-/-}$. Não avaliamos a expressão de CD103 em linfócitos intraepiteliais do cólon de ambos os grupos.

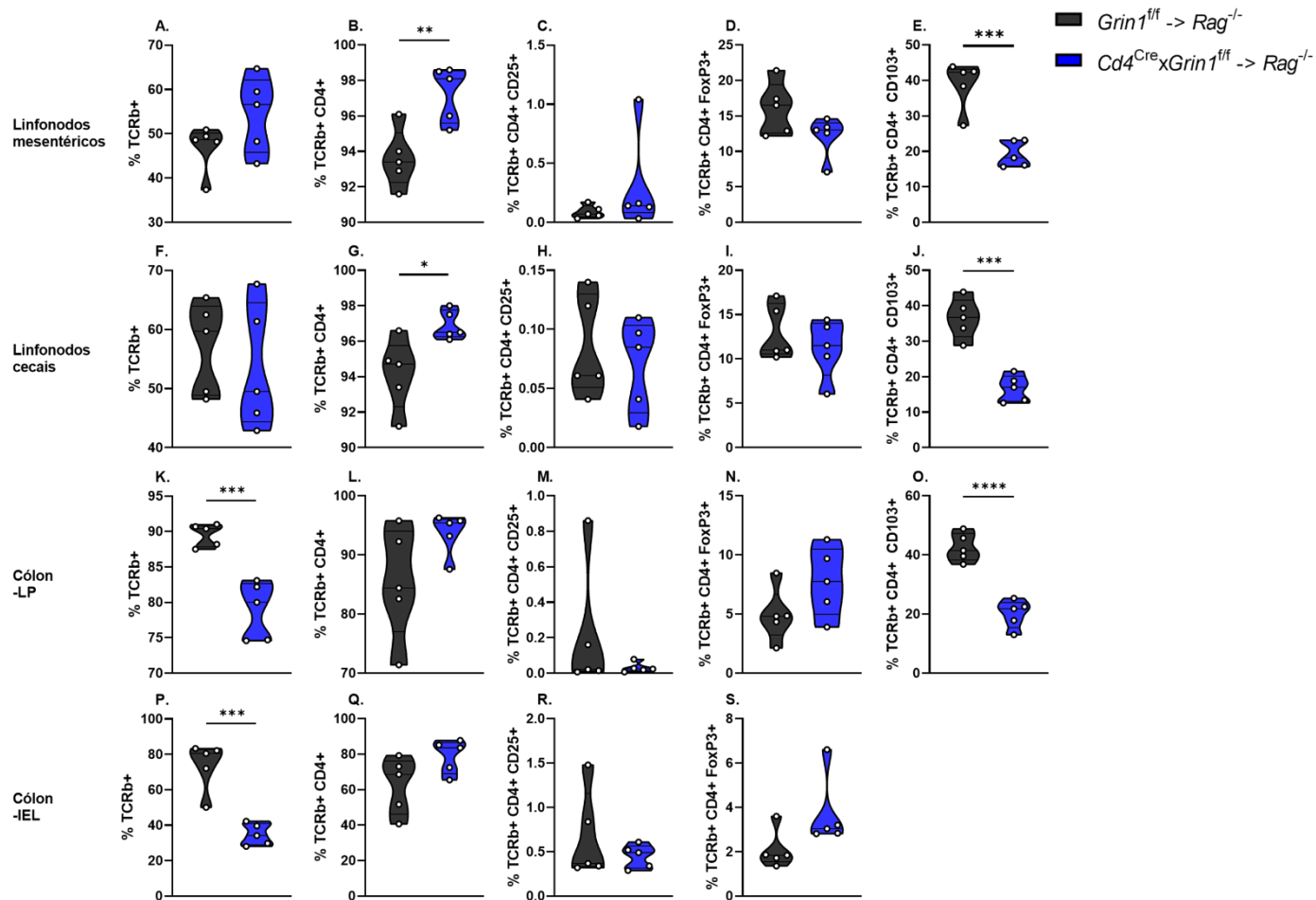


Figura 20: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por transferência de células T de camundongos $Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}$. Camundongos $Grin1^{fl/fl}$ e $Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}$ de 8 semanas de idade foram sacrificados e o baço e linfonodos inguinais, axilares e cervicais foram coletados. Após *cell sorting*, células T CD4+ naïve de ambos os grupos foram transferidas adotivamente a camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores. Camundongos $Rag1^{-/-}$ receptores foram sacrificados 12 semanas após a transferência e os linfonodos mesentéricos, linfonodos cecais e cólon foram coletados. As frequências de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (A, F, K e P), CD4+ (B, G, L e Q), CD4+CD25+ (C, H, M e R), CD4+FoxP3+ (D, I, N e S) e CD4+CD103+ (E, J e O) foram avaliadas por citometria de fluxo de acordo com mLN, ceLN, cólon-LP e cólon-IEL. Foram utilizados 5 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Ao avaliarmos a produção intracelular de citocinas, não notamos diferenças na produção de IL-10, IL-17 e IFN- γ por células T CD4+ presentes nos mLN, ceLN, cólon-LP e cólon-IEL de ambos os grupos $Rag1^{-/-}$ receptores (**Figura 21**). Interessantemente, notamos uma população de linfócitos T CD4+ produtores de ambas as citocinas IL-17 e IFN- γ , simultaneamente, neste modelo de colite crônica induzida através da transferência de células T, o que já havia sido relatado na literatura (Harbour *et al.*, 2015). Notamos que camundongos $Rag1^{-/-}$ que receberam células T do grupo experimental $Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}$ resultaram na redução de linfócitos T CD4+ duplo positivos para IL-17/IFN- γ em ambos os

linfonodos mesentéricos (Figura 21D) e cecais (Figura 21H), em comparação ao grupo controle *Grin1^{fl/fl} -> Rag1^{-/-}*.

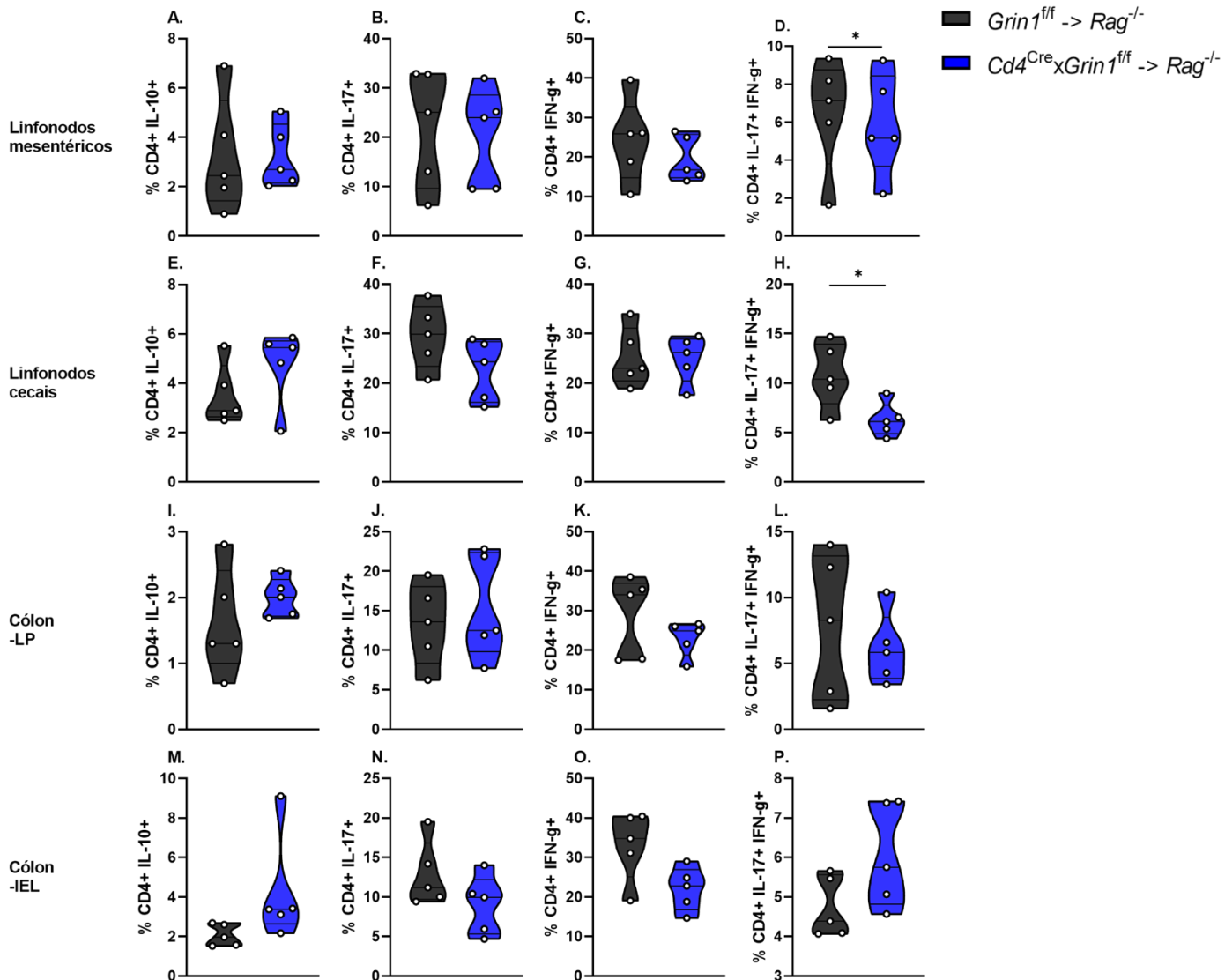


Figura 21: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ nos tecidos afetados pelo modelo de colite crônica induzido por transferência de células T de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*. Camundongos *Grin1^{fl/fl}* e *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* de 8 semanas de idade foram sacrificados e o baço e linfonodos inguinais, axilares e cervicais foram coletados. Após *cell sorting*, células T CD4+ naíve de ambos os grupos foram transferidas adotivamente a camundongos *Rag1^{-/-}* receptores. Camundongos *Rag1^{-/-}* receptores foram sacrificados 12 semanas após a transferência e os linfonodos mesentéricos, linfonodos cecais e cólon foram coletados. As células totais dos mLN, ceLN, cólon-LP e cólon-IEL foram estimuladas com PMA, ionomicina e monensina por três horas e, em seguida, avaliadas quanto a produção de IL-10 (A, E, I e M), IL-17 (B, F, J e N), IFN- γ (C, G, K e O) e IL-17/IFN- γ (D, H, L e P) por citometria de fluxo. Foram utilizados 5 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

4.6 Papel do NMDAR na tolerância oral

Por fim, decidimos investigar a deleção específica de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ na indução de tolerância oral (OT), modelo o qual linfócitos T desempenham papel importante na manutenção da homeostase intestinal e na prevenção da inflamação intestinal contra antígenos ingeridos. Resumidamente, a tolerância oral foi induzida através da ingestão contínua por cinco dias de OVA na água de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e $Grin1^{ff}$, seguido da imunização subcutânea deste camundongos com OVA emulsificado em CFA, conforme descrito em detalhes no item 3.2 de materiais e métodos. Dez dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado para análises de proliferação *in vitro* e análises fenotípicas de linfócitos T através da técnica de citometria de fluxo. Notamos que, apesar da ingestão oral de OVA ter gerado a tolerância oral como quantificado pela redução na proliferação de células T estimuladas com OVA, não foram observadas diferenças na indução de tolerância oral entre os grupos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ e seus controles $Grin1^{ff}$ (Figura 22).

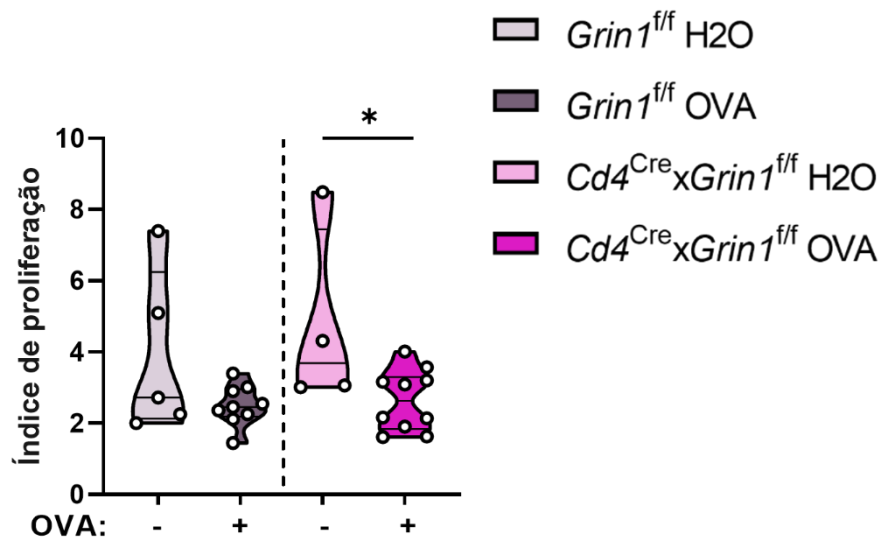


Figura 22: Avaliação da tolerância oral em camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$. Camundongos $Grin1^{ff}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade ingeriram OVA ou não em sua água por 5 dias. Interrompemos a ingestão de OVA por dois dias e, em seguida, os camundongos foram imunizados com OVA/CFA. 10 dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado. Células totais do baço foram estimuladas *in vitro* com 100 $\mu\text{g/mL}$ de OVA por 48 horas e a proliferação de células T foi avaliada através da incorporação de timidina. Foram utilizados de 5 a 10 camundongos por grupo, provenientes de apenas um experimento. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Não encontramos diferenças na frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ totais (**Figura 23A**), linfócitos T CD4+ (**Figura 23C**), linfócitos T CD8+ (**Figura 23D**) e na expressão de CD25 (**Figura 23E**) e FoxP3 (**Figura 23F**) por células Treg nos grupos experimentais através da análise pela técnica de citometria de fluxo. A única diferença encontrada foi uma redução na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ presentes no baço de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{ff}$, ambos os grupos que ingeriram apenas água e não OVA.

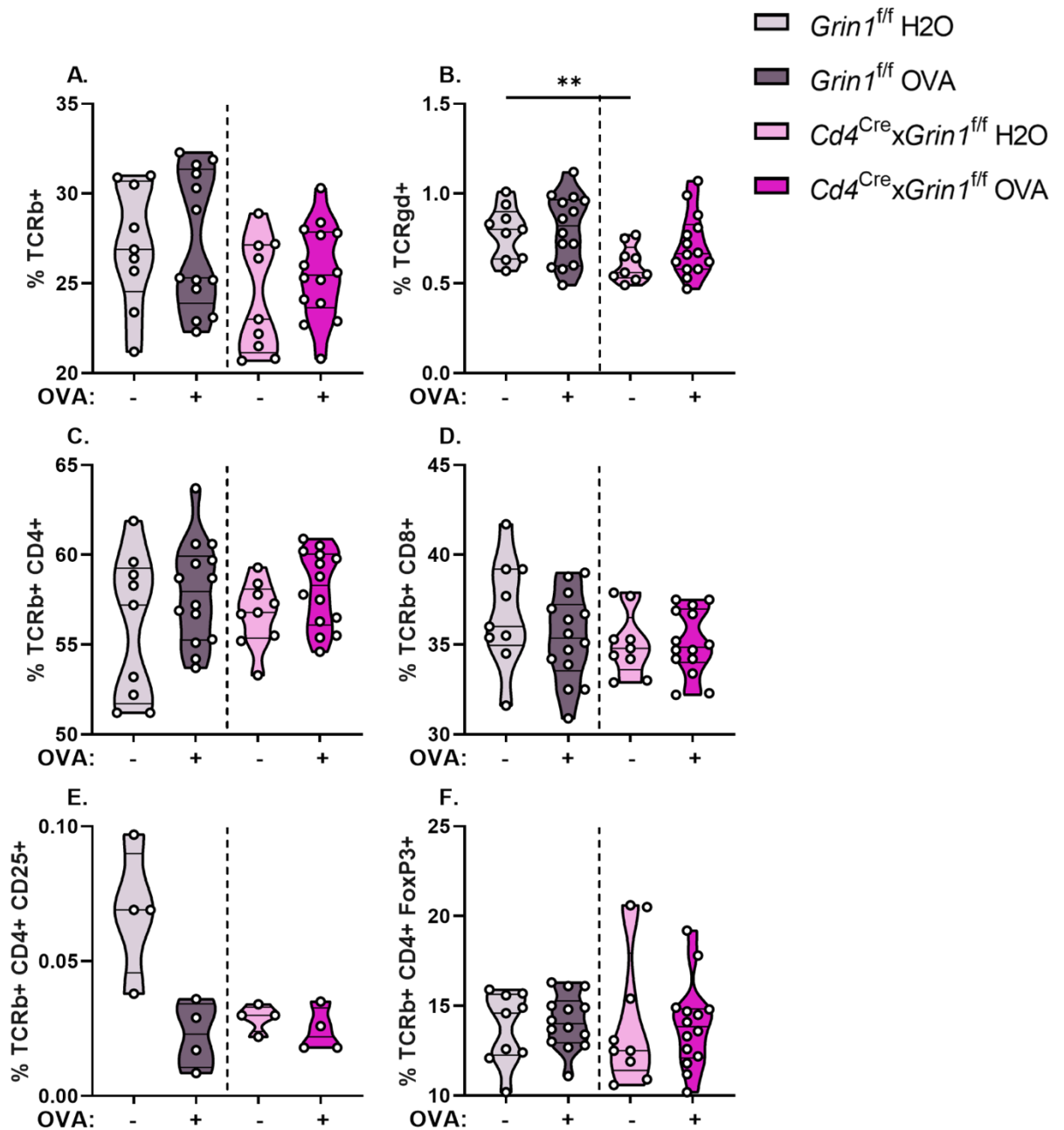


Figura 23: Distribuição e fenótipo de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ no baço de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ em modelo de tolerância oral. Camundongos $Grin1^{ff}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade ingeriram OVA ou não em sua água por 5 dias. Interrompemos a ingestão de OVA por dois dias e, em seguida, os camundongos foram imunizados com OVA/CFA. 10 dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado. A frequência de células T $\alpha\beta$ totais TCR β + (A), T $\gamma\delta$ (B), e as subpopulações de linfócitos T CD4+ (C), linfócitos T CD8+ (D), assim como a expressão de CD25 (E) e FoxP3 (F) por linfócitos T CD4+ foram avaliadas por citometria de fluxo. Foram utilizados de 5 a 10 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

Finalmente, também avaliamos a produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T CD4+ do baço de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{ff}$, após indução de tolerância oral. Novamente, nenhuma diferença foi observada entre os grupos (**Figura 24**).

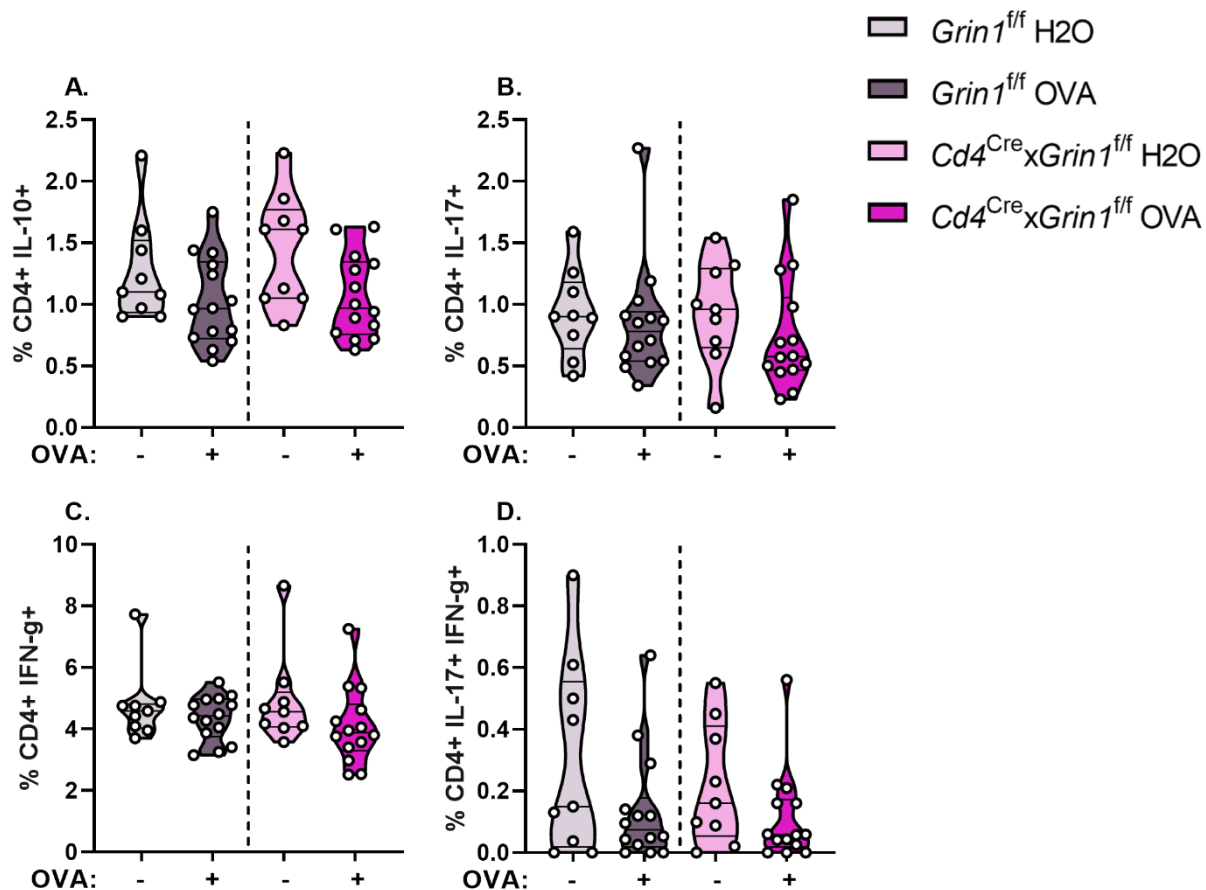


Figura 24: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+ no baço de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ em modelo de tolerância oral. Camundongos $Grin1^{ff}$ e $Cd4^{Cre} \times Grin1^{ff}$ de 8 semanas de idade ingeriram OVA ou não em sua água por 5 dias. Interrompemos a ingestão de OVA por dois dias e, em seguida, os camundongos foram imunizados com OVA/CFA. 10 dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado. As células totais do baço foram estimuladas com PMA, ionomicina e monensina por três horas e, em seguida, avaliadas quanto a produção de IL-10 (A), IL-17 (B), IFN- γ (C) e IL-17/IFN- γ (D) por citometria de fluxo. Foram utilizados de 5 a 10 camundongos por grupo, provenientes de dois experimentos independentes. *Considerado estatisticamente diferente quando $P \leq 0.05$.

5. DISCUSSÃO

Com o decorrer dos anos, nosso grupo vem estudando o receptor ionotrópico de glutamato NMDAR no SNC em um modelo experimental de Esclerose Múltipla, chamado de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Nosso grupo já demonstrou que o bloqueio do NMDAR, através de seu antagonista específico MK801, foi capaz de reduzir o escore clínico da EAE em camundongos imunizados com MOG₃₅₋₅₅, o que se dá pela redução da excitotoxicidade causada pela ativação deste receptor (manuscrito em preparação).

Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel do NMDAR em células T, mesmo sendo estudado por mais de 20 anos e mesmo tendo sido mostrado sua expressão por estas células há mais de 10 anos (Mashkina, Cizkova et al. 2010).

Baseado nestes fatos, nossos estudos primeiramente visavam compreender o papel do NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ no contexto da fisiopatologia da EAE e durante o desenvolvimento destes linfócitos T no timo, visto que os timócitos em desenvolvimento expressam este receptor e que sua deleção possa influenciar seu repertório.

As funções do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em células imunes, principalmente em linfócitos T, vêm sendo descritas ao longo dos últimos anos. Este receptor é responsável por aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular logo após a ativação de linfócitos T (Miglio, Varsaldi et al. 2005), o que pode levar a ativação da PKC dependente de Ca^{2+} , aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e indução de corpos apoptóticos ou necróticos nestas células (Boldyrev, Carpenter et al. 2005).

Durante todos estes anos, o papel do glutamato e de seu receptor ionotrópico NMDAR têm sido principalmente investigados no contexto da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Esclerose Múltipla (Lowinus, Bose et al. 2016; McFarland and Martin 2007).

Contudo, recentemente foi relatado a função do glutamato como o principal combustível responsável pela homeostase do tecido intestinal seja este proveniente da dieta (Tomé 2018) ou, até mesmo, produzido pelos neurônios do sistema nervoso entérico, podendo agir sobre as células imunes presentes na lâmina própria intestinal (Swaminathan, Hill-Yardin et al. 2019).

Devido a isto e ao fato de que o intestino é o principal órgão linfoide que abriga células T em todo o corpo, nossos estudos e foco tomaram esta direção.

Primeiramente, confirmamos a deleção específica do NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$

CD4+ e CD8+ de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}* naïve, através da citometria de fluxo. Todos os tecidos avaliados (baço, timo, linfonodos mesentéricos, linfonodos cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial dos intestinos delgado e cólon, exceto os linfonodos mesentéricos, apresentaram níveis mais baixos de NMDAR em ambas as subpopulações CD4+ e CD8+ de animais *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. Também buscamos a expressão do NMDAR em células T (CD3+) nos diferentes segmentos (duodeno, jejuno e íleo) do intestino delgado destes animais e do grupo controle, por imunofluorescência. Encontramos que apenas células T de animais controle co-expressam CD3+ e a subunidade NR1 do NMDAR em todos os segmentos do intestino delgado avaliados. Esses achados foram importantes para a validação da deleção condicional do NMDAR em células T CD4+ e também, porém em menores quantidades, em células T CD8+.

Em seguida, avaliamos a expressão das isoformas da subunidade NR2 do NMDAR compostas pelos genes *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c* e *Grin2d*, em animais deficientes do NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$. Em concordância com a literatura, a subunidade NR2 requer a expressão da subunidade invariante NR1 para dar origem ao NMDAR e este ser expresso na superfície da célula (García-Gallo and Díaz-Guerra 2001). Portanto, em nossos dados podemos identificar a expressão do mRNA das isoformas NR2a, b, c e d, mesmo não havendo a geração de um receptor maduro e funcional. Não foi possível identificar a expressão da subunidade NR2a em células T CD4+ do baço de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*. Podemos notar que apenas a subunidade NR2d se encontra mais expressa em células T CD4+ do baço, assim como as subunidades NR2c e NR2d se encontram mais expressas nas células totais dos linfonodos mesentéricos nestes animais. Acreditamos que esse fenômeno possa ocorrer de maneira compensatória ao deletar a expressão gênica da subunidade NR1 de linfócitos T $\alpha\beta$, levando em consideração que a forma mais encontrada deste receptor possui um dímero de NR1 em conjunto com outro dímero da subunidade NR2 (Schorge and Colquhoun 2003; Papadakis, Hawkins et al. 2004; Schüler, Mesic et al. 2008). Inesperadamente, as isoformas da subunidade NR2 não foram reguladas nas células intraepiteliais do intestino delgado em camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{ff}*.

Após isto, verificamos a morte celular, mais especificamente apoptose e necrose, de linfócitos T CD4+ e CD8+ de camundongos controle após cultivo in vitro com o agonista seletivo do NMDAR (NMDA) por citometria de fluxo. Testamos 5 diferentes concentrações de NMDAR, porém não foram notadas diferenças na morte de ambos os linfócitos T CD4+ e CD8+. Dados não mostrados.

Também avaliamos a expressão de genes relacionados as subpopulações de linfócitos Th1, Th17 e Treg (*Il2*, *Il6*, *Il17*, *Foxp3* e *Tbx21*) e podemos observar que células

T CD4⁺ do baço possuem um perfil gênico Th1 aumentado, enquanto células dos linfonodos mesentéricos e do compartimento intraepitelial do intestino delgado possuem um perfil misto Th1/Th17 aumentado.

O ensaio utilizado para avaliação da permeabilidade intestinal foi desenhado de acordo com Cifarelli *et al.*, 2017, que demonstrou que o pico de Dextran-FITC 4-kDa no soro de camundongos background C57BL/6 ocorre após 2 horas de sua administração. Contudo, nossos resultados sugerem que os animais *Cd4^{cre}xGrin1^{fllox}* possuem permeabilidade intestinal semelhante aos animais do grupo controle *Grin1^{flf}*. Nossas análises para determinação do trânsito intestinal, conforme Woting *et al.*, 2018, sugerem que o trânsito intestinal em ambos os animais avaliados ocorre de maneira semelhante e, após duas horas da administração do Dextran-FITC, este é identificado nas porções finais ou distais do intestino delgado, seguindo para o cólon e intestino grosso. Podemos notar que todos os segmentos do intestino delgado avaliados (duodeno, jejuno e íleo) apresentam uma tendência no aumento da concentração de Dextran-FITC, sugerindo assim, uma possível disfunção na barreira mucosa, apesar de a permeabilidade intestinal não estar alterada devido ao resultado da concentração de Dextran-FITC no soro destes animais.

Adicionalmente, camundongos *Cd4^{cre}xGrin1^{flf}* mostraram uma redução na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no órgão primário timo, o que sugere uma redução na maturação destas células ou, até mesmo, uma migração maior destas para a periferia. Notamos ainda um aumento de linfócitos T $\gamma\delta$ neste tecido em comparação ao grupo controle. Já nos órgãos linfoides secundários, notamos um aumento na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ e uma redução em linfócitos T CD8⁺ presentes no baço de animais que não possuem o NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$. Nos linfonodos mesentéricos houve uma redução em linfócitos T CD4⁺ e um aumento em linfócitos T CD8⁺. Por outro lado, nos linfonodos cecais, que drenam o ceco e cólon, notamos uma redução na frequência de linfócitos T CD4⁺. Não foram observadas alterações linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ e CD8⁺, assim como T $\gamma\delta$ presentes na lâmina própria ou entre o epitélio dos intestinos delgado e cólon. Estes dados sugerem que a deleção de NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ causam diferenças na distribuição de, principalmente, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em órgãos linfoides primários e secundários, porém não nos intestinos.

Por conta da alta expressão do NMDAR em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos intestinos, nós investigamos se sua deleção poderia afetar a inflamação intestinal em modelos experimentais de colite aguda e crônica. Embora tenhamos encontrado poucas alterações no modelo de colite aguda e crônica mediadas por DSS, nós notamos que no modelo de colite induzida pela transferência de células T CD4⁺ naíve os animais *Rag1^{-/-}* que

receberam células do grupo controle *Grin1^{fl/fl}* desenvolveram uma colite pior que o grupo receptor de células *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*. Ainda assim, camundongos receptores de células *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}* mostraram redução na produção de IL-17 e IFN- γ por células T CD4+ dos linfonodos mesentéricos e cecais em comparação ao grupo controle, o que sugere que o NMDAR expresso por células T CD4+ possui um papel importante neste modelo, considerando ainda que não foram observadas alterações na diferenciação *in vitro* de linfócitos Th1 e Th17 provenientes de camundongos *Cd4^{Cre}xGrin1^{fl/fl}*, dados não mostrados. Estes linfócitos T CD4+ duplo positivos para IL-17 e IFN- γ já foram relatados com patogenicidade neste modelo de colite (Harbour *et al.*, 2015). Além disso, notamos uma redução nas células T CD4+ de memória presentes nos linfonodos mesentéricos e cecais e também na lâmina própria dos camundongos receptores de célula T CD4+ que não expressam NMDAR. Estas células são consideradas importantes na regulação da inflamação intestinal causada neste modelo específico de colite (Annacker *et al.*, 2005; Bottois *et al.*, 2020).

Devido ao fato de que os modelos de colite permitem apenas a avaliação da inflamação do cólon, nós, por fim, investigamos o modelo de tolerância oral que permite a avaliação da função do intestino delgado, local onde os antígenos alimentares são absorvidos. Não encontramos diferenças entre os grupos ao realizarmos a tolerância oral a OVA. Esses resultados ressaltam a regulação da mucosa intestinal em prevenir perturbações causadas pela falta do receptor ionotrópico NMDAR, o que sugere ainda o envolvimento de mecanismos compensatórios desenvolvidos por células intestinais na ausência de NMDAR em células T $\alpha\beta$.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a deleção do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta$ impacta a compartimentalização de linfócitos T CD4+ e CD8+ em órgão linfoides primários e órgão linfoides secundários, como os linfonodos que drenam os intestinos delgado e cólon (mesentéricos e cecais). Nossos resultados ainda apontam para um papel importante do NMDAR expressos por células T $\alpha\beta$ no controle da inflamação intestinal no modelo de colite induzido pela transferência adotiva de células T. Em suma, nossos dados auxiliaram na compreensão do papel do receptor ionotrópico NMDAR em células T $\alpha\beta$ no controle da homeostase e inflamação intestinal.

6. CONCLUSÕES

A deleção do NMDAR especificamente em linfócitos T $\alpha\beta$ gerou:

- ✓ Um aumento na expressão gênica da isoforma NR2d em células CD4+ do baço, NR2c e NR2d em células dos linfonodos mesentéricos, enquanto nenhuma alteração das isoformas foi observada para células intraepiteliais do intestino delgado;
- ✓ Um aumento na expressão gênica de *Tbx21* em células T CD4+ do baço, *Il6*, *Il17* e *Tbx21* em células dos linfonodos mesentéricos e *Il2* e *Il6* em células intraepiteliais do intestino delgado.
- ✓ Uma redução na frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+ e um aumento na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ no timo de animais naïve;
- ✓ Uma redução na frequência de linfócitos T CD8+ e um aumento na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ no baço de animais naïve;
- ✓ Uma redução na frequência de linfócitos T CD4+ e um aumento na frequência CD8+ nos linfonodos mesentéricos de animais naïve;
- ✓ Uma redução na frequência de linfócitos T CD4+ nos linfonodos cecais de animais naïve;
- ✓ No modelo de colite aguda induzido por DSS, um aumento de células T $\gamma\delta$ e T $\alpha\beta$ totais assim como a subpopulação CD4+ e a expressão de CD25, seguido por redução da subpopulação CD8+ e ne produção de IL-17 por células T CD4+ na lâmina própria do ceco. O aumento na frequência de CD4+ e redução de CD8+ também foi notado no compartimento intraepitelial do cólon. Também gerou uma redução de linfócitos T $\gamma\delta$ na lâmina própria do cólon;
- ✓ No modelo de colite crônica induzido por DSS, uma redução na frequência de linfócitos T CD4+ e na expressão de CD25, porém um aumento na produção de IFN- γ por estas células na lâmina própria do cólon;
- ✓ No modelo de colite crônica induzido pela transferência adotiva, um aumento na frequência de linfócitos T CD4+ e redução de CD103 e na produção de IL-17 e IFN- γ nos linfonodos mesentéricos e cecais. Redução na frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ totais na lâmina própria e compartimento intraepitelial do cólon.

Condição naíve	T $\alpha\beta$ total	T $\alpha\beta$ CD4+	T $\alpha\beta$ CD8+	T $\gamma\delta$
Baço	s/a	s/a	↓	↑
Timo	s/a	↓	↓	s/a
mLN	s/a	↓	↑	s/a
ceLN	s/a	↑	s/a	s/a
Intestino delgado-LP	s/a	s/a	s/a	s/a
Intestino delgado-IEL	s/a	s/a	s/a	s/a
Cólon-LP	s/a	s/a	s/a	s/a
Cólon-IEL	s/a	s/a	s/a	s/a

Tabela 2: Frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4+ e CD8+) e T $\gamma\delta$ nos órgãos linfoides de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ naíve. Resumo dos achados encontrados no baço, timo, linfonodos mesentéricos e cecais, lâmina própria e compartimento intraepitelial do intestino delgado e cólon de camundongos $Cd4^{Cre} \times Grin1^{fl/fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl/fl}$. Setas para cima, aumento da frequência; seta para baixo, diminuição da frequência; s/a, sem alteração na frequência.

DSS agudo	T $\alpha\beta$	T CD4+	T CD4+ CD25+	T CD4+ FoxP3+	T CD8+	T $\gamma\delta$
ceLN	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
Ceco-LP	↑	↑	↑	s/a	↓	↑
Cólon-LP	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
Cólon-IEL	s/a	↑	s/a	↓	↓	s/a
DSS crônico	T $\alpha\beta$	T CD4+	T CD4+ CD25+	T CD4+ FoxP3+	T CD8+	T $\gamma\delta$
ceLN	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
Ceco-LP	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
Cólon-LP	s/a	↓	↓	s/a	s/a	s/a
Cólon-IEL	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
Transferência adotiva	T $\alpha\beta$	T CD4+	T CD4+ CD25+	T CD4+ FoxP3+	T CD4+ CD103+	
mLN	s/a	↑	s/a	s/a	↓	
ceLN	s/a	↑	s/a	s/a	↓	
Cólon-LP	↓	s/a	s/a	s/a	↓	
Cólon-IEL	↓	s/a	s/a	s/a	n/a	

Tabela 3: Frequência de linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4+ e CD8+) e linfócitos T $\gamma\delta$ e expressão de CD25, FoxP3 e CD103 por linfócitos T CD4+ nos órgãos linfóides de camundongos $Cd4^{Cre}Grin1^{fl}$ submetidos a três modelos distintos de colite. Resumo dos achados encontrados nos linfonodos mesentéricos, linfonodos cecais, lâmina própria do ceco e cólon e compartimento intraepitelial do cólon de camundongos $Cd4^{Cre}Grin1^{fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl}$. Seta para cima, aumento da frequência; seta para baixo, diminuição da frequência; s/a, sem alteração na frequência; n/a, não avaliado.





DSS agudo	IL-10	IL-17	IFN-γ	
ceLN	s/a	s/a	s/a	
Ceco-LP	s/a		s/a	
Cólon-LP	s/a	s/a	s/a	
Cólon-IEL	s/a	s/a	s/a	
DSS crônico	IL-10	IL-17	IFN-γ	
ceLN	s/a	s/a	s/a	
Ceco-LP	s/a	s/a	s/a	
Cólon-LP	s/a	s/a		
Cólon-IEL	s/a	s/a	s/a	
Transferência adotiva	IL-10	IL-17	IFN-γ	IL-17/ IFN-γ
mLN	s/a	s/a	s/a	
ceLN	s/a	s/a	s/a	
Cólon-LP	s/a	s/a	s/a	s/a
Cólon-IEL	s/a	s/a	s/a	s/a

Tabela 4: Produção intracelular de IL-10, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T CD4+ de camundongos $Cd4^{Cre}Grin1^{fl}$ submetidos a três modelos distintos de colite. Resumo dos achados encontrados nos linfonodos mesentéricos, linfonodos cecais, lâmina própria do ceco e cólon e compartimento intraepitelial do cólon de camundongos $Cd4^{Cre}Grin1^{fl}$ em comparação ao grupo controle $Grin1^{fl}$. Seta para cima, aumento da frequência; seta para baixo, diminuição da frequência; s/a, sem alteração na frequência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*, 8ª edição. Elsevier, 2015.
- ADER, R.; FELTEN, D.; COHEN, N. Interactions between the brain and the immune system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 30, p. 561-602, 1990. ISSN 0362-1642.
- AFFATICATI, P. et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 1, p. 99-108, Jan 2011. ISSN 1476-5403.
- ANNACKER, O. et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* 202, 1051–1061 (2005).
- ANNUNZIATO, F. et al. (2007) 'Phenotypic and functional features of human Th17 cells', *Journal of Experimental Medicine*, 204(8), pp. 1849–1861. doi: 10.1084/jem.20070663.
- BAUMGART, D. C. AND CARDING, S. R. (2007) 'Series Gastroenterology 1 Inflammatory bowel disease : cause and immunobiology', *The Lancet*, 369, pp. 1627–1640.
- BAI, N. et al. NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. **Mol Brain**, v. 6, p. 34, Jul 2013. ISSN 1756-6606.
- BALEMBA, O. B. et al. The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. **J Anat**, v. 192 (Pt 2), p. 257-67, Feb 1998. ISSN 0021-8782.
- BARBANTI, P. et al. Increased density of dopamine D5 receptor in peripheral blood lymphocytes of migraineurs: a marker for migraine? **Neurosci Lett**, v. 207, n. 2, p. 73-6, Mar 1996. ISSN 0304-3940.
- BARNES, M. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 401-11, Sep 2009. ISSN 1097-4180.
- BECKER, C. et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. **J Clin Invest**, v. 112, n. 5, p. 693-706, Sep 2003. ISSN 0021-9738.
- BERGLES, D. E. et al. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 187-91, May 2000. ISSN 0028-0836.
- BOISMENU, R. AND CHEN, Y. (2000) 'Insights from mouse models of colitis', *Journal of Leukocyte Biology*, 67(3), pp. 267–278. doi: 10.1002/jlb.67.3.267.
- BOLDYREV, A. A., D. O. CARPENTER AND P. JOHNSON (2005). "Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems." *J Neurochem* 95(4): 913-918.
- BOTTOIS, H. et al. KLRG1 and CD103 Expressions Define Distinct Intestinal Tissue-Resident Memory CD8 T Cell Subsets Modulated in Crohn's Disease. *Front. Immunol.* 11, 1–13 (2020).
- BRAZIL, J. C., LOUIS, N. A. AND PARKOS, C. A. (2013) 'The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease', *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(7), pp. 1556–1565. doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f54e.
- BURISCH, J. et al. (2013) 'The burden of inflammatory bowel disease in Europe', *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(4), pp. 322–337. doi: 10.1016/j.crohns.2013.01.010.
- BURNS, G. A.; STEPHENS, K. E. Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) co-exist in enteric neurons of the rat. **J Auton Nerv Syst**, v. 55, n. 3, p. 207-10, Nov 1995. ISSN 0165-1838.
- BURNS, G. A.; STEPHENS, K. E.; BENSON, J. A. Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor by the enteric neurons of the rat. **Neurosci Lett**, v. 170, n. 1, p. 87-90, Mar 1994. ISSN 0304-3940.

- CHEROUTRE, H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 217-46, 2004. ISSN 0732-0582.
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 7, p. 445-56, Jun 2011. ISSN 1474-1741.
- CHOI, D. W. Calcium and excitotoxic neuronal injury. **Ann N Y Acad Sci**, v. 747, p. 162-71, Dec 1994. ISSN 0077-8923.
- CIFARELLI V., et al. CD36 deficiency impairs the small intestinal barrier and induces subclinical inflammation in mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;3:82–98. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.001.
- COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev**, v. 41, n. 2, p. 143-210, Jun 1989. ISSN 0031-6997.
- CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 205-37, 1997. ISSN 0362-1642.
- CONTI, F. et al. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. **Cereb Cortex**, v. 9, n. 2, p. 110-20, Mar 1999. ISSN 1047-3211.
- CURTIS, D. R.; WATKINS, J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **J Neurochem**, v. 6, p. 117-41, Sep 1960. ISSN 0022-3042.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082.
- DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 4, p. 597-664, Dec 1998. ISSN 0031-6997.
- DINGLEDINE, R.; CONN, P. J. Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1039S-42S, Apr 2000. ISSN 0022-3166.
- DROLIA, R. et al. Listeria Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation. **Cell Host Microbe**, v. 23, n. 4, p. 470-484.e7, 04 2018. ISSN 1934-6069.
- EBBO, M. et al. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 11, p. 665-678, Nov 2017. ISSN 1474-1741.
- ECK, H. P. et al. Partial recovery of lymphocyte activity in patients with colorectal carcinoma after curative surgical treatment and return of plasma glutamate concentrations to normal levels. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 116, n. 6, p. 648-50, 1990. ISSN 0171-5216.
- ECK, H. P.; FREY, H.; DRÖGE, W. Elevated plasma glutamate concentrations in HIV-1-infected patients may contribute to loss of macrophage and lymphocyte functions. **Int Immunol**, v. 1, n. 4, p. 367-72, 1989. ISSN 0953-8178.
- ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-8, Jun 2005. ISSN 1095-9203.
- FALLARINO, F. et al. Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. **Nat Med**, v. 16, n. 8, p. 897-902, Aug 2010. ISSN 1546-170X.
- FANG, S.; WU, R.; CHRISTENSEN, J. Intramucosal nerve cells in human small intestine. **J Auton Nerv Syst**, v. 44, n. 2-3, p. 129-36, 1993 Aug-Sep 1993. ISSN 0165-1838.
- FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 16, n. 2, p. 171-91, 1991 May-Aug 1991.
- FISCHER, A. H., K. A. JACOBSON, J. ROSE and R. ZELLER (2008). "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections." CSH Protoc 2008: pdb.prot4986.

- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, v. 42, n. 1, p. 1-11, Jan 1984. ISSN 0022-3042.
- FUJINO, S. et al. (2003) 'Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease', *Gut*, 52(1), pp. 65–70. doi: 10.1136/gut.52.1.65.
- FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 141-143, Feb 2006.
- GARCÍA-GALLO M, RENART J, DÍAZ-GUERRA M. The NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor can be efficiently expressed alone in the cell surface of mammalian cells and is required for the transport of the NR2A subunit. *Biochem J*. 2001;356(Pt 2):539-547. doi:10.1042/0264-6021:3560539
- GERLACH, K. et al. (2014) 'T H 9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells', *Nature Immunology*, 15(7), pp. 676–686. doi: 10.1038/ni.2920.
- GLOBIG, A. M. et al. (2014) 'Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- γ +IL-17+coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease', *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(12), pp. 2321–2329. doi: 10.1097/MIB.0000000000000210.
- GRIDER, J. R. et al. Regulation of the descending relaxation phase of intestinal peristalsis by PACAP. **J Auton Nerv Syst**, v. 50, n. 2, p. 151-9, Dec 1994. ISSN 0165-1838.
- GUERESCHI, M. G. et al. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 4, p. 1001-12, Apr 2013. ISSN 1521-4141.
- HACK, N.; BALÁZS, R. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of granule cells in culture: effect of quisqualate and AMPA. **Neurochem Int**, v. 25, n. 3, p. 235-41, Sep 1994. ISSN 0197-0186.
- HARBOUR, S. N., MAYNARD, C. L., ZINDL, C. L., SCHOEB, T. R. & WEAVER, C. T. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7061–7066 (2015).
- HART, A. L. et al. (2005) 'Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases', *Gastroenterology*, 129(1), pp. 50–65. doi: 10.1053/j.gastro.2005.05.013.
- HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jpn J Physiol**, v. 3, n. 1, p. 46-64, Nov 1952. ISSN 0021-521X.
- HAYASHI, H. et al. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **J Med Microbiol**, v. 54, n. 11, p. 1093-1101, Nov 2005.
- HEADLEY, P. M.; GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 5, p. 205-11, May 1990. ISSN 0165-6147.
- HERTZ, L. **Glutamate, a neurotransmitter and so much more. A synopsis of Wierzba III. . Neurochemistry International.** 48: 416-425 p. 2006.
- HOLZER, P.; SCHLUET, W.; MAGGI, C. A. Ascending enteric reflex contraction: roles of acetylcholine and tachykinins in relation to distension and propagation of excitation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 264, n. 1, p. 391-6, Jan 1993. ISSN 0022-3565.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-73, Jun 2012. ISSN 1095-9203.
- HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 159-69, Mar 2010. ISSN 1474-1741.

- HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-4, Feb 2001. ISSN 0036-8075.
- HORNBY, P. J. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, n. 6, p. G1055-60, Jun 2001. ISSN 0193-1857.
- HOYTEMA VAN KONIJNENBURG, D. P. et al. Intestinal Epithelial and Intraepithelial T Cell Crosstalk Mediates a Dynamic Response to Infection. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 783-794.e13, Nov 2017. ISSN 1097-4172.
- HÖSLI, E.; HÖSLI, L. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 40, n. 4, p. 477-506, Apr 1993. ISSN 0301-0082.
- HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Microbiology: Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481-483, Set 2008.
- HUIBREGTSE, I. L., VAN LENT, A. U. AND VAN DEVENTER, S. J. H. (2007) 'Immunopathogenesis of IBD: Insufficient suppressor function in the gut?', *Gut*, 56(4), pp. 584–592. doi: 10.1136/gut.2006.103523.
- KAHLFUß, S. et al. Immunosuppression by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of Kv1.3 and KCa3.1 channels in T cells. **Mol Cell Biol**, v. 34, n. 5, p. 820-31, Mar 2014. ISSN 1098-5549.
- KAMADA, N. et al. (2008) 'Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis', *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), pp. 2269–2280. doi: 10.1172/JCI34610.
- KAPLAN, G. G. (2015) 'The global burden of IBD: From 2015 to 2025', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(12), pp. 720–727. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
- KAPLAN, G. G. AND NG, S. C. (2017) 'Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease', *Gastroenterology*, 152(2), pp. 313-321.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.020.
- KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, Apr 2005. ISSN 0033-3158.
- KIRCHGESSNER, A. L. Glutamate in the enteric nervous system. **Curr Opin Pharmacol**, v. 1, n. 6, p. 591-6, Dec 2001. ISSN 1471-4892.
- KIRCHGESSNER, A. L.; LIU, M. T.; ALCANTARA, F. Excitotoxicity in the enteric nervous system. **J Neurosci**, v. 17, n. 22, p. 8804-16, Nov 1997. ISSN 0270-6474.
- KIRCHGESSNER, A. L.; TAMIR, H.; GERSHON, M. D. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. **J Neurosci**, v. 12, n. 1, p. 235-48, Jan 1992. ISSN 0270-6474.
- KONIJNENBURG, D. et al. Intestinal epithelial and intraepithelial T cell crosstalk mediates a dynamic response to infection. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 783-794, Nov 2017. INSS 2894-2917.
- KVARATSKHELIA, E. et al. N-methyl-D-aspartate and sigma-ligands change the production of interleukins 8 and 10 in lymphocytes through modulation of the NMDA glutamate receptor. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 201-7, 2009. ISSN 1423-0216.
- LABERGE, S. et al. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. **J Immunol**, v. 156, n. 1, p. 310-5, Jan 1996. ISSN 0022-1767.
- LAUBE, B.; KUHSE, J.; BETZ, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. **J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2954-61, Apr 1998. ISSN 0270-6474.

- LEACH, M. W. et al. (1996) 'Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells', *American Journal of Pathology*, 148(5), pp. 1503–1515.
- LECCI, A.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C. A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 6, p. 630-41, Dec 2002. ISSN 1471-4892.
- LEE, S. H.; STARKEY, P. M.; GORDON, S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. J Exp Med*, v. 161, n. 3, p. 475-89, Mar 1985. ISSN 0022-1007.
- LEY, R. E. et al. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 776-88, 10 2008. ISSN 1740-1534.
- LIU, M. T. et al. Glutamatergic enteric neurons. **J Neurosci**, v. 17, n. 12, p. 4764-84, Jun 1997. ISSN 0270-6474.
- LOMBARDI, G. et al. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 6, p. 936-44, Jul 2001. ISSN 0007-1188.
- LOWINUS, T., T. BOSE, S. BUSSE, M. BUSSE, D. REINHOLD, B. SCHRAVEN AND U. H. BOMMHARDT (2016). "Immunomodulation by memantine in therapy of Alzheimer's disease is mediated through inhibition of Kv1.3 channels and T cell responsiveness." *Oncotarget* 7(33): 53797-53807.
- LU, Y. et al. Zbtb1 controls NKp46. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 55877-55888, Aug 2017. ISSN 1949-2553. LUO, T.; WU, W. H.; CHEN, B. S. NMDA receptor signaling: death or survival? **Front Biol (Beijing)**, v. 6, n. 6, p. 468-476, Dec 2011. ISSN 1674-7984.
- MACPHERSON, A. J. et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, v. 288, n. 5474, p. 2222-6, Jun 2000. ISSN 0036-8075. MANTUANO, E. et al. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. **Blood**, v. 130, n. 11, p. 1364-1374, 09 2017. ISSN 1528-0020.
- MASHKINA, A. P. et al. NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. **Cell Mol Neurobiol**, v. 30, n. 6, p. 901-7, Aug 2010. ISSN 1573-6830.
- MATUTE, C.; DOMERCQ, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v. 53, n. 2, p. 212-24, Jan 2006. ISSN 0894-1491.
- MAUL, J. et al. (2005) 'Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 128(7), pp. 1868–1878. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.043.
- MAYANS, S. et al. $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4(-)CD8 $\alpha\beta$ (-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 207-218, Aug 2014. ISSN 1097-4180.
- MCBAIN, C. J.; MAYER, M. L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev**, v. 74, n. 3, p. 723-60, Jul 1994. ISSN 0031-9333. MCDONALD, J. W. et al. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. **Nat Med**, v. 4, n. 3, p. 291-7, Mar 1998. ISSN 1078-8956.
- MCENTEE, W. J.; CROOK, T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 111, n. 4, p. 391-401, 1993. ISSN 0033-3158.
- MCFARLAND, H. F. AND R. MARTIN (2007). "Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity." *Nat Immunol* 8(9): 913-919.
- MCROBERTS, J. A. et al. Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. **Gastroenterology**, v. 120, n. 7, p. 1737-48, Jun 2001. ISSN 0016-5085.

- MESTECKY, J. et al. *Mucosal Immunology*, 4^a edição. **Elsevier**, 2015.
- MIDDEL, P. et al. (2006) 'Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: Evidence for a chemokine mediated retention mechanism', *Gut*, 55(2), pp. 220–227. doi: 10.1136/gut.2004.063008.
- MIGLIO, G., F. VARSALDI AND G. LOMBARDI (2005). "Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation." *Biochem Biophys Res Commun* 338(4): 1875-1883.
- MOLODECKY, N. A. et al. (2012) 'Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review', *Gastroenterology*, 142(1), pp. 46-54.e42. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.
- MONYER, H. et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 529-40, Mar 1994. ISSN 0896-6273.
- MORIYAMA, Y. et al. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. **J Exp Biol**, v. 203, n. Pt 1, p. 117-25, Jan 2000. ISSN 0022-0949.
- MORONI, F. et al. The presence of N-methyl-D-aspartate-type receptors for glutamic acid in the guinea pig myenteric plexus. **Neurosci Lett**, v. 68, n. 1, p. 57-62, Jul 1986. ISSN 0304-3940.
- MORSON, B. C. AND PATK, F. C. (no date) 'The Surgical Pathology of Crohn ' s Disease and', pp. 7–29.
- MULLER, P. A. et al. Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. **Cell**, v. 158, n. 5, p. 1210, Aug 2014. ISSN 1097-4172.
- NAKANISHI, N.; AXEL, R.; SHNEIDER, N. A. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 18, p. 8552-6, Sep 1992. ISSN 0027-8424. NEURATH, M. F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L. H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nat Med**, v. 8, n. 6, p. 567-73, Jun 2002. ISSN 1078-8956.
- NEURATH, M. F. (2012) 'Animal models of inflammatory bowel diseases: Illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer', *Digestive Diseases*, 30(SUPPL. 1), pp. 91–94. doi: 10.1159/000341131.
- NG, S. C. et al. (2017) 'Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies', *The Lancet*, 390(10114), pp. 2769–2778. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
- NI, J. et al. (2017) 'Gut microbiota and IBD: Causation or correlation?', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(10), pp. 573–584. doi: 10.1038/nrgastro.2017.88.
- OLLENSCHLÄGER, G. et al. Plasma glutamate--a prognostic marker of cancer and of other immunodeficiency syndromes? **Scand J Clin Lab Invest**, v. 49, n. 8, p. 773-7, Dec 1989. ISSN 0036-5513.
- OLSZAK, T. et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 489-93, Apr 2012. ISSN 1095-9203.
- OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. **J Comp Neurol**, v. 229, n. 3, p. 374-92, Nov 1984. ISSN 0021-9967. PACHECO, R. et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6695-704, Nov 2006. ISSN 0022-1767.
- PAPADAKIS M, HAWKINS LM, STEPHENSON FA. Appropriate NR1—NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-d-aspartate NR1/NR2 receptors. *J Biol Chem*. 2004;279:14703—12.11.

- PIN, J. P.; DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-26, Jan 1995. ISSN 0028-3908.
- PORTER, A. J. et al. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1916-23, Dec 1997. ISSN 0016-5085.
- POUSSIER, P. et al. A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. **J Exp Med**, v. 195, n. 11, p. 1491-7, Jun 2002. ISSN 0022-1007.
- RICCI, A. et al. Labeling of dopamine D3 and D4 receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes with [3H]7-OH-DPAT: a combined radioligand binding assay and immunochemical study. **J Neuroimmunol**, v. 92, n. 1-2, p. 191-5, Dec 1998. ISSN 0165-5728.
- POWRIE, F. (1995) 'T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles', *Immunity*, 3(2), pp. 171–174. doi: 10.1016/1074-7613(95)90086-1.
- RAMESH, R. et al. (2014) 'Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids', *Journal of Experimental Medicine*, 211(1), pp. 89–104. doi: 10.1084/jem.20130301.
- RICCIARDELLI, I. et al. (2008) 'Anti tumour necrosis- α therapy increases the number of FOXP3 + regulatory T cells in children affected by Crohn's disease', *Immunology*, 125(2), pp. 178–183. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02839.x.
- RIMOLDI, M. et al. (2005) 'Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells', *Nature Immunology*, 6(5), pp. 507–514. doi: 10.1038/ni1192.
- ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98-101, Oct 2011. ISSN 1095-9203.
- SANDS, B. E. (2007) 'Inflammatory bowel disease: Past, present, and future', *Journal of Gastroenterology*, 42(1), pp. 16–25. doi: 10.1007/s00535-006-1995-7.
- SANOS, S. L. et al. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. **Nat Immunol**, v. 10, n. 1, p. 83-91, Jan 2009. ISSN 1529-2916.
- SANTAMBROGIO, L. et al. Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. **J Neuroimmunol**, v. 45, n. 1-2, p. 113-9, Jun 1993. ISSN 0165-5728. SCHEMANN, M. et al. Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, n. 6, p. G919-25, Jun 2002. ISSN 0193-1857.
- SCHOEPP, D. D.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 1, p. 13-20, Jan 1993. ISSN 0165-6147.
- SCHORGE S, COLQUHOUN D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*.2003;23:1151—8.10.
- SCHÜLER T, MESIC I, MADRY C, BARTHOLOMÄUS I, LAUBE B. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem*.2008;283:37—46.
- SEGOVIA, G. et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 1, p. 1-29, Jan 2001. ISSN 0047-6374. SHELTON, M. K.; MCCARTHY, K. D. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. **Glia**, v. 26, n. 1, p. 1-11, Mar 1999. ISSN 0894-1491.
- DE SOUZA, H. S. P. AND FIOCCHI, C. (2016) 'Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13(1), pp. 13–27. doi: 10.1038/nrgastro.2015.186.

- STEINHÄUSER, C.; GALLO, V. News on glutamate receptors in glial cells. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 339-45, Aug 1996. ISSN 0166-2236.
- STORTO, M. et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. **J Neuroimmunol**, v. 109, n. 2, p. 112-20, Sep 2000. ISSN 0165-5728.
- SWAMINATHAN, M., E. L. HILL-YARDIN, J. C. BORNSTEIN AND J. P. P. FOONG (2019). "Endogenous Glutamate Excites Myenteric Calbindin Neurons by Activating Group I Metabotropic Glutamate Receptors in the Mouse Colon." *Front Neurosci* 13: 426.
- TAYLOR, G. S.; BYWATER, R. A. Antagonism of non-cholinergic excitatory junction potentials in the guinea-pig ileum by a substance P analogue antagonist. **Neurosci Lett**, v. 63, n. 1, p. 23-6, Jan 1986. ISSN 0304-3940.
- TOMÉ, D. The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine. **Ann Nutr Metab**, v. 73 Suppl 5, p. 15-20, 2018. ISSN 1421-9697.
- VELTKAMP, C. et al. (2011) 'Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF α treatment', *Gut*, 60(10), pp. 1345–1353. doi: 10.1136/gut.2010.217117.
- VERNADAKIS, A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. **Prog Neurobiol**, v. 49, n. 3, p. 185-214, Jun 1996. ISSN 0301-0082.
- WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S100-8, Jan 2006. ISSN 0007-1188.
- WIRTZ, S. et al. (2007) 'Chemically induced mouse models of intestinal inflammation', *Nature Protocols*, 2(3), pp. 541–546. doi: 10.1038/nprot.2007.41.
- WOTING A, BLAUT M. Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3H Mice. **Nutrients**. 2018;10(6):685. Published 2018 May 28. doi:10.3390/nu10060685
- WOOD, J. D.; ALPERS, D. H.; ANDREWS, P. L. Fundamentals of neurogastroenterology. **Gut**, v. 45 Suppl 2, p. II6-II16, Sep 1999. ISSN 0017-5749. YANO, S.; TOKUMITSU, H.; SODERLING, T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. **Nature**, v. 396, n. 6711, p. 584-7, Dec 1998. ISSN 0028-0836.
- YOUNG, M. R. et al. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. **Immunology**, v. 80, n. 3, p. 395-400, Nov 1993. ISSN 0019-2805.

APÊNDICES

Artigos completos publicados em periódicos durante o doutorado

- 1) Lira, A. A. L.; **De Oliveira, M. G.**; Inoue, A. H. S.; Beltrame, G. R.; Duarte, A. J. S.; Victor, J. R. . Preconceptional allergen immunization can induce offspring IL-17 secreting B cells (B17): do they share similarities with regulatory B10 cells?. *Allergologia Et Immunopathologia*, p. 454-459, 2018 (**Anexo 3**).
- 2) **De Oliveira, M. G.**; De Lima Lira, Aline Aparecida; Da Ressureição Sgnotto, Fábio; Inoue, Amanda Harumi Sabô; Beltrame, Giovanna Rossi; Da Silva, Débora; Menghini, Ricardo Palamar; Da Silva Duarte, Alberto José; Russo Victor, Jefferson. . Maternal immunization down-regulates offspring TCD4 regulatory cells (Tregs) thymic maturation without implications for allergy inhibition. *Scandinavian Journal Of Immunology*, v. 88, p. e12721, 2018 (**Anexo 4**).
- 3) **De Oliveira, M. G.**; Lira, A. A. L.; Sgnotto, F. R.; Inoue, A. H. S.; Duarte, A. J. S.; Victor, J. R. . Preconception immunization can modulate intracellular Th2 cytokine profile in offspring: in vivo influence of interleukin 10 and B/T cell collaboration. *Central European Journal of Immunology*, v. 43, p. 378-388, 2018 (**Anexo 5**).
- 4) **De Oliveira, M. G.**; Lira, Aline A. L.; Sgnotto, Fábio R.; Inoue, Amanda H. S.; Santos, Ludimila S.; Nakamatsu, Bernardo Y.; Duarte, Alberto J. S.; Leite'de'moraes, Maria; Victor, Jefferson R. . Maternal IgG impairs the maturation of offspring intrathymic IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells: Implications for murine and human allergies. *Clinical And Experimental Allergy*, v. 49, p. 454-459, 2019 (**Anexo 6**).
- 5) **De Oliveira, M. G.**; Sgnotto, F. R.; De sousa, T. R.; Fagundes, B. O.; Duarte, A. J. S.; Victor, J. R. . Preconceptional immunization with an allergen can inhibit offspring Th17 maturation without influence Th1 and Th2 cells. *European Cytokine Network*, v. 31, n. 3, p. 113-117, 2020 (**Anexo 7**).
- 6) Brandão, W. N.; **De Oliveira, M. G.**; Andreoni, R. T.; Nakaya, H.; Farias, A. S.; Peron, J. P. S. . Neuroinflammation at single cell level: What is new? *Journal of Leukocyte Biology*, v. 108, i. 4, p. 1129-1137, 2020 (**Anexo 8**).
- 7) Inoue, A. H. S.; Lira, A. A. L.; **De Oliveira, M. G.**; De Sousa, T. R.; Sgnotto, F. R.; Duarte, A. J. S.; Victor, J. R. . The Potential of IgG to Induce Murine and Human Thymic Maturation of IL-10+ B Cells (B10) Revealed in a Pilot Study. *Cells*, v. 9, p. 2239, 2020 (**Anexo 9**).

- 8) Polonio, C. M.; De Freitas, C. L.; **De Oliveira, M. G.**; Rossato, C.; Brandão, W. N.; Zanolui, N. G.; De Oliveira, L. G.; Mimura, L. A. N.; Silva, M. B. B.; Calich, V. L. G.; Nisenbaum, M. G.; Halpern, S.; Evangelista, L.; Maluf, M.; Perin, P.; Czeresnia, C. E.; Peron, J. P. S. . Murine endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis depending on indoleamine-2,3-dioxygenase expression. *Clinical Science*, v. 135, i. 9, p. 1065-1082, 2021 (**Anexo 10**).
- 9) De Freitas, C. L.; Polonio, C. M.; Brandão, W. N.; Rossato, C.; Zanolui, N. G.; De Oliveira, L. G.; **De Oliveira, M. G.**; Evangelista, L. P.; Halpern, S.; Maluf, M.; Czresnia, C. E.; Perin, P.; De Almeida, D. C.; Peron, J. P. S. . Human Fallopian Tube - Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Th1/Th17 Activation and Migration to Central Nervous System. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 17, p. 1, 2021 (**Anexo 11**).
- 10) De Oliveira, M. G., Angelo, Y. S, Yamamoto, P., Carregari, V. C., Reis-de-Oliveira, F. C. G., Costa, L., Vendramini, P. H., Duque, E. A., dos Santos, N. B., Firmino, E. M., Paiva, I. M., Almeida, G. M., Sebollela, A., Polonio, C. M., Zanolui, N. G., **de Oliveira, M. G.**, et al. SARS-CoV-2 infection impacts carbon metabolism and depends on glutamine for replication in Syrian Hamster astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 26; 10.1111, 2022 (**Anexo 12**).
- 11) Rafael M. Rezende, Laura M. Cox, Thais G. Moreira, Shirong Liu, Selma Boulenouar, Fyonn Dhang, Danielle S. LeServe, Brenda N. Nakagaki, Juliana R. Lopes, Bruna K. Tatematsu, Luisa Lemos, Julia Mayrink, Eduardo L. C. Lobo, Lydia Guo, **Marilia G. Oliveira**, Chantal Kuhn & Howard L. Weiner. Gamma-delta T cells modulate the microbiota and fecal micro-RNAs to maintain mucosal tolerance. *Microbiome*, 2023 (**Anexo 13**).

Artigos/ capítulos de livros em preparação e/ou submetidos para publicação

- Zanolui N. G.; Oliveira L. G.; Polonio C. M.; França T. T.; De Souza G. P.; Muraro S. P.; Amorim M.R.; Carregari V. C.; Brandão-Teles C.; Da Silva Patrick; **De Oliveira M. G.**; França R. F.; Cunha M. P.; Nogueira M. L.; Martins-de-Souza D.; Condino-Neto A.; Proença-Modena J. L.; Peron J. P. S. . Zika Virus infection of murine and human neutrophils and their function as trojan horses to the placenta. *Sciences Advances*. *Submetido*.
- Yassin, T., Moreira, T. G., **De Oliveira, M. G.**, Rezende, R. M., Weiner, H. L. . Nasal anti-CD3 ameliorates traumatic brain injury by inducing IL-10-dependent Tregs that modulate microglia inflammation. *Nature Immunology*. *Submetido*.

- Moreira, T. G., Cox, L. M., Murphy, L., Lobo, E. L. C., Silva, P., Lanser, T., Gauthier, C. D., Mangani, D., Wasen, C., **De Oliveira, M. G.**, Ekwudo, M. N., Liu, S., Menezes, G., Ferreira, E., Gabriely, G., Anderson, A. C., Faria, A. M. C., Rezende, R. M., Weiner, H. L. . Dietary protein antigens modulate intestinal dendritic cells to control mucosal homeostasis. *Submetido.*

Capítulos de livros publicados

- Zanluqui, N. G.; Polonio, C. M.; **De Oliveira, M. G.**; De Oliveira, L. G.; De Faria, L. C.; Peron, J. P. S.. Microglia and Border-Associated Macrophages in the Central Nervous System. Macrophage Book. Elsevier, 2021.

Anexo 1



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T alfa beta da mucosa intestinal em camundongos CD4crexGrin1flox", protocolada sob o CEUA nº 1287040618, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzmann Peron e equipe; Marília Garcia de Oliveira; Wesley Nogueira Brandão; Carla Longo de Freitas; Nagela Ghabdan Zanluqui; Carolina Manganeli Polonio ; Lilian Gomes de Oliveira ; Michael Alexandre dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 12/11/2018.

We certify that the proposal "Phenotypic and functional characterization of T cells of the intestinal mucosa in CD4crexGrin1flox mice", utilizing 96 Isogenics mice (48 males and 48 females), 96 Genetically modified mice (GMO) (48 males and 48 females), protocol number CEUA 1287040618, under the responsibility of **Jean Pierre Schatzmann Peron and team; Marília Garcia de Oliveira; Wesley Nogueira Brandão; Carla Longo de Freitas; Nagela Ghabdan Zanluqui; Carolina Manganeli Polonio ; Lilian Gomes de Oliveira ; Michael Alexandre dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 11/12/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6 WT	Idade ou peso:	6 a 8 semanas
		N amostral:	48
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	C57BL/6 WT	Idade ou peso:	6 a 8 semanas
		N amostral:	48
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6 Cd4crexGrin1flox	Idade ou peso:	6 a 8 semanas
		N amostral:	48
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos
Linhagem:	C57BL/6 Cd4crexGrin1flox	Idade ou peso:	6 a 8 semanas
		N amostral:	48

São Paulo, 13 de novembro de 2018



Instituto
de Ciências
Biomédicas

Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Anexo 3

Allergol Immunopathol (Madr). 2018;46(5):454–459



**Allergologia et
immunopathologia**
Sociedad Española de Inmunología Clínica,
Alergología y Asma Pediátrica

www.elsevier.es/ai



ORIGINAL ARTICLE

Preconceptional allergen immunization can induce offspring IL-17 secreting B cells (B17): do they share similarities with regulatory B10 cells?



Aline Aparecida de Lima Lira^a, Marília Garcia de-Oliveira^a,
Amanda Harumi Sabô Inoue^a, Giovanna Rossi Beltrame^a,
Alberto José da Silva Duarte^{a,b}, Jefferson Russo Victor^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^b Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^c Division of Environmental Health, FMU, Laureate International Universities, Sao Paulo, Brazil

Received 11 January 2018; accepted 6 April 2018

Available online 7 July 2018

KEYWORDS

Allergy;
OVA;
Maternal–fetal
interface;
IL-17;
B cells

Abstract

Background: IL-17-producing B cells can be identified in both mice and human and were named B17 cells. The role of B17 cells still needs to be elucidated and its inflammatory or regulatory functions remain controversial.

Objective: We evaluate the effect of maternal immunization with OVA on offspring B cells that produces IL-17 and can show a regulatory potential by IL-10 production.

Methods: C57BL/6 WT, IL-10^{-/-} or CD28^{-/-} female mice were immunized or not with OVA in Alum, and immunized females were boosted after 10 and 20 days. Immunized and non-immunized females were mated, and pups from both groups were evaluated at 3 or 20 days old (d.o.). Some offspring from the aforementioned two groups were immunized with OVA at 3 d.o., boosted after 10 days and evaluated at 20 d.o.

Results: Maternal immunization with OVA induced offspring B cells to produce IL-17 at higher intensity compared to the control group of offspring at 3 d.o. This effect was maintained until 20 d.o. and even after neonatal immunization with OVA. The co-production of IL-10 on offspring IL-17⁺ B cells is up-regulated in response to maternal immunization with OVA. Maternal immunization with OVA on IL-10^{-/-} mice reveals reduced percentage and mean of fluorescence intensity of IL-17 on B cells of offspring.

* Corresponding author.

E-mail address: victorjr@usp.br (J.R. Victor).

<https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.04.001>

0301-0546/© 2018 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Anexo 4


Received: 6 July 2018 | Revised: 25 September 2018 | Accepted: 1 October 2018

DOI: 10.1111/sji.12721

EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY

WILEY 

Maternal immunization downregulates offspring TCD4 regulatory cells (Tregs) thymic maturation without implications for allergy inhibition

Marília Garcia de Oliveira¹ | Aline Aparecida de Lima Lira¹ | Fábio da Ressureição Sgnotto² | Amanda Harumi Sabô Inoue¹ | Giovanna Rossi Beltrame¹ | Débora da Silva³ | Ricardo Palamar Menghini³ | Alberto José da Silva Duarte^{1,4} | Jefferson Russo Victor^{1,3} 

¹Division of Dermatology, Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

²Division of Hematology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Division of Environmental Health, FMU, Laureate International Universities, Sao Paulo, Brazil

⁴Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Correspondence

Jefferson Russo Victor
Division of Clinical Dermatology,
Laboratory of Medical Investigation LIM-56, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.
Email: victorjr@usp.br

Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: #2017/18558-9, #2018/05181-7

Abstract

The regulation of offspring allergy development mediated by maternal immunization was evidenced by several groups, and this mechanism seems to involve the induction of regulatory T cells (Tregs) on offspring. Here, we aimed to evaluate whether the effect of maternal immunization on offspring Tregs occurs as a result of peripheral or central modulation. Briefly, C57BL/6 female mice were immunized with OVA in Alum or Alum alone and boosted with OVA in saline or saline only after 10 and 20 days. Non-immunized offspring serum, thymus and spleen were evaluated at 3 or 20 days old, and some groups of pups were submitted to neonatal OVA-immunization protocol for the subsequent evaluation of antibody production and allergic response. Our experimental protocol could be validated because maternal OVA-immunization inhibited offspring allergic response as evidenced by the suppression of offspring IgE production and allergic lung inflammation. Interestingly, maternal immunization reduced the frequency of offspring thymic Tregs with an opposite effect on spleen Tregs. Furthermore, after neonatal immunization, the frequency of lung-infiltrated Tregs was also augmented on offspring from immunized mothers. In conclusion, maternal OVA-immunization can inhibit the thymic maturation of offspring Tregs without implications on peripheral Tregs induction and allergy inhibition.

1 | INTRODUCTION

The regulation of offspring allergy development mediated by maternal immunization with allergens was evidenced by several groups¹⁻⁴ and since 2003, it was suggested, in a murine model, that this regulation can be mediated by the induction of regulatory T cells (Tregs) on offspring.⁵

Tregs play a pivotal role on several immune-suppressive mechanisms including self-tolerance⁶ and allergy.⁷ Tregs can be classified in two main populations according to their origin, the thymus-derived naturally occurring Treg cells (nTregs) and the non-thymic-induced Treg cells (iTreg), and these populations can exert divergent functions in murine allergic response.⁸ Both Tregs populations can also acquire effector functions and enhance lung allergic

Anexo 5

Experimental immunology

DOI: <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.81345>

Preconception immunization can modulate intracellular Th2 cytokine profile in offspring: *in vivo* influence of interleukin 10 and B/T cell collaboration

MARÍLIA GARCIA DE OLIVEIRA¹, ALINE APARECIDA DE LIMA LIRA¹, FÁBIO DA RESSUREIÇÃO SGNOTTO¹, AMANDA HARUMI SABÔ INOUE¹, ALBERTO JOSÉ DA SILVA DUARTE^{1,2}, JEFFERSON RUSSO VICTOR^{1,2,3}

¹Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

²Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Division of Environmental Health, FMU, Laureate International Universities, Sao Paulo, Brazil

Abstract

Introduction: In the last few years our group has been studying the mechanisms involved in the inhibition of allergy in offspring mediated by preconception maternal immunization, but these mechanisms are not fully understood. Such mechanisms that we have studied aimed at the passive transfer of maternal antibodies and its influence on offspring immune status.

Aim of the study: To evaluate whether maternal immunization could modulate intracellular Th1/Th2 profiles in offspring.

Material and methods: C57BL/6 female wild type mice (WT), interleukin (IL)-10^{-/-} or CD28^{-/-} mice were immunized or not with ovalbumin (OVA) and were mated with respective lineage males and offspring were evaluated at 3 days old (d.o.), 20 d.o., or 20 d.o. after neonatal immunization.

Results: Preconception OVA immunization induced a marked reduction in IL-4 secretion by TCD4+ cells of WT offspring when compared with offspring from non-immunized mothers. The maternal immunization of IL-10^{-/-} mice induced an increase in the TCD4+IL-4+ percentage in offspring and a reduction in TCD4+IFN-γ+ cells. The maternal immunization in CD28^{-/-} mice induced augment IL-4 intensity in 3 and 20 d.o. offspring TCD4+ cells.

Conclusions: Our results reveal that maternal immunization with OVA can down-regulate the Th2 pattern in offspring and this regulation is dependent on IL-10 and B/T cell collaboration.

Key words: allergy, OVA, maternal fetal-interface, IL-10, Th1/Th2 balance, B cells.

(Centr Eur J Immunol 2018; 43 (4): 378-388)

Introduction

Allergic reactions are characterized by intense Th2 cytokine production profile and exacerbated immunoglobulin (Ig) E production. The balance between Th1 and Th2 cytokine profiles is regulated mainly by interferon (IFN)-γ (Th1-related) and interleukin (IL)-4 (Th2-related) production. The main sources of these cytokines are TCD4 cells but both cytokines can also be produced or regulated by B cells [1].

The prevention strategies to regulate allergy development are classified into three levels, with the primary strategy aiming to prevent allergen sensitization, the secondary aiming at the prevention of allergy development in already sensitized individuals, and tertiary aiming at the treatment

of the symptoms [2]. Primary strategies have been studied by our group in type I hypersensitivity murine models over the last 15 years [3-12]. These models consider three important factors: the maternal immunity during pregnancy, neonatal immunity, and the interaction between the two. The maternal and fetal immune system interaction occurs either through the placenta or through breast-feeding. Previously, we reported that maternal immunization with the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) can inhibit offspring Th2 exacerbation [13] characteristics that was also observed after maternal immunization with OVA [14]. In the same work, we also reported that the passive transfer of maternal IgG can modulate offspring IL-10 pro-

Correspondence: Jefferson Russo Victor, PhD, Laboratory of Medical Investigation LIM-56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3rd floor, 05403-000 Sao Paulo, Brazil, phone: +55 11 30617499, fax: +55 11 30817190, e-mail: victorjr@usp.br
Submitted: 19.05.2017; Accepted: 16.10.2017

Anexo 6

Received: 31 October 2018 | Revised: 20 February 2019 | Accepted: 23 March 2019

DOI: 10.1111/cea.13393



ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Basic Mechanisms in Allergic Disease

Maternal IgG impairs the maturation of offspring intrathymic IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells: Implications for murine and human allergies

Marília G. de-Oliveira¹ | Aline A. L. Lira¹ | Fábio R. Sgnotto² | Amanda H. S. Inoue¹ |
 Ludimila S. Santos^{1,3} | Bernardo Y. Nakamatsu³ | Alberto J. S. Duarte^{1,4} |
 Maria Leite-de-Moraes⁵ | Jefferson R. Victor^{1,3}

¹Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

²Division of Hematology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Division of Environmental Health, Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), Laureate International Universities, Sao Paulo, Brazil

⁴Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁵Laboratory of Immunoregulation and Immunopathology, INEM (Institut Necker-Enfants Malades), CNRS UMR8253, INSERM UMR1151, Université Paris Descartes, Paris, France

Correspondence

Jefferson R. Victor, Laboratory of Medical Investigation LIM-56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3rd floor, 05403-000 São Paulo, Brazil. Email: victorjr@usp.br

Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: #2017/18558-9 and 2018/05181-7

Abstract

Background: The precise mechanism involved in the acquisition of the IL-17+ profile of $\gamma\delta$ T cells, the ligands responsible for this change, and whether this default is acquired during intrathymic maturation need to be elucidated.

Objective: This study aimed to evaluate whether IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells are present in the airways of tolerant offspring from allergen-sensitized mothers and the possible implication of maternal IgG in the generation of these cells.

Methods: Female mice were immunized or not, and the allergic response, frequency of $\gamma\delta$ T cell subsets and cytokine production of the offspring were analysed by flow cytometry. The effects of passive in vivo transfer of purified IgG were investigated in offspring. A translational approach was employed to analyse $\gamma\delta$ T cells in the thymus and PBMCs from humans.

Results: Maternal immunization reduced the frequency of spontaneous IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the thymus, spleen and lung of offspring. This effect was mimicked by the in vivo treatment of females with purified IgG. IgG directly interacted with $\gamma\delta$ T cell membranes. The modulatory effect of human IgG on human infant intrathymic and adult peripheral $\gamma\delta$ T cells showed similarities to murine $\gamma\delta$ T cells, which is rarely reported in the literature.

Conclusions & Clinical Relevance: Together, our results reveal that IgG from potentially tolerant atopic mothers can influence offspring thymic IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell maturation. Furthermore, we suggest that IgG is an unprecedented modulatory factor of murine and human $\gamma\delta$ T cells. These observations may support the future development of IgG-based immunoregulatory therapeutic strategies.

KEYWORDS

maternal IgG, thymus, $\gamma\delta$ T cells

Anexo 7



[Home](#) > [Journals](#) > [European Cytokine Network](#) > **Preconceptional immunization with an allergen inhibits offspring thymic Th17 cells maturation without influence on Th1 and Th2 cells**

MY CART (0)

European Cytokine Network

MENU

Preconceptional immunization with an allergen inhibits offspring thymic Th17 cells maturation without influence on Th1 and Th2 cells

Volume 31, issue 3, September 2020

[PDF](#)

[Print](#)

[Save to My profile](#)

[Export Citation for this article](#)

[E-mail link to this article](#)

Get Permission

Abstract

[Full text](#)

[References](#)

[Figures](#)

[Other material](#)

Authors

Marília Garcia de Oliveira ¹

Fábio da Ressureição Sgnotto ²

Thamires Rodrigues de Sousa ¹

Beatriz Oliveira Fagundes ¹

Alberto José da Silva Duarte ^{1 3}

Jefferson Russo Victor ^{1 4 *}

¹ Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Division of Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

² Division of Hematology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³ Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁴ Division of Environmental Health, FMU, Laureate International Universities, Sao Paulo, Brazil

* Correspondence: Jefferson Russo Victor, PhD Laboratory of Medical Investigation LIM-56 Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3rd floor 05403-000 São Paulo, Brazil

Key words: Th17, thymus, allergy, preconceptional immunization, offspring

DOI : 10.1684/ecn.2020.0452

Page(s) : 113-7

Published in: 2020

Figures

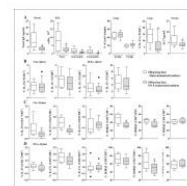


Figure 1

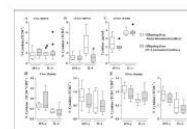


Figure 2

Anexo 8

DOI: 10.1002/JLB.3MR0620-035R



REVIEW

Neuroinflammation at single cell level: What is new?

WN Brandão¹ | MG De Oliveira¹ | RT Andreoni¹ | H Nakaya² | AS Farias^{3,4} | JPS Peron^{1,5,6}

¹Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³Autoimmune Research Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Immunology - Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

⁴Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), Division of Immune-Mediated Diseases

⁵Scientific Platform Pasteur, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁶Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Correspondence

JPS Peron, Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil.
Email: jeanpierre@usp.br

Abstract

Multiple sclerosis is a chronic and demyelinating disease of the central nervous system (CNS), most prevalent in women, and with an important social and economic cost worldwide. It is triggered by self-reacting lymphocytes that infiltrate the CNS and initiate neuroinflammation. Further, axonal loss and neuronal death takes place, leading to neurodegeneration and brain atrophy. The murine model for studying MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), consists in immunizing mice with myelin-derived epitopes. APCs activate encephalitogenic T CD4 and CD8 lymphocytes that migrate mainly to the spinal cord resulting in neuroinflammation. Most of the knowledge on the pathophysiology and treatment of MS was obtained from EAE experiments, as Th17 cells, anti-alpha4 blocking Abs and the role of microbiota. Conversely, recent technology breakthroughs, such as CyTOF and single-cell RNA-seq, promise to revolutionize our understanding on the mechanisms involved both in MS and EAE. In fact, the importance of specific cellular populations and key molecules in MS/EAE is a constant matter of debate. It is well accepted that both Th1 and Th17 T CD4 lymphocytes play a relevant role in disease initiation after re-activation in situ. What is still under constant investigation, however, is the plasticity of the lymphocyte population, and the individual contribution of both resident and inflammatory cells for the progression or recovery of the disease. Thus, in this review, new findings obtained after single-cell analysis of blood and central nervous system infiltrating cells from MS/EAE and how they have contributed to a better knowledge on the cellular and molecular mechanisms of neuroinflammation are discussed.

KEYWORDS

single cell, neuroinflammation

1 | INTRODUCTION

First described by Charcot in 1868,¹ Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS), most prevalent in women. Besides traumatic events, MS is the main cause of neurologic disability among young adults, with an important emotional, social, and economic cost.²⁻⁴ Both genetic and environmental factors seem to play a role in the prevalence and incidence of the disease. Although a huge effort has been done to understand the genetic trait of MS, only few alleles with low odds ratio were identified. The main relevant gene associated with the disease is still the HLA-DRB1 haplotype⁵ and other immune related genes, as STAT3, EOMES, and IL2RA.⁶ On the other hand, environmental factors, such as EBV infection, cigarette smoking, and UV expo-

sure also seem to contribute to susceptibility, although with lower odds ratio.^{7,8}

MS pathogenesis is triggered by the activation of self-reacting lymphocytes that further invade the brain through the ventricles⁹ and the meninges¹⁰ leading to neuroinflammation after the recognition of CNS myelin epitopes. The question whether MS starts inside or outside the CNS is still under intense debate. It is possible that microinflammation as observed during radiologic isolated syndrome (RIS) leads to myelin antigens drainage to cervical lymph nodes where it activates self-reactive lymphocytes.¹¹ On the other hand, some researchers believe that molecular mimicry occurs against EBV or microbiota epitopes,¹² leading to the activation of cross-reacting lymphocytes. Either way, the fact is that T CD4, CD8, and B lymphocytes get activated in the periphery, undergo intense clonal expansion and differentiation, and further

Received: 31 January 2020 | Revised: 5 June 2020 | Accepted: 16 July 2020

J Leukoc Biol. 2020;1-9.

www.jleukbio.org



©2020 Society for Leukocyte Biology | 1

Anexo 9



Article

The Potential of IgG to Induce Murine and Human Thymic Maturation of IL-10+ B Cells (B10) Revealed in a Pilot Study

Amanda Harumi Sabô Inoue ^{1,†}, Aline Aparecida de Lima Lira ^{1,†} , Marília Garcia de-Oliveira ^{1,†}, Thamires Rodrigues de Sousa ¹, Fábio da Ressureição Sgnotto ², Alberto José da Silva Duarte ^{1,3} and Jefferson Russo Victor ^{1,4,*} 

¹ Laboratory of Medical Investigation LIM 56, Division of Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, Brazil; amanda_inoue@hotmail.com (A.H.S.I.); line_llira@hotmail.com (A.A.d.L.L.); mariliagarcia@usp.br (M.G.d.-O.); sousarthamires@gmail.com (T.R.d.S.); adjsduar@usp.br (A.J.d.S.D.)

² Division of Hematology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo 01246-903, Brazil; fabio.house@hotmail.com

³ Division of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo 01246-903, Brazil

⁴ Division of Environmental Health, FMU, Laureate International Universities, Sao Paulo 04505-002, Brazil

* Correspondence: victorjr@usp.br; Tel.: +55-11-3061-7499

† These authors contribute equally to this paper.

Received: 25 August 2020; Accepted: 13 September 2020; Published: 5 October 2020



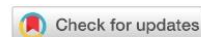
Abstract: Regulatory B (B10) cells can control several inflammatory diseases, including allergies; however, the origin of peripheral B10 cells is not fully understood, and the involvement of primary lymphoid organs (PLOs) as a primary site of maturation is not known. Here, using a murine model of allergy inhibition mediated by maternal immunization with ovalbumin (OVA), we aimed to evaluate whether B10 cells can mature in the thymus and whether IgG can mediate this process. Female mice were immunized with OVA, and offspring thymus, bone marrow, spleen, lung, and serum samples were evaluated at different times and after passive transfer of purified IgG or thymocytes. A translational approach was implemented using human nonatopic thymus samples, nonatopic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and IgG from atopic or nonatopic individuals. Based on the expression of CD1d on B cells during maturation stages, we suggest that B10 cells can also mature in the murine thymus. Murine thymic B10 cells can be induced in vitro and in vivo by IgG and be detected in the spleen and lungs in response to an allergen challenge. Like IgG from atopic individuals, human IgG from nonatopic individuals can induce B10 cells in the infant thymus and adult PBMCs. Our observations suggest that B10 cells may mature in the thymus and that this mechanism may be mediated by IgG in both humans and mice. These observations may support the future development of IgG-based immunoregulatory therapeutic strategies.

Keywords: IgG; thymus; B cells; B10 cells; mouse; human

1. Introduction

The regulation of offspring allergy development mediated by maternal immune status has already been shown by several groups [1–4]. Some recent discussions and evidence have suggested that this mechanism involves the modulation of cell maturation in the offspring's primary lymphoid organs (PLOs) [5,6], and the ability of maternal IgG to induce peripheral regulatory B cells (B10) in mice has been shown in murine peripheral cells [7,8]; however, the possible involvement of PLOs as a source of B10 cells has not been evaluated.

Anexo 10



Clinical Science (2021) 135 1065–1082
<https://doi.org/10.1042/CS20201544>



Research Article

Murine endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis depending on indoleamine-2,3-dioxygenase expression

Carolina Manganeli Polonio¹, Carla Longo de Freitas¹, Marília Garcia de Oliveira¹, Cristiano Rossato¹, Wesley Nogueira Brandão¹, Nágela Ghabdan Zanluqui^{1,2}, Lilian Gomes de Oliveira¹, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura³, Maysa Braga Barros Silva⁴, Vera Lúcia Garcia Calich⁵, Marcelo Gil Nisenbaum⁶, Silvio Halpern⁷, Lucila Evangelista⁶, Mariangela Maluf⁸, Paulo Perin⁸, Carlos Eduardo Czeresnia⁶ and Jean Pierre Schatzmann Peron^{1,2}

¹Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; ²Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; ³Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; ⁴Clinical Biochemistry Laboratory, Clinical Analysis Department, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; ⁵Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; ⁶Division of Reproductive Medicine, Célula Mater, São Paulo, SP, Brazil; ⁷Division of Reproductive Medicine, Halpern Clinic, São Paulo, SP, Brazil; ⁸Division of Reproductive Medicine, CEERH, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: Jean Pierre Schatzmann Peron (jeanpierre@usp.br)

Cellular therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) is a huge challenge for scientists, as little translational relevance has been achieved. However, many studies using MSCs have proved their suppressive and regenerative capacity. Thus, there is still a need for a better understanding of MSCs biology and the establishment of newer protocols, or to test unexplored tissue sources. Here, we demonstrate that murine endometrial-derived MSCs (meMSCs) suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). MSC-treated animals had milder disease, with a significant reduction in Th1 and Th17 lymphocytes in the lymph nodes and in the central nervous system (CNS). This was associated with increased *Il27* and *Cyp1a1* expression, and presence of IL-10-secreting T CD4⁺ cells. At EAE peak, animals had reduced CNS infiltrating cells, histopathology and demyelination. qPCR analysis evidenced the down-regulation of several pro-inflammatory genes and up-regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). Consistently, co-culturing of WT and IDO^{-/-} meMSCs with T CD4⁺ cells evidenced the necessity of IDO on the suppression of encephalitogenic lymphocytes, and IDO^{-/-} meMSCs were not able to suppress EAE. In addition, WT meMSCs stimulated with IL-17A and IFN- γ increased IDO expression and secretion of kynurenines *in vitro*, indicating a negative feedback loop. Pathogenic cytokines were increased when CD4⁺ T cells from AhR^{-/-} mice were co-cultured with WT meMSC. In summary, our research evidences the suppressive activity of the unexplored meMSCs population, and shows the mechanism depends on IDO-kynurenines-Aryl hydrocarbon receptor (AhR) axis. To our knowledge this is the first report evidencing that the therapeutic potential of meMSCs relying on IDO expression.

Received: 23 December 2020
 Revised: 19 April 2021
 Accepted: 26 April 2021

Version of Record published:
 07 May 2021

Anexo 11

Stem Cell Reviews and Reports
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10226-7>



Human Fallopian Tube – Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Th1/Th17 Activation and Migration to Central Nervous System

Carla Longo de Freitas^{1,7} · Carolina Manganeli Polonio^{1,7} · Wesley Nogueira Brandão^{1,7} · Cristiano Rossato^{1,7} · Nágela Ghabdan Zanluqui^{1,2,7} · Lilian Gomes de Oliveira^{1,7} · Marília Garcia de Oliveira^{1,7} · Lucila Pires Evangelista^{3,7} · Silvio Halpern^{4,7} · Mariangela Maluf^{5,7} · Carlos Eduardo Czresnia^{3,7} · Paulo Perin^{5,7} · Danilo Candido de Almeida^{6,7} · Jean Pierre Schatzman Peron^{1,2,7}

Accepted: 24 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Mesenchymal stem cells comprise a natural reservoir of undifferentiated cells within adult tissues. Given their self-renewal, multipotency, regenerative potential and immunomodulatory properties, MSCs have been reported as a promising cell therapy for the treatment of different diseases, including neurodegenerative and autoimmune diseases. In this study, we investigated the immunomodulatory properties of human tubal mesenchymal stem cells (htMSCs) using the EAE model. htMSCs were able to suppress dendritic cells activation downregulating antigen presentation-related molecules, such as MHCII, CD80 and CD86, while impairing IFN- γ and IL-17 and increasing IL-10 and IL-4 secretion. It further correlated with milder disease scores when compared to the control group due to fewer leukocytes infiltrating the CNS, specially Th1 and Th17 lymphocytes, associated with increased IL-10 secreting Tr1 cells. Conversely, microglia were less activated and infiltrating mononuclear cells secreted higher levels of IL-4 and IL-10 and expressed reduced chemokine receptors as CCR4, CCR6 and CCR8. qPCR of the spinal cords revealed upregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). Taken together, here evidenced the potential of htMSCs as an alternative for the treatment of inflammatory, autoimmune or neurodegenerative diseases.

Keywords Mesenchymal stem cell · Immunomodulation · EAE · Dendritic cells · Lymphocytes

✉ Jean Pierre Schatzman Peron
 jeanpierre@usp.br

¹ Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Lab 232. Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil

² Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³ Reproductive Medicine Division, Célula Mater Clinic, São Paulo, Brazil

⁴ Reproductive Medicine Division, Halpern Clinic, São Paulo, Brazil

⁵ Reproductive Medicine Division, CEERH Clinic, São Paulo, Brazil

⁶ Nephrology Division, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

⁷ Scientific Platform Pasteur-USP, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Introduction

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are typically defined as undifferentiated multipotent adult cells that possess capacity of self-renewal and differentiation into distinct mesoderm-derived lineages [1]. These progenitor cells are present in adult organisms where they constitute a reservoir found within the connective tissue of most organs, and are involved in the maintenance, repair and immunologic properties of tissues throughout the postnatal life of an individual [2].

Looking beyond their potential in tissue repair and regeneration, MSCs are a promising tool for overcoming autoimmunity, mainly due to their immunosuppressive capacities [3]. These activities are not constitutive, but may be induced by an inflammatory environment to which MSCs are exposed, such as soluble factors or by physical contact with inflammatory cells. The former, includes proinflammatory

Published online: 28 August 2021

Springer


Anexo 12




Received: 20 December 2021 | Revised: 10 July 2022 | Accepted: 12 July 2022

DOI: 10.1111/jnc.15679

Journal of
Neurochemistry **JNC** WILEY

ORIGINAL ARTICLE

SARS-CoV-2 infection impacts carbon metabolism and depends on glutamine for replication in Syrian hamster astrocytes 

Lilian Gomes de Oliveira^{1,2} | Yan de Souza Angelo^{1,2} | Pedro Yamamoto^{1,2} |
 Victor Corasolla Carregari³ | Fernanda Crunfli³ | Guilherme Reis-de-Oliveira³ |
 Lícia Costa³ | Pedro Henrique Vendramini³ | Érica Almeida Duque⁴ |
 Nilton Barreto dos Santos^{4,†} | Egidi Mayara Firmino⁵ | Isadora Marques Paiva⁵ |
 Glauca Maria Almeida⁶ | Adriano Sebollela⁶ | Carolina Manganeli Polonio^{1,2} |
 Nagela Ghabdan Zanluqui^{1,2} | Marília Garcia de Oliveira¹ | Patrick da Silva^{1,2} |
 Gustavo Gastão Davanzo⁷  | Marina Caçador Ayupe⁸ | Caio Loureiro Salgado⁸ |
 Antônio Francisco de Souza Filho⁹  | Marcelo Valdemir de Araújo⁹ |
 Taiana Tainá Silva-Pereira⁹ | Angélica Cristine de Almeida Campos¹⁰ |
 Luiz Gustavo Bentim Góes¹⁰ | Marielton dos Passos Cunha¹⁰ | Elia Garcia Caldini¹¹ |
 Maria Regina D'Império Lima¹² | Denise Moraes Fonseca⁸ | Ana Márcia de Sá Guimarães⁹ |
 Paola Camargo Minoprio¹⁰ | Carolina Demarchi Munhoz⁴ | Cláudia Madalena Cabrera Mori¹³ |
 Pedro Manoel Moraes-Vieira⁷ | Thiago Mattar Cunha⁵ | Daniel Martins-de-Souza^{3,14,15,16} |
 Jean Pierre Schatzmann Peron^{1,2,17} 

¹Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil²Neuroimmunology of Arboviruses Laboratory, Scientific Platform Pasteur-USP, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil³Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil⁴Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil⁵Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Department of Pharmacology—Ribeirão Preto Medical School—University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil⁶Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil⁷Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

Abbreviations: 2-DG, 2-deoxy- α -D-glucose-6-phosphate; ACE-2, angiotensin-converting enzyme; ACN, acetonitrile; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CAN, acetonitrile; cDNA, complementary deoxy-ribonucleic acid; CMV, cytomegalovirus; COVID-19, coronavirus disease 2019; CPT-1a, carnitine palmitoyltransferase 1a; Ct, cycle threshold; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DEP, differentially expressed protein; DIA, data-independent acquisition; DLPPFC, dorso-lateral prefrontal cortex; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DNA, deoxy-ribonucleic acid; DON, δ -Dl-azido-5-oxo-L-leucine; dpi, days post infection; dpp, days postpartum; E, envelope; EDTA, 2,2',2''-[ethane-1,2-diylidinitrilo] tetraacetic acid; EMRT, exact mass retention time; ETO, etomoxir; FASP, fast adaptative and secure; FBS, fetal bovine serum; FDR, false discovery rate; GABA, 4-aminobutanoic acid; GLS, mitochondrial glutaminase; H₂O, water; HCCI, chloroform; HD, huntington disease; HILIC, hydrophobic interaction liquid chromatography; HIV, human immunodeficiency virus; hpi, hours post infection; HSV, herpes simplex virus; ICB, institute of biomedical sciences; IFN, Interferon; IL, Interleukin; ISG, interferon-stimulated gene; KEGG, kyoto encyclopedia of genes and genomes; LC, liquid chromatography; M, mass; M, membrane; MDA-5, melanoma differentiation-associated protein 5; MeOH, Methanol; MOI, multiplicity of infection; MRI, magnetic resonance imaging; MS, mass spectrometry; N, nucleocapsid; NEAA, non-essential amino acids; NH₄CHO₃, ammonium acetate; NH₄OH, ammonium hydroxide; ORF, open reading frame; OSN, olfactory sensory neurons; PASC, post-acute sequelae of COVID-19; PBS, phosphate-buffered saline; PCA, principal component analysis; PD-1, programmed cell death protein 1; PFA, paraformaldehyde; PFU, plaque-forming units; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; RNA, ribonucleic acid; RT-qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; S, spike; SARS, severe acute respiratory syndrome; sgRNA, subgenomic RNA; snRNA-seq, single nuclei RNA sequencing; SPPU, Scientific Platform Pasteur-USP; TCA, tricarboxylic acid cycle; TCID₅₀, median tissue culture infectious dose; TEM, transmission electron microscopy; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; TMPRSS2, transmembrane protease serine 2; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; TRIS, 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol; UMAP, uniform manifold approximation and projection; UPLC, ultra-performance liquid chromatography; USP, University of São Paulo; vGLUT, vesicular glutamate transporters; WHO, World Health Organization; Z, charge.

Lilian Gomes de Oliveira and Yan de Souza Angelo contributed equally to this work.

†In memoriam of a great scientist and human being that lost the battle against COVID-19.

Anexo 13

Rezende et al. *Microbiome* (2023) 11:32
<https://doi.org/10.1186/s40168-023-01478-1>

Microbiome

RESEARCH

Open Access



Gamma-delta T cells modulate the microbiota and fecal micro-RNAs to maintain mucosal tolerance

Rafael M. Rezende[†], Laura M. Cox[†], Thais G. Moreira, Shirong Liu, Selma Boulenouar, Fyonn Dhang, Danielle S. LeServe, Brenda N. Nakagaki, Juliana R. Lopes, Bruna K. Tatematsu, Luisa Lemos, Julia Mayrink, Eduardo L. C. Lobo, Lydia Guo, Marilia G. Oliveira, Chantal Kuhn and Howard L. Weiner

Abstract

Background Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells are a major cell population in the intestinal mucosa and are key mediators of mucosal tolerance and microbiota composition. Little is known about the mechanisms by which intestinal $\gamma\delta$ T cells interact with the gut microbiota to maintain tolerance.

Results We found that antibiotic treatment impaired oral tolerance and depleted intestinal $\gamma\delta$ T cells, suggesting that the gut microbiota is necessary to maintain $\gamma\delta$ T cells. We also found that mice deficient for $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta^{-/-}$) had an altered microbiota composition that led to small intestine (SI) immune dysregulation and impaired tolerance. Accordingly, colonizing WT mice with $\gamma\delta^{-/-}$ microbiota resulted in SI immune dysregulation and loss of tolerance whereas colonizing $\gamma\delta^{-/-}$ mice with WT microbiota normalized mucosal immune responses and restored mucosal tolerance. Moreover, we found that SI $\gamma\delta$ T cells shaped the gut microbiota and regulated intestinal homeostasis by secreting the fecal micro-RNA let-7f. Importantly, oral administration of let-7f to $\gamma\delta^{-/-}$ mice rescued mucosal tolerance by promoting the growth of the $\gamma\delta^{-/-}$ -microbiota-depleted microbe *Ruminococcus gnavus*.

Conclusions Taken together, we demonstrate that $\gamma\delta$ T cell-selected microbiota is necessary and sufficient to promote mucosal tolerance, is mediated in part by $\gamma\delta$ T cell secretion of fecal micro-RNAs, and is mechanistically linked to restoration of mucosal immune responses.

Introduction

The intestine contains the largest amount of lymphoid tissue in the body and plays a critical role in developing a tolerogenic or inflammatory immune response to dietary and host antigens. There is a bi-directional interaction between intestinal immune cells and the gut microbiota

to maintain homeostasis. $\gamma\delta$ T cells play a major role in shaping the gut microbiota because of their innate-like and adaptive properties. $\gamma\delta$ T cells that inhabit the intestinal epithelium are constitutively activated by commensal microbiota [1] and can rapidly respond to T cell receptor (TCR) signals in an MHC-independent manner [2] and to pattern recognition receptors signals including toll-like receptors (TLRs) [3] and NOD-like receptors (NLR) including NOD2 [4].

$\gamma\delta$ T cells that reside in the gut lamina propria (LP) and intraepithelial lymphocyte (IEL) compartments maintain intestinal homeostasis by suppressing microbial populations through the secretion of cytokines such as IL-22 and IL-17 and growth factors including keratinocyte

[†]Rafael M. Rezende and Laura M. Cox contributed equally to this work.

*Correspondence: rafael.m.rezende@bwh.harvard.edu
 Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.