

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

JEFFERSON ELIAS OLIVEIRA

***Lactococcus lactis* expressando HSP65 protege contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1 por meio da indução de células dendríticas tolerogênicas via TLR2**

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2024

JEFFERSON ELIAS OLIVEIRA

***Lactococcus lactis* expressando HSP65 protege contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1 por meio da indução de células dendríticas tolerogênicas via TLR2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Carlos Sartori

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Jefferson Elias

*Lactococcus lactis* expressando HSP65 protege contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1 por meio da indução de células dendríticas tolerogênicas via TLR2. Ribeirão Preto, 2024.

130 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Sartori, Daniela Carlos

1. *Lactococcus lactis*. 2. HSP65. 3. Células dendríticas. 4. Linfócitos T reguladores. 5. TLR2.

**Nome: OLIVEIRA, Jefferson Elias**

**Título:** *Lactococcus lactis* expressando HSP65 protege contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1 por meio da indução de células dendríticas tolerogênicas via TLR2.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof (a). Dr (a). Daniela Carlos Sartori

Instituição: FMRP-USP

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunorregulação de Doenças Metabólicas (LIDM), Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). Essa tese recebeu apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos: 18/14815-0 e 22/02762-4;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FAEPA-HCFMRP/USP);

Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

DEDICATÓRIA

Meu doutorado, e tudo o que eu vier a conquistar nessa vida, será sempre dedicado à minha mãe, Luiza Elias Oliveira, que durante toda sua vida se sacrificou para que eu pudesse me formar e chegar cada vez mais longe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceber inúmeras bênçãos durante toda minha vida, por ser minha fonte de força e perseverança, e por me proteger.

À minha mãe Luiza Elias Oliveira (*in memoriam*), que vai ser sempre minha maior fonte de amor. Todos os dias me lembro da senhora, e agradeço por todo o tempo que tivemos juntos nessa vida. O meu desejo de honrar toda sua trajetória é o que me mantém forte. A senhora vai ser pra sempre minha maior prova de amor, de dedicação, de força e de bondade. Um dia sei que vamos nos reencontrar, e vou poder te abraçar e mais uma vez agradecer por tudo que a senhora fez por mim.

Aos meus avós, Marieta Rosa de Oliveira Cardoso e José Elias Cardoso, por serem o alicerce da nossa família. Junto com minha mãe, sempre estiveram do meu lado, dando todo o apoio e ensinando valores que jamais esquecerei. Sou muito privilegiado por ter os senhores, e compartilhar momentos tão simples e tão confortantes nas minhas idas à Jataí. Um obrigado especial também às minhas tias, Gizélia e Divina, tio Sérgio e primos, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e a me confortar nos momentos difíceis! Serei eternamente grato!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Carlos Sartori, minha orientadora. Jovem, determinada, paciente... sua trajetória, sua ética profissional e sua forma de fazer Ciência são para mim exemplos. Obrigado pela confiança em meu trabalho desde que cheguei ao laboratório e que se estendeu durante esses quatro anos. Para mim será sempre um grande orgulho dizer que fui seu aluno.

À Dr.<sup>a</sup> Vanessa Fernandes Rodrigues, minha companheira de bancada, de desabafos, de risadas... Sua ajuda foi muito importante e com você aprendi muito! Sua habilidade, paciência e competência são inspiradoras. Obrigado pela amizade e por todos os bons momentos que passamos juntos!

Aos meus amigos do LIDM (Laboratório de Imunorregulação de Doenças Metabólicas), Jefferson Leite, Jhefferson Barbosa, Gabriel Martins, Ítalo Sousa, Vanessa Fernandes, Melissa Santana, Jéssica Assis, Sara Cândida, Rebecca Lavarini e Thaílla Cristina. Obrigado pelos bons momentos vividos, pela ajuda, pelas risadas, pelas longas horas de experimentos e ensinamentos compartilhados!

Aos técnicos Wander Cosme, Denise Brufato Ferraz, Ana Paula Masson, Wendy Martin Rios e Izaira Tincani Brandão. Com certeza vocês foram essenciais para a execução dessa pesquisa. Obrigado por todo suporte e disponibilidade.

Aos Prof. Drs. Célio Lopes Silva (FMRP) e Anderson Miyoshi (UFMG) pela doação das cepas de *L. lactis* selvagem e recombinante utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Biotério Geral da USP e Biotério de camundongos especiais da FMRP pelo suporte e auxílio na manutenção dos animais.

Ao meu grande amigo Murillo Duarte. Chegamos ao ponto de não haver palavras para descrever nossa sintonia, nossa cumplicidade. Sua sabedoria em nossas conversas sobre vida foi base para mim, como é bom te ouvir! Sempre serei grato por cada palavra, por cada choro

seu nos rolês declarando sua amizade, por cada pedaço de bolo e por todo o apoio nos momentos difíceis que compartilhamos.

As minhas amigas da vida: Gabriela Maria, Jéssica Sanches, Camila Fernandes e Laura Vilela. Obrigado pela amizade sincera, pelas cervejas, pelas conversas (muitas vezes por videochamada) e por toda lealdade a nossa amizade que já dura 12 anos! Ainda bem que tenho vocês para a vida toda!

Aos meus amigos Samuel, Ualter e Murillo! A imuno nos uniu e nunca mais iremos nos distanciar. Nosso quarteto vai ficar pra sempre! Cada conversa, cada conselho, cada rolê ficarão pra sempre em minha memória. O doutorado com vocês do lado foi mais feliz!

Às amizades conquistadas em Ribeirão Preto, Camila, Marcela, Luana, Ricardo, Tainara, Joseana, Thales, Renan, Firmino e Talícia. Juntos ou separados, cada um de vocês me ensinou algo, cada um à sua maneira. Minha amiga Josi, você foi uma dessas boas surpresas que a vida nos dá! Aprendi tanto com você! Nossos cafezinhos eram terapêuticos. E que sigamos tomando cafés por aí!

À secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine Silva Ferreira, por toda disponibilidade em ajudar durante esses quatro anos. Você é parte essencial para nosso Programa!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela formação de excelência, pelos momentos compartilhados nas disciplinas e organizações de eventos, pelas oportunidades e por todo auxílio!

À FAPESP (Processos: 18/14815-0 e 22/02762-4), CNPq e a CAPES- PROEX pelo apoio financeiro fundamental.

“Eu sei que às vezes dá vontade de parar  
Mas, se você desistir, quem vai lutar por você?

Tanta luta pra chegar até aqui

Tanta história, pra agora desistir?

Caso aconteça, deixe o cansaço pra trás

E nunca se esqueça: Por aqui não há tarde demais

Então mire as estrelas e salte o mais alto que der

Tome distância, e faça o melhor que puder

Só não se permita viver na sombra do talvez

Aqui só se vive uma vez...”

Mire as estrelas

Rosa de Saron

RESUMO



## RESUMO

OLIVEIRA, J. E. *Lactococcus lactis* expressando HSP65 protege contra o desenvolvimento de diabetes tipo 1 por meio da indução de células dendríticas tolerogênicas via TLR2. 2024. 130 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O Diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado pela destruição de células beta produtoras de insulina, resultando em hiperglicemia. Novas estratégias terapêuticas são importantes para controlar a doença e impedir/amenizar as complicações associadas. Nos últimos anos, o uso de probióticos naturais ou recombinantes tem mostrado efeitos benéficos em doenças autoimunes, principalmente pela modulação da microbiota intestinal, indução de tolerância ou mecanismos de imunorregulação. Já foi mostrado que a proteína do choque térmico 65 (HSP65), uma chaperona molecular que mantém a estrutura e função das proteínas, possui atividade anti-inflamatória em doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. Nesse sentido, o objetivo no trabalho foi avaliar o efeito profilático-terapêutico de *Lactococcus lactis* expressando HSP65 durante o desenvolvimento de DM1 em modelo experimental. Primeiro, observamos que a HSP65 recombinante induz a diferenciação de dois subtipos de células dendríticas convencionais *in vitro*, cDC1 e cDC2, com perfis de ativação distintos. As células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) estimuladas com rHSP65 produziram mais IL-10 em comparação com aquelas estimuladas com LPS. Além disso, as BMDCs CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 co-cultivadas com células T CD4<sup>+</sup> virgens induziram diferenciação de células T reguladoras (Tregs). Posteriormente, utilizamos um modelo profilático-terapêutico envolvendo a administração de *L. lactis* expressando HSP65 em camundongos com DM1 induzida por estreptozotocina (STZ) e em camundongos diabéticos não obesos (NOD), que desenvolvem DM1 espontânea. Em ambos os modelos, observamos que a administração de *L. lactis*-HSP65 reduziu a hiperglicemia e a incidência da doença. No modelo de indução com STZ, observamos aumento na expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas e diminuição dos níveis séricos de IgG anti-HSP65 em comparação com camundongos diabéticos que não receberam probiótico. Além disso, *L. lactis* aumentou a expressão de genes associados à função de barreira intestinal no cólon, tais como Reg3g e Tjp1. Observamos um aumento nas populações de cDC1 TLR2<sup>+</sup> e Tregs PD-1<sup>+</sup> no linfonodo cecal (LC) e Tregs LAP<sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos (LP), associado ao aumento de IL-10 e TGF- $\beta$  no pâncreas de camundongos que receberam *L. lactis*-HSP65. Por outro lado, a administração de *L. lactis*-HSP65 em camundongos deficientes de TLR2 não foi capaz de reduzir a incidência da doença e controlar a hiperglicemia como observado nos camundongos selvagens. Esses dados foram associados com menores porcentagens de cDC1 e Tregs e redução na produção de IL-10 no pâncreas. Nas BMDCs, observamos que o TLR2 é fundamental para a expressão gênica de Irf8 e Il-10, e também para a geração de cDC1 e produção de IL-10. Finalmente, observamos que BMDCs CD103<sup>+</sup> deficientes de TLR2 ou IL-10 estimuladas com rHSP65 e co-cultivadas com células T CD4<sup>+</sup> virgens induziram menor porcentagem de Tregs quando comparado às BMDCs de camundongos selvagens. Em resumo, os resultados demonstram que *L. lactis*-HSP65 induziu proteção contra o DM1 através da imunorregulação mediada por linfócitos T reguladores e células dendríticas tolerogênicas por meio de um mecanismo dependente de TLR2/IL-10.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*. HSP65. Células dendríticas. Linfócitos T reguladores. TLR2.

Suporte financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP (nº. processo: 2022/02762-4).

ABSTRACT

## ABSTRACT

OLIVEIRA, J. E. *Lactococcus lactis* expressing HSP65 protects against the development of type 1 diabetes through the induction of tolerogenic dendritic cells via TLR2. 2024. 130 p. Thesis (doctorate) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Type 1 Diabetes mellitus is characterized by the destruction of insulin-producing beta cells, resulting in hyperglycemia. New therapeutic strategies are important to control the disease and prevent/mitigate associated complications. In recent years, the use of natural or recombinant probiotics has shown beneficial effects in autoimmune diseases, mainly by modulating the intestinal microbiota, inducing tolerance or immunoregulatory mechanisms. It has been shown that heat shock protein 65 (HSP65), a molecular chaperone that maintains the structure and function of proteins, has anti-inflammatory activity in autoimmune and chronic inflammatory diseases. In this sense, the objective of the work was to evaluate the prophylactic-therapeutic effect of *Lactococcus lactis* expressing HSP65 during the development of DM1 in an experimental model. First, we observed that recombinant HSP65 induces the differentiation of two subtypes of conventional dendritic cells *in vitro*, cDC1 and cDC2, with distinct activation profiles. Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) stimulated with rHSP65 produced more IL-10 compared to those stimulated with LPS. Furthermore, rHSP65-stimulated CD103<sup>+</sup> BMDCs co-cultured with naïve CD4<sup>+</sup> T cells induced differentiation of regulatory T cells (Tregs). Subsequently, we used a prophylactic-therapeutic model involving the administration of *L. lactis* expressing HSP65 in mice with streptozotocin (STZ)-induced DM1 and in non-obese diabetic mice (NOD), which develop spontaneous DM1. In both models, we observed that administration of *L. lactis*-HSP65 reduced hyperglycemia and disease incidence. In the STZ induction model, we observed an increase in insulin expression in pancreatic islets and a decrease in serum levels of IgG anti-HSP65 compared to diabetic mice that did not receive probiotics. Furthermore, *L. lactis* increased the expression of genes associated with intestinal barrier function in the colon, such as Reg3g and Tjp1. We observed an increase in the populations of cDC1 TLR2<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> Tregs in the cecal lymph node (LC) and LAP<sup>+</sup> Tregs in the pancreatic lymph nodes (LP), associated with increased IL-10 and TGF- $\beta$  in the pancreas of mice that received *L. lactis*-HSP65. On the other hand, the administration of *L. lactis*-HSP65 in TLR2-deficient mice was not able to reduce the incidence of the disease and control hyperglycemia as observed in wild-type mice. These data were associated with lower percentages of cDC1 and Tregs and reduced IL-10 production in the pancreas. In BMDCs, we observed that TLR2 is essential for the gene expression of Irf8 and Il-10, and also for the generation of cDC1 and IL-10 production. Finally, we observed that TLR2- or IL-10-deficient CD103<sup>+</sup> BMDCs stimulated with rHSP65 and co-cultured with naïve CD4<sup>+</sup> T cells induced a lower percentage of Tregs when compared to BMDCs from wild-type mice. In summary, the results demonstrate that *L. lactis*-HSP65 induced protection against T1D through immunoregulation mediated by regulatory T lymphocytes and tolerogenic dendritic cells through a TLR2/IL-10-dependent mechanism.

Keywords: *Lactococcus lactis*. HSP65. Dendritic cells. Regulatory T lymphocytes. TLR2.

Financial support: CAPES, CNPq and FAPESP (process no.: 2022/02762-4).

RESUMEN

## RESUMEN

OLIVEIRA, J. E. *Lactococcus lactis* que expresa HSP65 protege contra el desarrollo de diabetes tipo 1 mediante la inducción de células dendríticas tolerogénicas a través de TLR2. 2024. 130 p. Tesis (Doctorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células beta productoras de insulina, lo que provoca hiperglucemia. Nuevas estrategias terapéuticas son importantes para controlar la enfermedad y prevenir/mitigar las complicaciones asociadas. En los últimos años, el uso de probióticos naturales o recombinantes ha demostrado efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes, principalmente modulando la microbiota intestinal, induciendo tolerancia o mecanismos inmunorreguladores. Se ha demostrado que la proteína de choque térmico 65 (HSP65), una chaperona molecular que mantiene la estructura y función de las proteínas, tiene actividad antiinflamatoria en enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas. En este sentido, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto profiláctico-terapéutico de *Lactococcus lactis* expresando HSP65 durante el desarrollo de la DM1 en un modelo experimental. Primero, observamos que la HSP65 recombinante induce la diferenciación de dos subtipos de células dendríticas convencionales *in vitro*, cDC1 y cDC2, con distintos perfiles de activación. Las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) estimuladas con rHSP65 produjeron más IL-10 en comparación con las estimuladas con LPS. Además, las BMDC CD103<sup>+</sup> estimuladas con rHSP65 cocultivadas con células T CD4<sup>+</sup> vírgenes indujeron la diferenciación de células T reguladoras (Tregs). Posteriormente, utilizamos un modelo terapéutico-profiláctico que implica la administración de *L. lactis* que expresa HSP65 en ratones con DM1 inducida por estreptozotocina (STZ) y en ratones diabéticos no obesos (NOD), que desarrollan DM1 espontánea. En ambos modelos, observamos que la administración de *L. lactis*-HSP65 redujo la hiperglucemia y la incidencia de la enfermedad. En el modelo de inducción de STZ, observamos un aumento en la expresión de insulina en los islotes pancreáticos y una disminución en los niveles séricos de IgG anti-HSP65 en comparación con ratones diabéticos que no recibieron probióticos. Además, *L. lactis* aumentó la expresión de genes asociados con la función de la barrera intestinal en el colon, como Reg3g y Tjp1. Observamos un aumento en cDC1 TLR2<sup>+</sup> y PD-1<sup>+</sup> Tregs en el ganglio linfático cecal (LC) y LAP<sup>+</sup> Tregs en los ganglios linfáticos pancreáticos (LP), asociado con un aumento de IL-10 y TGF- $\beta$  en el páncreas de ratones que recibieron *L. lactis*-HSP65. Por otro lado, la administración de *L. lactis*-HSP65 en ratones deficientes en TLR2 no fue capaz de reducir la incidencia de la enfermedad y controlar la hiperglucemia como se observó en ratones de tipo salvaje. Estos datos se asociaron con porcentajes más bajos de cDC1 y Tregs y una producción reducida de IL-10 en el páncreas. En BMDC, observamos que TLR2 es esencial para la expresión génica de Irf8 e Il-10, y también para la generación de cDC1 e IL-10. Finalmente, observamos que las BMDC CD103<sup>+</sup> deficientes en TLR2 o IL-10 estimuladas con rHSP65 y cocultivadas con células T CD4<sup>+</sup> vírgenes indujeron un porcentaje menor de Treg en comparación con las BMDC de ratones de tipo salvaje. En resumen, los resultados demuestran que *L. lactis*-HSP65 indujo protección contra la diabetes Tipo 1 mediante inmunorregulación mediada por linfocitos T reguladores y células dendríticas tolerogénicas mediante un mecanismo dependiente de TLR2/IL-10.

Palabras clave: *Lactococcus lactis*. HSP65. Células dendríticas. Linfocitos T reguladores. TLR2.

Apoyo financiero: CAPES, CNPq y FAPESP (n° de proceso: 2022/02762-4).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Curva concentração-resposta de rHSP65 em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) .....	45
<b>Figura 2</b> - rHSP65 ativa e induz perfil tolerogênico em BMDCs .....	47
<b>Figura 3</b> - DCs CD103 <sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 induzem diferenciação de células T reguladoras <i>in vitro</i> .....	48
<b>Figura 4</b> - Validação do cultivo e expressão heteróloga de HSP65 em <i>Lactococcus lactis</i> .	50
<b>Figura 5</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 reduz a incidência de DM1 induzida por estreptozotocina (STZ) .....	52
<b>Figura 6</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 reduz a insulite e induz tolerância oral em modelo de DM1 induzida por estreptozotocina (STZ) .....	54
<b>Figura 7</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 reduz a incidência de DM1 autoimune espontânea .....	56
<b>Figura 8</b> - <i>L. lactis</i> aumenta a expressão de genes associados à função de barreira intestinal e <i>L. lactis</i> -HSP65 induz genes associados à função imunorreguladora .....	59
<b>Figura 9</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 aumenta cDC1 no linfonodo cecal e cDC2 nos linfonodos jejuno-ileais durante DM1 .....	61
<b>Figura 10</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 aumenta cDC1 TLR2 <sup>+</sup> em linfonodos intestinais durante DM1 .....	63
<b>Figura 11</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 induz linfócitos T reguladores em linfonodos intestinais durante DM1 .....	65
<b>Figura 12</b> - <i>L. lactis</i> expressando HSP65 aumenta TFG- $\beta$ no cólon de camundongos com DM1 .....	67
<b>Figura 13</b> - <i>L. lactis</i> -HSP65 aumenta Tregs e expressão de LAP nos linfonodos pancreáticos e IL-10 e TFG- $\beta$ no pâncreas de camundongos com DM1.....	69
<b>Figura 14</b> - TLR2 é essencial na proteção contra DM1 induzida por <i>L. lactis</i> expressando HSP65.....	71
<b>Figura 15</b> - Camundongos diabéticos e deficientes de TLR2 que receberam <i>L. lactis</i> -HSP65 apresentam redução de cDC1 e da expressão de XCR1 no linfonodo cecal .....	73
<b>Figura 16</b> - Camundongos diabéticos e deficientes de TLR2 que receberam <i>L. lactis</i> -HSP65 apresentam prejuízo na indução de Tregs PD1 <sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos e produção de IL-10 no pâncreas .....	75
<b>Figura 17</b> - TLR2 é importante para a expressão gênica de Il10 e Irf8 mediada por rHSP65 em BMDCs .....	76
<b>Figura 18</b> - rHSP65 induz cDC1 e produção de IL-10 via TLR2 em BMDCs .....	78
<b>Figura 19</b> - TLR2 e IL-10 são importantes para a indução de Tregs mediada por DCs estimuladas com rHSP65 <i>in vitro</i> .....	80

<b>Figura 20</b> - A indução de cDC1 TLR2 <sup>+</sup> é associada com a proteção contra DM1 mediada por <i>L. lactis</i> -HSP65 .....	91
<b>Figura suplementar 1</b> - rHSP65 aquecida não é capaz de ativar BMDCs <i>in vitro</i> .....	107
<b>Figura suplementar 2</b> - Representativos das estratégias de <i>gate</i> para <i>sorting</i> de DCs CD103 <sup>+</sup> , CD103 <sup>-</sup> e linfócitos Th0 .....	108
<b>Figura suplementar 3</b> - <i>L. lactis</i> aumenta cDC1 PD-L1+ no linfonodo cecal no modelo de DM1 .....	109
<b>Figura suplementar 4</b> - <i>L. lactis</i> -HSP65 não altera cDC1 no linfonodo cecal mas aumenta Tregs nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD .....	110
<b>Figura suplementar 5</b> - <i>L. lactis</i> aumenta a expressão de PD-1 em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no modelo de DM1 .....	111
<b>Figura suplementar 6</b> - A deficiência de TLR2 não altera o desenvolvimento de DM1 induzida por STZ .....	111

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Anticorpos e corantes utilizados na marcação de células para citometria de fluxo .....	39
<b>Quadro 2</b> - Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR .....	41



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACK</b>	Cloreto de amônio e potássio
<b>APC</b>	Do inglês, <i>antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
<b>BMDC</b>	Do inglês, <i>Bone marrow derived dendritic cells</i> (células dendríticas derivadas da medula óssea)
<b>cDC</b>	Célula dendrítica convencional
<b>DAMP</b>	Do inglês <i>Damage-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a danos)
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>DSS</b>	Do inglês <i>Dextran Sulfate Sodium</i> (dextran sulfato de sódio)
<b>GM-CSF</b>	Do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
<b>GTT</b>	Do inglês, <i>Glucose tolerance test</i> (Teste de tolerância à glicose)
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HSP65</b>	Do inglês, <i>Heat Shock protein 65</i> (Proteína do choque térmico 65)
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>Irf4</b>	Fator regulador de interferon 4
<b>Irf8</b>	Fator regulador de interferon 8
<b>LC</b>	Linfonodo cecal
<b>LJI</b>	Linfonodo jejuno-ileal
<b>LP</b>	Linfonodo pancreático
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NOD</b>	Do inglês, <i>Non-obese diabetic mice</i> (camundongo diabético não obeso)
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear κB
<b>PAMP</b>	Do inglês, <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PD-1</b>	Do inglês, <i>protein program death 1</i> (proteína de morte celular programada 1)
<b>PD-L1 (CD274)</b>	Do inglês, <i>Programmed cell death ligand 1</i> (Ligante de morte celular programada 1)
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>Teff</b>	Célula T efetora
<b>TGF-β</b>	Do inglês, <i>transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
<b>TLR2</b>	Do inglês, <i>Toll-like receptor 2</i> (Receptor semelhante a <i>Toll</i> 2)
<b>TLR4</b>	Do inglês, <i>Toll-like receptor 4</i> (Receptor semelhante a <i>Toll</i> 4)
<b>tolDC</b>	Célula dendrítica tolerogênica
<b>Treg</b>	Célula Treguladora
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônias
<b>WT</b>	Do inglês, <i>Wild-type</i> (selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	Diabetes mellitus tipo 1.....	18
1.2	Mecanismos de imunorregulação no intestino e suas disfunções associadas ao DM1 .....	20
1.3	Proteínas do choque térmico (HSPs) e seus efeitos imunorreguladores .....	25
1.4	<i>Lactococcus lactis</i> como veículo de entrega de proteínas.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>31</b>
2.1	Objetivos específicos.....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	Animais .....	33
3.2	Diferenciação e estímulos de BMDCs .....	33
3.3	Co-cultura de BMDCs e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	34
3.4	Cultivo de <i>L. lactis</i> e indução da expressão de HSP65 .....	34
3.5	<i>Western blot</i> para validação da expressão de HSP65.....	35
3.6	Coloração de Gram.....	35
3.7	Indução de diabetes tipo 1 com STZ.....	36
3.8	Preparo de <i>L. lactis</i> para administração.....	36
3.9	Delineamentos experimentais .....	36
3.10	Teste de tolerância à glicose (GTT) .....	37
3.11	Coleta de sangue e obtenção de soro.....	37
3.12	Análise histopatológica do pâncreas e cólon.....	37
3.13	Marcação para muco com ácido periódico de Schiff (PAS) .....	38
3.14	Marcação de insulina por IHQ .....	38
3.15	Citometria de fluxo das BMDCs e células dos linfonodos.....	39
3.16	Quantificação de insulina, anticorpos e citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) ....	40
3.17	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	40
3.18	Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR) .....	41
3.19	Análise estatística.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Avaliação do efeito de diferentes concentrações de rHSP65 na viabilidade e produção de citocinas em BMDCs .....	44
4.2	rHSP65 ativa BMDCs e induz subpopulações de DCs com perfil tolerogênico.....	46

4.3	DCs CD103 <sup>+</sup> previamente estimuladas com rHSP65 induzem diferenciação de células T reguladoras <i>in vitro</i> .....	48
4.4	Validação do cultivo e da expressão heteróloga de HSP65 em <i>Lactococcus lactis</i> .....	49
4.5	<i>Lactococcus lactis</i> expressando HSP65 controla a glicemia e reduz a incidência de DM1 induzida por estreptozotocina.....	50
4.6	A administração de <i>L. lactis</i> -HSP65 reduz a insulite e IgG anti-HSP65 sérica no DM1 .....	53
4.7	A administração de <i>L. lactis</i> -HSP65 reduz a incidência de DM1 no modelo de camundongos NOD	54
4.8	<i>L. lactis</i> aumenta a expressão de marcadores associados à melhora da função de barreira intestinal e <i>L. lactis</i> -HSP65 induz genes de DCs com perfil tolerogênico no colón.....	56
4.9	<i>L. lactis</i> -HSP65 induz cDC nos linfonodos que drenam o ceco e jejuno-íleo.....	60
4.10	<i>L. lactis</i> -HSP65 induz cDC1 expressando TLR2 em linfonodos intestinais.....	62
4.11	<i>L. lactis</i> -HSP65 aumenta Tregs e expressão de PD-1, mas não altera as células T patogênicas nos linfonodos intestinais.....	64
4.12	A administração de <i>L. lactis</i> expressando HSP65 aumenta a produção de TGF- $\beta$ no cólon de camundongos com DM1 .....	66
4.13	<i>L. lactis</i> -HSP65 aumenta Tregs e expressão de LAP nos linfonodos pancreáticos e IL-10 e TFG- $\beta$ no pâncreas de camundongos com DM1.....	67
4.14	A redução da incidência de DM1 induzida por <i>L. lactis</i> - HSP65 é dependente de TLR2 ....	70
4.15	TLR2 é importante para a indução de cDC1 no linfonodo cecal mediada por <i>L. lactis</i> -HSP65 no modelo de DM1.....	72
4.16	TLR2 é importante para indução de Tregs no linfonodo pancreático e produção de IL-10 no pâncreas induzidas por <i>L. lactis</i> - HSP65 no modelo de DM1.....	73
4.17	BMDCs de camundongos Tlr2 <sup>-/-</sup> apresentam expressão gênica reduzida de Il10 e Irf8 após estímulo com rHSP65 .....	75
4.18	rHSP65 induz cDC1 e produção de IL-10 via TLR2 em BMDCs.....	77
4.19	TLR2 e IL-10 são importantes para a indução de Tregs mediada por DCs estimuladas com rHSP65 .....	79
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE A – FIGURAS SUPLEMENTARES</b> .....	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE B – PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE C - PREMIAÇÕES</b> .....	<b>122</b>
	<b>ANEXO A – AUTORIZAÇÃO CEUA</b> .....	<b>123</b>

# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Diabetes mellitus tipo 1

Diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizadas principalmente por hiperglicemia crônica, resultante do prejuízo de secreção e/ou sinalização de insulina [1], hormônio peptídico secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas, importantes no controle da glicemia [2]. O descontrole da glicemia leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse celular, podendo desencadear diversas complicações, como danos vasculares, que frequentemente são causas de retinopatia, nefropatia, acidente vascular encefálico e doença arterial coronariana [3,4].

DM é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, e estimativas atuais mostram que cerca de 415 milhões de pessoas são diagnosticadas como diabéticas, mas ainda existem aquelas sem diagnóstico por apresentarem sintomas mais brandos [5]. A classificação dos tipos de diabetes mellitus mais aceita é a proposta em 1997, pela *American Diabetes Association* (ADA), que determina as seguintes categorias: (1) diabetes tipo 1, caracterizada por destruição das células  $\beta$  e deficiência total de insulina (imuno-mediada), (2) diabetes tipo 2, na qual ocorre resistência à insulina e, (3) outros tipos específicos de diabetes, como a causada por defeitos genéticos nas células  $\beta$  ou na ação da insulina, por doenças no pâncreas exócrino, induzida por agentes químicos, infecções ou diabetes gestacional [1,6].

A diabetes tipo 1 (DM1), também conhecida como diabetes autoimune, é diagnosticada ainda na infância ou juventude, e ocorre em 5%-10% dos indivíduos diagnosticados com diabetes [1]. Em 2021, foi estimado que cerca de 8,4 milhões de pessoas vivem com DM1 à nível mundial, sendo que em 2040 a estimativa é que esse número chegue de 13,5-17,4 milhões de pessoas [7]. De acordo com o relatório da Federação Internacional de Diabetes intitulado "*Type 1 diabetes estimates in children and adults*", estimou-se que 588.800 indivíduos no Brasil viviam com DM1 em 2022. Essa estimativa coloca o país em terceiro lugar no ranking mundial de nações com o maior número de casos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América e da Índia [8].

Nas etapas iniciais da doença, mesmo na ausência de sintomas, já se verifica a geração de autoanticorpos e a redução das células  $\beta$ , restringindo o diagnóstico à identificação desses autoanticorpos. Os principais autoanticorpos associados à DM1 são aqueles que tem como alvo a insulina, a proteína 2 associado ao insulinoma (IA-2), a descarboxilase do ácido

glutâmico de 65 kDa (GAD-65) e o transportador de zinco 8 (ZNT8) [9], os quais são detectados como biomarcadores de autoimunidade [3]. A disglícemia marca o segundo estágio da doença, no qual a glicemia está elevada, mas ainda não configura diabetes (100–125 mg/dL) [4]. O terceiro estágio da doença é caracterizado por intensa perda de células  $\beta$ , que leva aos sintomas clássicos de hiperglicemia, como poliúria, sede e perda de peso [3].

Os mecanismos iniciais no desenvolvimento da autoimunidade ainda não são claros, mas acredita-se que os primeiros autoanticorpos sejam produzidos após células dendríticas apresentarem antígenos das ilhotas pancreáticas e ativarem linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  específicos. Essas células parecem reconhecer, principalmente, peptídeos alterados na fase pós-traducional das células  $\beta$ , sugerindo que essa falha na tolerância pode ser originada por proteínas alteradas decorrentes de estresse na célula  $\beta$  [10,11]. Além disso, a diminuição da seleção negativa no timo, seja devido à expressão alterada do antígeno específico do tecido ou devido à sinalização do receptor de células T (TCR), faz com que ocorra maiores chances do escape de clones de células T específicos de células  $\beta$  para a periferia [12].

Na periferia, as células T específicas contra células  $\beta$  são estimuladas nos linfonodos pancreáticos pelas APCs das ilhotas, levando à diferenciação das células T efetoras (Teff) patogênicas, que se infiltram nas ilhotas e iniciam a inflamação, levando à redução da função e/ou sobrevivência das células  $\beta$  [13]. Entretanto, nem todas as ilhotas são potencialmente infiltradas devido a um fenótipo imaturo e à redução da expressão de autoantígenos pelas células  $\beta$  [14]. A inflamação contínua das ilhotas também leva à geração de neoautoantígenos diretamente nas células  $\beta$  ou durante o processamento do antígeno pela APC. A apresentação de neoautoantígenos dentro dos linfonodos pancreáticos promove a ativação e expansão de clones adicionais de Teff. Dessa forma, esses eventos amplificam e estabelecem um estado crônico de inflamação das ilhotas (insulite), levando ao comprometimento da massa funcional de células  $\beta$  e ao início clínico do DM1 [12].

Além da presença de linfócitos autorreativos, há evidências de falhas nas células Treguladoras (Tregs) em pacientes como DM1. Foi mostrado que a depleção de Tregs ou mutações no Foxp3 induzem autoimunidade no pâncreas [15]. Além disso, no sangue periférico de pacientes com DM1 há redução no número dessas células [16]. O desenvolvimento de biomarcadores focados em Treg, alterações em Foxp3 ou CTLA-4, por exemplo, possibilita a classificação dos pacientes com base no nível de deficiência de Treg, favorecendo a identificação de subgrupos com maior probabilidade de se beneficiarem de terapias baseadas em Treg [17].

Os estudos sugerindo o papel de Tregs como estratégia terapêutica para DM1 vêm crescendo nos últimos anos, visto que essas células, quando residentes no pâncreas, desempenham um papel crucial na supressão da inflamação das ilhotas pancreáticas, seja por produção de IL-10 e TGF- $\beta$  para inibição das células Teff, por alterações metabólicas, por liberação de granzimas para citólise de Teff ou por inibir a maturação de DCs [18]. As principais estratégias envolvem o transplante de Tregs policlonais [19], Tregs específicas para antígenos pancreáticos [20] ou até mesmo injeção de Tregs autólogas [21]. Além disso, a administração de IL-2 em pacientes com DM1 foi segura e efetiva na indução de Tregs [22], e o uso de DCs com fenótipo tolerogênico também representa uma estratégia promissora para a indução de Tregs [23].

A modulação da microbiota intestinal e da função de barreira, geralmente comprometidos na DM1 [24], e indução de Tregs no trato gastrointestinal, que possuem a capacidade de migrar para a periferia e atingir outros órgãos podendo suprimir os linfócitos efetores diabetogênicos [25], vêm sendo cada vez mais estudadas e constituem estratégias promissoras no controle de DM1.

## **1.2 Mecanismos de imunorregulação no intestino e suas disfunções associadas ao DM1**

Componentes do sistema imunológico do intestino, como as células do sistema imune inato e adaptativo, e células epiteliais, desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase intestinal [26]. Dentre as células epiteliais, os enterócitos e as células enteroendócrinas, são responsáveis principalmente pela absorção de nutrientes e produção de hormônios intestinais, respectivamente [27]. As células caliciformes são localizadas principalmente nas criptas do cólon, onde sofrem hiperplasia e produzem muco após diferentes estímulos, como IL-22, uma citocina importante no controle de infecções intestinais [28]. Já foi mostrado que alterações na camada mucosa estão presentes em indivíduos com DM1 e são associadas à disbiose e desregulação imunológica [29]. As células de Paneth, localizadas na base das criptas do intestino delgado, são importantes produtoras de fatores de crescimento e peptídeos antimicrobianos, como Reg3 $\gamma$  e  $\alpha$ -defensinas, que são importantes para a defesa do hospedeiro [30]. Em modelo de DM1 induzido por STZ, foi observado que apesar do aumento no número de células de Paneth nos camundongos diabéticos, a expressão de peptídeos antimicrobianos derivados dessas células foi significativamente diminuída [31].

No grupo das células da imunidade inata, estão as células linfoides inatas (ILCs), os macrófagos e as DCs. As ILCs são residentes em tecidos, como pulmões, pele e mucosa

intestinal, e se diferenciam dos linfócitos T por não expressarem o TCR e por induzirem resposta mediada por citocinas poucas horas após a ativação [32]. São divididas em três grupos: ILC1s, que produzem principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e medeiam respostas contra bactérias e parasitas, ILC2s, produtoras de IL-4 e IL-5, são efetoras contra helmintos, e ILC3s, importantes produtoras de IL-22 e IL-17, que induzem produção de muco auxiliando no controle bactérias e fungos [33]. A frequência dessas células foi associada com a gravidade de DM1, visto que camundongos NOD com DM1 estabelecida apresentaram frequências mais baixas de ILC3 e Treg produtoras de IL-2 no intestino delgado quando comparado com camundongos NOD pré-diabéticos [34].

Por outro lado, os macrófagos intestinais constituem um grupo celular bastante heterogêneo, e estão envolvidos com diversos aspectos da homeostase, como secreção e motilidade intestinal [35]. Além disso, os macrófagos do intestino são altamente fagocíticos, porém não induzem resposta inflamatória muito evidente [36,37]. Macrófagos peritoneais isolados de camundongos com DM1 apresentam produção exacerbada de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 após estímulo com LPS [38], e já foi mostrado que DM1 induz disfunção de macrófagos através de piroptose citoplasmática associada ao AIM2, um sensor citosólico de DNA [39].

As DCs possuem papel essencial na apresentação de antígenos e são reguladoras da resposta imunológica e da tolerância [40]. As células dendríticas convencionais (cDC) migram dos tecidos periféricos para os linfonodos drenantes para apresentarem antígenos aos linfócitos T virgens, podendo induzir sua diferenciação para um perfil inflamatório ou regulador. No intestino, essas células estão distribuídas na lâmina própria e nos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT), e possuem fenótipos e funções distintas a depender da região onde estão localizadas [41]. No intestino de camundongos e de humanos, assim como em outros tecidos, as cDCs expressam MHC-II e CD11c, e são divididas basicamente em cDC1 (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>XCR1<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>), cujos fatores de transcrição são o fator regulador do interferon 8 (Irf8) e fator de transcrição semelhante a ATF com zíper de leucina básico 3 (Batf3), e cDC2 (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>SIRP $\alpha$ <sup>+</sup>), que tem Irf4 como fator de transcrição [42,43]. A expressão de Irf8 é essencial para o desenvolvimento de cDC1 [44], entretanto, já foi mostrado em BMDCs que na ausência desse fator de transcrição as cDC1 sofrem reprogramação transcricional e metabólica para um perfil cDC2 [45]. Camundongos NOD pré-diabéticos apresentam redução nas cDC1 (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) nos linfonodos que drenam jejuno e ceco [46], bem como diminuição da população cDC1 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> no baço [47]. Foi mostrado que cDC2 também são reduzidas nos linfonodos mesentéricos de camundongos



NOD pré-diabéticos e com diabetes já estabelecida, sugerindo que disfunções nessas células podem estar associadas com a progressão da doença [46].

A expressão de CD103 é essencial para a regulação positiva de CCR9 e de  $\alpha 4\beta 7$  em células T, possibilitando a migração dessas células para tecidos periféricos não linfoides, e ainda induz diferenciação de células T Foxp3<sup>+</sup>, influenciando no equilíbrio entre a atividade das células T efetoras e reguladoras no intestino [48–50]. As DCs CD103<sup>+</sup> dos linfonodos intestinais expressam níveis mais elevados de Aldh1a2, o gene que codifica RALDH2, que é uma enzima chave envolvida no metabolismo da retinol em ácido retinoico, associada com indução de perfil regulador em DCs [50,51]. Em contrapartida, DCs CD103<sup>-</sup> promovem a diferenciação de células T produtoras de IFN- $\gamma$  ou IL-17 em modelos de inflamação intestinal [48,52].

Funcionalmente, as cDCs intestinais são capazes de 1) capturar antígenos por diferentes mecanismos na lâmina própria [53], 2) migrar para os linfonodos drenantes via aumento da expressão de CCR7 [54], 3) induzir inflamação após um estímulo direto [55] e 4) promover tolerância no estado basal, quando são chamadas de DCs tolerogênicas (tolDCs) [56]. Essas células, geralmente apresentam perfil imaturo ou semi-maturo, caracterizado por redução na expressão de MHC-II, CD80 ou CD86 [56,57]. Essa menor expressão de moléculas co-estimuladoras induz anergia em células T efetoras [58] e favorece a indução de Tregs, porém essa característica é controversa, pois DCs maduras também podem induzir Tregs [59]. Foi mostrado que a administração de TNF- $\alpha$  exógeno em camundongos NOD neonatos induz maturação de DCs e desregula o perfil de tolDCs, eventos que podem estar associadas com a progressão da doença [60]. Além disso, as tolDCs produzem a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que promove a degradação de triptofano em quinurenina, metabólito que diminui a proliferação de células T efetoras [61,62]. Nesse contexto, foi mostrado que a inibição de IDO acelera a progressão de DM1 [63]. A inibição das células T efetoras também pode ser mediada pela expressão de moléculas inibitórias nas tolDCs, como os ligantes de morte programada 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2)[64]. As tolDCs também produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , citocinas que induzem a diferenciação de Tregs [65,66].

As células Treguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) são as principais mediadoras da tolerância periférica, e são cruciais para a prevenção e controle de doenças inflamatórias e autoimunes [67]. Como o trato gastrointestinal é constantemente exposto a grande variedade de antígenos alimentares e da microbiota intestinal, a atividade de Tregs é essencial para limitar respostas imunes exacerbadas no intestino [68], inclusive há evidências de que a

geração e a maturação das Tregs do cólon são influenciados pelos antígenos da microbiota intestinal [69]. Essa relação parece ser uma via de mão dupla, pois na ausência de células Foxp3<sup>+</sup> ocorre redução da abundância relativa de bactérias da classe Clostridia e alteração de outros filos, indicando que as Tregs mantêm as bactérias indutoras de Treg no lúmen intestinal e controlam o perfil da microbiota intestinal [70,71]. Apesar das diferenças funcionais, a diferenciação de células T naive para Tregs ou Th17 é controlada por um fino balanço na produção de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23 e ácido retinóico, e ainda, por sinais provenientes da microbiota intestinal, reforçando que a disbiose intestinal pode induzir inflamação na mucosa do intestino por alterar o balanço de Treg/Th17 [72,73].

Em relação à origem das Tregs, elas podem ser classificadas em naturais ou induzidas. As Tregs naturais (nTreg) expressam Helios e neuropilina 1 (Nrp1) e saem do timo já em estado maduro, com capacidade de suprimir células T autorreativas na periferia, onde se mantêm de forma dependente de IL-2 [74]. Por outro lado, as Tregs induzidas (iTregs) são células CD4<sup>+</sup> que se diferenciam em Tregs após estímulo por uma APC com antígeno não-próprio na periferia, que produzem citocinas polarizantes, como IL-10 e TGF- $\beta$  [75]. Vários estudos mostraram que a depleção de Tregs utilizando anti-CD25 acelera o desenvolvimento de DM1, e que as Tregs de indivíduos com DM1 se apresentam em número menor e com capacidade supressora reduzida [76,77].

A atividade supressora das Tregs pode ser induzida por diferentes mecanismos, incluindo a liberação de citocinas anti-inflamatórias, expressão de receptores de superfície inibitórios e indução de lise celular [68]. IL-10 produzida por Tregs inibe a proliferação de células efetoras, e de forma autócrina, favorece a expansão de Tregs [78]. Além disso, Tregs com deficiência na produção de IL-10 falham na supressão de células Th17 em modelo de colite experimental [79]. A deficiência na produção de TGF- $\beta$  também é associada com autoimunidade e inflamação intestinal exacerbada [80,81].

Em relação às moléculas inibitórias de superfície, a alta expressão de CD25, subunidade  $\alpha$  do receptor da IL-2, nas Tregs faz com que haja redução de IL-2 no microambiente, prejudicando a função de células efetoras [82]. Nesse sentido, foi observado que pacientes com DM1 apresentam defeitos na sinalização de IL-2R que contribuem com a redução de Tregs nesses pacientes [83]. Já foi mostrado que o receptor CTLA-4 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico) é expresso de forma constitutiva nas Tregs, e é essencial para a supressão *in vitro* da proliferação de células T efetoras por Tregs [84], além de induzir redução na expressão de CD80/CD86 em APCs [85]. O mecanismo supressor de Tregs

mediado por PD-1 (proteína de morte celular programada 1), envolve a interação com PD-L1/PD-L2 nas APCs, levando à inibição de células T efetoras [86]. O papel de PD-1 no controle da inflamação intestinal é controverso, pois a ausência desse receptor afeta a secreção de IgA e induz disbiose [87], porém, protege contra a colite experimental [88]. No DM1, foi demonstrado que a interação entre as moléculas inibitórias PD-1 nas células T e PD-L1 nas DC é necessária para a manutenção da tolerância em camundongos NOD [89].

Durante estresse e ativação celular ocorre o aumento de ATP no meio extracelular [90]. Nessas situações, a expressão de CD39 (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1) e CD73 (5'-nucleotidase) é aumentada nas Tregs [91,92]. CD39 é a enzima que converte o ATP (adenosina trifosfato) em AMP (monofosfato cíclico de adenosina), e quando altamente expressa, mantém a expressão de Foxp3 nas Tregs humanas mesmo na presença IL-1 $\beta$  e IL-6, o que não ocorre em Tregs com baixa expressão de CD39, que foram convertidas em Th1 ou Th17 [93]. CD73, por sua vez, converte AMP em adenosina [94]. A interação da adenosina extracelular com seu receptor A<sub>2A</sub>, promove anergia em células T efetoras, estimula a diferenciação de Tregs e auxilia na manutenção da homeostase intestinal [92].

Além da produção de citocinas e expressão de moléculas inibitórias, as Tregs são capazes de secretar granzimas e perforinas, moléculas citotóxicas que desempenham um papel significativo nos efeitos imunossupressores de células T efetoras, particularmente em modelos relacionados à pneumonia viral e as doenças como linfoma e melanoma [95,96]. No sistema imune do trato gastrointestinal, já foi mostrado que granzima A é necessária para a regulação mediada por células T na doença do enxerto contra o hospedeiro [97].

Além da patogenia clássica de DM1, foi mostrado que o início da autoimunidade em modelos pré-clínicos de DM1 está associado a alterações na estrutura da camada mucosa e à perda da integridade da barreira intestinal, que ocorrem em paralelo com a ativação de células T auto-reativas contra as ilhotas pancreáticas na presença de microbiota intestinal [98]. Foi observado que crianças com DM1 apresentam mecanismos regulatórios prejudicados e tolerância oral desregulada [99]. Como DM1 está associado com falha na tolerância, diversos ensaios pré-clínicos buscam resgatar mecanismos de tolerância intestinal e extra-intestinal, por meio da administração ou indução de tolDCs e Tregs [100]. DCs tolerogênicas residentes foram descritas no pâncreas, e sua frequência diminui com a progressão do influxo de células T ao redor e nas ilhotas pancreáticas durante DM1, reforçando a importância dessas células na prevenção ou controle da doença [101,102]. No mesmo sentido, estratégias baseadas na

administração de Tregs exógenas ou no aumento da geração/função das Tregs tem mostrado efeitos benéficos em modelos murinos de DM1 [15].

### 1.3 Proteínas do choque térmico (HSPs) e seus efeitos imunorreguladores

As Proteínas de Choque Térmico (HSPs, do inglês Heat Shock Proteins) constituem uma família diversificada de proteínas altamente conservadas entre eucarióticos e procarióticos, e essenciais para a homeostase celular [103]. São induzidas em resposta a condições de estresse, como altas temperaturas, radiação, e agentes químicos, desempenhando um papel crucial na proteção das células contra danos e na manutenção da sua sobrevivência, pois atuam como chaperonas moleculares, auxiliando no correto dobramento de proteínas [104]. Apesar de serem primariamente expressas no meio intracelular, HSPs já foram encontradas no soro de humanos [105].

Essas proteínas são classificadas em diferentes grupos, principalmente com base em seus pesos moleculares. As HSPs de alto peso molecular incluem a HSP90, que desempenha um papel vital na estabilização de proteínas, no controle do ciclo celular e na sinalização de hormônios [106]. As HSPs de peso intermediário, como a família da HSP60, que inclui a HSP65, e a família da HSP70, estão localizadas principalmente no citosol e nas mitocôndrias, e são conhecidas por atuarem no dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas, redobramento de proteínas mal dobradas e agregadas, bem como por seus efeitos imunorreguladores [103,107]. Essas proteínas geralmente apresentam homologia entre as espécies, como é o caso da HSP65 de micobactérias, que compartilha 50% de identidade de aminoácidos com a HSP60 de mamíferos [108]. As HSPs de baixo peso molecular incluem as HSP10 e HSP20, são localizadas principalmente no citosol, e desempenham funções variadas, como estabilização do citoesqueleto, chaperonas e efeito anti-apoptótico [109].

As HSPs são importantes moduladores do sistema imunológico, seja induzindo respostas imunes efetivas para proteção ou desempenhando um papel na tolerância imunológica [110]. Já foi mostrado que as HSPs interagem com células inatas pela ligação aos receptores semelhantes a *Toll*, principalmente TLR2 e TLR4, presentes em DCs e macrófagos [111,112].

DCs murinas estimuladas com HSP70 de camundongos ou de micobactéria, e pulsadas com proteoglicano, um antígeno indutor de artrite, suprimiram o desenvolvimento da doença em camundongos com artrite induzida por proteoglicano (PGIA), provavelmente com participação da IL-10 induzida por HSP70 [113]. Nesse sentido, BMDCs estimuladas com

HSP70 por 24 ou 48 horas, apresentaram redução na expressão de MHC-II e CD86, sugerindo que essa proteína induz DCs com perfil tolerogênico [114]. Foi mostrado que pacientes com artrite apresentam elevação de HSP70 no líquido sinovial em resposta à inflamação, e essa HSP induz aumento de IL-10 via TLR4 nos fibroblastos, além de reduzir a produção de IL-6 e IL-8 [115]. Além disso, com o objetivo de avaliar o efeito de uma vacina de DNA de HSP65 na artrite, um estudo mostrou que a vacina induziu proteção contra o desenvolvimento da doença, e em paralelo aumentou a produção de IL-10 e reduziu IL-6 e IL-12 em sobrenadante de células do baço reestimuladas com HSP65 recombinante [116].

Os efeitos imunorreguladores de HSP65 já foram mostrados na tuberculose [117], na paracoccidiodomicose [118] e na asma [119]. Adicionalmente, em modelo de DM1 induzida por STZ, a aplicação de três doses de vacina contendo DNA de HSP65 de micobactéria foi eficaz na redução da insulite, efeito associado com aumento de IL-10 e Tregs no baço, e redução de T CD8<sup>+</sup> infiltrantes no pâncreas dos camundongos vacinados [120]. Em camundongos NOD com 4 semanas de idade, antes do início de DM1, a aplicação de HSP65 contendo o peptídeo diabetogênico P277 na mucosa nasal foi capaz de inibir o desenvolvimento de DM1 e evitar a mortalidade decorrente do agravamento da doença [121]. Além disso, as células T dos camundongos vacinados com HSP65-P277 foram fracamente ativadas e tiveram redução na proliferação após reestímulo com o peptídeo quando comparado com as células T dos camundongos controle, sugerindo que a vacina foi capaz de induzir tolerância ao antígeno diabetogênico [121].

O papel de HSP65 na patogênese de DM1 ainda não está claro [122]. Além dos autoanticorpos clássicos detectados no soro de pacientes com DM1, anticorpos anti-HSP65 também já foram detectados no soro desses indivíduos, mas não foram considerados como marcadores da doença [123]. Por outro lado, já foi mostrado que os soros de pacientes com DM1 e DM2 reagem de forma cruzada com peptídeos HSP65 micobacterianos conservados, provavelmente devido a presença de peptídeos significativamente conservados entre a HSP65 micobacteriana e a HSP60 humana [124]. Nesse mesmo estudo, o estímulo de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) com HSP65 induziu aumento de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que HSP65 pode contribuir com a patogênese de DM1 [124].

A tolerância oral é definida como a supressão ou redução da resposta imune específica contra um antígeno, alcançada pela administração desse antígeno em baixas doses por determinado período por via oral [125]. Se HSP65 possuir algum papel na patogênese de

DM1, estratégias de entrega de HSP65 na mucosa intestinal antes do início ou concomitante com o desenvolvimento da doença podem ser eficazes na indução de tolerância oral e redução da incidência da doença.

#### 1.4 *Lactococcus lactis* como veículo de entrega de proteínas

*L. lactis*, da família Streptococcaceae, faz parte do grupo de bactérias ácido láctico (LAB), que compreende bactérias Gram positivas, aerotolerantes, não formadoras de esporos e que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de açúcares (homofermentação) [126]. Já foi mostrado que as LAB também podem produzir etanol, ácido acético e fórmico como produtos da fermentação, na chamada heterofermentação [127]. Essas bactérias vêm sendo exploradas na indústria de alimentos fermentados, pois contribuem com o sabor, textura e segurança desse alimentos, além de produzirem bacteriocinas, consideradas bioconservantes [128]. A principal função de *L. lactis* nas culturas lácteas é produzir uma quantidade suficiente de ácido láctico capaz de quebrar as proteínas do leite durante a fermentação, na fabricação de queijos artesanais e comerciais, leite fermentado e cremes de leite [129].

Diversas cepas de *L. lactis* já foram isoladas de diferentes fontes, por exemplo, as cepas IL1403, CNCMI-1631 e TIFN2 foram encontradas em produtos lácteos, porém, a cepa KF147 foi isolada originalmente de brotos de feijão, e a cepa NCDO 2118, utilizada nesse estudo, foi encontrada primeiramente em ervilhas [130]. Diferentemente, a cepa CV56 foi isolada da microbiota vaginal [131]. *L. lactis* é reconhecida como bactéria “geralmente considerada segura” (GRAS, do inglês *Generally Regarded As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA), e apesar de não fazer parte da microbiota intestinal, *L. lactis* é capaz de sobreviver no trato gastrointestinal de forma transitória, mas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar o tempo de viabilidade da bactéria no intestino [132,133]. Esses fatores, somados ao fato de que todo o genoma de *L. lactis* já foi sequenciado, sugerem um potencial efeito como bactéria probiótica na saúde humana [134].

Já foi mostrada que a administração oral de  $1 \times 10^9$  CFU de diferentes cepas de *L. lactis* durante sete dias melhora o aspecto inflamatório da colite induzida por DSS, reduz a produção de TNF- $\alpha$  na mucosa intestinal e ainda diminui a perda de células caliciformes e o aumento da permeabilidade intestinal em camundongos [135]. A administração de duas doses de  $2,0 \times 10^9$  CFU/ml de *L. lactis* com intervalo de sete dias entre as doses, melhorou o crescimento, regulou o sistema GABAérgico intestinal e aumentou a diversidade beta da microbiota intestinal em leitões desmamados [136]. Além disso, vários estudos clínicos com humanos

foram realizados para avaliar os efeitos de diferentes cepas de *L. lactis* na hipertensão (NCT02670811), na rinosinusite crônica (NCT04048174) e na resistência à insulina (NCT06092060), porém os resultados ainda não foram publicados.

Além dos potenciais efeitos benéficos das cepas selvagens, *L. lactis* vem sendo usado como veículo de entrega direcionada de vacinas, hormônios ou moléculas com atividade imunorreguladora, por meio da indução de expressão heteróloga de proteínas [137]. Dessa forma, vários vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis foram desenvolvidos para obter aumento na secreção de proteínas e controlar a sua produção [138]. O principal sistema de expressão de proteínas heterólogas induzíveis é o NICE (Expressão controlada induzível por nisina), porém outros sistemas também são utilizados, como o sistema de expressão do gene P170, o SICE (Sistema de expressão controlada induzido por estresse) [139] e o XIES (Sistema de expressão induzível por xilose), que utiliza o promotor de *xylT*, o gene da xilose permease, (*PxylT*) de *L. lactis* NCDO2118, para controlar a expressão do gene de interesse [140]. A administração de *L. lactis* expressando vetores de vacinas ou outras proteínas, independente do sistema de expressão, se mostrou seguro nas vias oral, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal e intranasal [141].

Já foi mostrado que *L. lactis* expressando o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) murino promoveu melhora significativa na tolerância à glicose juntamente com aumento dos níveis de insulina em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD) [142]. Além disso, *L. lactis* expressando o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) atenuou o *score* inflamatório da colite e reforçou a função de barreira no cólon de camundongos com a doença [143].

Foi demonstrado que *L. lactis* expressando citocinas é uma estratégia eficaz em diferentes contextos [144]. A administração preventiva de *L. lactis* expressando IL-35 foi capaz de atenuar a colite [145] e reduzir IFN- $\gamma$  e IL-17 em modelo artrite, atenuando o processo inflamatório da doença [146]. *L. lactis* secretando IL-10 foi capaz de proteger contra a colite [147], e quando a expressão dessa citocina foi associada com a expressão do autoantígeno GAD65, o probiótico foi capaz de reduzir a incidência de DM1 em camundongos NOD [148]. De forma semelhante, a expressão de IL-4 associada com IL-10 em *L. lactis* atenuou a insulite em camundongos DM1 induzida por STZ, mas não alterou a incidência da doença [149]. *L. lactis* expressando IL-22, IL-27 ou IL-2+antígeno Omp16 foi capaz de aliviar a gastroenterite bacteriana [150], proteger contra colite [151] e brucelose

[152], respectivamente. O uso de *L. lactis* expressando IL-6 como adjuvante de vacina também já foi reportado [153].

A expressão de HSP65 já foi induzida em *L. lactis* como forma de prevenção ou tratamento de infecções, alergias, doenças inflamatórias e autoimunes. A administração oral profilática de *L. lactis*-HSP65 atenuou os efeitos da infecção por *Leishmania braziliensis* em associação com expansão de Tregs e aumento de citocinas anti-inflamatórias, e a administração terapêutica foi capaz de reduzir a carga parasitária dos camundongos infectados [154]. Em modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA), *L. lactis*-HSP65 reduziu hiperresponsividade das vias aéreas, a produção de muco e o recrutamento de eosinófilos para os pulmões [155]. Na colite e na artrite murinas, *L. lactis* expressando HSP65 reduziu o processo inflamatório nessas doenças, devido a indução de IL-10 e Tregs LAP<sup>+</sup>, e foi mostrado que TLR2 é importante para a proteção induzida pelo probiótico em ambos os contextos [156,157].

O efeito de *L. lactis* expressando HSP65 de *Mycobacterium leprae* em associação com o peptídeo IA2P2 ou P277, ambos derivados da HSP60 humana, já foi avaliado no DM1 utilizando camundongos NOD. Em ambos os estudos, foi mostrado que o probiótico recombinante preveniu a hiperglicemia, reduziu a insulite e a proliferação de esplenócitos específicos para os antígenos [158,159]. Além disso, a administração de *L. lactis*-HSP65 + IA2P2 reduziu a relação Th17/Treg no baço [158].

Apesar desses dados mostrarem o papel benéfico de *L. lactis* expressando HSP65 no controle de DM1, os possíveis mecanismos de imunorregulação envolvidos, principalmente os que ocorrem nos linfonodos que drenam o intestino e o pâncreas, ainda não foram completamente elucidados.



OBJETIVOS

## 2 OBJETIVO

Determinar o efeito profilático-terapêutico de *L. lactis* expressando HSP65 durante o desenvolvimento de DM1 em modelo experimental.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de rHSP65 na ativação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) e indução de perfil tolerogênico *in vitro*;
- Cultivar e validar a expressão heteróloga de HSP65 de *M. leprae* em *L. lactis*,
- Investigar o efeito profilático-terapêutico de *L. lactis*-HSP65 no DM1, com ênfase na indução de células dendríticas tolerogências e linfócitos T reguladores, utilizando modelos de camundongos NOD e de DM1 induzida por STZ;
- Avaliar o efeito de *L. lactis*-HSP65 na expressão de genes relacionados à função de barreira intestinal de camundongos com DM1,
- Investigar o papel de TLR2 e TLR4 no efeito de *L. lactis*-HSP65 durante o desenvolvimento de DM1.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos (21-23g), das linhagens C57BL/6, provenientes do Biotério Geral da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto, Foxp3<sup>EGFP</sup> (#006769, The Jackson Laboratory), deficientes de TLR2 (*Tlr2*<sup>-/-</sup>, #004650, The Jackson Laboratory), deficientes de TLR4 (*Tlr4*<sup>-/-</sup>, [160]) ou deficientes de IL-10 (*Il10*<sup>-/-</sup>, #002251, The Jackson Laboratory), provenientes Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Também foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens NOR/LtJ (#002050, The Jackson Laboratory) e NOD/ShiLtJ (#001976, The Jackson Laboratory) de 5-6 semanas, provenientes do CCCE. Os animais foram mantidos em estante ventilada (Alesco, Monte Mor – SP) com livre acesso a água e alimento. A temperatura do biotério foi mantida a 21°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP (autorização n°. 007/2020), conforme ANEXO A.

#### 3.2 Diferenciação e estímulos de BMDCs

Para diferenciação de células dendríticas *in vitro* foram utilizados precursores da medula óssea de camundongos WT (C57Bl/6), deficientes de TLR2 ou deficientes de IL-10. As células foram recuperadas da medula óssea do fêmur e tíbia, e em seguida utilizamos solução ACK para lisar as hemácias. Os precursores foram então plaqueados em placas de Petri na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml (em 10 ml de volume final por placa), em meio RPMI completo (10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina, 0,1% de 2-mercaptoetanol, 0,1% de gentamicina e 0,1% de anfotericina) contendo GM-CSF murino (Biolegend, cat. 576306) a 20 ng/ml. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Nos dias 3, 7, 10 e 12 o meio foi substituído por meio fresco contendo GM-CSF (20 ng/ml). No dia 14, as células semi-aderentes foram coletadas, contadas e plaqueadas em placa de cultura de 48 poços, com  $5 \times 10^5$  células em 500 µl de meio por poço. Os estímulos foram realizados com LPS (500 ng/ml, InvivoGen, cat. #tlrl-pekllps, San Diego, USA) ou rHSP65 (6, 12 ou 24 µg/ml) e após 24 ou 48 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e as células foram coletadas para marcação para citometria de fluxo ou extração de RNA.

### 3.3 Co-cultura de BMDCs e linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Para avaliar se as BMDCs previamente estimuladas com rHSP65 tem capacidade de indução de Tregs, diferenciamos e estimulamos BMDCs de camundongos WT ou deficientes de TLR2 ou IL-10, conforme descrito no item 3.2. Após o tempo de diferenciação, separamos as células vivas CD64<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para obtenção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, maceramos linfonodos axilares, pancreáticos, cecal e o baço de camundongos WT, adicionamos ACK à suspensão de células para lisar as hemácias e separamos as células CD4<sup>+</sup> por meio de *microbeads* magnéticas (MACS Miltenyi Biotec, cat.130-104-454, Germany). Em seguida, as células T CD4<sup>+</sup> isoladas foram marcadas com corante de viabilidade (FVS 780, cat. 565388, BD Biosciences), anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD62L para separação das células T CD4<sup>+</sup> *naive* (vivas CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) por citometria de fluxo. As células T foram estimuladas com anti-CD3 (cat. 553057, BD Biosciences) e anti-CD28 (cat. 553294, BD Biosciences) murinos e colocadas em cultura com BMDCs CD103<sup>+</sup> estimuladas ou não rHSP65, na proporção de 1 BMDC: 3 T CD4<sup>+</sup> *naive*. A co-cultura foi realizada em placa de cultura de 96 poços, mantida em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 96 horas. Ao final do tempo de cultura, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e as células foram utilizadas para marcação e identificação de Tregs por citometria de fluxo.

### 3.4 Cultivo de *L. lactis* e indução da expressão de HSP65

Foram utilizadas as cepas *L. lactis* NCD02118 (*L.lactis* subsp *lactis*, selvagem) e *L. lactis* LLHsp65 com vetor pXylT:SEC:hsp65, utilizando um sistema de expressão induzível por xilose, que direciona a expressão da HSP65 recombinante para o meio extracelular, gentilmente cedidas pelos professores Anderson Miyoshi (UFMG) e Célio Lopes Silva (FMRP-USP). Com o objetivo de isolar uma colônia de cada cepa, foi realizada semeadura por esgotamento em ágar-M17 (cat. 218561, Difco, BD Biosciences) suplementado com glicose a 0,5% para *L. lactis* selvagem, ou em ágar-M17 suplementado com glicose a 0,5% + Cloranfenicol (10 µg/ml) para *L. lactis* recombinante. Em seguida, as placas foram mantidas a 30°C por 24 horas. Após o tempo de crescimento, uma colônia de cada cepa foi transferida para um tubo contendo meio M17 suplementado com glicose a 0,5% (e cloranfenicol para a cepa recombinante) e as culturas mantidas a 30°C por 24 horas, sem agitação. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 10x em M17 fresco, e no tubo correspondente à cepa recombinante foram adicionados xilose a 2%, para a indução da expressão de HSP65 e cloranfenicol. No tubo da cepa selvagem, apenas glicose a 0,5 % foi adicionada. Os tubos

foram mantidos a 30°C por 24 horas sem agitação. No dia seguinte, quando a D.O. está aproximadamente 2.0 a 600 nm, as culturas foram centrifugadas a 14000 RPM e os *pellets* ressuspendido em PBS-glicerol 20% na metade do volume da cultura do dia anterior [161]. Alíquotas de 1ml foram armazenadas a -80°C para utilização nos experimentos. Antes dos experimentos, uma alíquota de cada cepa foi descongelada para crescimento em ágar-M17 e posterior coloração de Gram, para confirmar pureza do banco. A quantificação das UFC do banco de cada cepa foi realizada por diluição seriada da alíquota e por D.O. (a 600 nm) a partir de uma alíquota de *L. lactis* com UFC conhecida utilizada como padrão.

### 3.5 Western blot para validação da expressão de HSP65

A confirmação da expressão de HSP65 nas amostras de *L. lactis* foi validada por meio de *Western blot*, conforme realizado em estudo anterior [155]. Em síntese, duas amostras de cada linhagem foram centrifugadas a 14.000 RPM, a 4°C, por 7 minutos. O sobrenadante foi concentrado utilizando colunas de ultrafiltração por membrana (VIVASPIN 500, cat.GE28-9322-36, GE Healthcare). Em seguida, tanto o pellet como o sobrenadante concentrado foram ressuspendidos, separadamente, em tampão TES-lisozima (0,01 mol l<sup>-1</sup> de Tris-HCl, 0,01 mol l<sup>-1</sup> de EDTA, 0,3 mol l<sup>-1</sup> de NaCl, 10 mg ml<sup>-1</sup> de lisozima, 0,01 mol l<sup>-1</sup> de DTT, e Complete) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, foi adicionado SDS a 20%, agitou-se a solução e foi adicionado um tampão de amostra concentrado cinco vezes (0,2 mol l<sup>-1</sup> de Tris-HCl, 40% de glicerol, 10% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol). A solução resultante foi aquecida a 100°C por 5 minutos para obtenção do extrato proteico. No dia seguinte, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS a 10% e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A detecção foi realizada utilizando um anticorpo policlonal anti-Hsp65 (1:500; Farmacore Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000; Molecular Probes, San Diego, CA, EUA), seguido pela aplicação de um substrato de peroxidase 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Kit de Substrato de Peroxidase SK-4100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

### 3.6 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada segundo as especificações do fabricante (LB Laborclin). Em resumo, uma colônia de *L. lactis* foi diluída em PBS 1x estéril, espalhada em lâmina de vidro, que foi secada e fixada com chama de bico de Bunsen. Após esfriamento, a lâmina foi coberta com solução de violeta genciana (1 min) e em seguida lugol (1min). O

lugol foi removido com solução descolorante (15 seg) e a lâmina lavada com água corrente. A solução de fucsina foi adicionada por 40 segundos e em seguida a lâmina foi lavada e deixada em temperatura ambiente para secagem. A lâmina foi observada em objetiva de imersão para captura das fotomicrografias.

### 3.7 Indução de diabetes tipo 1 com STZ

Os animais C57Bl/6, Tlr2<sup>-/-</sup>, Tlr4<sup>-/-</sup> ou Foxp3<sup>EGFP</sup> receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) diária de STZ (cat. S0130, Sigma, MO, USA) na concentração final de 40 mg/kg de peso do animal em solução de citrato de sódio 0,1M (pH 4,5), durante cinco dias consecutivos, totalizando cinco injeções. Os camundongos controle (grupo veículo), receberam apenas citrato de sódio i.p. durante os cinco dias. A glicemia dos animais foi avaliada nos dias -5 (antes do início da administração de *L. lactis*), 0 (antes do início da indução de DM1), 5, 10, 12 e 15 após o início da indução. Para isso, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas, e em seguida uma gota de sangue foi retirada da ponta da cauda e a glicemia determinada com uso de fitas de glicemia e glicosímetro Accu-Chek Guide (Roche). Camundongos com duas medições de glicemia consecutivas  $\geq 200$  mg/dL foram considerados diabéticos [162].

### 3.8 Preparo de *L. lactis* para administração

Após descongelamento, as alíquotas de *L. lactis* selvagem ou expressando HSP65 foram centrifugadas a 14000 RPM, a 4°C por 12 minutos. Para remover o PBS-glicerol, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com PBS 1x estéril, e novamente centrifugado. Por fim, o pellet foi ressuscitado novamente com PBS 1x estéril. Cada animal recebeu  $1,0 \times 10^9$  UFC (no modelo de DM1 induzido por STZ) ou  $2,0 \times 10^8$  UFC (modelo do NOD) em 200  $\mu$ l de PBS 1x estéril, por gavagem. Esse procedimento foi realizado em todos os dias de administração, sempre com uma alíquota nova.

### 3.9 Delineamentos experimentais

No modelo de DM1 induzido por STZ, os camundongos C57Bl/6 ou Foxp3<sup>EGFP</sup> foram divididos em quatro grupos: VH (veículo, não diabético), STZ + PBS (diabético que não recebeu *L. lactis*), STZ + LL (diabético que recebeu *L. lactis* selvagem) e STZ + LLHSP65 (diabético que recebeu *L. lactis*-HSP65). No dia -5, a glicemia de jejum e peso de todos os animais foi avaliado, e em seguida, *L. lactis* selvagem ou expressando HSP65 foi administrado por gavagem ( $1,0 \times 10^9$  CFU) durante cinco dias consecutivos. No dia 0, a

glicemia de jejum e peso foram novamente avaliados para início da indução de DM1 com STZ i.p., durante cinco dias consecutivos, concomitantemente com a administração do probiótico. No dia 4 (último dia de injeção de STZ) a glicemia dos animais foi novamente avaliada. Nos dez dias seguintes, a administração de *L. lactis* foi realizada em dias alternados. Nos dias 10, 12 e 15 a glicemia e peso foram novamente avaliados. Além disso, a estimativa do consumo de ração foi avaliada durante todo o experimento, por meio da diferença entre oferta e sobra, dividindo-se essa diferença pelo número de dias e número de animais na caixa. O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado no dia 14, e a eutanásia para coleta das amostras no dia 15, após 12 horas de jejum. No modelo de camundongos NOD, os animais foram separados em três grupos: camundongos NOR (controles que não desenvolvem DM1), grupo NOD + PBS (grupo que desenvolve DM1 espontaneamente) e grupo NOD + LLHSP65 (desenvolve DM1 e recebeu o probiótico recombinante). Durante a semana 7, o grupo NOD + LLHSP65 recebeu *L. lactis* diariamente ( $2,0 \times 10^8$  CFU), e os demais grupos receberam PBS. Da semana 8 a 13 a administração foi realizada 3 vezes por semana, e nas semanas 14 a 16, uma vez por semana. A glicemia de jejum e peso foram avaliados uma vez por semana, durante todo o experimento. A eutanásia foi realizada na semana 16, com os animais em jejum por 12 horas.

### **3.10 Teste de tolerância à glicose (GTT)**

O GTT foi realizado com injeção intraperitoneal de solução de D-glicose (Sigma, cat. G8270) a 25% (2 g/kg de peso corporal) nos camundongos após 12 horas de jejum. A glicemia foi medida aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. Um dia após o GTT, todos os animais foram anestesiados com quetamina (80-100 mg/kg) / xilasina (10mg/kg) e eutanasiados para coleta das amostras.

### **3.11 Coleta de sangue e obtenção de soro**

Após a injeção da anestesia, cerca de 500 µl de sangue de cada camundongo foi coletado do plexo retro-orbital em tubo sem anticoagulante. As amostras foram centrifugas a 10000 RPM por 2 minutos para obtenção do soro, que foi dividido em duas alíquotas e congelado a -80°C.

### **3.12 Análise histopatológica do pâncreas e cólon**

A avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório no pâncreas e cólon foi realizada após coloração com hematoxilina e eosina (HE) de amostras fixadas em



PBS/formaldeído 10%. Resumidamente, as amostras foram submetidas a desidratação, diafanização, impregnação, inclusão em parafina e microtomia. Em seguida, as amostras foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com HE. A montagem das lâminas foi feita com meio Permount (Fisher Scientific) e lamínula. Foram analisadas todas as ilhotas pancreáticas encontradas em cada camundongo por grupo, que foram avaliadas conforme o grau do infiltrado inflamatório, sendo classificadas em: sem insulite, peri-insulite, insulite moderada ou invasiva. A análise das ilhotas foi realizada no aumento de 200x.

### **3.13 Marcação para muco com ácido periódico de Schiff (PAS)**

Os cortes histológicos do colón intestinal foram desparafinizados com Xilol, hidratados e lavados. Em seguida, os cortes foram cobertos com Ácido periódico a 0,5% por 10 minutos. Após isso, foram lavados com água destilada por 5 minutos e cobertos com o reativo de Schiff por 15 minutos. Após a lavagem com água, as lâminas foram montadas, e 5-7 fotomicrografias (200x) de cada amostra de cada animal por grupo foram obtidas, e a porcentagem média de marcação de muco foi avaliada por meio do *software* ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

### **3.14 Marcação de insulina por IHQ**

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a expressão de insulina no pâncreas dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Os cortes histológicos de 4 µm foram desparafinizados e incubados com tampão citrato/ácido cítrico (pH=6) 2 vezes durante 5 minutos no microondas para exposição dos antígenos de superfície celular. As amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-insulina (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, USA). Após o período de incubação as amostras foram lavadas com PBS/Tween e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com biotina (Vector, VA, USA). Em seguida, o conjugado HRP foi adicionado. Por fim, foi realizado o tratamento com o substrato DAB (Research Genetics) e contra-coloração com hematoxilina. As lamínulas foram aderidas às lâminas com Entellan® (Merck, Germany) e as fotomicrografias (200x) foram obtidas empregando o microscópio óptico Nikon® Eclipse Ts2 e *software* NIS Elements (Nikon®). A determinação da média da porcentagem de marcação de insulina, foi realizada em fotomicrografias de todas as ilhotas encontradas em cada amostra de cada camundongo, por meio do *software* ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

### 3.15 Citometria de fluxo das BMDCs e células dos linfonodos

Após o tempo de estímulo das BMDCs, o sobrenadante foi separado e congelado a -80°C para posterior dosagem de citocinas, e as células foram transferidas para uma placa de 96 poços para marcação por citometria de fluxo. Os linfonodos coletados dos diferentes grupos experimentais foram macerados com auxílio de um embolo de seringa em meio RPMI com 5% de SBF. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 8000 RPM por 1 minuto e o pellet foi ressuspenso em 1 ml de meio para contagem em contador automático (TC20, BioRad Laboratories®). Pelo menos  $1 \times 10^6$  células foram transferidas para uma placa de 96 poços, e em seguida, o receptor Fc foi bloqueado com Fc block (Purified rat anti-mouse CD16/CD32, BD Pharmingen, cat. 553142) por 15 minutos. Após esse o bloqueio, a marcação de alvos de superfície foi realizada com anticorpos específicos conjugados com fluorocromos na diluição 1:200, durante 30 minutos. Para a marcação de alvos intracelulares, as células foram permeabilizadas por até 18 horas (Foxy3/transcription fator staining buffer set, cat. 00-5523-00, Invitrogen, CA, USA), e em seguida marcadas com anticorpos na diluição 1:100 por 30 minutos. Após o tempo de marcação, as células foram lavadas com PBS 1x para remover o excesso de anticorpos não ligados, e em seguida ressuspenso em tampão formol 4% (Cytifix Fixation Buffer, BD Biosciences® - San Diego, CA, EUA) e transferidas para tubos FACS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA) e a análise realizada por meio do *software FlowJo V.10.8* (BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA). Controles de compensação *single color* ou beads (CompBeads, cat. 552845, BD Biosciences) e controles FMO (*Fluorescence minus one*) foram utilizados em todas as análises. A lista de anticorpos, seus respectivos clones e fluorocromos estão listados abaixo (Quadro 1).

**Quadro 1- Anticorpos e corantes utilizados na marcação de células para citometria de fluxo**

Marcador	Fluorocromo	Clone	Fabricante
CD64	APC	X54-5/7.1	Biolegend
CD11c	PECy7	HL3	BD
CD11b	APCCy7	M1/70	BD
CD103	PE	M290	BD
CD274 (PD-L1)	BV605	10F.9G2	Biolegend
CD69	PE	H1.2F3	Biolegend
CD80	BV421	16-10A1	Biolegend
CD282 (TLR2)	BV421	6C2	BD
CD3	APCCy7	145-2C11	BD
CD8	PECy7	53-6.7	BD
CD4	BB700	RM4-5	BD

Foxp3	PE	FJK-16s	Invitrogen
I-A/I-E (MHC-II)	PerCP	M5/114.15.2	Biologend
LAP	BV421	TW7-16B4	Biologend
PD-1 (CD279)	APC	29F.1A12	Biologend
TCRV $\beta$ 8.1, 8.2	AF647	KJ16-133.18	Biologend
XCR1	BV421	ZET	Biologend
FVS 780	APCCy7	-	BD
FVS 575V	BV605	-	BD
Live/Dead	FITC	-	Life technologies

Fonte: autoria própria

### 3.16 Quantificação de insulina, anticorpos e citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes de cultura e homogenatos de tecidos (pâncreas, cólon e íleo distal) dos camundongos foram utilizados para quantificação de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-27p28/IL-30, IL-10 e TGF- $\beta$ , conforme as especificações do fabricante (DuoSet ELISA, R&D Systems ou ELISA MAX Deluxe, Biologend). Para dosagem de insulina, foram utilizadas amostras de soro dos camundongos após 12 horas de jejum, e procedimento foi realizado conforme especificações do fabricante (*Mouse ultrasensitive insulin* ELISA, Alpcó). Para a dosagem de IgG anti-insulina e IgG anti-HSP65 placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína-alvo (insulina a 10  $\mu$ g/ml ou rHSP65 a 5  $\mu$ g/ml) diluídas em tampão carbonato durante 18 horas, a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS1x-0,05% Tween20 e foi adicionado tampão de bloqueio (PBS1x-0,05% Tween20 acrescido com 10% de soro bovino fetal) por 1 hora a 37°C. Após a lavagem, as amostras foram diluídas 1:25 e adicionadas aos poços da placa, que foi mantida a 37°C durante 2 horas. As placas então foram lavadas, e o anticorpo anti-mouse IgG conjugado com biotina (cat. B7022, Sigma) foi adicionado na diluição 1:1000. Após 1 hora de incubação e nova lavagem, a estreptavidina HRP (cat. 554066, BD Biosciences) foi adicionada na diluição 1:1000, mantida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, a reação foi revelada com TMB Substrate (BD OptEIA, cat. 555214, BD Biosciences). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 16% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura da densidade ótica das amostras foi realizada em filtro de 450 nm e 570 nm em espectrofotômetro de placa (*Multiskan Sky*– ThermoScientific).

### 3.17 Extração de RNA e síntese de cDNA

BMDCs ou parte do colón dos camundongos foi acondicionado em Trizol® (cat. 15596018, Invitrogen, CA, USA) a -80°C até o momento da extração de RNA. Após digestão

mecânica do tecido, a extração foi realizada com a metodologia do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, WI, USA) conforme recomendações do fabricante. A concentração do RNA extraído foi avaliada por meio do equipamento *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Rockwood, TN, EUA). Posteriormente, o RNA extraído foi utilizado para obtenção de 140 ng de cDNA para BMDCs ou 1000 ng de cDNA para cólon. Para isto, foi utilizado o kit *HighCapacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA) e termociclador *Mastercycler Nexus gradient* (Eppendorf, Germany).

### 3.18 Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)

A expressão dos genes (Quadro 2) foi avaliada em BMDCs ou cólon dos camundongos. A expressão gênica em tempo real foi avaliada empregando o sistema *GoTaq qPCR* (Promega, cat. A600A) ou *PowerUp SYBR Green master mix* (cat. A25742, Applied Biosystems) e o equipamento de PCR em Tempo Real *Step One Plus* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA) ou *QuantStudio 1* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA). Todos os valores de expressão dos genes citados acima foram normalizados pelos valores da expressão do gene constitutivo da  $\beta$ -actina. Para a construção do gráfico, a expressão gênica das BMDCs não estimuladas ou do cólon de animais não diabéticos foram consideradas amostras de referências, sendo o  $2^{-\Delta\Delta CT}$  igual a 1 [163].

**Quadro 2- Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR**

Gene alvo	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Actb	GGCCAACCGTGAAAAGATGA	CAGCCTGGATGGCTACGTACA
Aldh1a2	CATGGTATCCTCCGCAATG	GCGCATTTAAGGCATTGTAAC
Cldn2	TGCGACACACAGCACAGGCATCAC	TCAGGAACCAGCGGCGAGTAGAA
Il22	GCCTTGTTTCAGATACCACAG	ACCATGGAGGACAAGAATGAAG
Ido1	GGCTTCTTCCTCGTCTCTCTATTG	TGACGCTCTACTGCACTGGATAC
Il10	GCCAACGAAGATCCTCCCCCGTAC	TAAGAGCAGGCAGCATAGCAGTGC
Zo1	TTCAAAGTCTGCAGAGACAATAGC	TCACATTGCTTAGTCCAGTTCC
Muc1	GCAGTCCTCAGTGGCACCTC	CACCGTGGGCTACTGGAGAG
Muc2	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC
Ocludin	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
Irf4	AGCCAGCTGGATATCTCTGA	ATAATCCCTCCAGCTCCTGT
Irf8	CCCAGATTTTGAAGAAGTGAC	GCTTGCATTTTTGTTCTTCC
Pdl1	CCATCCTGTTGTTCTCATTG	CACTGCTTACGTCTCCTCG

Reg3g	TTCCTGTCCTCCATGATCAAAA	CATCCACCTCTGTTGGGTTCA
Tgfb	TGAACCAAGGAGACGGAATACA	GGAGTTTGTTATCTTTGCTGTCACA

Fonte: autoria própria

### 3.19 Análise estatística

Os resultados obtidos, analisados por meio do programa GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA), foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), sendo as diferenças estatísticas determinadas pela análise de variância (One-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey), ou teste t de Student. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de rHSP65 na viabilidade e produção de citocinas em BMDCs

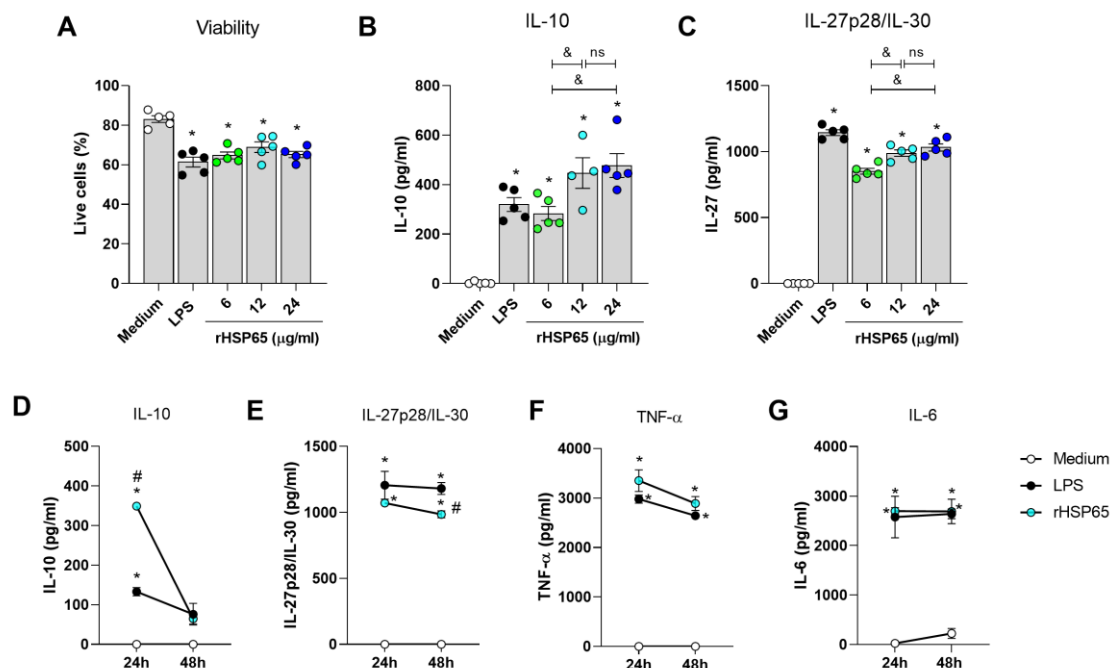
Antes de testarmos o potencial terapêutico de *L. lactis* expressando HSP65 no desenvolvimento de DM1, realizamos um teste de controle de qualidade da HSP65 recombinante que foi utilizada nos experimentos *in vitro* para descartar a possibilidade de contaminação com LPS. Para isso, aquecemos uma alíquota de rHSP65 a 90°C por 30 minutos, condição que desnatura a proteína, mas não interfere na integridade do LPS. Em seguida, estimulamos BMDCs com rHSP65 aquecida ou não, ou LPS por 24 horas, para avaliar a ativação das BMDCs. Observamos que a rHSP65 não aquecida, assim como o LPS, foi capaz de induzir aumento na expressão MHC-II (Apêndice A, Fig. Supl. 1A-B) e CD80 (Apêndice A, Fig. Supl. 1C-D) quando comparamos às BMDCs não estimuladas. Entretanto, a rHSP65 aquecida não foi capaz de induzir essas moléculas, sugerindo que não há LPS contaminante em quantidade suficiente para ativar as BMDCs *in vitro*.

Nosso próximo passo foi comparar os efeitos de diferentes concentrações de rHSP65 em BMDCs, com foco na indução de citocinas importantes para a polarização de linfócitos T *naive*. Após a diferenciação das BMDCs, estimulamos as células com LPS (controle positivo de ativação celular) ou rHSP65 recombinante, nas concentrações 6; 12 ou 24 µg/ml durante 24 horas.

Após o tempo de estímulo, observamos que tanto LPS como as três concentrações de rHSP65 avaliadas reduzem a viabilidade das células, quando comparamos com as células que não receberam estímulo (Fig. 1A). Como nossa hipótese é que rHSP65 promova a diferenciação de linfócitos T reguladores, avaliamos qual a concentração de rHSP65 que melhor induz TGF-β, IL-10 e IL-27p28/IL-30, citocinas importantes para geração de Tregs ou inibição de linfócitos T efetores [164–166]. Apesar de não detectarmos TGF-β no sobrenadante da cultura (dados não mostrados), observamos que as três concentrações de rHSP65 induzem maior produção de IL-10 e IL-27 quando comparamos com as células não estimuladas, com pico de produção na concentração de 12 µg/ml, que não é alterado na concentração de 24 µg/ml (Fig. 1B-C). Sendo assim, escolhemos a concentração de 12 µg/ml como a concentração ideal para avaliar os efeitos imunorreguladores de rHSP65.

Uma vez determinada a concentração a ser utilizada, avaliamos o efeito do tempo de estímulo na produção de citocinas. Além da avaliação das citocinas indutoras de Treg, avaliamos também a produção de IL-12p170 e IL-6, citocinas essenciais para a diferenciação de Th1 e Th17, respectivamente, e TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória relacionada com a ativação de células dendríticas. Observamos que a rHSP65 induziu maior produção de IL-10 quando comparamos com o LPS após 24 horas de estímulo, porém, essa produção é reduzida após 48 horas (Fig. 1D). A produção de IL-27 não sofreu influência do tempo de estímulo, mas no tempo de 48 horas a produção induzida pela rHSP65 é menor quando comparada à do LPS (Fig. 1E). rHSP65 induziu TNF- $\alpha$  (Fig. 1F) e IL-6 (Fig. 1G) de forma semelhante ao LPS, sem diferenças entre os diferentes tempos de estímulo. A produção de IL-12p70 não foi detectada nos tempos avaliados (dados não mostrados).

Com esses dados, determinamos que 24 horas de estímulo com 12  $\mu\text{g/ml}$  de rHSP65 é a condição ideal para avaliarmos os efeitos dessa proteína na ativação e indução de perfil tolerogênico nas BMDCs.



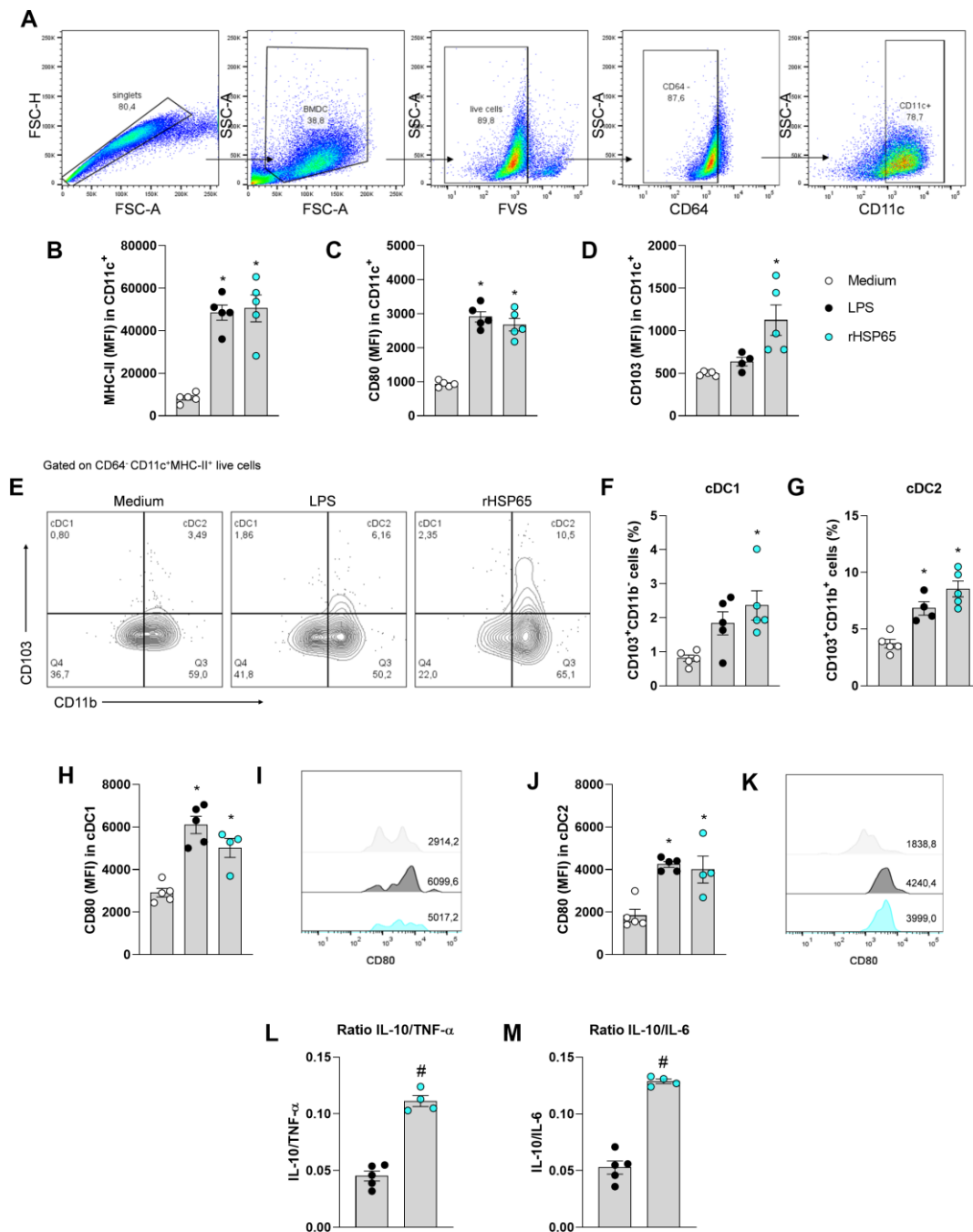
**FIGURA 1. Curva concentração-resposta de rHSP65 em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).** BMDCs foram estimuladas com LPS (500 ng/ml) ou rHSP65 nas concentrações 6; 12 ou 24  $\mu\text{g/ml}$  por 24 horas para determinação da viabilidade por citometria de fluxo (A) e produção de IL-10 (B) e IL-27 (C) no sobrenadante da cultura por ELISA. Após 48h de estímulo, as citocinas IL-10 (D), IL-27 (E), TNF- $\alpha$  (F) e IL-6 (G) foram avaliadas por ELISA. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de dois experimentos independentes ( $n = 4-5$  poços por condição) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* meio vs estímulos, # rHSP65 vs LPS, & entre diferentes concentrações de rHSP65.



#### 4.2 rHSP65 ativa BMDCs e induz subpopulações de DCs com perfil tolerogênico

O passo seguinte foi avaliar o papel de rHSP65 no perfil de maturação/ativação de BMDCs e na indução de tolDCs *in vitro*. Após o período de 14 dias de diferenciação com GM-CSF, as BMDCs foram estimuladas com LPS ou rHSP65 por 24 horas. Após esse período, definimos a população de DCs (CD64<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>) por citometria de fluxo (Fig. 2A). Nessa população, observamos que rHSP65 aumentou a expressão de MHC-II (Fig. 2B) e CD80 (Fig. 2C), indicando a capacidade de induzir a ativação das DCs, assim como LPS. Além disso, observamos que somente rHSP65 foi capaz de aumentar a expressão de CD103 (Fig. 2D), uma integrina presente em DCs tolerogênicas [167]. Na população CD64<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>, observamos que rHSP65 foi capaz de aumentar a porcentagem de cDC1 (CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>) (Fig. 2E-F) e cDC2 (CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) (Fig. 2E e G), ambas subpopulações de DCs convencionais descritas como células de perfil tolerogênico na lâmina própria intestinal [168]. Essas células são conhecidas por apresentarem um perfil de ativação intermediário, e como esperado, observamos que cDC1 estimuladas com rHSP65 possuem tendência de menor expressão de CD80 quando comparado às estimuladas com LPS (Fig. 2H-I). Por outro lado, o perfil de expressão de CD80 nas cDC2 foi semelhante após estímulo com LPS ou rHSP65 (Fig. 2J-K).

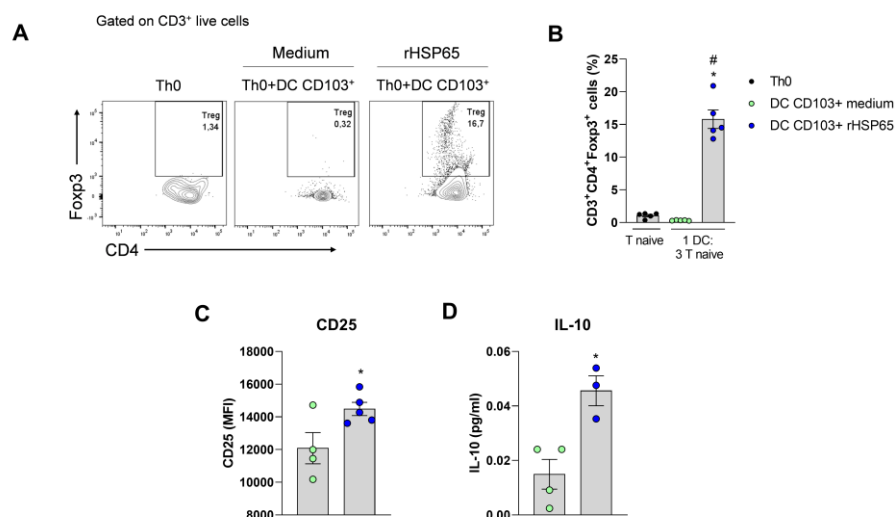
No sobrenadante da cultura, observamos que rHSP65 aumentou a razão IL-10/TNF- $\alpha$  e IL-10/IL-6 quando comparado às células estimuladas com LPS (Fig. 2L-M), indicando funcionalmente um perfil de DC tolerogênico induzido por rHSP65.



**FIGURA 2. rHSP65 ativa e induz perfil tolerogênico em BMDCs.** Estratégia de *gates* para definir a população de CD11c<sup>+</sup> diferenciadas a partir de células da medula óssea (A). Intensidade média de fluorescência (MFI) de MHC-II (B), CD80 (C) e CD103 (D) nas células CD11c<sup>+</sup> após 24h de estímulo avaliadas por citometria de fluxo. *Contour plots* representativos das populações de cDC1 e cDC2 após 24h de estímulo com LPS (500 ng/ml) ou rHSP65 (12 $\mu$ g/ml) (E). Porcentagens de cDC1 (F) e cDC2 (G) determinadas por citometria de fluxo. Gráfico de barras (H) e histogramas (I) representativos da MFI de CD80 nas cDC1. Gráfico de barras (J) e histogramas (K) representativos da MFI de CD80 nas cDC2. Razão entre as concentrações de IL-10 e TNF- $\alpha$  (L) e IL-10 e IL-6 (M), detectadas no sobrenadante por ELISA. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e são de um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados (n = 4-5 poços por condição) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* meio vs estímulos, # rHSP65 vs LPS.

### 4.3 DCs CD103<sup>+</sup> previamente estimuladas com rHSP65 induzem diferenciação de células T reguladoras *in vitro*

Para determinar se as DCs CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 possuem efeito funcional na geração de Tregs *in vitro*, diferenciamos BMDCs durante 14 dias e então as estimulamos ou não com rHSP65 por 24 horas. Em seguida, as células foram separadas em populações CD103<sup>-</sup> e CD103<sup>+</sup> por *sorting* no citômetro de fluxo (Apêndice A, Fig. Supl. 2A). As células CD103<sup>+</sup> foram co-cultivadas com linfócitos naive/Th0, definidos como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (Apêndice A, Fig. Supl. 1B) durante 96 horas, para determinação da porcentagem de Tregs diferenciadas. As DCs CD103<sup>+</sup> que foram estimuladas previamente com rHSP65 apresentaram maior capacidade de geração de Tregs quando comparadas às DCs CD103<sup>+</sup> não estimuladas (Fig. 3A-B). As Tregs diferenciadas na presença de DCs CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 apresentaram maior expressão de CD25 quando comparamos àquelas diferenciadas com DCs não estimuladas com rHSP65 (Fig. 3C). Além disso, observamos que as DCs CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 induziram maior produção de IL-10 no sobrenadante da cultura quando comparamos às DCs não estimuladas (Fig. 3D). Em conjunto, esses dados sustentam nossa hipótese de que rHSP65 induz perfil tolerogênico nas DCs que expressam CD103, que, conseqüentemente, adquirem maior capacidade de indução de Tregs *in vitro*.

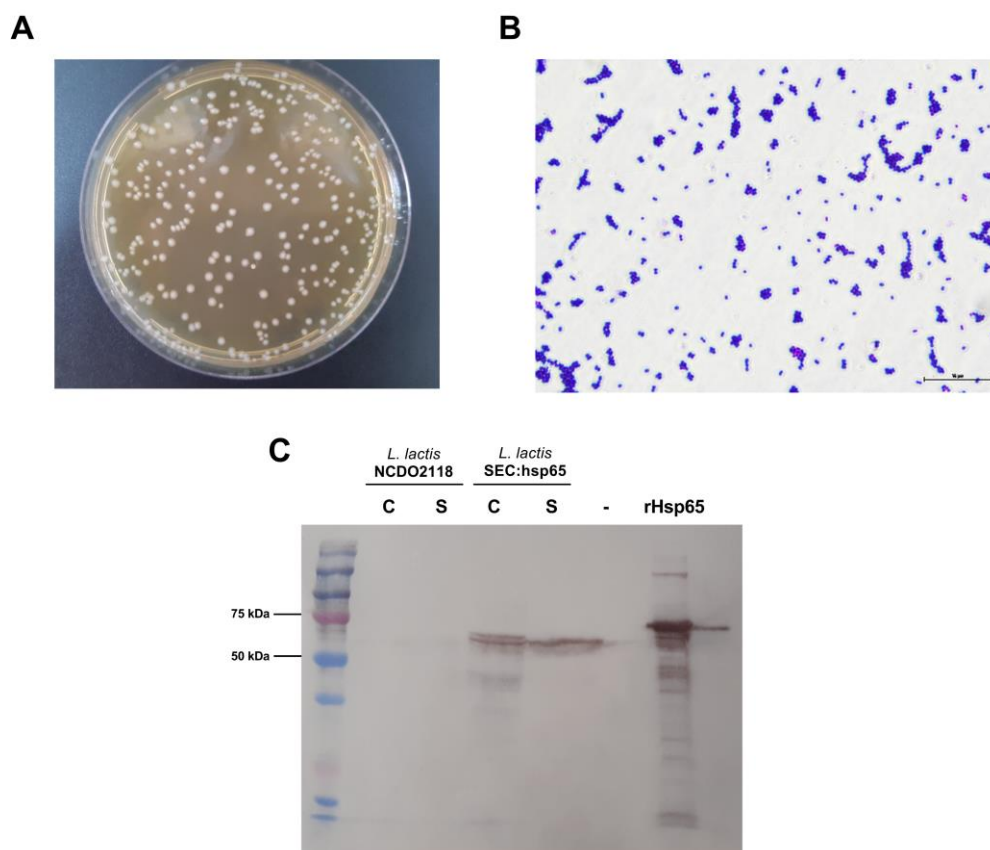


**FIGURA 3. DCs CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP65 induzem diferenciação de células T reguladoras *in vitro*.** Contour plots (A) e gráfico de barras (B) representativos da porcentagem de Tregs após 96h de co-cultura de linfócitos T naive (Th0) com DCs CD103<sup>-</sup> ou CD103<sup>+</sup> previamente estimuladas ou não com rHSP65. Intensidade média de fluorescência (MFI) de CD25 nas Tregs determinada por citometria de fluxo (C). IL-10 no sobrenadante da cultura (D). Dados expressos como média ± EPM representativos de um experimento (n = 3-5 poços por condição) e analisadas pelo teste ANOVA one-way e Tukey no pós-teste (B) ou teste T (C e D). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* Th0 sem DC vs Th0 com DC, # DC CD103<sup>+</sup> sem HSP65 vs DC 103<sup>+</sup> rHSP65.

#### 4.4 Validação do cultivo e da expressão heteróloga de HSP65 em *Lactococcus lactis*

Antes de administrarmos *L. lactis* expressando HSP65 em camundongos diabéticos, validamos o cultivo das cepas selvagem e recombinante e a expressão heteróloga de HSP65 na cepa recombinante. Após semeadura em ágar-M17 e 24 horas de crescimento em temperatura ambiente, as colônias se apresentaram pequenas, circulares e com aspecto leitoso (Fig. 4A). Para confirmar a pureza do estoque bacteriano, procedemos com a coloração de Gram, e como esperado, observamos somente bactérias Gram-positivas, agrupadas em estreptococos (Fig. 4B).

Para a indução da expressão de HSP65 de *Mycobacterium leprae* em *L. lactis*, utilizamos o método de indução por xilose [161]. Em resumo, após o crescimento em ágar-M17, suplementado com cloranfenicol, uma colônia foi isolada e transferida para meio M17 em caldo para crescimento. No dia seguinte, a cultura foi diluída em meio M17 fresco suplementado com a xilose e cloranfenicol, e mantida a 30°C por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa selvagem, porém sem adição de cloranfenicol e com adição de glicose no lugar de xilose. No dia seguinte, o *pellet* bacteriano e o sobrenadante da cultura de cada cepa foram coletados para extração das proteínas e separação por eletroforese. Por *western blot*, utilizando anticorpo anti-HSP65, verificamos a presença de banda com peso molecular próximo à da rHSP65 utilizada como padrão, tanto no *pellet* bacteriano como no sobrenadante da cultura, validando a expressão e secreção de HSP65 para o meio (Fig. 4C). Como esperado, não detectamos a expressão de HSP65 na cepa selvagem. Sendo assim, confirmamos que a indução da expressão de HSP65 em *L. lactis* foi eficaz, tornando possível sua utilização em modelo experimental.



**FIGURA 4. Validação do cultivo e expressão heteróloga de HSP65 em *Lactococcus lactis*.** Aspecto morfológico das colônias de *L. lactis* após 24 horas de crescimento em ágar-M17 a temperatura ambiente (A). Fotomicrografia de *L. lactis* (aumento 1000x, escala da barra: 10µm) corada utilizando a coloração de Gram (B). Extratos proteicos de *L. lactis* NCDO2118 (cepa selvagem) NCDO2118: pXIES:SEC: hsp65 (secretora, recombinante) foram preparados a partir da fração celular (colunas C) e sobrenadante (colunas S) e analisados por *Western blot* usando anticorpos anti-Hsp65. (- canal vazio).

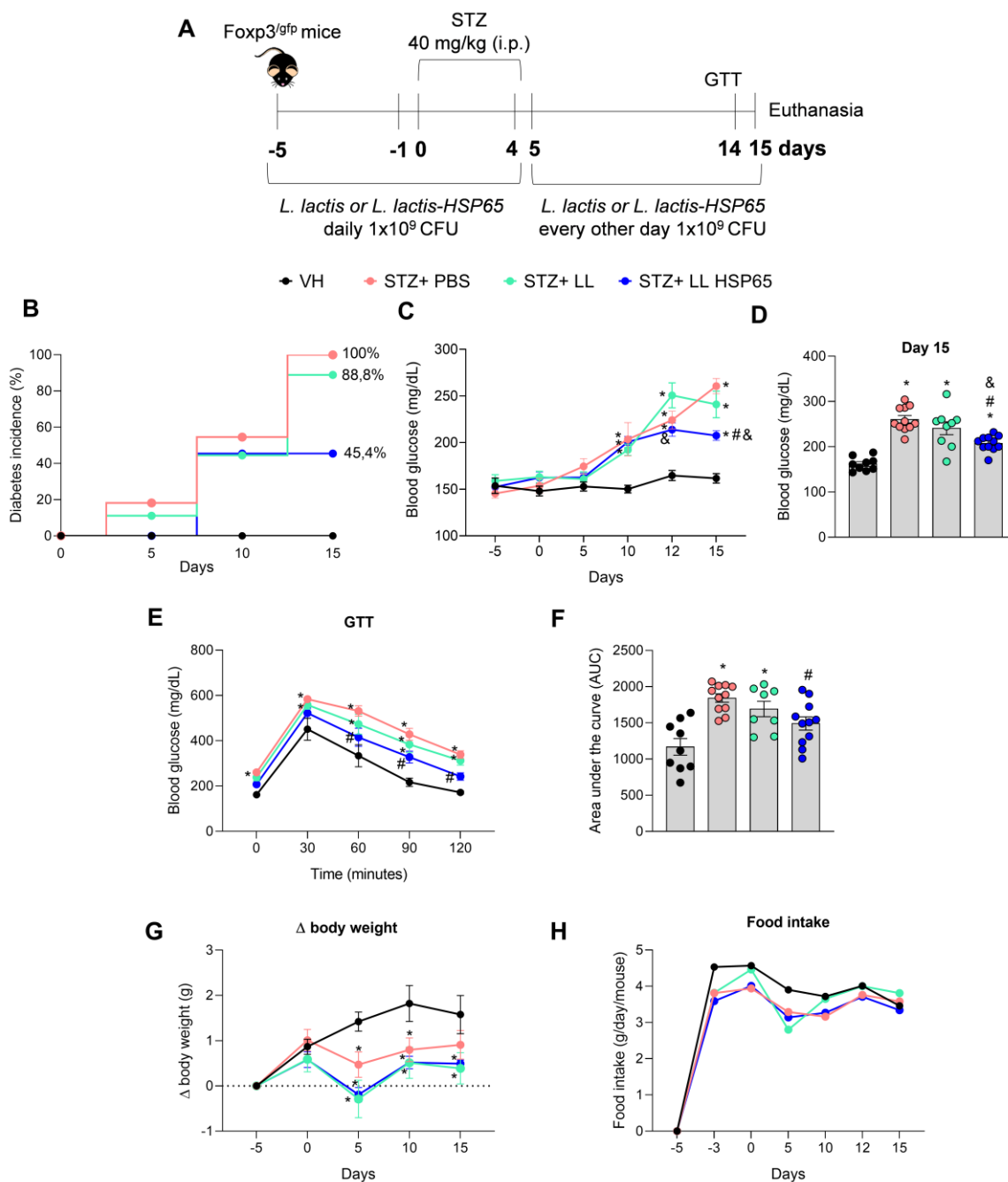
#### 4.5 *Lactococcus lactis* expressando HSP65 controla a glicemia e reduz a incidência de DM1 induzida por estreptozotocina

Para avaliar o efeito de *L. lactis* expressando HSP65, utilizamos um modelo profilático-terapêutico, que se baseou na administração de aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU de *L. lactis* (recombinante ou não) diariamente durante dez dias consecutivos (dia -5 a dia 4) em camundongos *Foxp3<sup>tgfp</sup>*, sendo cinco antes da indução de DM1 e cinco durante a indução. Após o fim da indução de DM1 (dia 5), a administração de *L. lactis* foi realizada em dias alternados, durante dez dias (Fig. 5A).

No dia 15, após o fim das administrações do probiótico, observamos que a incidência de DM1 no grupo que recebeu somente STZ foi de 100%. O grupo de camundongos que recebeu STZ e a cepa selvagem de *L. lactis* apresentou 88,8% de incidência de DM1. Por

outro lado, no grupo que recebeu STZ e *L. lactis*-HSP65 somente 45,4% dos camundongos ficaram com DM1 estabelecida (Fig. 5B). A glicemia de jejum foi monitorada durante todo o protocolo experimental, e observamos a partir do dia 10, a glicemia dos grupos que receberam STZ foi maior quando comparado ao grupo que recebeu veículo (não diabético), e no dia 12 o grupo que recebeu *L. lactis*-HSP65 já apresentava redução na glicemia quando comparado ao grupo que recebeu *L. lactis* selvagem (Fig. 5C). No dia 15, a glicemia do grupo que recebeu *L. lactis*-HSP65 foi consideravelmente menor quando comparada à dos grupos STZ-PBS e STZ+ *L. lactis* selvagem (Fig. 5C-D).

Como medida mais sensível e específica para avaliar o controle glicêmico, realizamos o teste de tolerância à glicose (GTT). Após 60 minutos da sobrecarga de glicose, observamos que os camundongos que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentaram melhor controle da glicemia quando comparamos aos grupos STZ-PBS e STZ+ *L. lactis* selvagem, efeito que se estende até 120 minutos após a sobrecarga de glicose (Fig. 5E-F). Em relação à variação de peso corporal, observamos que a indução de DM1 induz perda expressiva de peso, e curiosamente, os grupos que receberam alguma das cepas do probiótico apresentaram maior dificuldade em recuperar o peso quando comparamos ao grupo diabético (Fig. 5G), apesar de todos os grupos terem apresentando um padrão de consumo alimentar semelhante (Fig. 5H).



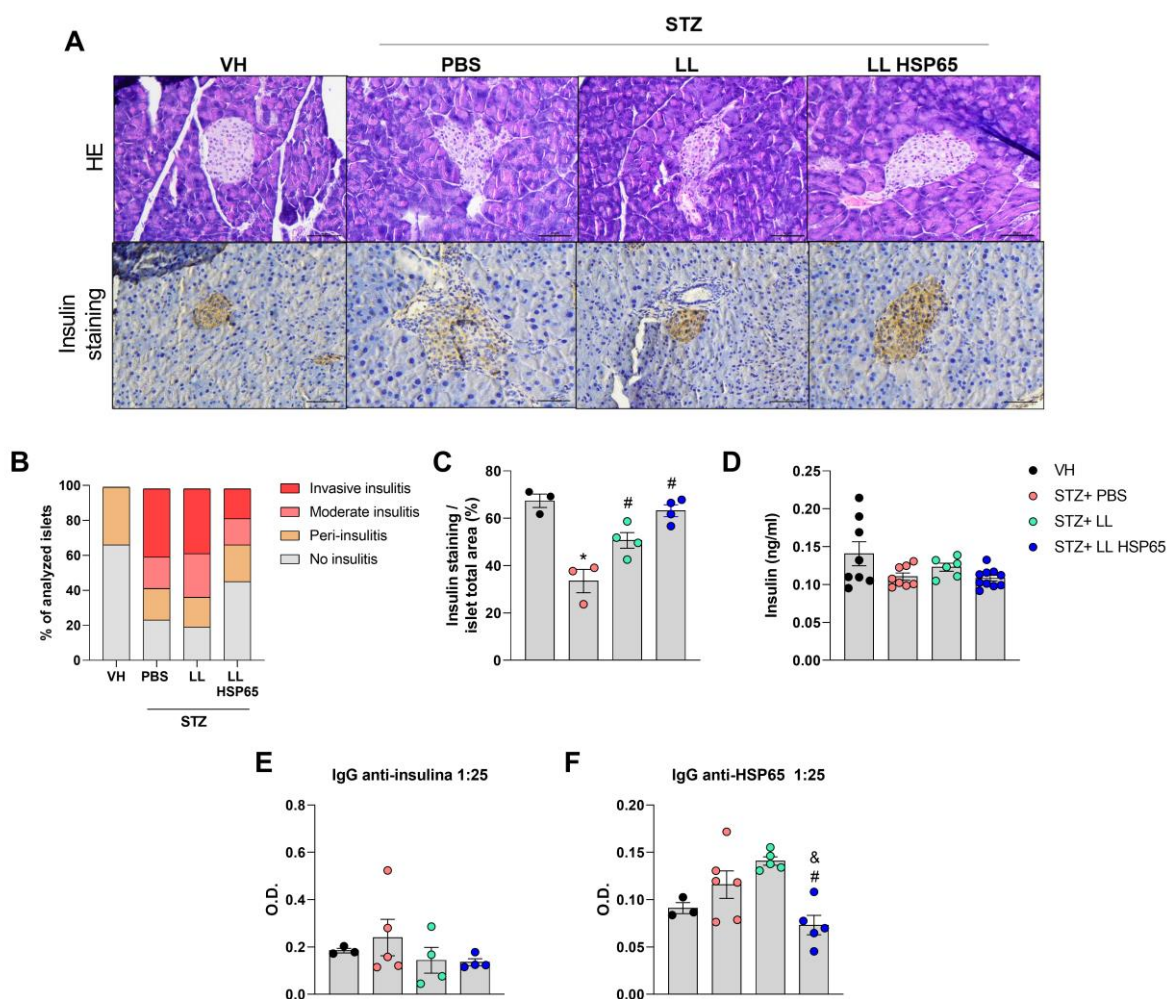
**FIGURA 5. *L. lactis* expressando HSP65 reduz a incidência de DM1 induzida por estreptozotocina (STZ).** Esquema do protocolo de administração de *L. lactis* selvagem ou expressando HSP65 em camundongos  $Foxp3^{GFP+}$  (A). Incidência de DM1 após 15 dias do início da administração de STZ (B). *Time course* da glicemia após 10 horas de jejum durante a administração de *L. lactis* (C). Glicemia de jejum após 15 dias do início da administração de STZ (D). Glicemia dos camundongos após teste de tolerância à glicose (GTT) em diferentes tempos após a sobrecarga de glicose (E). Área sob a curva do gráfico E referente ao GTT (F). Variação de peso corporal durante a administração de *L. lactis* (G). Consumo médio de ração dos camundongos em gramas/dia/camundongo durante o protocolo experimental (H). Dados expressos como média  $\pm$  EPM compilados de dois experimentos independentes (n = 9-11 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

#### 4.6 A administração de *L. lactis*-HSP65 reduz a insulite e IgG anti-HSP65 sérica no DM1

Além dos efeitos benéficos observados na glicemia, avaliamos o grau de destruição das ilhotas pancreáticas. Por meio da coloração com hematoxilina-eosina, observamos que as ilhotas pancreáticas dos camundongos diabéticos que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentaram estrutura preservada e com menor grau de infiltrado inflamatório quando comparamos aos grupos STZ-PBS ou STZ- *L. lactis* selvagem (Fig. 6A, painel superior), sendo que a maioria das ilhotas apresentou apenas peri-insulite ou nenhum grau de insulite (Fig. 6B). Em concordância com menor grau de insulite observado nas ilhotas pancreáticas do grupo STZ+ *L. lactis*-HSP65, observamos maior expressão de insulina nas ilhotas desse grupo quando comparamos ao grupo STZ+PBS (Fig. 6A, painel inferior e Fig. 6C), apesar de não termos observado diferenças estatísticas na insulina sérica (Fig. 6D).

Como o DM1 é uma doença autoimune, avaliamos se no modelo de DM1 induzida por STZ há aumento de IgG anti-insulina no soro e se a administração do probiótico expressando HSP65 poderia diminuir a produção desses anticorpos. No tempo analisado, não observamos diferenças estatísticas na produção de IgG anti-insulina (Fig. 6E). Alguns trabalhos da literatura sugerem que anticorpos anti-HSP65 podem contribuir com a patogênese da DM1 em humanos [124,169]. Além disso, em outros trabalhos que utilizaram *L. lactis*-HSP65 via gavagem, a redução de anticorpos anti-HSP65 no grupo que recebeu HSP65 indica o estabelecimento da tolerância oral [154,157]. Em nosso modelo, observamos um aumento de IgG anti-HSP65 no grupo diabético, porém sem diferenças estatísticas quando comparamos ao grupo veículo. Por outro lado, observamos que *L. lactis*-HSP65 reduziu a produção de IgG anti-HSP65 no soro quando comparamos aos grupos STZ+ PBS e STZ+ *L. lactis*, indicando que a estratégia de indução de tolerância oral foi efetiva (Fig. 6F).





**FIGURA 6. *L. lactis* expressando HSP65 reduz a insulite e induz tolerância oral em modelo de DM1 induzida por estreptozotocina (STZ).** Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas corados com HE (A, painel superior - aumento 200x, escala da barra: 50µm) e cortes submetidos a imuno-histoquímica (IHQ) para avaliação da marcação de insulina (A, painel inferior - aumento 200x, escala da barra: 50µm). Avaliação do grau de insulite no pâncreas após 15 dias após o início da administração de STZ (B). Porcentagem de marcação de insulina nos cortes histológicos de pâncreas determinada por meio software ImageJ nas fotomicrografias de IHQ (C). Concentração de insulina sérica avaliada por ELISA após 10 horas de jejum (D). Mensuração da densidade óptica para estimar IgG anti-insulina (E) e IgG anti-HSP65 (F) no soro dos camundongos 15 dias após o início da administração de STZ. Dados expressos como média ± EPM de um experimento representativo de dois experimentos independentes realizados (n=3-6, A-C, E-F) ou de dados compilados de dois experimentos independentes (n=6-11, D), comparados usando ANOVA one-way e pós-teste de Tukey, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

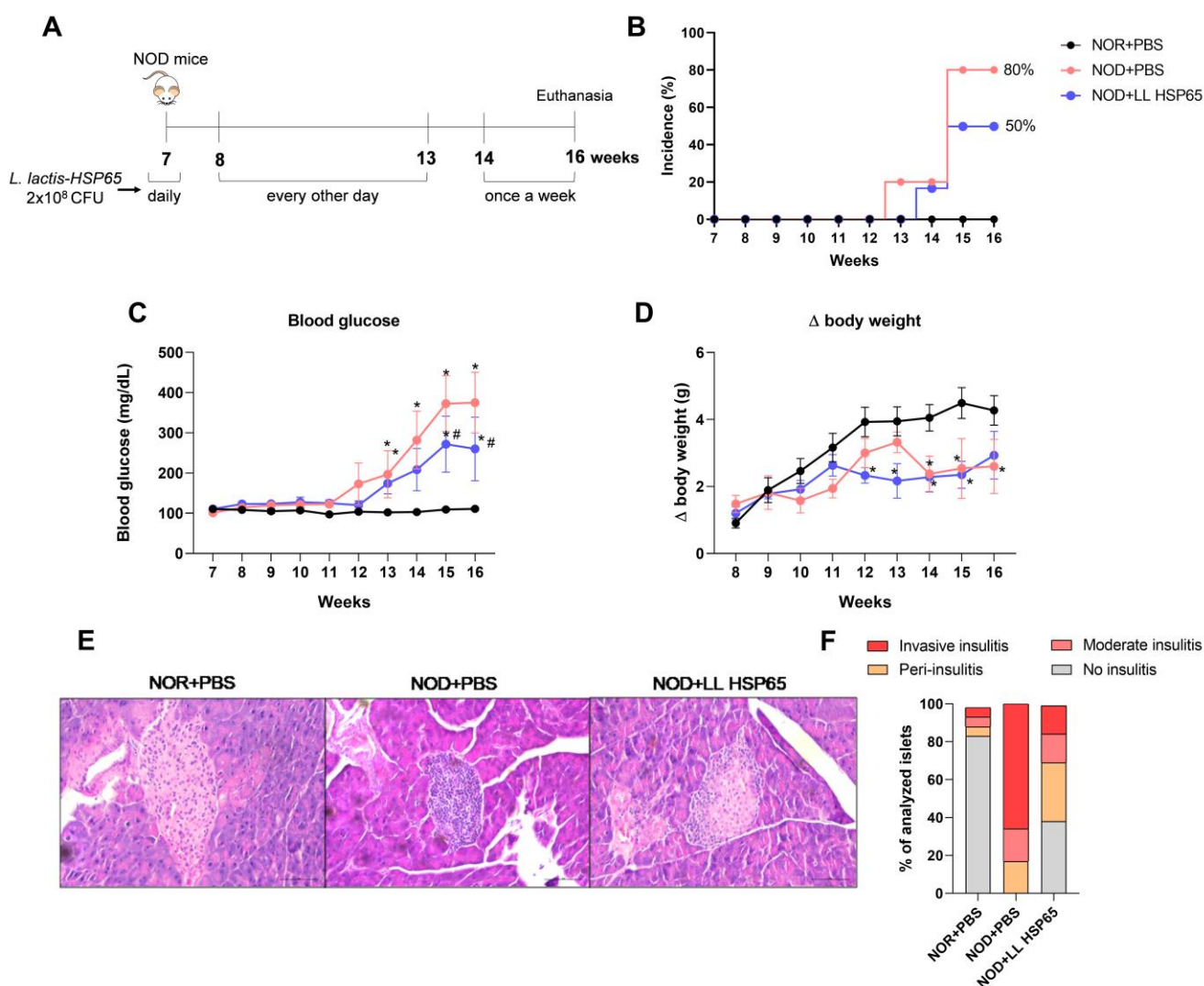
#### 4.7 A administração de *L. lactis*-HSP65 reduz a incidência de DM1 no modelo de camundongos NOD

O modelo de DM1 induzida por múltiplas doses baixas de STZ se baseia na toxicidade do composto, que tem alta afinidade pelo transportador GLUT2 e assim tem como alvo principal as células β-pancreáticas, onde induz estresse oxidativo e destruição celular

[170,171]. É um modelo que envolve recrutamento de células inflamatórias que contribuem com o dano tecidual, e apesar de ser bem estabelecido e aceito, há controvérsias sobre a participação de componentes autoimunes, como ocorre em humanos [172,173]. Pensando nisso, avaliamos se os efeitos benéficos de *L. lactis*-HSP65 observados no modelo de DM1 induzido quimicamente por STZ se reproduzem no modelo de diabetes autoimune espontânea utilizando camundongos NOD (diabéticos não obesos), e seus controles NOR (não diabéticos). Para isso, realizamos alguns experimentos de padronização (dados não mostrados) para definirmos o esquema de administração do probiótico mantendo o modelo profilático-terapêutico, utilizado no modelo de indução com STZ. Os camundongos NOD fêmeas, com sete semanas de idade, receberam aproximadamente  $2 \times 10^8$  CFU de *L. lactis*-HSP65 diariamente durante uma semana, e em dias alternados da 8ª até a 13ª semana de idade. Na última etapa, da 14ª até a 16ª semana de idade, a administração foi realizada uma vez por semana (Fig. 7A).

Com esse esquema de administração, observamos que na 16ª semana 80% dos camundongos NOD que não receberam o probiótico recombinante estavam com DM1 estabelecida, contra 50% de incidência da doença no grupo NOD que recebeu *L. lactis*-HSP65 (Fig. 7B). A glicemia dos camundongos NOD começou a se elevar na 13ª semana, e na 15ª e 16ª, a glicemia dos camundongos que receberam o probiótico recombinante estava reduzida quando comparada à dos camundongos NOD que receberam PBS (Fig. 7C), confirmando que *L. lactis*-HSP65 foi eficaz na proteção contra oDM1 nesse modelo experimental. Os camundongos NOD perderam peso quando comparamos aos camundongos NOR não diabéticos, e a administração de *L. lactis*-HSP65 não foi capaz de reverter esse efeito (Fig. 7D).

Em cortes histológicos de pâncreas, observamos intenso recrutamento inflamatório nas ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD que receberam PBS, que estava atenuado nos camundongos NOD que receberam *L. lactis*-HSP65 (Fig. 7E). Na análise do grau de insulite, encontramos insulite invasiva na maioria das ilhotas dos camundongos NOD+ PBS, enquanto que nos camundongos que receberam *L. lactis*-HSP65 a maioria das ilhotas não apresentavam insulite ou apenas peri-insulite (Fig. 7F), confirmando que o probiótico foi capaz de atenuar o processo autoimune nas ilhotas pancreáticas.



**FIGURA 7. *L. lactis* expressando HSP65 reduz a incidência de DM1 autoimune espontânea.** Esquema do protocolo de administração de *L. lactis* expressando HSP65 em camundongos NOD (A). Registro da incidência de DM1 da 7ª até a 16ª semana de idade dos camundongos NOR e NOD (B). *Time course* da glicemia após 10 horas de jejum durante a administração de *L. lactis* (C). Variação de peso corporal durante a administração de *L. lactis* (D). Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas corados com HE - aumento 200x, escala da barra: 50µm (E). Avaliação do grau de insulite no pâncreas na 16ª semana de idade dos camundongos NOR e NOD (F). Dados expressos como média  $\pm$  EPM representativos de um experimento (n = 5-11 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . \* vs NOR, # vs NOD+ PBS.

#### 4.8 *L. lactis* aumenta a expressão de marcadores associados à melhora da função de barreira intestinal e *L. lactis*-HSP65 induz genes de DCs com perfil tolerogênico no colón

Alterações na mucosa intestinal e prejuízos na função de barreira, são associadas ao DM1 [174–176]. Além disso, já foi mostrado que *L. lactis* expressando HSP65 melhora a colite em camundongos [156,177]. Nesse sentido, avaliamos os efeitos de *L. lactis*-HSP65 na

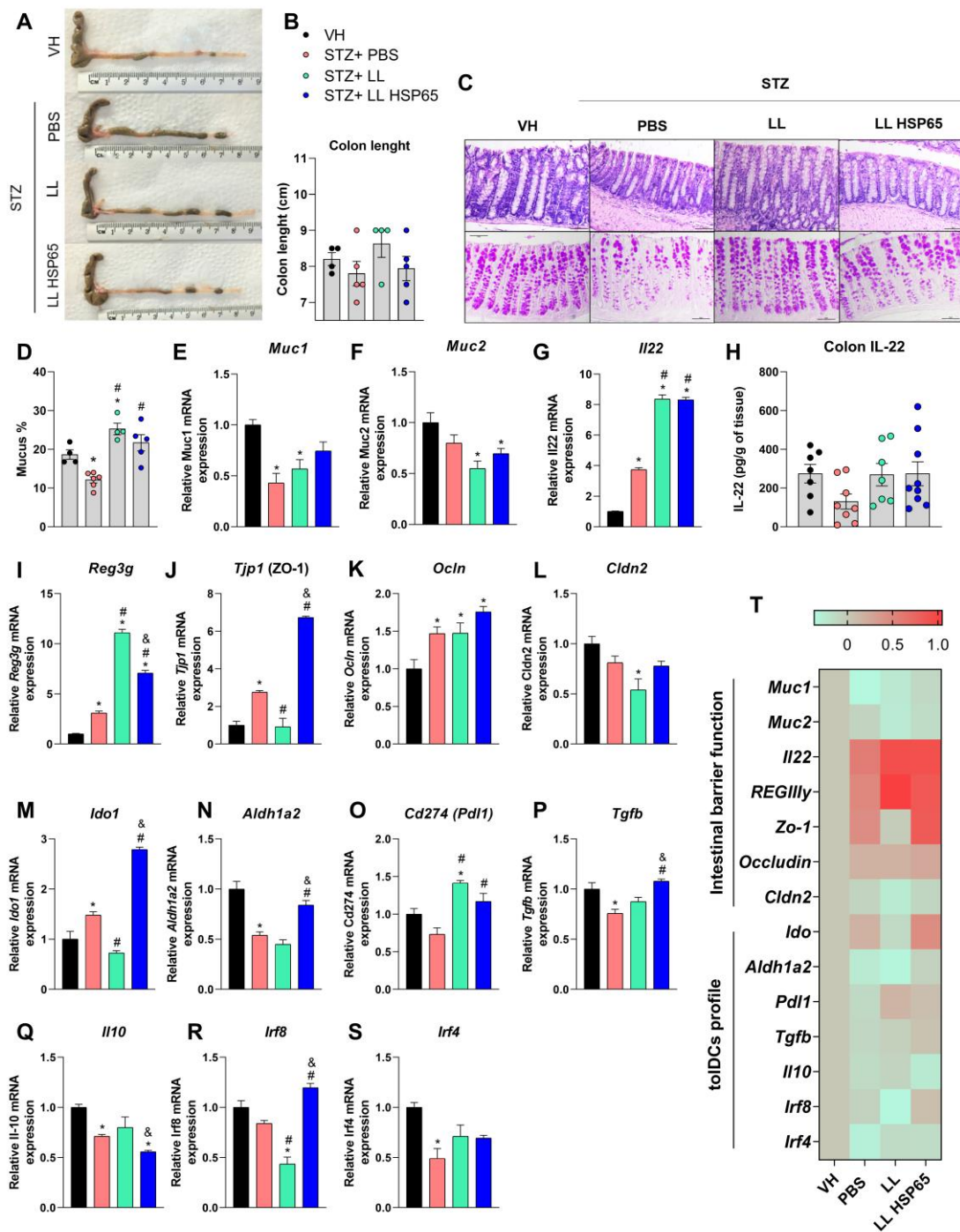
mucosa intestinal dos camundongos diabéticos em nosso modelo. Primeiramente, observamos que a indução de DM1 com STZ não altera o comprimento do cólon quando comparamos com o grupo não diabético, assim como a administração de *L. lactis* selvagem ou recombinante (Fig. 8A-B). Por outro lado, em cortes de cólon corados com HE, observamos que os camundongos com DM1 apresentaram uma aparente redução no número de células caliciformes quando comparamos aos demais grupos (Fig. 8C, painel superior). Para confirmar esse dado, procedemos com a coloração utilizando ácido periódico de Schiff (PAS), que cora substâncias ricas em carboidratos, como as mucinas, presentes no muco produzido pelas células caliciformes [178]. De fato, observamos que os camundongos diabéticos apresentam menor marcação de muco no cólon quando comparamos aos demais grupos, e a administração de *L. lactis* selvagem ou recombinante nos camundongos restaura a produção de muco, em nível semelhante ao grupo não diabético (Fig. 8C, painel inferior, 8D). Nos grupos STZ+ PBS e STZ+ LL observamos redução na expressão gênica de *Muc1* no cólon quando comparamos ao grupo veículo (Fig. 8E), e redução de *Muc2* nos grupos STZ que receberam as cepas de *L. lactis* em relação ao grupo veículo, sem diferenças quando comparamos ao grupo STZ+ PBS (Fig. 8F). Como a citocina IL-22, produzida principalmente por linfócitos Th17 e ILC3, é associada à produção de muco no cólon intestinal [179,180], avaliamos se *L. lactis* induz aumento na expressão dessa citocina. Observamos que tanto os animais diabéticos que não receberam o probiótico como os que receberam alguma cepa de *L. lactis* apresentaram maior expressão gênica de *Il22*, e destacamos que a administração da cepa selvagem ou recombinante aumentou a expressão desse gene de forma significativamente maior quando comparamos ao grupo diabético (Fig. 8G). Por outro lado, não observamos diferenças significativas na concentração de IL-22 em homogenato de cólon, detectada por ELISA (Fig. 8H).

Além da produção de muco, avaliamos a expressão de outros genes relacionados à função de barreira intestinal no cólon dos camundongos. Quando comparamos com o grupo diabético, nós observamos que a administração de *L. lactis*, sobretudo a cepa selvagem, aumenta a expressão gênica de *RegIIIγ* (Fig. 8I), um peptídeo antimicrobiano produzido principalmente pelas células de Paneth, que auxilia na manutenção da mucosa intestinal, inibe a translocação bacteriana e está associado com aumento da diversidade da microbiota intestinal [181,182]. Em relação aos genes de proteínas de junção, observamos que *L. lactis*-HSP65 aumentou a expressão do gene *Tjp1*, que codifica a proteína zonula occludens-1 (ZO-1), quando comparamos ao grupo STZ+ PBS, indicando que o probiótico recombinante

reforça a função de barreira intestinal (Fig. 8J). Em relação à expressão do gene *Ocln*, que codifica a ocludina, observamos aumento da expressão no grupo diabético que não recebeu probiótico e também nos grupos que receberam *L. lactis* em relação ao grupo veículo (Fig. 8K). A expressão de *Cldn2*, que codifica claudina-2, foi reduzida somente no grupo diabético que recebeu *L. lactis* selvagem quando comparado ao grupo veículo (Fig. 8L).

Como utilizamos uma estratégia profilático-terapêutica de entrega de *L. lactis*-HSP65 no intestino e por acreditar que as células dendríticas com perfil tolerogênico intestinais estejam envolvidas na proteção contra DM1, avaliamos alguns genes que estão associados à essas células no cólon. A administração de *L. lactis* selvagem foi capaz de aumentar somente a expressão gênica de *Pd11* quando comparado ao grupo diabético (Fig.8O), enquanto que *L. lactis*-HSP65 aumentou a expressão gênica de *Ido1* (Fig. 8M), *Aldh1a2* (Fig. 8N), *Pd11* (Fig. 8O), *Tgfb* (Fig. 8P) e *Irf8* (Fig. 8R). Por outro lado, *L. lactis*-HSP65 reduziu a expressão de *Il10* (Fig. 8Q) e não alterou a expressão de *Irf4* (Fig. 8S) quando comparamos ao grupo diabético. O panorama geral da expressão dos genes avaliados no cólon pode ser observado no *heat map* (Fig. 8T).

Esses dados sugerem que *L. lactis* melhora a função de barreira intestinal no modelo de DM1 induzido por STZ e mostram que *L. lactis* expressando HSP65 aumenta a expressão de genes associados à função imunorreguladora de DCs no cólon de camundongos com DM1.



**FIGURA 8.** *L. lactis* aumenta a expressão de genes associados à função de barreira intestinal e *L. lactis*-HSP65 induz genes associados à função imunorreguladora. Aspecto macroscópico dos cólons intestinais (A). Comprimento do cólon em centímetros (B). Fotomicrografias de cortes histológicos de cólon corados com HE (C, painel superior - aumento 200x, escala da barra: 50µm) e cortes submetidos a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação da marcação de muco (C, painel inferior - aumento 200x, escala da barra: 50µm). Porcentagem de marcação de muco nos cortes histológicos de cólon corados com PAS (D). Expressões gênicas de *Muc1* (E), *Muc2* (F) e *Il22* (G) no cólon avaliadas por qRT-PCR. Quantificação de IL-22 em homogenato de cólon avaliada por ELISA (H). Expressões gênicas de *Reg3g* (I), *Tjp1* (J), *Ocln* (K), *Cldn2* (L), *Ido* (M), *Aldh1a2* (N), *Pdl1* (O), *Tgfb* (P), *Il10* (Q), *Irf8* (R) e *Irf4* (S) no cólon avaliadas por qRT-PCR. Heat map representando a expressão dos genes avaliados no cólon (T). Dados expressos como média ± EPM representativos de um experimento (n = 5-6 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.



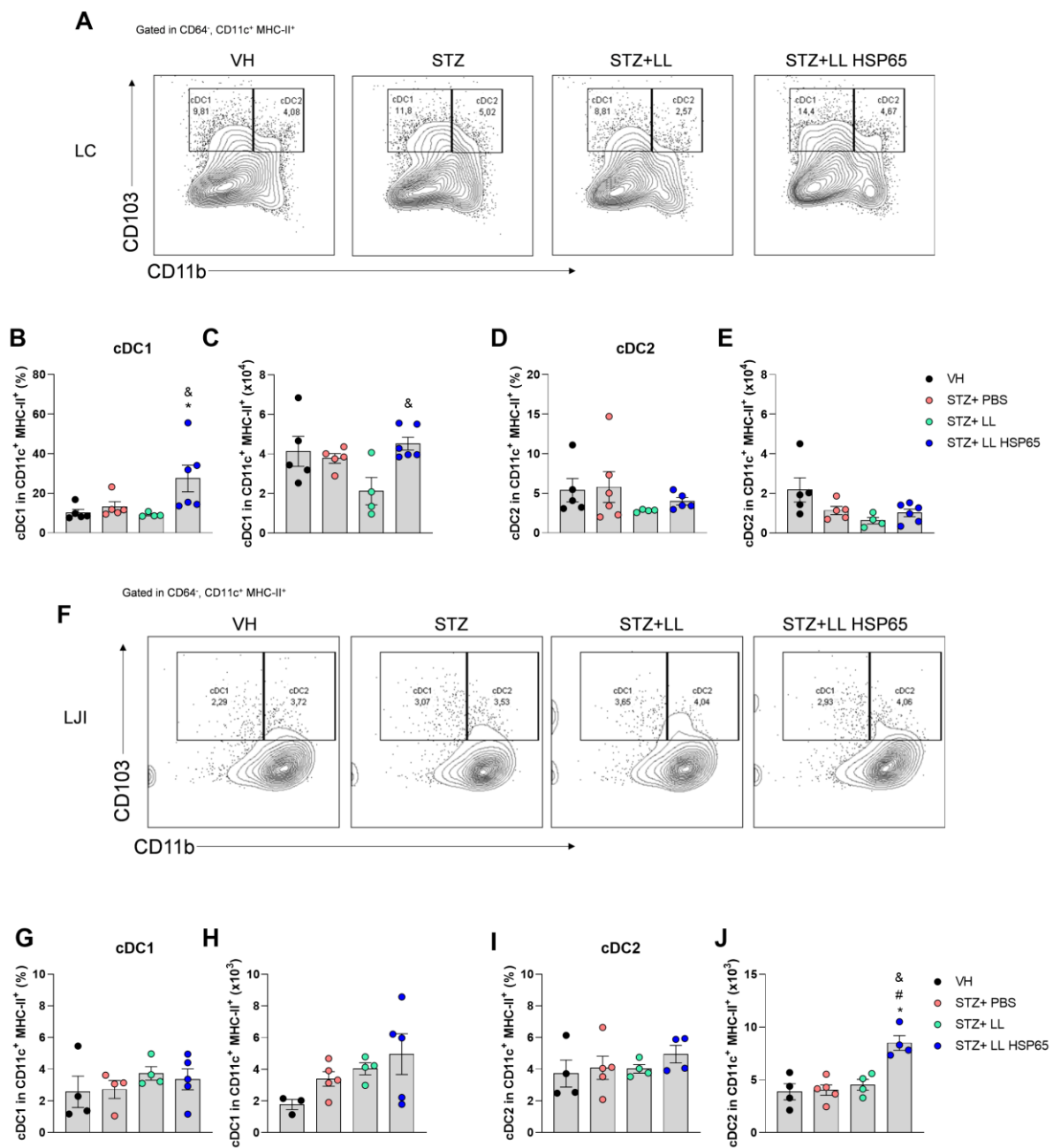
#### 4.9 *L. lactis*-HSP65 induz cDC nos linfonodos que drenam o ceco e jejuno-íleo

O aumento na expressão de genes relacionados à função tolerogênica de DCs no cólon dos animais que receberam STZ+ *L. lactis*-HSP65 nos levou a investigar se de fato o probiótico recombinante induz aumento nas populações de cDC nos linfonodos cecal (LC) e jejuno-ileais (LJI). Ao final do esquema de administração, observamos que o *L. lactis*-HSP65 aumenta a porcentagem (Fig. 9A-B) e número absoluto (Fig. 9C) da população de cDC1 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>) no LC quando comparamos ao grupo que recebeu *L. lactis* selvagem, indicando que a HSP65 tem papel na indução dessas células. Por outro lado, não observamos diferenças na população de cDC2 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) após a administração de *L. lactis* (Fig. 9A, D-E). Além disso, tanto *L. lactis* selvagem como o recombinante aumentaram o número absoluto de cDC1 PD-L1<sup>+</sup> quando comparamos ao grupo STZ+PBS no LC, mas não alteraram cDC2 PD-L1<sup>+</sup> (Apêndice A, Fig. Supl. 3A-F).

Nos linfonodos que drenam o jejuno e íleo, observamos um perfil oposto. A administração de *L. lactis*-HSP65 não foi capaz de modular a porcentagem (Fig.9 F-G), o número absoluto (Fig. 9H) de cDC1, nem a porcentagem de cDC2 (Fig. 9F, I), mas induziu aumento no número absoluto de cDC2 quando comparamos ao grupo STZ+ PBS e STZ+ *L. lactis* selvagem (Fig. 9J).

Em camundongos NOD, avaliamos a indução de cDC1 e cDC2 no LC. Nesse modelo, não obtivemos diferenças na porcentagem de cDC1 (Apêndice A, Fig. Supl. 4A-B), porém observamos que camundongos NOD que não receberam *L. lactis*-HSP65 possuem número absoluto de cDC1 reduzido no LC (Apêndice A, Fig. Supl. 4C), sugerindo que no DM1 a indução dessas células fica comprometida. Por outro lado, a administração de *L. lactis*-HSP65 tende a elevar essas células ao nível dos camundongos NOR (Apêndice A, Fig. Supl. 4C). Em relação à cDC2, não observamos diferenças na porcentagem (Apêndice A, Fig. Supl. 4A,D), mas o número absoluto estava reduzido nos camundongos NOD e NOD que receberam *L. lactis*- HSP65 (Apêndice A, Fig. Supl. 4E).

Esses dados sugerem que *L. lactis* expressando HSP65 atua de forma dinâmica, induzindo diferentes perfis de cDC em diferentes compartimentos do intestino no modelo experimental de DM1.



**FIGURA 9.** *L. lactis* expressando HSP65 aumenta cDC1 no linfonodo cecal e cDC2 nos linfonodos jejuno-ileais durante DM1. *Contour plots* representativas das populações cDC1 e cDC2 no linfonodo cecal avaliadas por citometria de fluxo (A). Porcentagem de cDC1 no linfonodo cecal (B). Número absoluto de cDC1 no linfonodo cecal (C). Porcentagem de cDC2 no linfonodo cecal (D). Número absoluto de cDC2 no linfonodo cecal (E). *Contour plots* representativas das populações cDC1 e cDC2 nos linfonodos jejuno-ileais avaliadas por citometria de fluxo (F). Porcentagem de cDC1 nos linfonodos jejuno-ileais (G). Número absoluto de cDC1 nos linfonodos jejuno-ileais (H). Porcentagem de cDC2 nos linfonodos jejuno-ileais (I). Número absoluto de cDC2 nos linfonodos jejuno-ileais (J). Dados expressos como média ± EPM representativas de dois experimentos independentes (n = 4-6 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.



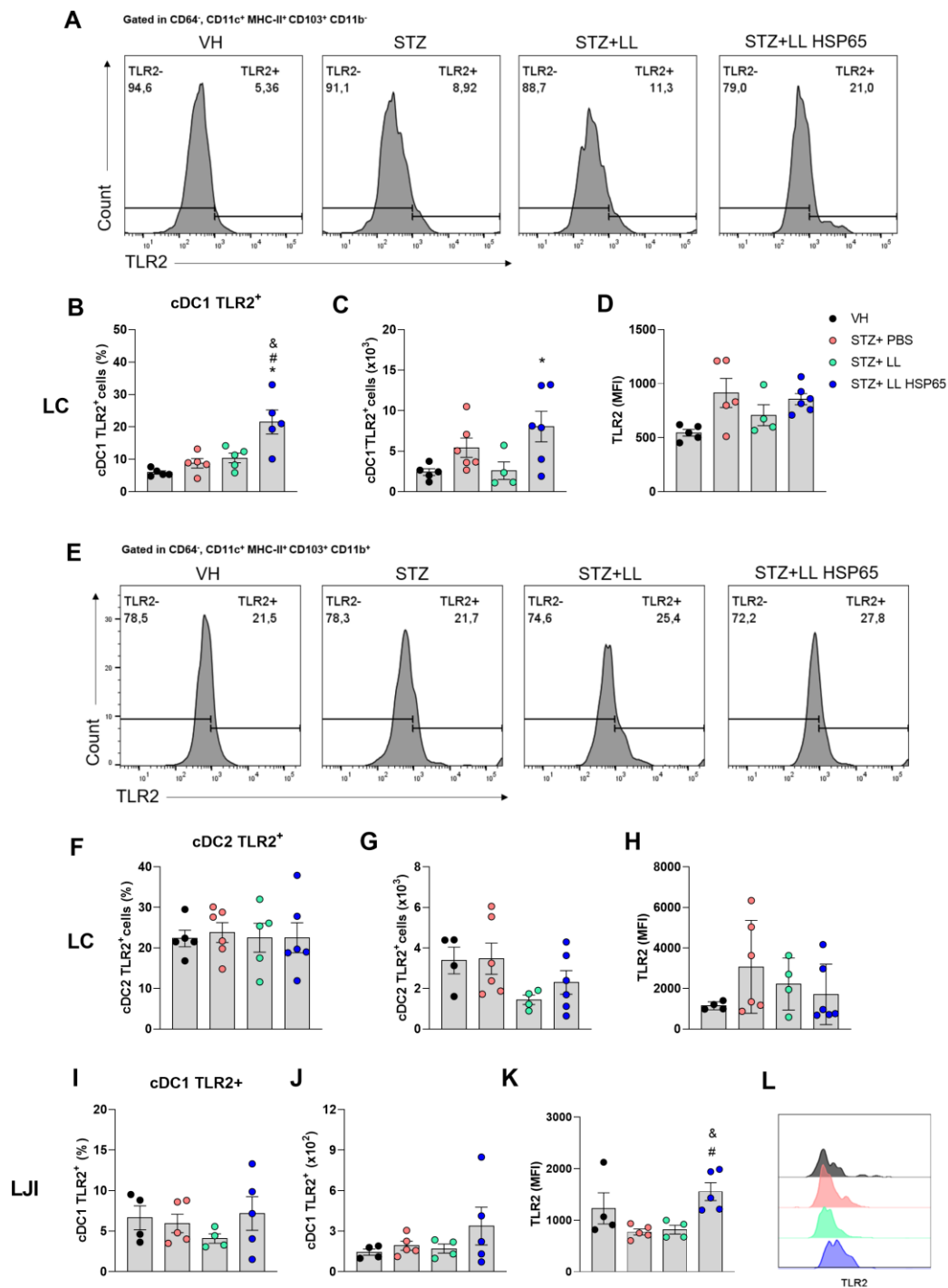
#### 4.10 *L. lactis*-HSP65 induz cDC1 expressando TLR2 em linfonodos intestinais

Os receptores TLR2 e TLR4, comumente encontrados na superfície de células apresentadoras de antígenos, são capazes de reconhecer HSP65 e induzir respostas pró ou anti-inflamatórias [183,184]. Nesse sentido, avaliamos os efeitos de *L. lactis*-HSP65 na expressão de TLR2 na superfície das cDCs avaliadas anteriormente.

No LC, observamos que o probiótico expressando HSP65 induz aumento na porcentagem de cDC1 TLR2<sup>+</sup> quando comparado aos demais grupos (Fig. 10A-B) e induz aumento no número absoluto dessas células quando comparamos ao grupo veículo (Fig. 10C), sem modular a intensidade da expressão de TLR2 nessa população celular (Fig. 10D) no tempo avaliado. Por outro lado, *L. lactis*-HSP65 não induziu aumento de TLR2 nas cDC2 do LC (Fig. 10E-H).

Adicionalmente, no LJI, *L. lactis*-HSP65 não modulou a porcentagem (Fig.10I) e número absoluto (Fig. 10J) de cDC1 expressando TLR2, mas induziu aumento na intensidade de expressão desse receptor nas cDC1 quando comparamos aos grupos diabético e diabético que receberam *L. lactis* selvagem (Fig. 10K-L). Não observamos diferenças significativas nas cDC2 expressando TLR2 nesses linfonodos (dados não mostrados).

Em conjunto, esses dados mostram que HSP65 promove indução das cDC1 que expressam TLR2 nos linfonodos intestinais, sugerindo que esse receptor pode estar envolvido com o efeito benéfico induzido por *L. lactis*-HSP65 no DM1.



**FIGURA 10.** *L. lactis* expressando HSP65 aumenta cDC1 TLR2<sup>+</sup> em linfonodos intestinais durante DM1. Histogramas representativos da porcentagem de cDC1 expressando TLR2 no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem de cDC1 TLR2<sup>+</sup> no linfonodo cecal (B). Número absoluto de cDC1 TLR2<sup>+</sup> no linfonodo cecal (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de TLR2 nas cDC1 (D). Histogramas representativos da porcentagem de cDC2 expressando TLR2 no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (E). Porcentagem de cDC2 TLR2<sup>+</sup> no linfonodo cecal (F). Número absoluto de cDC2 TLR2<sup>+</sup> no linfonodo cecal (G). Intensidade média de fluorescência (MFI) de TLR2 nas cDC2 (H). Porcentagem de cDC1 TLR2<sup>+</sup> nos linfonodos jejuno-ileais (I). Número absoluto de cDC1 TLR2<sup>+</sup> nos linfonodos jejuno-ileais (J). Intensidade média de fluorescência (MFI) de TLR2 nas cDC1 (K-L). Dados expressos como média ± EPM representativas de dois experimentos independentes (n = 4-6 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

#### 4.11 *L. lactis*-HSP65 aumenta Tregs e expressão de PD-1, mas não altera as células T patogênicas nos linfonodos intestinais

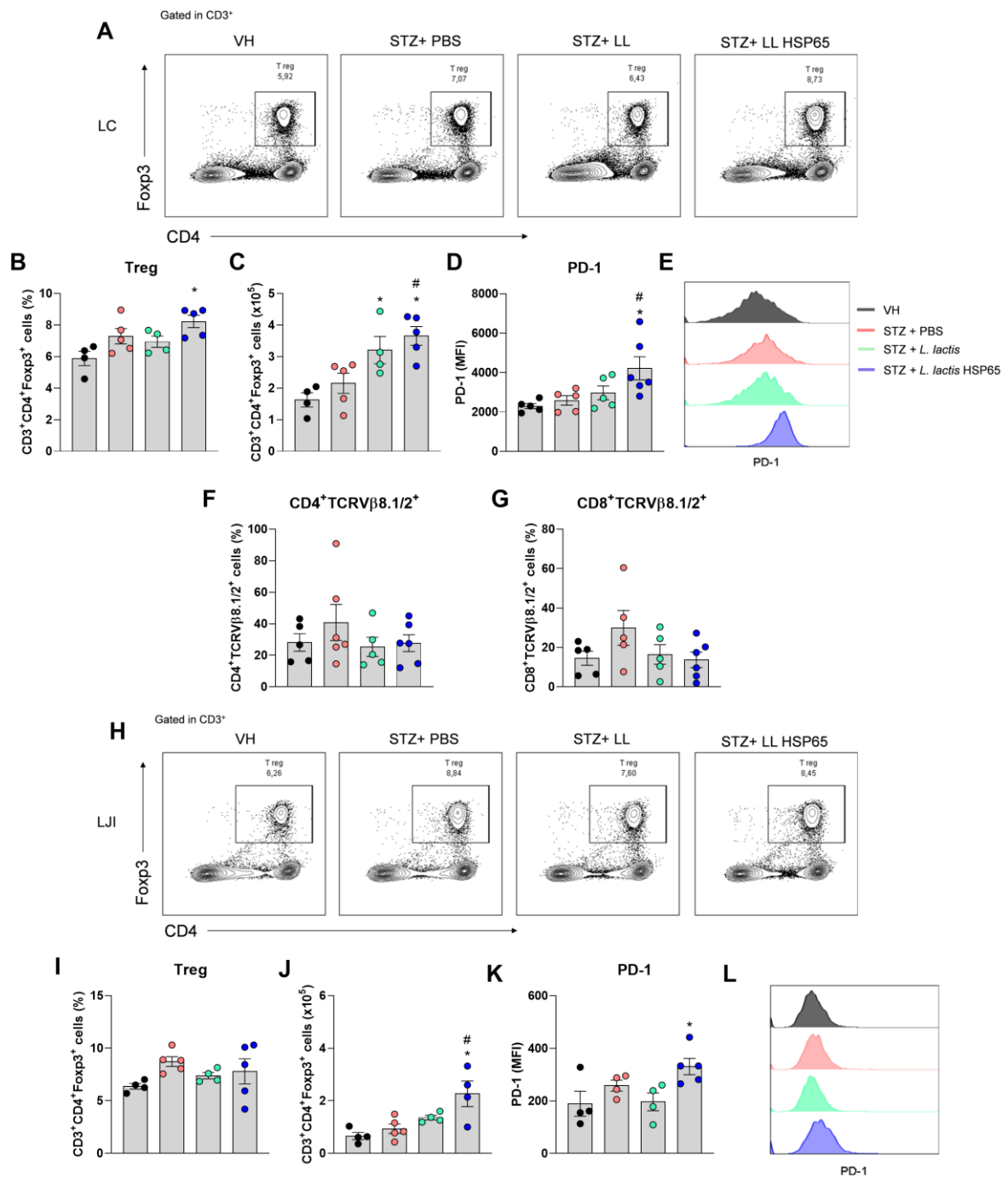
Nossos dados, até o momento, mostram que *L. lactis* expressando HSP65 controla a glicemia e reduz a incidência de DM1, em associação com melhoras na função de barreira intestinal e indução de células dendríticas tolerogênicas, principalmente cDC1 TLR2<sup>+</sup> nos linfonodos que drenam jejuno, íleo e ceco. Já é mostrado que as cDCs, principalmente cDC1, são importantes indutoras de Tregs, tanto *in vivo* como *in vitro* [50,185]. Como as Tregs possuem papel chave no controle de doenças autoimunes [186], investigamos se a administração de *L. lactis*- HSP65 altera também as Tregs nos linfonodos cecal e jejuno-ileal.

Observamos que *L. lactis*- HSP65 aumentou a porcentagem Tregs no LC quando comparamos com o grupo veículo (Fig. 11A-B). Quando observamos o número absoluto de Tregs, *L. lactis*- HSP65 aumentou essa população quando comparamos como grupo STZ que não recebeu probiótico (Fig. 11C). Além disso, as Tregs de camundongos que receberam *L. lactis* -HSP65 apresentaram maior intensidade de expressão de PD-1 quando comparamos às Tregs de camundongos diabéticos que não receberam *L. lactis* (Fig. 11D-E), sugerindo que a HSP65 aumenta a capacidade supressora das Tregs no LC. Nesse sentido, avaliamos também os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> que expressam TCRV $\beta$ 8.1/2<sup>+</sup>, clones autorreativos associados à diversas doenças autoimunes [187,188], porém, não observamos diferenças estatísticas na porcentagem dessas células no LC (Fig. 11F-G).

Nos LJI, não observamos diferenças na porcentagem de Tregs entre os grupos (Fig. 11H-I), mas observamos que *L. lactis*- HSP65 aumenta o número absoluto de Tregs quando comparamos com os grupos veículo e STZ+ PBS (Fig. 11J). De forma contrária ao observado no LC, *L. lactis*- HSP65 induz aumento na expressão de PD-1 somente quando comparamos ao grupo veículo, mas não com o grupo STZ+ PBS (Fig. 11K-L).

Adicionalmente, observamos que *L. lactis*-HSP65 aumentou consideravelmente a expressão de PD-1 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> quando comparamos com o grupo STZ+ PBS, tanto no LC como LJI (Apêndice A, Fig. Supl. 5A-B), sugerindo que os efeitos imunorreguladores induzidos por HSP65 não se restringem à apenas linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Estes dados indicam que os linfonodos intestinais, principalmente LC, são locais primários de indução de Tregs em nosso modelo, e suportam a ideia de que essas células sejam cruciais no controle de DM1 induzido por *L. lactis*- HSP65.



**FIGURA 11.** *L. lactis* expressando HSP65 induz linfócitos T reguladores em linfonodos intestinais durante DM1. *Contour plots* representativos da porcentagem de Tregs no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem Treg (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Fcpx3<sup>+</sup>) no linfonodo cecal (B). Número absoluto de Treg no linfonodo cecal (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 nas Tregs do linfonodo cecal (D-E). Porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (F) ou T CD8<sup>+</sup> (G) que expressam o TCRVβ8.1/2 no LC. *Contour plots* representativos da porcentagem de Treg nos linfonodos jejuno-ileais determinada por citometria de fluxo (H). Porcentagem de Treg nos linfonodos jejuno-ileais (I). Número absoluto de Treg nos linfonodos jejuno-ileais (J). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 nas Tregs dos linfonodos jejuno-ileais (K-L). Dados expressos como média ± EPM representativas de dois experimentos independentes (n = 4-6 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

#### 4.12 A administração de *L. lactis* expressando HSP65 aumenta a produção de TGF- $\beta$ no cólon de camundongos com DM1

Após o reconhecimento de um PAMP ou DAMP via TLR ou outros receptores da imunidade inata, as DCs se tornam ativadas e aumentam a expressão de MHC e moléculas coestimuladoras, para então apresentarem o antígeno para a célula T [189]. Além desses sinais, as citocinas liberadas pelas DCs têm papel importante na diferenciação de células T efetoras para um perfil adequado, a depender do estímulo, seja infeccioso ou não [190]. IL-12 e IFN- $\gamma$ , por exemplo, são relacionadas com a indução de linfócitos Th1, já TGF- $\beta$ , com indução de Tregs, e IL-6/IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$  induzem linfócitos Th17 [191]. Além disso, uma vez diferenciadas, as células T CD4<sup>+</sup> também produzem citocinas importantes para sua função efetora, como a liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  por Tregs [191].

Como observamos que *L. lactis*- HSP65 induz cDC1 e Tregs (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) nos linfonodos intestinais, avaliamos o perfil de produção de algumas citocinas pró- e anti-inflamatórias no intestino dos camundongos. No cólon, observamos que *L. lactis*- HSP65 não alterou a produção de IL-10 (Fig. 12A), mas aumentou de maneira significativa TGF- $\beta$  (Fig. 12B). Em relação às citocinas pró-inflamatórias no contexto do DM1, *L. lactis*- HSP65 não alterou a produção de IFN- $\gamma$  (Fig. 12C) e IL-17 (Fig. 12D) no cólon dos animais no tempo avaliado.

No íleo, não observamos diferenças na produção de IL-10 (Fig. 12E), de TGF- $\beta$  (Fig. 12F) e nem na produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 (dados não mostrados), sugerindo que o íleo não é o local de maior efeito imunorregulador de *L. lactis*-HSP65 em nosso modelo experimental.

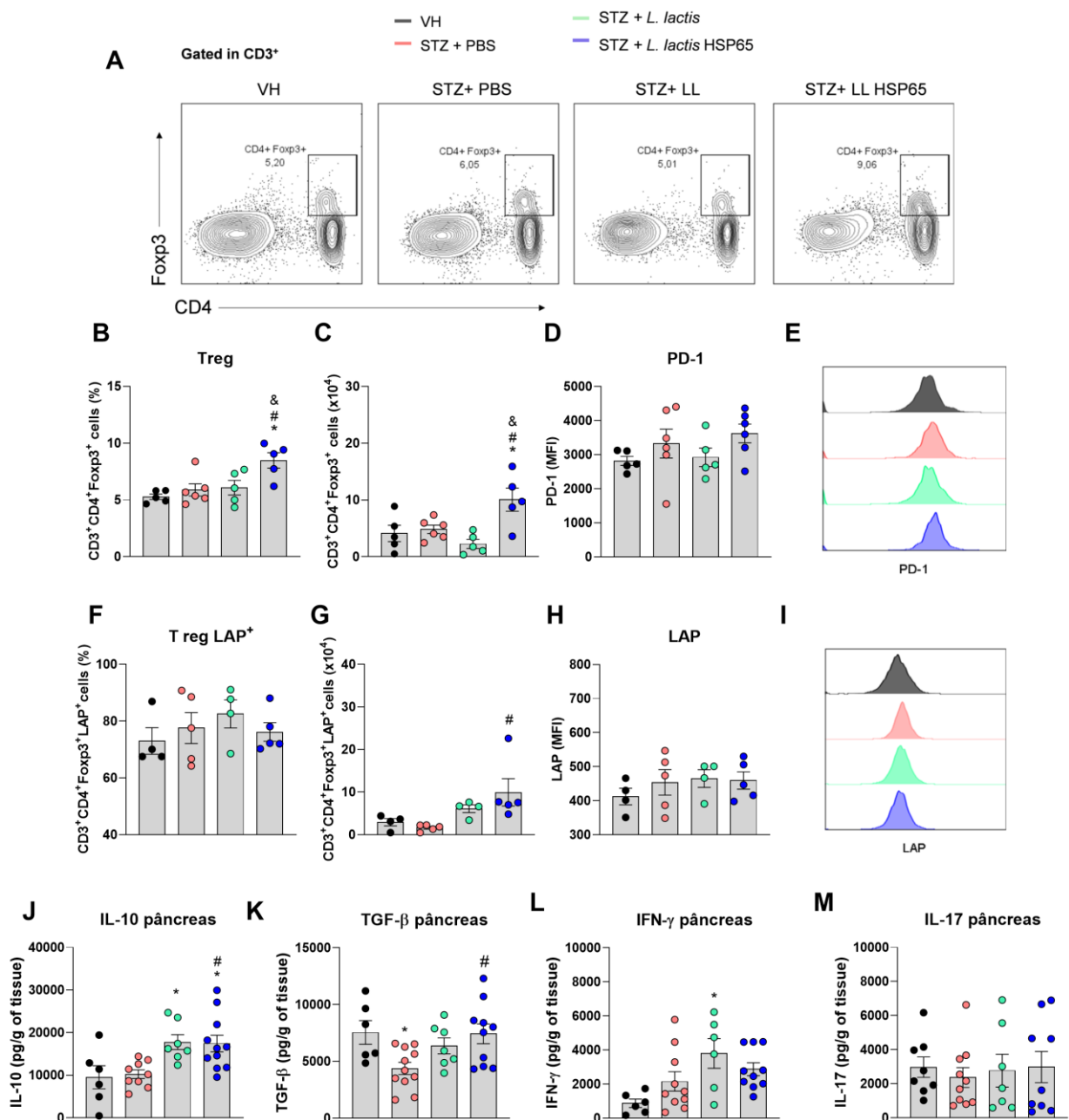


reduz a expressão de PD-1 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no LP, e, como observado nos linfonodos intestinais avaliados, a administração do probiótico aumenta essa expressão (Apêndice A, Fig. Supl. 5C).

Adicionalmente, observamos que *L. lactis*- HSP65 aumentou a porcentagem de Tregs também no modelo utilizando camundongos NOD (Apêndice A, Fig. Supl. 4F-G), mas não alterou a expressão de PD-1 nessas células (Apêndice A, Fig. Supl. 4I).

Em concordância com o aumento de Tregs total e expressando LAP nos linfonodos pancreáticos no modelo de DM1 induzida por STZ, observamos que *L. lactis*- HSP65 aumentou de forma significativa a produção de IL-10 (Fig. 13J) e de TGF- $\beta$  (Fig. 13K) no pâncreas quando comparamos ao grupo STZ+ PBS, que por sua vez tem a produção de TGF- $\beta$  reduzida quando comparamos ao grupo veículo. Em contrapartida, não observamos diferenças na produção de IFN- $\gamma$  (Fig. 13L) e IL-17 (Fig. 13M) entre os grupos no tempo avaliado.

Estes dados mostram que os efeitos imunorreguladores de *L. lactis*- HSP65 atingem os linfonodos e tecido pancreático, seja por migração de Tregs dos linfonodos intestinais para os pancreáticos, ou por geração de Tregs diretamente no tecido.



**FIGURA 13.** *L. lactis*-HSP65 aumenta Tregs e expressão de LAP nos linfonodos pancreáticos e IL-10 e TGF-β no pâncreas de camundongos com DM1. *Contour plots* representativos da porcentagem de Tregs (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) nos linfonodos pancreáticos determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem de Tregs nos linfonodos pancreáticos (B). Número absoluto de Tregs nos linfonodos pancreáticos (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 nas Tregs dos linfonodos pancreáticos (D-E). Porcentagem de Tregs expressando LAP nos linfonodos pancreáticos (F). Número absoluto de Tregs LAP<sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos (G). Intensidade média de fluorescência (MFI) de LAP nas Tregs (H-I). Concentração das citocinas IL-10 (J), TGF-β (K), IFN-γ (L) e IL-17 (M) em pg/g de homogenato de pâncreas no 15º dia após início da indução de DM1, avaliadas por ELISA. Dados expressos como média ± EPM representativo de dois experimentos independentes (n=4-6 por grupo, A-I) ou compilados de dois experimentos independentes (n = 7-11 por grupo, J-M) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.



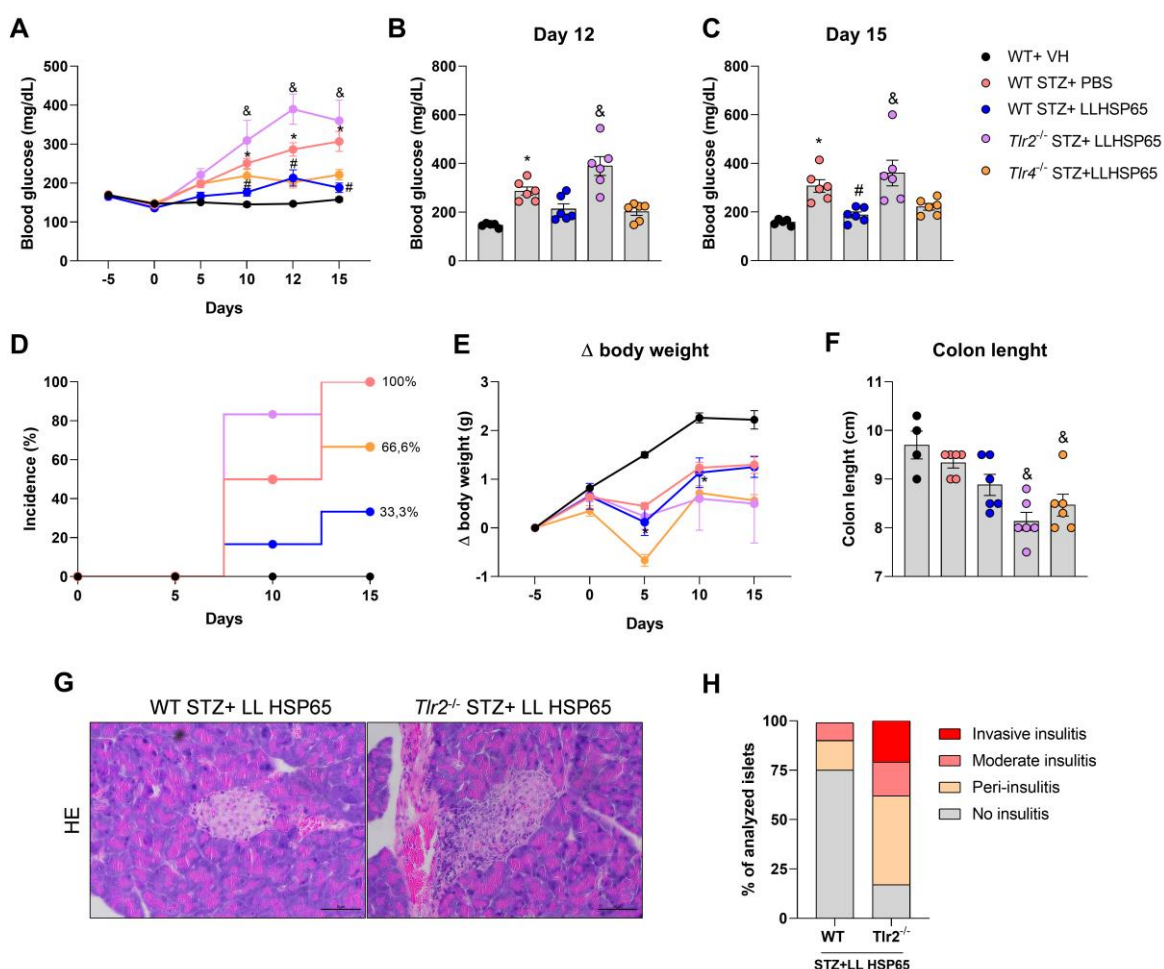
#### 4.14 A redução da incidência de DM1 induzida por *L. lactis*- HSP65 é dependente de TLR2

Nossos dados anteriores mostram que *L. lactis*- HSP65 induz aumento na expressão de TLR2 nas cDC1 nos linfonodos intestinais, sugerindo que esse receptor possa estar envolvido na proteção contra DM1 observada ao final do esquema de administração do probiótico recombinante. Para confirmar essa hipótese, administramos *L. lactis*- HSP65 em camundongos deficientes de TLR2 e camundongos deficientes de TLR4, que também pode estar envolvido no reconhecimento de HSP65. Primeiramente, determinamos se a deficiência de TLR2 por si só alteraria a incidência de DM1 em modelo induzido por STZ. Para isso, administramos STZ em camundongos WT (C57Bl/6) e deficientes de TLR2 e após 15 dias do início da indução não observamos diferenças na glicemia entre os dois grupos, mostrando que a deficiência de TLR2 não altera o desenvolvimento de DM1 (Apêndice A, Fig. Supl. 6A-B), validando assim a utilização desses animais para verificar o impacto de TLR2 no efeito de *L. lactis*- HSP65.

Após 12 dias do início da indução de DM1 com STZ, observamos que todos os animais WT que receberam STZ+ PBS e os deficientes de TLR2 que receberam STZ+ *L. lactis*- HSP65 já estavam com glicemia acima de 200 mg/dL (Fig. 14A-B). No 15º dia, a glicemia dos animais *Tlr2*<sup>-/-</sup> que receberam *L. lactis*- HSP65 estava significativamente maior quando comparada com a glicemia dos camundongos WT que também receberam a mesma cepa de probiótico (Fig. 14C), indicando que *L. lactis*- HSP65 perdeu seu efeito protetor contra o DM1 na deficiência de TLR2. Por outro lado, a deficiência de TLR4 não impactou a glicemia dos camundongos quando comparada à do grupo WT (Fig. 14A-C). Ao se avaliar a incidência da doença, observamos que, de fato, *L. lactis*- HSP65 não foi capaz de reduzir a incidência de DM1 nos camundongos *Tlr2*<sup>-/-</sup> como observado nos camundongos WT, e camundongos *Tlr4*<sup>-/-</sup> exibiram um perfil intermediário de incidência de DM1 (Fig. 14D). Apenas os camundongos WT que receberam *L. lactis*- HSP65 apresentaram perda significativa de peso quando comparado ao grupo veículo (Fig. 14E). Entretanto, camundongos *Tlr2*<sup>-/-</sup> ou *Tlr4*<sup>-/-</sup> que receberam *L. lactis*- HSP65 apresentaram encurtamento de cólon, sugerindo inflamação intestinal, o que não foi observado no grupo WT (Fig. 14F).

Como o papel de TLR2 na proteção induzida por *L. lactis*- HSP65 no DM1 ficou mais evidente do que o de TLR4, nos concentramos em investigar o impacto de TLR2 no mecanismo de imunorregulação envolvido durante o DM1.

Confirmando os dados da glicemia, observamos que os camundongos deficientes de TLR2 diabéticos que receberam *L. lactis* -HSP65 apresentaram maior infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas quando comparado ao observado nos camundongos WT (Fig. 14G), caracterizando maior porcentagem de ilhotas com insulite invasiva ou peri-insulite (Fig. 14H). Em conjunto, esses dados evidenciam que HSP65 exerce seu efeito protetor no DM1 via sinalização de TLR2.



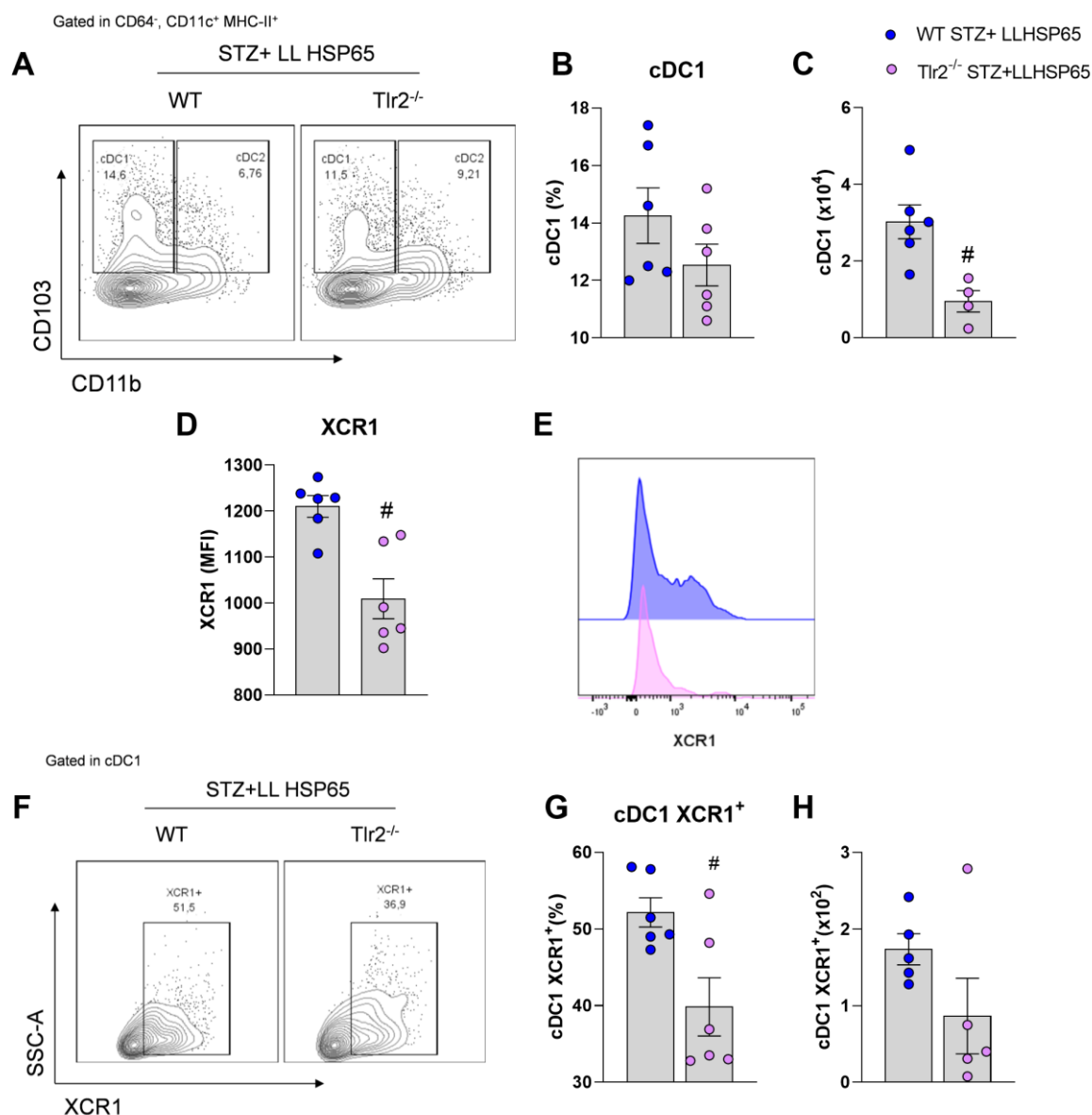
**FIGURA 14. TLR2 é essencial na proteção contra DM1 induzida por *L. lactis* expressando HSP65.** *Time course* da glicemia após 10 horas de jejum durante o protocolo de administração de *L. lactis* (A). Glicemia de jejum após 12 dias do início da administração de STZ (B). Glicemia de jejum após 15 dias do início da administração de STZ (C). Incidência de DM1 após 15 dias do início da administração de STZ (D). Variação de peso corporal durante a administração de *L. lactis* (E). Comprimento do cólon em centímetros (F). Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas corados com HE, aumento 200x, escala da barra: 50µm (G). Avaliação do grau de insulite no pâncreas após 15 dias após o início da administração de STZ (H). Dados expressos como média ± EPM representativos de dois experimentos independentes (n = 5-6 por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs VH, # vs WT STZ+PBS, & Tlr2<sup>-/-</sup> ou Tlr4<sup>-/-</sup> STZ + *L. lactis*- HSP65 vs WT STZ+ *L. lactis* HSP65.

#### 4.15 TLR2 é importante para a indução de cDC1 no linfonodo cecal mediada por *L. lactis*-HSP65 no modelo de DM1

Nossos dados anteriores mostraram que camundongos diabéticos que receberam *L. lactis*-HSP65 têm mais cDC1 expressando TLR2 nos linfonodos cecal e jejuno-ileais. Além disso, na deficiência de TLR2 o probiótico recombinante não consegue proteger contra o desenvolvimento de DM1. Diante disso, avaliamos se a deficiência de TLR2 impactaria diretamente na indução de cDC1.

Observamos que camundongos diabéticos *Tlr2*<sup>-/-</sup> que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentam porcentagem de cDC1 semelhante à observada no grupo controle WT (Fig. 15A-B), entretanto, apresentam redução significativa no número absoluto dessas células no LC quando comparamos ao grupo WT (Fig. 15C).

O XCR1 é o receptor específico para a quimiocina XCL1 e exibe uma expressão elevada nas cDC1 [193]. Essas células estão diretamente envolvidas na apresentação cruzada e na indução de tolerância periférica, tornando o XCR1 um marcador crucial para identificar cDC1 com propriedades tolerogênicas importantes. [194,195]. Em nosso modelo, observamos que as cDC1 de camundongos *Tlr2*<sup>-/-</sup> diabéticos que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentam redução na intensidade de expressão de XCR1 quando comparamos ao grupo controle (Fig. 15D-E). Essa redução também é observada na porcentagem de cDC1 XCR1<sup>+</sup> (Fig. 15F-G), mas não no número absoluto (Fig. 15H). Esses dados indicam que TLR2 é importante para a indução das cDC1 no LC e manutenção do fenótipo tolerogênico no modelo de DM1.



**FIGURA 15. Camundongos diabéticos e deficientes de TLR2 que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentam redução de cDC1 e da expressão de XCR1 no linfonodo cecal.** *Contour plots* representativos da porcentagem de cDC1 no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem de cDC1 no linfonodo cecal (B). Número absoluto de cDC1 no linfonodo cecal (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de XCR1 nas cDC1 do linfonodo cecal (D-E). *Contour plots* representativos da porcentagem de cDC1 XCR1<sup>+</sup> no linfonodo cecal (F). Porcentagem de cDC1 XCR1<sup>+</sup> no linfonodo cecal (G). Número absoluto de cDC1 no linfonodo cecal (H). Dados expressos como média ± EPM representativo de um experimento (n=4-6 por grupo) analisados pelo teste t de Student, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. # vs WT STZ+ *L. lactis* HSP65.

#### 4.16 TLR2 é importante para indução de Tregs no linfonodo pancreático e produção de IL-10 no pâncreas induzidas por *L. lactis*- HSP65 no modelo de DM1

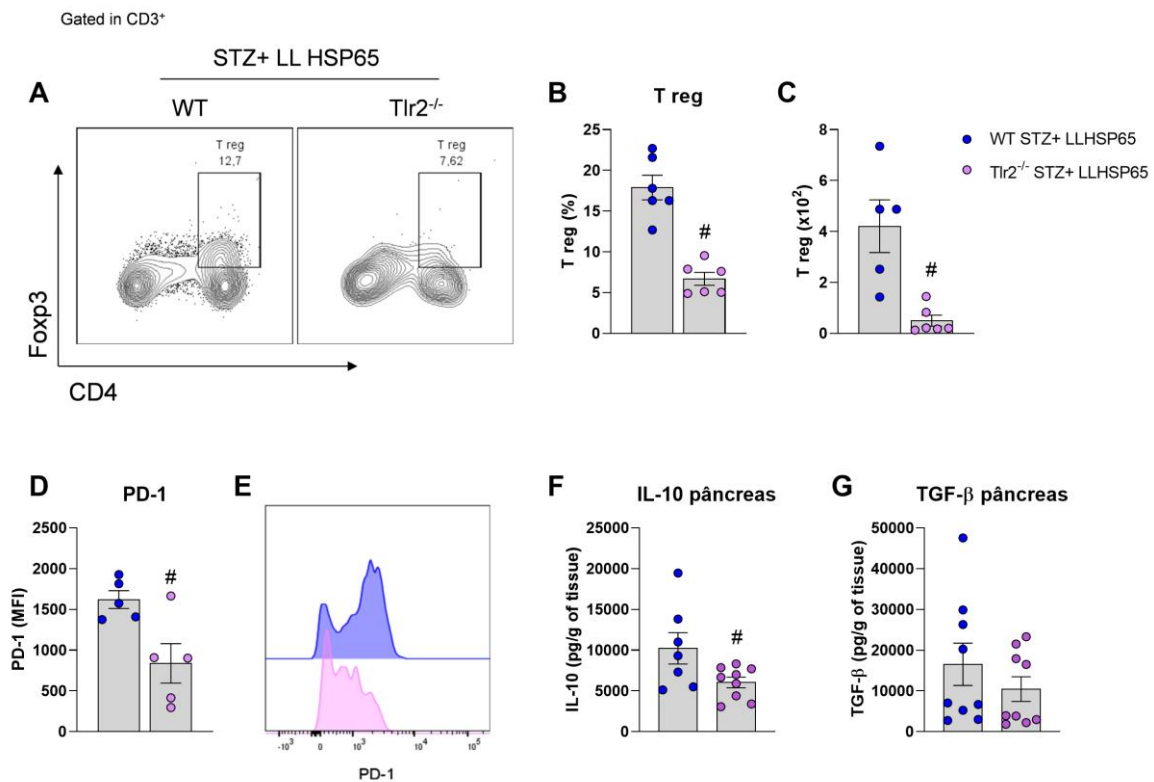
Ao constatarmos a relevância do TLR2 na proteção contra a DM1 e na indução de cDC1 após o esquema de administração de *L. lactis*-HSP65 em camundongos diabéticos,

procuramos avaliar como a deficiência desse receptor afeta alguns componentes imunorreguladores no pâncreas.

Primeiramente, observamos que camundongos deficientes de TLR2 que receberam *L. lactis*-HSP65 têm redução na porcentagem (Fig. 16A-B) e número absoluto (Fig. 16C) de Tregs nos linfonodos pancreáticos quando comparamos com o grupo WT. Em relação à funcionalidade dessas células, observamos que na ausência de TLR2 há redução na expressão de PD-1 quando comparamos com o grupo WT (Fig. 16D-E).

Em relação às citocinas, observamos que camundongos deficientes de TLR2 que receberam *L. lactis*-HSP65 têm redução significativa na produção de IL-10 no pâncreas (Fig. 16F), mas produção semelhante de TGF- $\beta$  quando comparamos ao grupo WT (Fig. 16G). Não observamos diferenças estatísticas na produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 entre os grupos (dados não mostrados).

Estes dados demonstram que a diferenciação de Tregs e aumento na produção de IL-10, importantes no controle de DM1 [196,197] e mediadas por *L. lactis*-HSP65 em nosso modelo experimental, são dependentes de TLR2.



**FIGURA 16.** Camundongos diabéticos e deficientes de TLR2 que receberam *L. lactis*-HSP65 apresentam prejuízo na indução de Tregs PD1<sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos e produção de IL-10 no pâncreas. *Contour plots* representativos da porcentagem de Tregs nos linfonodos pancreáticos determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem de Tregs nos linfonodos pancreáticos (B). Número absoluto de Tregs nos linfonodos pancreáticos (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 nas Tregs dos linfonodos pancreáticos (D-E). Concentração das citocinas IL-10 (F) e TGF- $\beta$  (G) em pg/g de homogenato de pâncreas no 15<sup>o</sup> dia após início da indução de DM1, avaliadas por ELISA. Dados expressos como média  $\pm$  EPM representativo de um experimento (n=4-6 por grupo) analisados pelo teste t de Student, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . # vs WT STZ+ *L. lactis* HSP65.

#### 4.17 BMDCs de camundongos *Tlr2*<sup>-/-</sup> apresentam expressão gênica reduzida de *Il10* e *Irf8* após estímulo com rHSP65

Para investigar o papel de TLR2 no fenótipo e funcionalidade das cDC1 após estímulo com rHSP65, utilizamos a estratégia *in vitro* de geração de BMDCs de camundongos WT e deficientes de TLR2.

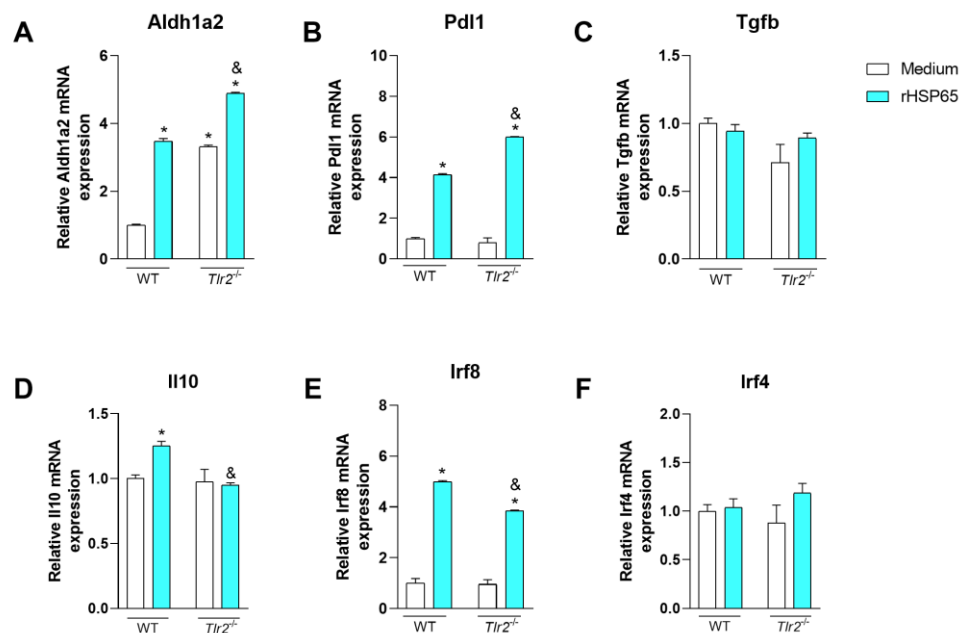
Primeiramente, buscamos avaliar se a indução de perfil tolerogênico nas BMDCs mediada por rHSP65 é dependente de TLR2. Para isso, estimulamos as BMDCs com rHSP65 por 24 horas e analisamos a expressão de alguns genes associados à função tolerogênica nas DCs.

Observamos que rHSP65 induz aumento na expressão de *Aldh1a2*, porém na deficiência de TLR2 essa expressão é ainda maior, fato parcialmente explicado pelo aumento

na expressão nas BMDCs  $Tlr2^{-/-}$  não estimuladas, sugerindo que TLR2 por si só regula a expressão de *Aldh1a2* (Fig. 17A). O estímulo com rHSP65 aumentou a expressão de *Pd11* nas BMDCs de camundongos WT, e a deficiência de TLR2 potencializou essa expressão (Fig. 17B). Por outro lado, a ausência de TLR2 não impactou na expressão gênica de *Tgfb* no tempo avaliado (Fig. 17C).

Em dados anteriores, observamos redução na produção de IL-10 nos pâncreas de camundongos  $Tlr2^{-/-}$  quando comparamos ao grupo WT que recebeu *L. lactis*- HSP65. Pensando nisso, avaliamos se o mesmo ocorre diretamente nas BMDCs deficientes de TLR2, e como esperado, na deficiência desse receptor a expressão de *Il10* é reduzida quando comparamos às BMDCs WT (Fig. 17D). O mesmo ocorre com a expressão de *Irf8*, fator de transcrição essencial para o desenvolvimento de cDC1 [198], que é reduzida na deficiência de TLR2 após estímulo com rHSP65 (Fig. 17E). Por outro lado, rHSP65 nem a deficiência de TLR2 modulam a expressão gênica de *Irf4* (Fig. 17F), fator de transcrição das cDC2 [199].

Em conjunto, estes dados reforçam que TLR2 é essencial para que HSP65 induza o perfil tolerogênico das cDC1, caracterizado pelo aumento na expressão de *Irf8* e de *Il10*.



**FIGURA 17. TLR2 é importante para a expressão gênica de *Il10* e *Irf8* mediada por rHSP65 em BMDCs.** Expressão relativa dos genes *Aldh1a2* (A), *Pd11* (B), *Tgfb* (C), *Il10* (D), *Irf8* (E) e *Irf4* (F) em BMDCs de camundongos WT ou  $Tlr2^{-/-}$  estimuladas ou não com rHSP65 (12  $\mu$ g/ml) por 24 horas, avaliada por qRT-PCR. Dados expressos como média  $\pm$  EPM representativo de um experimento (n=5 poços por condição) analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . \* vs meio, & vs WT rHSP65.

#### 4.18 rHSP65 induz cDC1 e produção de IL-10 via TLR2 em BMDCs

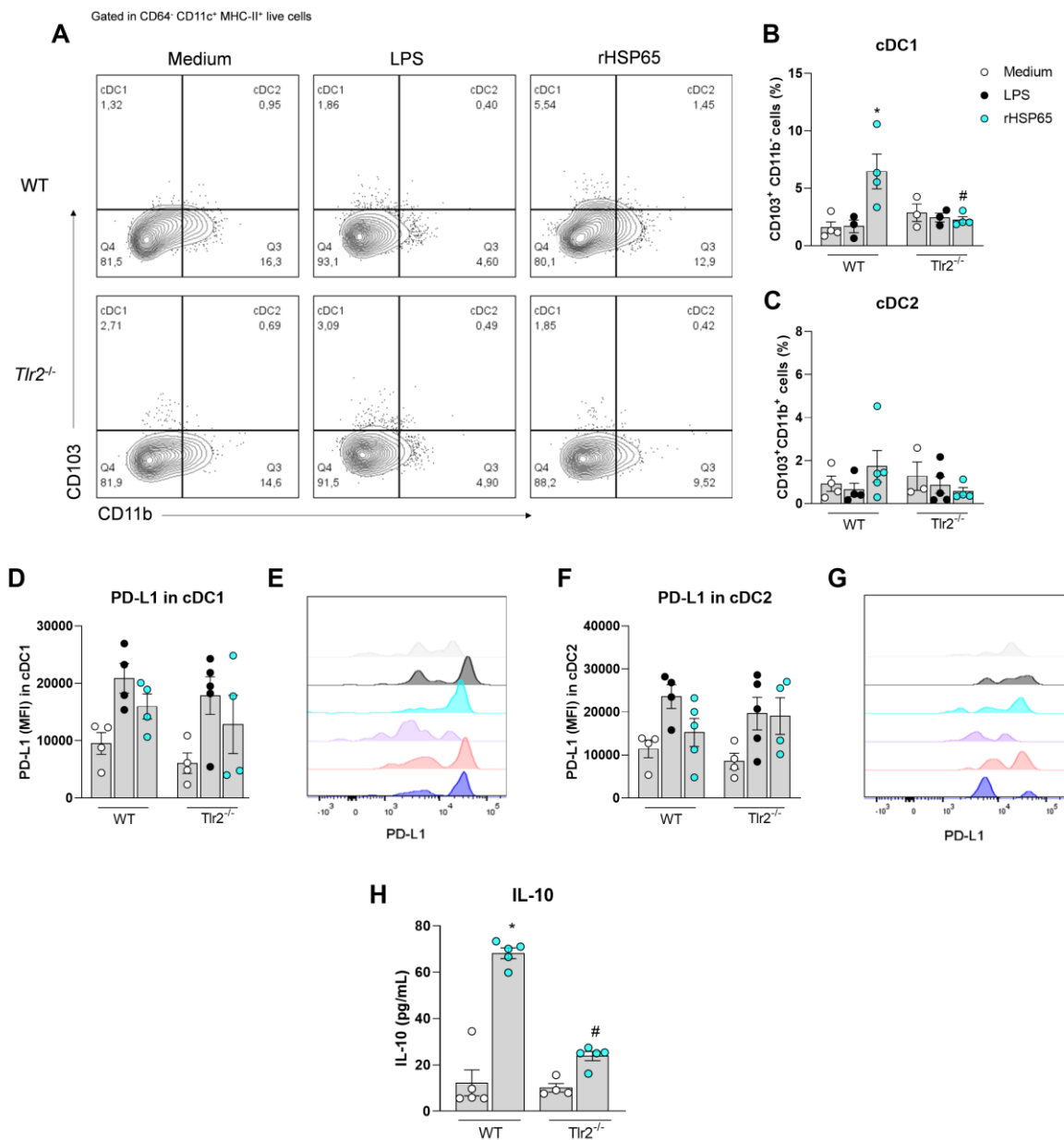
Como vimos que TLR2 é importante para a indução de Il10 e Irf8 a nível de expressão gênica, nosso próximo passo foi determinar se a deficiência de TLR2 compromete a diferenciação de cDC1 induzida por rHSP65.

Após 24 horas de estímulo, observamos que nas BMDCs deficientes de TLR2 o estímulo com rHSP65 não foi capaz de induzir cDC1 quando comparamos às BMDCs de camundongos WT (Fig. 18A-B). Em contrapartida, observamos que a deficiência de TLR2 não impacta na indução de cDC2 (Fig. 18C).

Além da porcentagem de cDCs, avaliamos se a deficiência de TLR2 influenciaria na funcionalidade dessas células. Observamos que rHSP65 não aumenta a expressão de PD-L1 nas cDC1 (Fig. 18 D-E) e cDC2 (Fig. 18F-G). Por outro lado, observamos que TLR2 é essencial para a produção de IL-10 após estímulo com rHSP65 (Fig. 18H).

Em conjunto, esses dados suportam a ideia de que os efeitos imunorreguladores de rHSP65 são induzidos via TLR2, que facilita a diferenciação de cDC1 com aumento na produção de IL-10.





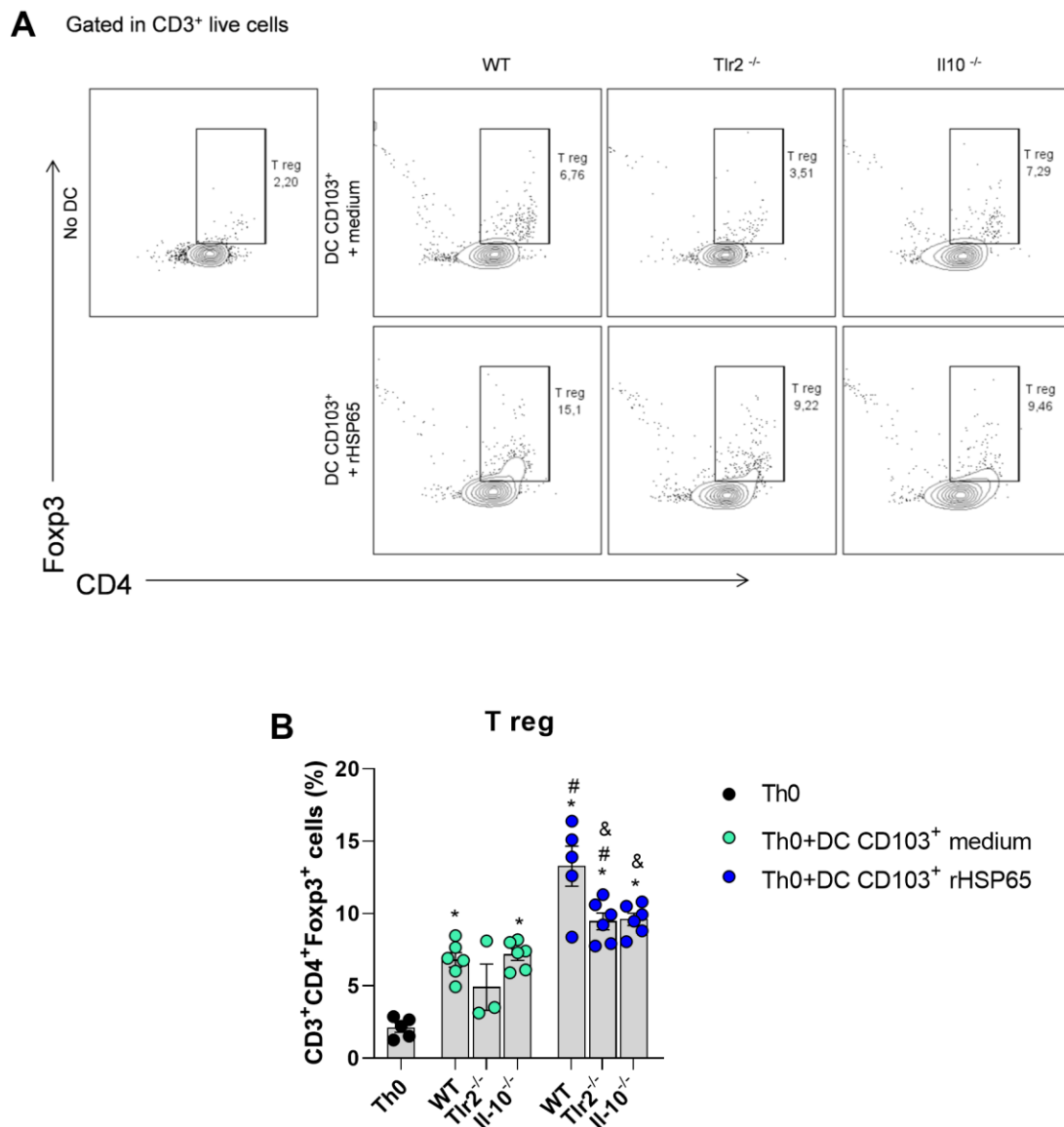
**FIGURA 18.** rHSP65 induz cDC1 e produção de IL-10 via TLR2 em BMDCs. *Contour plots* representativos da porcentagem de cDC1 e cDC2 em BMDCs após 24 horas de estímulo ou não com LPS (500 ng/ml) ou rHSP65 (12µg/ml) determinada por citometria de fluxo (A). Porcentagem de cDC1 (B) e cDC2 (C). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-L1 nas cDC1 (D-E) ou cDC2 (F-G) após 24 horas de estímulo com LPS ou rHSP65 determinada por citometria de fluxo. Concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura de BMDCs estimuladas ou não com rHSP65 determinada por ELISA (H). Dados expressos como média ± EPM representativo de um experimento (n=4-5 poços por condição) analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ . \* vs meio, # vs WT rHSP65.

#### 4.19 TLR2 e IL-10 são importantes para a indução de Tregs mediada por DCs estimuladas com rHSP65

Nossos dados *in vitro* mostram que HSP65 ativa BMDCs e, via TLR2, promove a diferenciação de cDC1 e produção de IL-10. Nossa hipótese, é que o eixo TLR2-IL-10 seja importante para que as cDC1 induzam a polarização de linfócitos CD4 naive para Tregs, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Para elucidar a essa pergunta, diferenciamos BMDCs de camundongos WT, de deficientes de TLR2 e de deficientes de IL-10 e estimulamos ou não com rHSP65 por 24 horas. Em seguida, isolamos as DCs CD103<sup>+</sup> e co-cultivamos com linfócitos CD4 naive (Th0). Após 96 horas de cultura, observamos que as DCs não estimuladas das três linhagens de camundongos induziram Tregs, o que nos mostra que o contato célula-célula auxilia na polarização de Tregs *in vitro* (Fig. 19A-B). Por outro lado, as DCs de camundongos Tlr2<sup>-/-</sup> ou Il10<sup>-/-</sup> que foram estimuladas com rHSP65 induziram menos Treg quando comparadas às DCs de camundongos WT estimuladas, mostrando que DC expressando TLR2 potencializa a diferenciação de Tregs *in vitro* (Fig. 19A-B).

Esses dados mostram que o eixo TLR2-IL-10 é importante para que rHSP65 induza perfil tolerogênico nas DCs CD103<sup>+</sup>, que por sua vez são capazes de polarizar linfócitos Th0 para Tregs *in vitro*. Mecanicamente, esses dados complementam nossos achados no modelo de DM1, com o qual mostramos que, na deficiência de TLR2, *L. lactis*-HSP65 não foi capaz de induzir cDC1 tolerogênicas no linfonodo cecal e Tregs PD-1<sup>+</sup> nos linfonodos pancreáticos. Esses eventos estão associados com a falha no controle da glicemia e consequente aumento na incidência de DM1.



**FIGURA 19.** TLR2 e IL-10 são importantes para a indução de Tregs mediada por DCs estimuladas com rHSP65 *in vitro*. Contour plots (A) e gráfico de barras (B) representativos da porcentagem de Tregs após 96h de co-cultura de linfócitos T naives (Th0) com DCs CD103<sup>+</sup> previamente estimuladas ou não com rHSP65 (12 µg/ml). Dados expressos como média ± EPM representativos de um experimento (n = 3-6 poços por condição) e analisadas pelo teste ANOVA one-way e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* vs Th0 sem DC, # vs Th0 + DC CD103<sup>+</sup> meio, & vs DC CD103<sup>+</sup> + HSP65 de WT.

## DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

As HSPs já são bem conhecidas por induzirem imunorregulação, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* [200]. Poucos estudos investigaram o efeito de HSP65 de *M. leprae* em DCs, células essenciais para a montagem de uma resposta imune ativada ou tolerogênica [201]. Nesse sentido, diferenciamos BMDCs e estimulamos com rHSP65 para avaliarmos o perfil das DCs e a produção de citocinas. Primeiramente, observamos que a proteína é capaz de ativar BMDCs, e induzir a expressão de CD103, uma integrina-chave na indução de linfócitos Tregs [202]. rHSP65 induziu cDC1 e cDC2, ambas com perfil de ativação semelhante. Funcionalmente, rHSP65 induziu significativo aumento na razão IL-10/TNF- $\alpha$  e IL-10/IL-6, sugerindo predominância do perfil regulador nessas células. Ainda mostramos que as BMDCs CD103<sup>+</sup> estimuladas previamente com rHSP65 foram capazes de induzir diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> naive para Tregs *in vitro*. Contrariando nossos dados, um estudo mostrou que rHSP65, em dose semelhante a que usamos, induziu predominantemente produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 quando comparado com IL-10. Na co-cultura com linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens, as BMDCs previamente estimuladas com rHSP65 induziram a produção de citocinas do perfil Th1, mas que foram eficazes na redução da hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas em modelo de asma alérgica [119]. Por outro lado, os dados de Spierign e colaboradores mostraram que HSP70 de micobactéria diminuiu a expressão de CD40, CD86 e MHC-II nas BMDCs, e estas apresentam baixa produção de IL-12, mesmo na presença de LPS, mostrando que HSP70 consegue prevenir a ativação de BMDCs mantendo um perfil regulador [113]. Nossos dados suportam a ideia de que rHSP65 pode ser uma estratégia eficaz de indução de tolerância oral em modelo de DM1.

Os efeitos benéficos de probióticos recombinantes em modelos experimentais de infecções, doenças inflamatórias e autoimunes vem sendo demonstrados nos últimos anos, pois constituem formas seguras e eficientes de indução de imunorregulação [203,204]. Até o momento, diversos estudos mostraram que o uso de *L. lactis* expressando HSP65 é eficiente no controle da inflamação em infecções, na colite, na artrite, na encefalomielite e no DM1. Entretanto, o mecanismo celular e os receptores envolvidos ainda não foram descritos nos modelos de DM1. Assim, tivemos como objetivo inicial avaliar os efeitos da administração oral da cepa NCDO2118 de *L. lactis* secretora de HSP65 no DM1, em um esquema profilático-terapêutico.

Em nosso modelo, utilizando  $1 \times 10^9$  CFU de *L. lactis*-HSP65 por dose, observamos que o probiótico foi capaz de reduzir a hiperglicemia em alguns camundongos com DM1 no 15º dia após início da indução com STZ, e isso se refletiu na redução da incidência da doença, que foi de 45,4%, contra 100% no grupo que não recebeu probiótico e 88,8% no grupo que recebeu *L. lactis* selvagem. Em camundongos NOD fêmeas, com 7 semanas de idade, observamos que  $2 \times 10^8$  CFU de *L. lactis*-HSP65 administrado até a 16ª semana de vida, foi capaz de controlar a hiperglicemia nas semanas 15 e 16 e reduzir a incidência de DM1 em 30%, associado com menor grau de insulite nas ilhotas pancreáticas. Nossos dados se assemelham com os obtidos em estudos que utilizaram *L. lactis* expressando HSP65 associados com peptídeos da HSP65 humana em camundongos NOD, nos quais foi observado melhor controle da hiperglicemia, redução da insulite e da incidência da doença, que foi de 20 a 40% menor quando comparado ao grupo diabético que não recebeu o probiótico [158,159]. Outras estratégias utilizando *L. lactis* expressando IL-10 + GAD65, ou antígeno I do fator de colonização (CFA/I) também foram eficazes na redução da incidência do DM1 [148,205].

Como forma complementar de avaliar o controle glicêmico em nosso modelo de DM1 induzida por STZ, realizamos o teste de tolerância à glicose (GTT), metodologia mais acurada na detecção de falhas na atividade da insulina [206]. Apesar da média da glicemia do grupo STZ + *L. lactis*-HSP65 ser maior que 200 mg/dl (critério de presença de DM1) após 120 minutos da sobrecarga de glicose, essa média é significativamente menor quando comparado ao grupo STZ que não recebeu probiótico, indicando que *L. lactis*-HSP65 melhorou a tolerância à glicose dos camundongos. Nossos dados corroboram parcialmente os publicados por Liu e colaboradores, que mostraram que a administração de *L. lactis*-HSP65-IA2P2 reduziu a glicemia no GTT para uma média inferior a 200 mg/dl, evidenciando um efeito mais robusto na tolerância a glicose [158]. Em nosso modelo observamos que *L. lactis* selvagem não exerceu efeitos benéficos no DM1, reforçando os dados já publicados anteriormente, nos quais *L. lactis* selvagem não alterou os parâmetros clínicos da doença [205].

Interessantemente, em ambos os modelos que avaliamos, os camundongos que receberam alguma das cepas de *L. lactis* apresentaram perda de peso, sem afetar o consumo de ração. Uma possível explicação para isso é que *L. lactis* reduz o peso corporal e a massa gorda peri-epididimal de forma acentuada em camundongos com obesidade [207], efeito esse que provavelmente acontece em outras condições, como DM1. Ainda sobre os parâmetros clínicos da doença, não encontramos nenhum estudo que tenha mostrado o efeito de *L. lactis*-HSP65 na concentração de insulina sérica ou no pâncreas no DM1, mas já foi mostrado que a

associação de *L. lactis* expressando IL-10 humana com injeções de anti-CD3 preservou a insulina no pâncreas de camundongos NOD, dado não observado no grupo que recebeu apenas anti-CD3, mostrando que o efeito é exercido pelo probiótico recombinante [148]. Em nosso modelo, apesar de termos observado que *L. lactis*-HSP65 preservou a produção de insulina em cortes histológicos do pâncreas, avaliados pro IHQ, não observamos diferenças significantes entre os grupos na concentração de insulina sérica. Para entender melhor esse resultado, iremos repetir a dosagem em diferentes tempos utilizando um kit de ELISA mais sensível.

Apesar da indução de DM1 com baixas doses de STZ ser imuno-mediado e amplamente utilizado, a participação de componentes autoimunes nesse modelo é controversa [208,209]. Pensando nisso, buscamos avaliar a presença de IgG anti-insulina no soro dos camundongos no modelo STZ e determinar se a administração de *L. lactis*-HSP65 altera a produção desses autoanticorpos. Na dose de STZ utilizada, não observamos aumento de IgG anti-insulina sérica no grupo que recebeu STZ em comparação com o grupo não diabético, e a administração de ambas as cepas de *L. lactis* não modulou esse autoanticorpo. Não encontramos trabalhos publicados que mostrassem a detecção de anticorpos anti-insulina no modelo STZ, mas já é bem estabelecido que em camundongos NOD [210] e em humanos [211] há maior concentração de anticorpos anti-insulina circulante. O papel de HSP65 como autoantígeno do DM1 já foi sugerido em alguns estudos, mas ainda não bem definido se essa proteína contribui com o desenvolvimento da doença [122,124]. Em nosso modelo de DM1 induzida com STZ, detectamos que os camundongos diabéticos apresentam uma média de IgG anti-HSP65 maior no soro em relação ao grupo não diabético, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, o grupo diabético que recebeu *L. lactis*-HSP65 apresentou redução significativa no título desse anticorpo em relação ao grupo diabético que não recebeu *L. lactis*. Esse dado, isoladamente, não define se HSP65 é de fato um autoantígeno importante, responsável por induzir autoanticorpos na doença, mas comprova que *L. lactis*-HSP65 foi capaz de induzir tolerância oral à HSP65, de forma antígeno-específica, como mostrado por outros grupos que utilizaram a mesma estratégia em modelo de artrite e encefalomielite autoimune [157,212].

Como observamos que *L. lactis*-HSP65 melhorou os parâmetros clínicos de DM1, nossos próximos passos foram investigar os possíveis mecanismos associados. Alguns estudos mostraram que há uma correlação entre inflamação intestinal, alterações na função de barreira e DM1, tanto em camundongos como em humanos [213–215]. Portanto, avaliamos a

inflamação, a produção de muco e a expressão de genes associados a manutenção da barreira intestinal no cólon dos camundongos. Em nossos dados, a indução de DM1 com STZ não alterou o comprimento do cólon, entretanto, outros estudos mostraram que a administração de STZ em ratos aumentou o comprimento do cólon dos animais, como possível consequência do remodelamento da matriz extracelular induzido pela polifagia observada em ratos com DM1[216,217]. Por outro lado, foi mostrado que o STZ potencializa o encurtamento do cólon induzido por DSS em modelo de colite [218]. A administração de *L. lactis*, selvagem ou recombinante, também não alterou o comprimento do cólon quando comparamos com os demais grupos. Em relação às células caliciformes e produção de muco, constatamos que camundongos com DM1 induzida por STZ apresentaram redução na porcentagem de células caliciformes, na expressão gênica de Muc1 e de Il22 no cólon quando comparamos com o grupo não diabético, sugerindo que DM1 afeta parcialmente a função de barreira intestinal, já que a camada de muco é importante na proteção contra patógenos [219]. Nossos dados estão de acordo com dados publicados por outros grupos, que mostraram prejuízos na produção de muco em camundongos NOD [46] e em pacientes com DM1 [29]. Interessantemente, observamos que *L. lactis*, independente de HSP65, preserva a produção de muco e a expressão gênica de Il22 no cólon, uma citocina importante na manutenção da camada de muco intestinal [220]. Outros estudos já demonstraram que diversas espécies de probióticos potencializam a produção de muco [221] e são dependentes de IL-22 para promoverem seus efeitos benéficos no intestino [222].

Além da produção de muco, a produção de peptídeos antimicrobianos e a manutenção das proteínas de junção são essenciais para preservar a homeostase da permeabilidade intestinal [223]. Nossos resultados mostraram que *L. lactis*, selvagem ou recombinante, induz aumento na expressão de Reg3g no cólon quando comparada ao grupo STZ. Outros probióticos, como *Bifidobacterium breve*, também são capazes de induzir Reg3g no intestino [181]. Esse peptídeo antimicrobiano é produzido principalmente pelas células de Paneth, e são fundamentais no controle de bactérias patogênicas e da inflamação no epitélio do intestino [182]. Em nosso modelo, observamos que *L. lactis*-HSP65 aumentou consideravelmente a expressão de ZO-1 no cólon quando comparada ao grupo STZ, suportando a ideia de que o probiótico reforça a função de barreira intestinal aumentando também a expressão dessa proteína de junção, que geralmente é prejudicada em pacientes com doenças inflamatórias intestinais [224] e diabetes [215].



Buscando avaliar os efeitos de *L. lactis*-HSP65 nos mecanismos de imunorregulação induzidos no intestino durante DM1, observamos que alguns genes relacionados a DCs com perfil tolerogênico estavam aumentados no cólon, como *Ido1*, *Aldh1a2*, *Pd11*, *Tgfb* e *Irf8*, em comparação com o grupo diabético que não recebeu *L. lactis*-HSP65. As DCs tolerogênicas do intestino mantêm sua capacidade de apresentar antígenos, mas paralelamente regulam negativamente a expressão de moléculas coestimuladoras de células T e citocinas pró-inflamatórias, enquanto aumentam a expressão de moléculas inibitórias como PD-L1, CD95L ou IDO, bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10 [40]. Em nosso modelo, observamos que *L. lactis*-HSP65 aumentou cDC1 (CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>) quando comparamos com os grupos não diabético e diabético que receberam *L. lactis* selvagem, sugerindo que a HSP65 é capaz de induzir essa população de DCs no LC, enquanto as cDC2 (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) não foi alterada. De forma oposta, nos LJI não observamos diferenças nas cDC1, enquanto o número absoluto de cDC2 foi maior no grupo diabético que recebeu *L. lactis*-HSP65 quando comparado com o grupo diabético. Estes dados sugerem que há uma compartimentalização de indução dessas populações ao longo do intestino, que pode variar de acordo com a região avaliada.

Como TLR2 pode reconhecer as HSPs e contribuir com a indução dos efeitos imunorreguladores [111], avaliamos a expressão de TLR2 na superfície das populações de cDCs. Interessantemente, observamos que somente *L. lactis*-HSP65 aumentou a porcentagem de cDC1 TLR2<sup>+</sup> no LC, e esse efeito não se reproduziu nas cDC2. Adicionalmente, o probiótico recombinante também aumentou a intensidade da expressão de TLR2 nas cDC1 dos LJI. Já foi mostrado que em camundongos NOD pré-diabéticos e com diabetes estabelecida há redução das cDC1 quando comparado com o grupo não diabético [46], no entanto, a indução dessas populações de DCs não é um efeito exclusivo de *L. lactis*-HSP65 no DM1. De forma semelhante a nossos dados, já foi mostrado que *L. lactis*-HSP65 administrado pela via oral induziu a cDC1 no baço, mas não nos linfonodos mesentéricos, durante a colite [225]. Além disso, nossos dados vão de encontro com os publicados por Nelson e colaboradores, que mostraram que *L. lactis* expressando CFA/I induz cDC1 nos linfonodos mesentéricos, concomitantemente com o aumento de IL-10, TGF- $\beta$  e IDO, moléculas inibitórias com perfil regulador [226].

As células Tregs são as indutoras-chave de tolerância periférica [227]. Em nosso modelo observamos que *L. lactis*-HSP65 aumenta o número absoluto de Tregs no LC, bem como a intensidade de expressão de PD-1 nessas células, sugerindo maior atividade

supressora, e ainda induz aumento de Tregs LAP<sup>+</sup> no LP. Esses dados reforçam a capacidade indutora de Tregs de *L. lactis*-HSP65 já mostrada nos linfonodos inguinais em modelo de encefalomielite autoimune [212], nos linfonodos mesentéricos em modelo de colite [156] e no baço em modelo de artrite [157]. As células Tregs obtidas de camundongos NOD apresentam baixa expressão de LAP e outros marcadores inibitórios, como PD-1 e CD39 [228–230], e, em concordância com nossos dados, já foi mostrado que o envolvimento de LAP na capacidade supressora de Tregs induzida por *L. lactis*-HSP65 é essencial para a proteção contra o desenvolvimento de encefalomielite autoimune [212]. Em concordância com o aumento de Tregs induzido por *L. lactis*-HSP65 observado em nosso modelo, observamos que o probiótico recombinante aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  no cólon e no pâncreas, e IL-10 no pâncreas. De forma semelhante, Yanjun e colaboradores mostraram que a administração de *L. lactis*-HSP65-P277 aumenta a produção de IL-10 em esplenócitos, de forma antígeno-específica [159].

Além disso, já foi mostrado que existe uma correlação negativa entre a expressão de IL-10 nas células do sangue periférico e o tempo de diagnóstico em pacientes com DM1, sugerindo que a expressão dessa citocina vai diminuído durante o curso da doença [231]. Nos modelos de colite, artrite e encefalomielite já foi observado que *L. lactis*-HSP65 aumenta a produção dessas citocinas anti-inflamatórias e estão associadas com a atenuação ou prevenção da doença [156,157,212], mostrando que esse efeito é bastante característico desse probiótico, independente do contexto. Apesar de observamos diferenças nas citocinas anti-inflamatórias, *L. lactis*-HSP65 não modulou a produção de IL-17 ou IFN- $\gamma$  no cólon, íleo ou pâncreas no tempo avaliado em nosso modelo. De forma contrária, a administração de *L. lactis*-HSP65-P277 ou expressando CFA/I, ou ainda *L. lactis*-HSP65 em outros modelos de doenças autoimunes foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$  [156,159,226].

Após determinarmos que *L. lactis*-HSP65 protege contra DM1 e induz cDC1 TLR2<sup>+</sup> e Tregs no LC e LP, nosso passo seguinte foi avaliar se os receptores TLR2 e TLR4 poderiam mediar os efeitos imunorreguladores de *L. lactis*-HSP65. Vários estudos já haviam sugerido que as HSPs podem induzir efeitos em APCs após interação com receptores do tipo *Toll* [111,112], o que reforçou nossa hipótese de que a HSP65 secretada pelo probiótico estaria envolvida na proteção observada. De fato, observamos que camundongos deficientes de TLR2 não foram protegidos contra o desenvolvimento de DM1 após administração de *L. lactis*-HSP65 quando comparamos com o grupo WT. Na deficiência desse receptor, os

camundongos apresentaram maior hiperglicemia, encurtamento do cólon e maior porcentagem de ilhotas pancreáticas com insulite invasiva. Por outro lado, a deficiência de TLR4 não alterou a glicemia de jejum quando comparamos com o grupo WT durante a administração de *L. lactis*-HSP65. Em paralelo a esses dados, observamos que na deficiência de TLR2 a geração de cDC1 XCR1<sup>+</sup> fica comprometida no LC, bem como a indução de Tregs, a expressão de PD-1 no LP e a produção de IL-10 no pâncreas. Esses dados em conjunto, nos mostra que de fato a proteção induzida por *L. lactis*-HSP65 é dependente de TLR2, pois esse receptor é importante para a indução desses efeitos tolerogênicos. De forma semelhante, Filippi e colaboradores mostraram que a sinalização de TLR2 melhora a imunorregulação no DM1 [232]. Neste estudo, os autores mostraram que a ativação de TLR2 com um agonista sintético, o P3C, reduziu a incidência de DM1 em camundongos NOD. Em paralelo, o agonista de TLR2 aumentou a porcentagem de Tregs nos LP e no baço dos camundongos, e foi observado que o tratamento com P3C conferiu às Tregs a capacidade de diminuir a incidência de DM1 neste modelo. Além disso, as DCs dos linfonodos de camundongos que receberam P3C apresentam perfil tolerogênico e foram capazes de proteger contra DM1 após transferência adotiva, o que não ocorre com as DCs de camundongos que não receberam P3C [232]. Em conjunto, esses dados vão de encontro com o que observamos em nosso modelo, mas em nosso caso, a HSP65 seria o “agonista de TLR2” responsável por promover os efeitos imunorreguladores.

A importância de TLR2 na indução de Tregs também já foi mostrada em outros modelos. Nossos dados corroboram com a pesquisa de Gomes-Santos e colaboradores, que mostrou que *L. lactis*-HSP65 protege contra a colite de forma dependente de TLR2, pois esse receptor foi essencial para a produção de IL-10 no homogenato de cólon e para a indução de Tregs no baço e linfonodos mesentéricos dos animais com colite [156]. A dependência de TLR2 para proteção mediada por *L. lactis*-HSP65 também foi observada em modelo de artrite experimental [157].

Com os dados descritos até o momento, associamos a deficiência sistêmica de TLR2 com a redução de cDC1, mas ainda não podemos afirmar que é a deficiência nas DCs que compromete a proteção contra DM1. Para avaliar esse efeito, utilizamos BMDCs de deficientes de TLR2 para determinar se rHSP65 atua via esse receptor especificamente nas DCs. Primeiramente, observamos que após 24 horas de estímulo com rHSP65, a expressão gênica de *Il10* e *Irf8* foram comprometidas na deficiência de TLR2, sugerindo HSP65 utiliza TLR2 para indução do perfil tolerogênico de cDC1 nas BMDCs. A importância de TLR2 para

indução de Il10 e Irf8 já foi reportada em APCs [233,234]. Por citometria de fluxo, nós observamos que de fato na deficiência de TLR2, rHSP65 perde a capacidade de induzir cDC1 *in vitro*, enquanto a diferenciação de cDC2 não foi alterada. Além disso, as BMDCs Tlr2<sup>-/-</sup> produzem menos IL-10 após estímulo com rHSP65 quando comparado às BMDCs WT. Esses dados corroboram os achados de Chamorro e colaboradores, que verificaram que DC tolerogênicas humanas estimuladas aumentam a expressão de TLR2 e adquirem o perfil regulador devido à produção de IL-10, que é dependente de TLR2 [235].

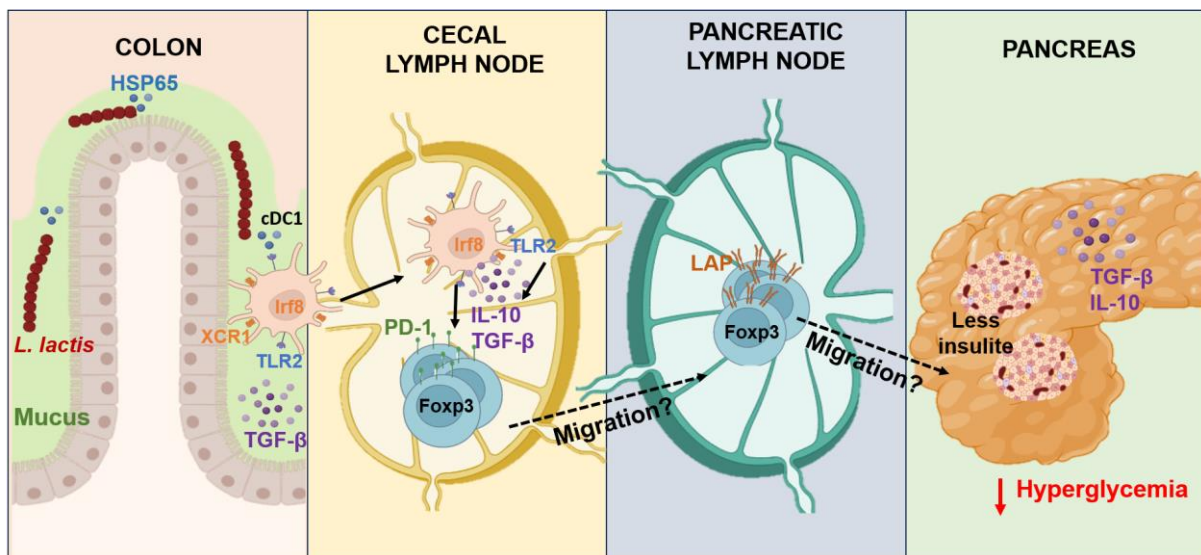
As DCs CD103<sup>+</sup> na lâmina própria intestinal são condicionadas por fatores derivados de outras células ou provenientes da dieta, como ácido retinóico, por exemplo. Uma vez condicionadas, as DCs migram para os linfonodos drenantes, onde induzem o desenvolvimento de células Foxp3<sup>+</sup>, que migram preferencialmente de volta para o cólon via CCR9 e controlam a inflamação intestinal ou ainda podem migrar para outros tecidos [202,236]. Partindo desse pressuposto, avaliamos se TLR2 e IL-10 são importantes para que as BMDC CD103<sup>+</sup> estimuladas com rHSP6 induzam Tregs *in vitro*. Como esperado, observamos que BMDCs deficientes de TLR2 ou de IL-10 apresentam prejuízo na geração de Treg após 24 horas de estímulo com rHSP65. Esse dado corrobora com os achados de Wang e colaboradores, que também observaram que a expressão de TLR2 nas BMDCs é importante para a indução de Treg após estímulo com um antígeno derivado de HSP60 de *Schistosoma japonicum* [237]. Por outro lado, nossos dados diferem dos obtidos por Nyirenda e colaboradores, que observaram que a estimulação com o P3C reduziu a função de Treg e induziu polarização de Th17 em amostras de pacientes com esclerose múltipla, sugerindo um efeito prejudicial após ativação de TLR2 [238].

Em conjuntos, nossos dados evidenciam que *L. lactis*-HSP65 melhora a hiperglicemia e reduz a incidência de DM1, induz expressão de genes associados à função de barreira intestinal e promove mecanismos de imunorregulação durante o DM1. Além disso, mostramos que o probiótico recombinante induz seus efeitos benéficos por meio de DCs tolerogênicas expressando TLR2. Esses dados reforçam que o uso de probióticos recombinantes pode ser uma estratégia terapêutica eficiente no controle de DM1.

CONCLUSÃO

## 6 CONCLUSÃO

A HSP65 recombinante é capaz de induzir perfil tolerogênico em BMDC, e essas, expressando CD103, são eficientes na diferenciação de Treg *in vitro*. *L. lactis* expressando HSP65 administrado pela via oral reduz a hiperglicemia e a incidência de DM1, bem como aumenta a expressão de genes relacionados à função de barreira intestinal. Como mecanismo envolvido, demonstramos que a indução de cDC1 no LC, Tregs no LP e produção de IL-10 no pâncreas é parcialmente dependente de TLR2, cuja sinalização é essencial para a imunorregulação mediada por *L. lactis*-HSP65 (Figura 20).



**FIGURA 20.** A indução de cDC1 TLR2<sup>+</sup> é associada com a proteção contra DM1 mediada por *L. lactis*-HSP65. Na mucosa intestinal, *L. lactis* secreta a HSP65, induzindo aumento de muco no cólon dos animais com DM1. Ainda no intestino, *L. lactis*-HSP65 induz aumento de TLR2 nas cDC1 XCR1<sup>+</sup>, e da liberação das citocinas TGF-β. No linfonodo cecal (LC), as cDC1 TLR2<sup>+</sup>, provavelmente carregando peptídeos derivados da HSP65, induzem diferenciação de Tregs PD-1<sup>+</sup>, que provavelmente migram para o linfonodo pancreático (LP), onde expressam LAP. No pâncreas, as Tregs são recrutadas liberam IL-10 e TGF-β, controlando a inflamação e reduzindo a insulite e hiperglicemia no DM1.

## REFERÊNCIAS

1. Kharroubi AT. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6:850.
2. WILCOX G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:19–30.
3. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 2017;3:1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00561-3>
4. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017;66:241–55.
5. Al-Lawati JA. Diabetes mellitus: A local and global public health emergency! *Oman Med J*. 2017;32:177–9.
6. ASSOCIATION AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33.
7. Ogrotis I, Koufakis T, Kotsa K. Changes in the Global Epidemiology of Type 1 Diabetes in an Evolving Landscape of Environmental Factors: Causes, Challenges, and Opportunities. *Medicina (Kaunas)*. Switzerland; 2023;59.
8. Aschner P, Basit A, Fawwad A, Guariguata L, James S, Karuranga S, et al. IDF Atlas Reports. *Int Diabetes Fed*. 2022;102:147–8.
9. Krischer JP, Lynch KF, Schatz DA, Ilonen J, Lernmark A, Hagopian WA, et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*. Germany; 2015;58:980–7.
10. McLaughlin RJ, Spindler MP, van Lummel M, Roep BO. Where, How, and When: Positioning Posttranslational Modification Within Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep* [Internet]. Springer US; 2016;16:63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168063>
11. van Lummel M, Duinkerken G, van Veelen PA, de Ru A, Cordfunke R, Zaldumbide A, et al. Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes. *Diabetes*. United States; 2014;63:237–47.
12. Clark M, Kroger CJ, Tisch RM. Type 1 diabetes: A chronic anti-self-inflammatory response. *Front Immunol*. 2017;8.
13. Sims EK, Mirmira RG, Evans-Molina C. The role of beta-cell dysfunction in early type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. England; 2020;27:215–24.
14. Pugliese A. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. Denmark; 2016;17 Suppl 22:31–6.
15. Bettini M, Bettini ML. Function, Failure, and the Future Potential of Tregs in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. United States; 2021;70:1211–9.
16. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. United States; 2002;109:131–40.
17. Pesenacker AM, Wang AY, Singh A, Gillies J, Kim Y, Piccirillo CA, et al. A Regulatory T-Cell Gene Signature Is a Specific and Sensitive Biomarker to Identify Children With New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes*. United States; 2016;65:1031–9.
18. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008;8:523–32. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri2343>
19. Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes

- and transplantation. *Eur J Immunol*. Germany; 2008;38:931–4.
20. Song J. Development of Auto Antigen-specific Regulatory T Cells for Diabetes Immunotherapy. *Immune Netw*. Korea (South); 2016;16:281–5.
21. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*. United States; 2012;35:1817–20.
22. Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *lancet Diabetes Endocrinol*. England; 2013;1:295–305.
23. Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. England; 2018;153:161–70.
24. Li X, Atkinson MA. The role for gut permeability in the pathogenesis of type 1 diabetes--a solid or leaky concept? *Pediatr Diabetes*. Denmark; 2015;16:485–92.
25. Jacob N, Jaiswal S, Maheshwari D, Nallabelli N, Khatri N, Bhatia A, et al. Butyrate induced Tregs are capable of migration from the GALT to the pancreas to restore immunological tolerance during type-1 diabetes. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10:19120. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76109-y>
26. Okumura R, Takeda K. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. Japan; 2016;92:423–35.
27. Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2019;15:226–37. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
28. Yang S, Yu M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res*. New Zealand; 2021;14:3171–83.
29. Lo Conte M, Cosorich I, Ferrarese R, Antonini Cencicchio M, Nobili A, Palmieri V, et al. Alterations of the intestinal mucus layer correlate with dysbiosis and immune dysregulation in human Type 1 Diabetes. *EBioMedicine*. Netherlands; 2023;91:104567.
30. Wallaey C, Garcia-Gonzalez N, Libert C. Paneth cells as the cornerstones of intestinal and organismal health: a primer. *EMBO Mol Med*. England; 2023;15:e16427.
31. Yu T, Yang H-S, Lu X-J, Xia Z-S, Ouyang H, Shan T-D, et al. Association of Bactericidal Dysfunction of Paneth Cells in Streptozocin-Induced Diabetic Mice with Insulin Deficiency. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. United States; 2016;22:3062–72.
32. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. United States; 2018;174:1054–66.
33. Fan H, Wang A, Wang Y, Sun Y, Han J, Chen W, et al. Innate Lymphoid Cells: Regulators of Gut Barrier Function and Immune Homeostasis. *J Immunol Res*. Egypt; 2019;2019:2525984.
34. Saksida T, Paunović V, Koprivica I, Mićanović D, Jevtić B, Jonić N, et al. Development of Type 1 Diabetes in Mice Is Associated with a Decrease in IL-2-Producing ILC3 and FoxP3+ Treg in the Small Intestine. *Molecules* [Internet]. 2023;28. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/8/3366>
35. Yip JLK, Balasuriya GK, Spencer SJ, Hill-Yardin EL. The Role of Intestinal Macrophages in Gastrointestinal Homeostasis: Heterogeneity and Implications in Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. United States; 2021;12:1701–18.
36. Bain CC, Schridde A. Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:1–15.
37. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same



- Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2013;6:498–510. Available from: <https://doi.org/10.1038/mi.2012.89>
38. Galvão Tessaro FH, Ayala TS, Bella LM, Martins JO. Macrophages from a type 1 diabetes mouse model present dysregulated PI3K/AKT, ERK 1/2 and SAPK/JNK levels. *Immunobiology* [Internet]. 2020;225:151879. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298519300142>
39. Nie L, Zhao P, Yue Z, Zhang P, Ji N, Chen Q, et al. Diabetes induces macrophage dysfunction through cytoplasmic dsDNA/AIM2 associated pyroptosis. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2021;110:497–510. Available from: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.3MA0321-745R>
40. Steimle A, Frick J-S. Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J Immunol Res*. Egypt; 2016;2016:1958650.
41. Moreira TG, Mangani D, Cox LM, Leibowitz J, Lobo ELC, Oliveira MA, et al. PD-L1+ and XCR1+ dendritic cells are region-specific regulators of gut homeostasis. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12:4907. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25115-3>
42. Cerovic V, Houston SA, Westlund J, Utriainen L, Davison ES, Scott CL, et al. Lymph-borne CD8 $\alpha$ + dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8+ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2015;8:38–48. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933021922008030>
43. Cerovic V, Houston SA, Scott CL, Aumeunier A, Yrlid U, Mowat AM, et al. Intestinal CD103– dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2013;6:104–13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933021922011709>
44. Sichien D, Scott CL, Martens L, Vanderkerken M, Van Gassen S, Plantinga M, et al. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity*. United States; 2016;45:626–40.
45. Lança T, Ungerbäck J, Da Silva C, Joeris T, Ahmadi F, Vandamme J, et al. IRF8 deficiency induces the transcriptional, functional, and epigenetic reprogramming of cDC1 into the cDC2 lineage. *Immunity*. United States; 2022;55:1431-1447.e11.
46. Miranda MCG, Oliveira RP, Torres L, Aguiar SLF, Pinheiro-Rosa N, Lemos L, et al. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol*. 2019;106:513–29.
47. VASQUEZ AC, FEILI-HARIRI M, TAN RJ, MOREL PA. Qualitative and quantitative abnormalities in splenic dendritic cell populations in NOD mice. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2004;135:209–18. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02359.x>
48. Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med*. United States; 2005;202:1051–61.
49. Bengt J-L, Marcus S, Oliver P, Caroline P, Gabriel M, Reinhold F, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing . *J Exp Med* [Internet]. 2005;202:1063–73. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20051100>
50. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo C V, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. United States; 2007;204:1757–64.
51. Zhu B, Buttrick T, Bassil R, Zhu C, Olah M, Wu C, et al. IL-4 and Retinoic Acid Synergistically Induce Regulatory Dendritic Cells Expressing Aldh1a2. *J Immunol* [Internet]. 2013;191:3139–51. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300329>
52. Liang J, Huang H-I, Benzatti FP, Karlsson AB, Zhang JJ, Youssef N, et al. Inflammatory Th1 and Th17 in the Intestine Are Each Driven by Functionally Specialized Dendritic Cells with Distinct Requirements for MyD88. *Cell Rep*. United States; 2016;17:1330–43.

53. Farache J, Koren I, Milo I, Gurevich I, Kim K-W, Zigmund E, et al. Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. *Immunity* [Internet]. 2013;38:581–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761313000496>
54. Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016;9:468–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933021922008753>
55. Laffont S, Siddiqui KRR, Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010;40:1877–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.200939957>
56. Domogalla MP, Rostan P V., Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through education: How tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1–14.
57. Zhuang Q, Cai H, Cao Q, Li Z, Liu S, Ming Y. Tolerogenic Dendritic Cells: The Pearl of Immunotherapy in Organ Transplantation. *Front Immunol*. Switzerland; 2020;11:552988.
58. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. United States; 1990;248:1349–56.
59. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006;6:476–83. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri1845>
60. Lee L-F, Xu B, Michie SA, Beilhack GF, Warganich T, Turley S, et al. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2005;102:15995–6000.
61. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. United States; 2002;196:447–57.
62. Mellor AL, Munn DH. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004;4:762–74. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri1457>
63. Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD. The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*. United States; 2007;179:5041–53.
64. Wölflle SJ, Strebovsky J, Bartz H, Sähr A, Arnold C, Kaiser C, et al. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol*. Germany; 2011;41:413–24.
65. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer J-P, Cottrez F, Groux H. Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and Tregulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity* [Internet]. 2003;18:605–17. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761303001134>
66. Esebanmen GE, Langridge WHR. The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol Res*. United States; 2017;65:987–94.
67. Toms C, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect* [Internet]. 2001;3:929–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645790101454X>
68. Figliuolo da Paz VR, Jamwal DR, Kiela PR. Intestinal Regulatory T Cells. *Adv Exp Med Biol*. United States; 2021;1278:141–90.
69. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, Ng DCK, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* [Internet]. Elsevier; 2011;34:794–806. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
70. Koshida K, Ito M, Yakabe K, Takahashi Y, Tai Y, Akasako R, et al. Dysfunction of Foxp3(+)

Regulatory T Cells Induces Dysbiosis of Gut Microbiota via Aberrant Binding of Immunoglobulins to Microbes in the Intestinal Lumen. *Int J Mol Sci.* Switzerland; 2023;24.

71. Kehrman J, Effenberg L, Wilk C, Schoemer D, Ngo Thi Phuong N, Adamczyk A, et al. Depletion of Foxp3(+) regulatory T cells is accompanied by an increase in the relative abundance of Firmicutes in the murine gut microbiome. *Immunology.* England; 2020;159:344–53.

72. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* England; 2013;25:305–12.

73. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol.* Switzerland; 2015;6:639.

74. Almeida ARM, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol.* United States; 2002;169:4850–60.

75. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* [Internet]. 2014;259:88–102. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12160>

76. Vesperas A, Vignali DAA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol.* United States; 2016;197:3762–70.

77. Mariño E, Villanueva J, Walters S, Liuwantara D, Mackay F, Grey ST. CD4(+)CD25(+) T-cells control autoimmunity in the absence of B-cells. *Diabetes.* United States; 2009;58:1568–77.

78. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol.* United States; 2007;8:931–41.

79. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich J-M, et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* United States; 2011;34:566–78.

80. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* United States; 2006;25:441–54.

81. Kotlarz D, Marquardt B, Barøy T, Lee WS, Konnikova L, Hollizeck S, et al. Human TGF-β1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nat. Genet.* United States; 2018. p. 344–8.

82. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17:1322–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.3540>

83. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, et al. Defects in IL-2R Signaling Contribute to Diminished Maintenance of FOXP3 Expression in CD4+CD25+ Regulatory T-Cells of Type 1 Diabetic Subjects. *Diabetes* [Internet]. 2009;59:407–15. Available from: <https://doi.org/10.2337/db09-0694>

84. Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, et al. Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol.* Germany; 2004;34:3485–96.

85. Tekguc M, Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States; 2021;118.

86. Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, Arce F, Bennett CL, Collins M, et al. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol Med.* England; 2011;3:581–92.

87. Maruya M, Kawamoto S, Kato LM, Fagarasan S. Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency. *Gut Microbes* [Internet]. Taylor & Francis; 2013;4:165–71. Available from: <https://doi.org/10.4161/gmic.23595>
88. Park SJ, Kim J-H, Song M-Y, Sung YC, Lee S-W, Park Y. PD-1 deficiency protects experimental colitis via alteration of gut microbiota. *BMB Rep. Korea (South)*; 2017. p. 578–83.
89. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* [Internet]. 2009;10:1185–92. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1790>
90. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. United States*; 2009;23:1685–93.
91. Rissiek A, Baumann I, Cuapio A, Mautner A, Kolster M, Arck PC, et al. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J Autoimmun* [Internet]. 2015;58:12–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841114001863>
92. Cronstein BN, Haskó G. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Front Immunol* [Internet]. 2013;4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2013.00085>
93. Gu J, Ni X, Pan X, Lu H, Lu Y, Zhao J, et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2017;14:521–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.30>
94. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *Int J Mol Sci. Switzerland*; 2021;22.
95. Loebbermann J, Thornton H, Durant L, Sparwasser T, Webster KE, Sprent J, et al. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2012;5:161–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/mi.2011.62>
96. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Pivnicka-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity. United States*; 2007;27:635–46.
97. Velaga S, Ukena SN, Dringenberg U, Alter C, Pardo J, Kershaw O, et al. Granzyme A Is Required for Regulatory T-Cell Mediated Prevention of Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *PLoS One. United States*; 2015;10:e0124927.
98. Sorini C, Cosorich I, Lo Conte M, De Giorgi L, Facciotti F, Lucianò R, et al. Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2019;116:15140–9.
99. Vaarala O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol. United States*; 2012;90:271–6.
100. Baekkeskov S, Hubbell JA, Phelps EA. Bioengineering strategies for inducing tolerance in autoimmune diabetes. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2017;114:256–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X17300911>
101. Beumer W, Welzen-Coppens JMC, van Helden-Meeuwssen CG, Gibney SM, Drexhage HA, Versnel MA. The gene expression profile of CD11c+ CD8α- dendritic cells in the pre-diabetic pancreas of the NOD mouse. *PLoS One. United States*; 2014;9:e103404.
102. Wedgwood KCA, Richardson SJ, Morgan NG, Tsaneva-Atanasova K. Spatiotemporal Dynamics of Insulinitis in Human Type 1 Diabetes. *Front Physiol. Switzerland*; 2016;7:633.
103. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm. China*; 2022;3:e161.

104. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules*. 2018.
105. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RFM, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels* [Internet]. 2000;15:18–22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s003800070043>
106. Jackson SE. Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem*. Germany; 2013;328:155–240.
107. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. Switzerland; 2005;62:670–84.
108. Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol*. United States; 1989;9:2279–83.
109. Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2015;1854:291–319. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963914003355>
110. Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2016;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2016.00159>
111. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. United States; 2002;277:15028–34.
112. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJC, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol*. Switzerland; 2012;3:95.
113. Spiering R, van der Zee R, Wagenaar J, van Eden W, Broere F. Mycobacterial and mouse HSP70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells. *Cell Stress Chaperones*. Netherlands; 2013;18:439–46.
114. Motta A, Schmitz C, Rodrigues L, Ribeiro F, Teixeira C, Detanico T, et al. Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology*. England; 2007;121:462–72.
115. Luo X, Zuo X, Zhang B, Song L, Wei X, Zhou Y, et al. Release of heat shock protein 70 and the effects of extracellular heat shock protein 70 on the production of IL-10 in fibroblast-like synoviocytes. *Cell Stress Chaperones*. Netherlands; 2008;13:365–73.
116. Santos-Junior RR, Sartori A, De Franco M, Filho OGR, Coelho-Castelo AAM, Bonato VLD, et al. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther*. United States; 2005;16:1338–45.
117. Lima KM, dos Santos SA, Santos RR, Brandão IT, Rodrigues JM, Silva CL. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *Vaccine* [Internet]. 2003;22:49–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03005437>
118. Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Souza ACCO, Faccioli LH, Coelho-Castelo AAM, et al. HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine* [Internet]. 2010;28:1528–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X09018659>
119. Shin YS, Takeda K, Shiraishi Y, Jeong YY, Domenico J, Jia Y, et al. Microbial heat shock protein 65 attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation by modulating the function of dendritic cells. *J Immunol*. United States; 2012;189:3404–10.
120. Santos RR, Sartori A, Lima DS, Souza PRM, Coelho-Castelo AAM, Bonato VLD, et al. DNA vaccine containing the mycobacterial hsp65 gene prevented insulinitis in MLD-STZ diabetes. *J Immune Based Ther Vaccines* [Internet]. 2009;7:4. Available from: <https://doi.org/10.1186/1476-8518-7-4>

121. Liang J, Aihua Z, Yu W, Yong L, Jingjing L. HSP65 serves as an immunogenic carrier for a diabetogenic peptide P277 inducing anti-inflammatory immune response in NOD mice by nasal administration. *Vaccine* [Internet]. 2010;28:3312–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10002963>
122. Moin ASM, Nandakumar M, Diane A, Dehbi M, Butler AE. The Role of Heat Shock Proteins in Type 1 Diabetes. *Front Immunol. Switzerland*; 2020;11:612584.
123. Tun RYM, Smith MD, Lo SSS, Rook GAW, Lydyard P, Leslie RDG. Antibodies to Heat Shock Protein 65 kD in Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabet Med* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1994;11:66–70. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1994.tb00232.x>
124. Rani PS, Babajan B, Tulsian NK, Begum M, Kumar A, Ahmed N. Mycobacterial Hsp65 potentially cross-reacts with autoantibodies of diabetes sera and also induces (in vitro) cytokine responses relevant to diabetes mellitus. *Mol Biosyst. England*; 2013;9:2932–41.
125. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol. United States*; 2018;55:107–17.
126. Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017;16:55. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>
127. Kleerebezem M, Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2003;14:232–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166903000338>
128. Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2008;121:123–38. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507004941>
129. Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int Dairy J* [Internet]. 2002;12:91–109. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694601001510>
130. Cavanagh D, Fitzgerald GF, McAuliffe O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol* [Internet]. 2015;47:45–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014002615>
131. Yong G, Ying L, Kun-Ling T, Mei-Ling C, Hua-Jun Z, Yong-Qiang Z, et al. Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a Probiotic Strain Isolated from the Vaginas of Healthy Women. *J Bacteriol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2011;193:2886–7. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.00358-11>
132. Meyrand M, Guillot A, Goin M, Furlan S, Armalyte J, Kulakauskas S, et al. Surface proteome analysis of a natural isolate of *Lactococcus lactis* reveals the presence of pili able to bind human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Proteomics. United States*; 2013;12:3935–47.
133. Tan EW, Tan KY, Phang LV, Kumar PV, In LLA. Enhanced gastrointestinal survivability of recombinant *Lactococcus lactis* using a double coated mucoadhesive film approach. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2019;14:e0219912. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219912>
134. Wels M, Siezen R, van Hijum S, Kelly WJ, Bachmann H. Comparative Genome Analysis of *Lactococcus lactis* Indicates Niche Adaptation and Resolves Genotype/Phenotype Disparity. *Front Microbiol* [Internet]. 2019;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00004>
135. Alves JL, Lemos L, Rodrigues NM, Pereira VB, Barros PAV, Canesso MCC, et al. Immunomodulatory effects of different strains of *Lactococcus lactis* in DSS-induced colitis. *Brazilian J Microbiol* [publication Brazilian Soc Microbiol. Brazil; 2023;54:1203–15.

136. Yu D, Xia Y, Ge L, Tan B, Chen S. Effects of *Lactococcus lactis* on the Intestinal Functions in Weaning Piglets. *Front Nutr. Switzerland*; 2021;8:713256.
137. Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol. Switzerland*; 2008;14:48–58.
138. Frelet-Barrand A. *Lactococcus lactis*, an Attractive Cell Factory for the Expression of Functional Membrane Proteins. *Biomolecules*. 2022.
139. Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, et al. *Lactococcus lactis*, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2007;14:48–58. Available from: <https://doi.org/10.1159/000106082>
140. Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2004;239:205–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.018>
141. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A New Strategy for Vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol. Iran*; 2017;9:163–8.
142. Arora T, Wegmann U, Bobhate A, Lee YS, Greiner TU, Drucker DJ, et al. Microbially produced glucagon-like peptide 1 improves glucose tolerance in mice. *Mol Metab. Germany*; 2016;5:725–30.
143. Liu S, Li Y, Deng B, Xu Z. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine insulin-like growth factor I ameliorates DSS-induced colitis in mice. *BMC Biotechnol. England*; 2016;16:25.
144. Campos GM, Américo MF, Dos Santos Freitas A, Barroso FAL, da Cruz Ferraz Dutra J, Quaresma LS, et al. *Lactococcus lactis* as an Interleukin Delivery System for Prophylaxis and Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Probiotics Antimicrob Proteins. United States*; 2023;1–15.
145. Wang J, Tian M, Li W, Hao F. Preventative delivery of IL-35 by *Lactococcus lactis* ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol. Germany*; 2019;103:7931–41.
146. Maddaloni M, Kochetkova I, Hoffman C, Pascual DW. Delivery of IL-35 by *Lactococcus lactis* Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol. Switzerland*; 2018;9:2691.
147. del Carmen S, Martín Rosique R, Saraiva T, Zurita-Turk M, Miyoshi A, Azevedo V, et al. Protective Effects of Lactococci Strains Delivering Either IL-10 Protein or cDNA in a TNBS-induced Chronic Colitis Model. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2014;48. Available from: [https://journals.lww.com/jcge/fulltext/2014/11001/protective\\_effects\\_of\\_lactococci\\_strains.7.aspx](https://journals.lww.com/jcge/fulltext/2014/11001/protective_effects_of_lactococci_strains.7.aspx)
148. Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, Robert S, Grieco FA, Caluwaerts S, et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest. United States*; 2012;122:1717–25.
149. Preisser TM, da Cunha VP, Santana MP, Pereira VB, Cara DC, Souza BM, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* Carrying IL-4 and IL-10 Coding Vectors Protects against Type 1 Diabetes in NOD Mice and Attenuates Insulinitis in the STZ-Induced Model. Sugawara A, editor. *J Diabetes Res* [Internet]. Hindawi; 2021;2021:6697319. Available from: <https://doi.org/10.1155/2021/6697319>
150. Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, et al. AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* [Internet]. Taylor & Francis; 2022;14:2022997. Available from: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022997>
151. Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, Stewart CA, et al. Oral Delivery of IL-27 Recombinant Bacteria Attenuates Immune Colitis in Mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2014;146:210–221.e13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508513014303>
152. Rezaei M, Rabbani Khorasgani M, Zarkesh Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Production of *Brucella melitensis* Omp16 protein fused to the human interleukin 2 in *Lactococcus lactis* MG1363 toward developing a *Lactococcus*-based vaccine against brucellosis. *Can J Microbiol* [Internet]. NRC

- Research Press; 2019;66:39–45. Available from: <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0261>
153. Li H-S, Piao D-C, Jiang T, Bok J-D, Cho C-S, Lee Y-S, et al. Recombinant interleukin 6 with M cell-targeting moiety produced in *Lactococcus lactis* IL1403 as a potent mucosal adjuvant for peroral immunization. *Vaccine* [Internet]. 2015;33:1959–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15002509>
154. Guerra PV, Andrade CM, Nunes IV, Gama BC, Tibúrcio R, Santos WLC, et al. Oral Tolerance Induced by Heat Shock Protein 65-Producing *Lactococcus lactis* Mitigates Inflammation in *Leishmania braziliensis* Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2021;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.647987>
155. de Lacerda LB, Rios WM, Masson AP, Brandão IT, Milani TM, Borges MC, et al. Oral administration of Hsp65-producing *Lactococcus lactis* attenuates allergic asthma in a murine model. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2021;130:2075–86. Available from: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.14913>
156. Gomes-Santos AC, de Oliveira RP, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, et al. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Front Immunol. Switzerland*; 2017;8:30.
157. Gusmao-Silva G, Aguiar SLF, Miranda MCG, Guimarães MA, Alves JL, Vieira AT, et al. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol. Switzerland*; 2020;11:562905.
158. Liu K-F, Liu X-R, Li G-L, Lu S-P, Jin L, Wu J. Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressing heat shock protein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Immunol Lett* [Internet]. 2016;174:28–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247816300591>
159. Ma Y, Liu J, Hou J, Dong Y, Lu Y, Jin L, et al. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. *PLoS One. United States*; 2014;9:e105701.
160. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product1. *J Immunol* [Internet]. 1999;162:3749–52. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.7.3749>
161. de Azevedo MSP, Rocha CS, Electo N, Pontes DS, Molfetta JB, Gonçalves EDC, et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res. Brazil*; 2012;11:1146–57.
162. Costa FRC, Leite JA, Rassi DM, da Silva JF, Elias-Oliveira J, Guimarães JB, et al. NLRP1 acts as a negative regulator of Th17 cell programming in mice and humans with autoimmune diabetes. *Cell Rep. United States*; 2021;35:109176.
163. Paula-Silva FWG, Petean IBF, da Silva LAB, Faccioli LH. Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis. *J Endod. United States*; 2016;42:447–54.
164. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. United States*; 2004;4:1614–27.
165. Khan FU, Khongorzul P, Raki AA, Rajasekaran A, Gris D, Amrani A. Dendritic Cells and Their Immunotherapeutic Potential for Treating Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4885>
166. Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol. United States*; 2013;14:1054–63.
167. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of



tolerance? *Trends Immunol.* England; 2011;32:412–9.

168. Stagg AJ. Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2018;9:2883. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30574151>

169. Horváth L, Cervenak L, Oroszlán M, Prohászka Z, Uray K, Hudecz F, et al. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett.* Netherlands; 2002;80:155–62.

170. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14:140–62. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>

171. Wu J, Yan L-J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* New Zealand; 2015;8:181–8.

172. Yaochite JNU, Caliarí-Oliveira C, Davanso MR, Carlos D, Malmegrim KCR, Cardoso CR de B, et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology.* Netherlands; 2013;218:338–52.

173. Zhu BT. Pathogenic Mechanism of Autoimmune Diabetes Mellitus in Humans: Potential Role of Streptozotocin-Induced Selective Autoimmunity against Human Islet  $\beta$ -Cells. *Cells.* Switzerland; 2022;11.

174. Hardin JA, Donegan L, Woodman RC, Trevenen C, Gall DG. Mucosal inflammation in a genetic model of spontaneous type I diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol.* Canada; 2002;80:1064–70.

175. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Pihkala P, Ilonen J, Savilahti E. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* United States; 2003;52:2287–95.

176. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* United States; 2006;55:1443–9.

177. da Cunha VP, Preisser TM, Santana MP, Machado DCC, Pereira VB, Miyoshi A. Mycobacterial Hsp65 antigen delivered by invasive *Lactococcus lactis* reduces intestinal inflammation and fibrosis in TNBS-induced chronic colitis model. *Sci Rep.* England; 2020;10:20123.

178. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* England; 2014;260:8–20.

179. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest.* United States; 2008;118:534–44.

180. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MRM. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol.* United States; 2015;33:747–85.

181. Natividad JMM, Hayes CL, Motta J-P, Jury J, Galipeau HJ, Philip V, et al. Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Appl Environ Microbiol.* United States; 2013;79:7745–54.

182. Shin JH, Bozadjieva-Kramer N, Seeley RJ. Reg3 $\gamma$ : current understanding and future therapeutic opportunities in metabolic disease. *Exp Mol Med* [Internet]. 2023;55:1672–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01054-5>

183. Vabulas RM, Wagner H, Schild H. Heat Shock Proteins as Ligands of Toll-Like Receptors. In: Beutler B, Wagner H, editors. *Toll-Like Recept Fam Members Their Ligands* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2002. p. 169–84. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4_11)

184. Zhou J, An H, Xu H, Liu S, Cao X. Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology*. England; 2005;114:522–30.
185. Sasaki I, Kato T, Hemmi H, Fukuda-Ohta Y, Wakaki-Nishiyama N, Yamamoto A, et al. Conventional Type 1 Dendritic Cells in Intestinal Immune Homeostasis. *Front Immunol* [Internet]. 2022;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.857954>
186. Goswami TK, Singh M, Dhawan M, Mitra S, Emran T Bin, Rabaan AA, et al. Regulatory T cells (Tregs) and their therapeutic potential against autoimmune disorders - Advances and challenges. *Hum Vaccin Immunother*. United States; 2022;18:2035117.
187. Fernández-Malavé E, Stark-Aroeira L. A natural anti-T-cell receptor monoclonal antibody protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. Netherlands; 2011;234:63–70.
188. Leucht K, Caj M, Fried M, Rogler G, Hausmann M. Impaired removal of V $\beta$ 8(+) lymphocytes aggravates colitis in mice deficient for B cell lymphoma-2-interacting mediator of cell death (Bim). *Clin Exp Immunol*. England; 2013;173:493–501.
189. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy*. Switzerland; 2005;86:120–35.
190. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. United States; 2018;10.
191. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. Egypt; 2012;2012:925135.
192. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015;67:88–97. Available from: <https://doi.org/10.1002/iub.1349>
193. Ohta T, Sugiyama M, Hemmi H, Yamazaki C, Okura S, Sasaki I, et al. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci Rep*. England; 2016;6:23505.
194. Audsley KM, McDonnell AM, Waithman J. Cross-Presenting XCR1(+) Dendritic Cells as Targets for Cancer Immunotherapy. *Cells*. Switzerland; 2020;9.
195. Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9:350. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00350>
196. Ben-Skowronek I, Sieniawska J, Pach E, Wrobel W, Skowronek A, Tomczyk Z, et al. Potential Therapeutic Application of Regulatory T Cells in Diabetes Mellitus Type 1. *Int J Mol Sci*. Switzerland; 2021;23.
197. Huang J, Tan Q, Tai N, Pearson JA, Li Y, Chao C, et al. IL-10 Deficiency Accelerates Type 1 Diabetes Development via Modulation of Innate and Adaptive Immune Cells and Gut Microbiota in BDC2.5 NOD Mice. *Front Immunol*. Switzerland; 2021;12:702955.
198. Zhang S, Audiger C, Chopin M, Nutt SL. Transcriptional regulation of dendritic cell development and function. *Front Immunol* [Internet]. 2023;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1182553>
199. Bosteels C, Scott CL. Transcriptional regulation of DC fate specification. *Mol Immunol* [Internet]. 2020;121:38–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589019307485>
200. Khandia R, Munjal AK, Iqbal HMN, Dhama K. Heat Shock Proteins: Therapeutic Perspectives in Inflammatory Disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. United Arab Emirates; 2017;10:94–104.

201. Iberg CA, Jones A, Hawiger D. Dendritic Cells As Inducers of Peripheral Tolerance. *Trends Immunol.* England; 2017;38:793–804.
202. Siddiqui KRR, Powrie F. CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2008;1:S34–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/mi.2008.43>
203. Mathipa MG, Thantsha MS. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathog* [Internet]. 2017;9:28. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0178-9>
204. Raheem A, Liang L, Zhang G, Cui S. Modulatory Effects of Probiotics During Pathogenic Infections With Emphasis on Immune Regulation. *Front Immunol* [Internet]. 2021;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.616713>
205. Nelson AS, Maddaloni M, Abbott JR, Hoffman C, Akgul A, Ohland C, et al. Oral therapy with colonization factor antigen I prevents development of type 1 diabetes in Non-obese Diabetic mice. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10:6156. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62881-4>
206. Benedé-Ubieto R, Estévez-Vázquez O, Ramadori P, Cubero FJ, Nevzorova YA. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes.* New Zealand; 2020;13:439–50.
207. Jeong H, Hwang U-S, Choi H, Park Y-S. Assessing the Anti-Obesity Potential of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAB701: Modulation of Adipocyte Differentiation and Lipid Metabolism in In Vitro and In Vivo Models. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 2023; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10198-9>
208. Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapoport M, Lohse AW, Cohen IR. Autoimmune Diabetes Induced by the  $\beta$ -cell Toxin STZ: Immunity to the 60-kDa Heat Shock Protein and to Insulin. *Diabetes* [Internet]. 1994;43:992–8. Available from: <https://doi.org/10.2337/diab.43.8.992>
209. Singh R, Gholipourmalekabadi M, Shafikhani SH. Animal models for type 1 and type 2 diabetes: advantages and limitations. *Front Endocrinol (Lausanne).* Switzerland; 2024;15:1359685.
210. Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States; 2000;97:1701–6.
211. Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler A-G. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* United States; 2004;140:882–6.
212. Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros SR, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FG, et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *J Autoimmun.* England; 2013;40:45–57.
213. J S Leeds \*, Hopper AD, Hadjivassiliou M, Tesfaye S, Sanders DS. Inflammatory bowel disease is more common in type 1 diabetes mellitus. *Gut* [Internet]. 2011;60:A208 LP-A208. Available from: [http://gut.bmj.com/content/60/Suppl\\_1/A208.1.abstract](http://gut.bmj.com/content/60/Suppl_1/A208.1.abstract)
214. Pellegrini S, Sordi V, Bolla AM, Saita D, Ferrarese R, Canducci F, et al. Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2017;102:1468–77. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3222>
215. Robles-Osorio ML, Sabath E. Tight junction disruption and the pathogenesis of the chronic complications of diabetes mellitus: A narrative review. *World J Diabetes.* United States; 2023;14:1013–26.
216. Zhao J, Nakaguchi T, Gregersen H. Biomechanical and Histomorphometric Colon Remodelling in STZ-Induced Diabetic Rats. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2009;54:1636–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0540-3>
217. Esteves-Monteiro M, Menezes-Pinto D, Ferreira-Duarte M, Dias-Pereira P, Morato M, Duarte-Araújo M. Histomorphometry Changes and Decreased Reactivity to Angiotensin II in the Ileum and

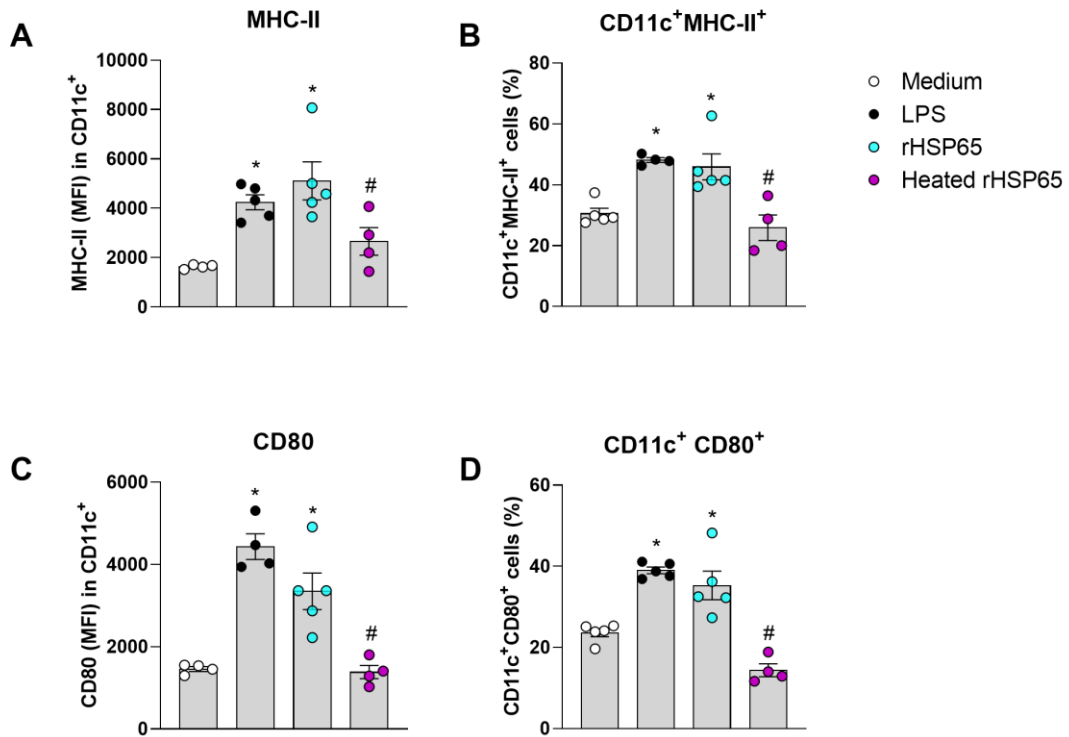
- Colon of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci*. Switzerland; 2022;23.
218. Francis KL, Alonge KM, Pacheco MC, Hu SJ, Krutzsch CA, Morton GJ, et al. Diabetes exacerbates inflammatory bowel disease in mice with diet-induced obesity. *World J Gastroenterol*. United States; 2023;29:4991–5004.
219. Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue barriers*. United States; 2015;3:e982426.
220. Patnaude L, Mayo M, Mario R, Wu X, Knight H, Creamer K, et al. Mechanisms and regulation of IL-22-mediated intestinal epithelial homeostasis and repair. *Life Sci* [Internet]. 2021;271:119195. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320521001806>
221. La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. United States; 2018;10:11–21.
222. Sun S, Luo L, Liang W, Yin Q, Guo J, Rush AM, et al. Bifidobacterium alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of Tregulatory cells in the context of immune checkpoint blockade. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2020;117:27509–15. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1921223117>
223. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferrì F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med* [Internet]. 2023; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
224. Kuo W-T, Zuo L, Odenwald MA, Madha S, Singh G, Gurniak CB, et al. The Tight Junction Protein ZO-1 Is Dispensable for Barrier Function but Critical for Effective Mucosal Repair. *Gastroenterology* [Internet]. 2021;161:1924–39. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650852103465X>
225. Luerce TD, Gomes-Santos AC, Rocha CS, Moreira TG, Cruz DN, Lemos L, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis [Internet]. *Gut Pathog*. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 - 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.; 2014. p. 33. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/25110521>
226. Nelson AS, Akgul A, Maddaloni M, Bhagyaraj E, Hoffman C, Pascual DW. Oral probiotic promotes indoleamine 2,3-dioxygenase- and TGF- $\beta$ -Producing plasmacytoid dendritic cells to initiate protection against type 1 diabetes. *Immunol Lett*. Netherlands; 2021;239:12–9.
227. Cheru N, Hafler DA, Sumida TS. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2023;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1154575>
228. Tucker CF, Nebane-Ambe DL, Chhabra A, Parnell SA, Zhao Y, Alard P, et al. Decreased frequencies of CD4+CD25+Foxp3+ cells and the potent CD103+ subset in peripheral lymph nodes correlate with autoimmune disease predisposition in some strains of mice. *Autoimmunity*. England; 2011;44:453–64.
229. D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C, et al. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2008;105:19857–62. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810713105>
230. Godoy GJ, Olivera C, Paira DA, Salazar FC, Ana Y, Stempin CC, et al. Tregulatory Cells From Non-obese Diabetic Mice Show Low Responsiveness to IL-2 Stimulation and Exhibit Differential Expression of Anergy-Related and Ubiquitination Factors. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02665>
231. Dos Santos Haber JF, Barbalho SM, Sgarbi JA, de Argollo Haber RS, de Labio RW, Laurindo LF, et al. The Relationship between Type 1 Diabetes Mellitus, TNF- $\alpha$ , and IL-10 Gene Expression. *Biomedicines*. Switzerland; 2023;11.

232. Filippi CM, Ehrhardt K, Estes EA, Larsson P, Oldham JE, von Herrath MG. TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes. *Eur J Immunol*. Germany; 2011;41:1399–409.
233. Park JH, Ko R, Lee SY. Reciprocal regulation of TLR2-mediated IFN- $\beta$  production by SHP2 and Gsk3 $\beta$ . *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:6807. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07316-3>
234. Kim WS, Yoon J-H, Shin M-K, Shin SJ. Infection of Dendritic Cells With *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* Exhibits a Functionally Tolerogenic Phenotype in Response to Toll-Like Receptor Agonists via IL-10/Cox2/PGE2/EP2 Axis. *Front Microbiol* [Internet]. 2019;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01795>
235. Chamorro S, García-Vallejo JJ, Unger WWJ, Fernandes RJ, Bruijns SCM, Laban S, et al. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J Immunol*. United States; 2009;183:2984–94.
236. Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA. Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor- $\beta$  and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8. *Gastroenterology*. United States; 2011;141:1802–12.
237. Wang X, Zhou S, Chi Y, Wen X, Hoellwarth J, He L, et al. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. *Eur J Immunol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009;39:3052–65. Available from: <https://doi.org/10.1002/eji.200939335>
238. Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M, et al. TLR2 Stimulation Regulates the Balance between Regulatory T Cell and Th17 Function: A Novel Mechanism of Reduced Regulatory T Cell Function in Multiple Sclerosis. *J Immunol* [Internet]. 2015;194:5761–74. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400472>

APÊNDICE A – FIGURAS SUPLEMENTARES

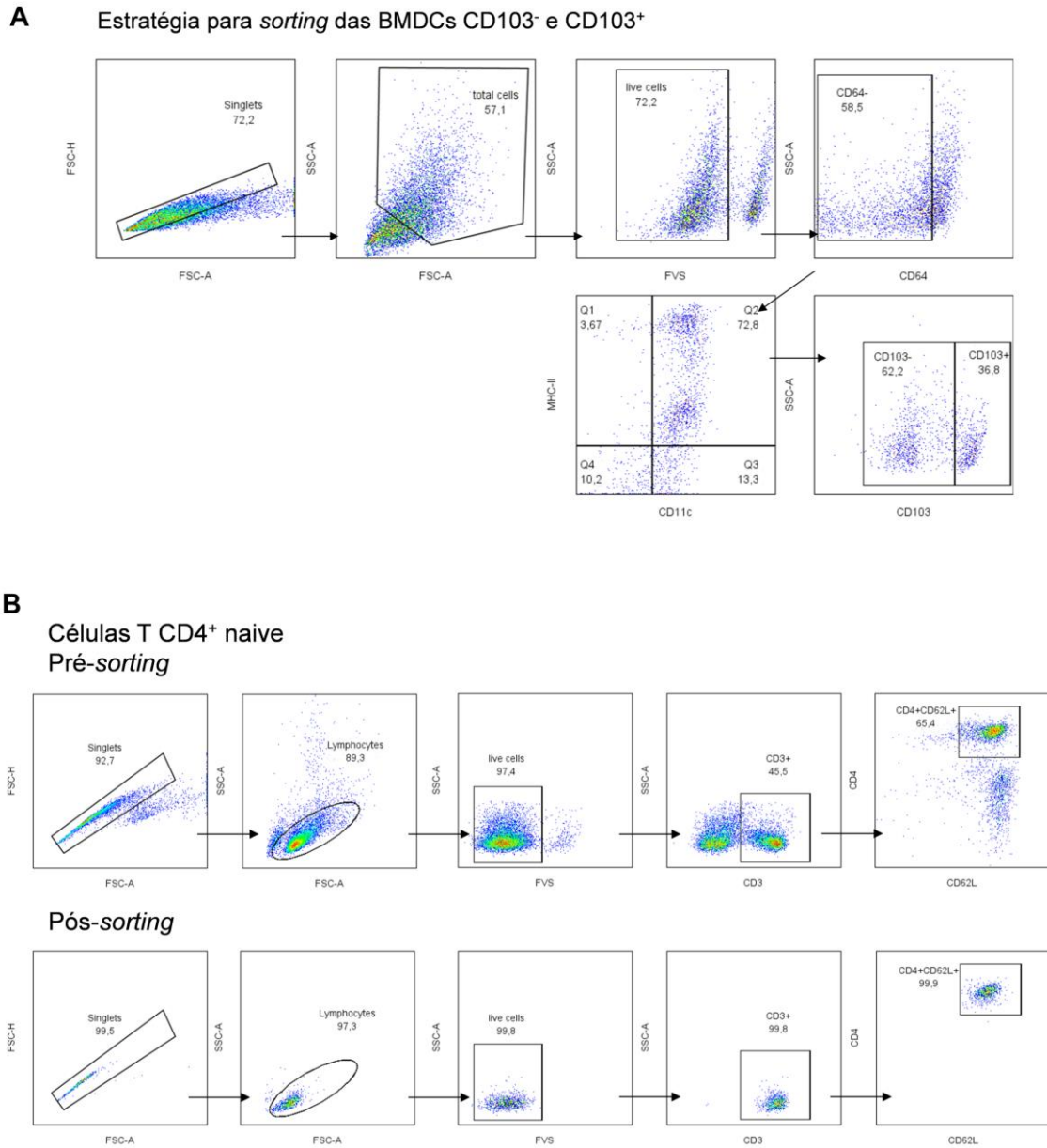
Figuras suplementares

Fig. Supl. 1



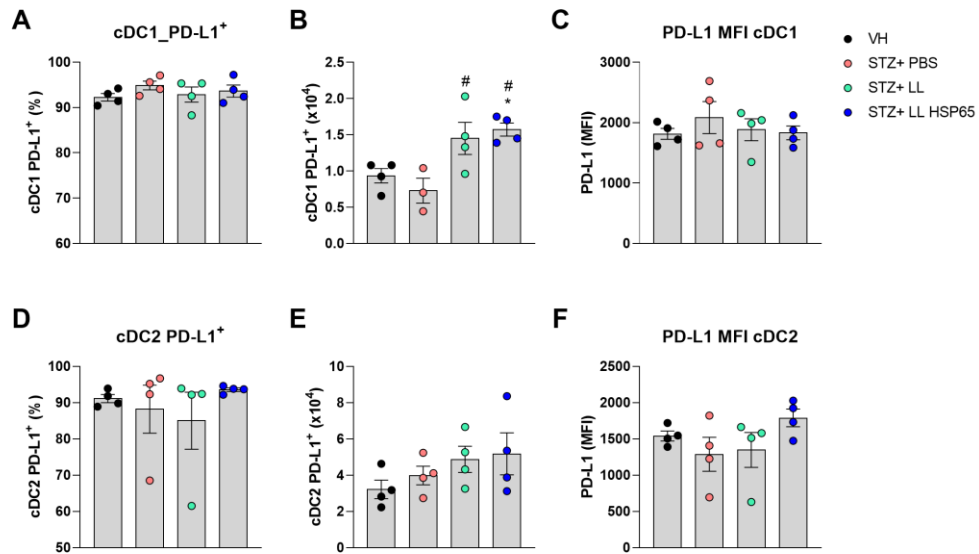
**FIGURA SUPLEMENTAR 1. rHSP65 aquecida não é capaz de ativar BMDCs *in vitro*.** BMDCs foram estimuladas com LPS (500 ng/ml) ou rHSP65 fervida ou não (12 µg/ml) por 24 horas para avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI) de MHC-II (A), porcentagem de células CD11<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> (B), MFI de CD80 (C) e porcentagem de células CD11c<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> (D) por citometria de fluxo. Os dados estão expressos como média ± EPM e são representativos de um experimento realizado (n = 4-5 poços por condição) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* *vs* meio, # *vs* rHSP65.

**Fig. Supl. 2**



**FIGURA SUPLEMENTAR 2. Representativos das estratégias de *gate* para *sorting* de DCs CD103<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup> e linfócitos Th0.** Para separação das DCs, consideramos as células vivas, CD64<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> e CD103<sup>+</sup> ou CD103<sup>-</sup> (A). Para separação dos linfócitos, primeiramente isolamos as células CD4<sup>+</sup> de baço e linfonodos de camundongos C57Bl/6 utilizando *beads* magnéticas e obtivemos pureza de 65,4% de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> antes da separação por citometria de fluxo (B, painel superior). No *sorting* celular utilizando citômetro, isolamos as células vivas, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>, alcançando 99,9% de pureza após o *sorting* (B, painel inferior).

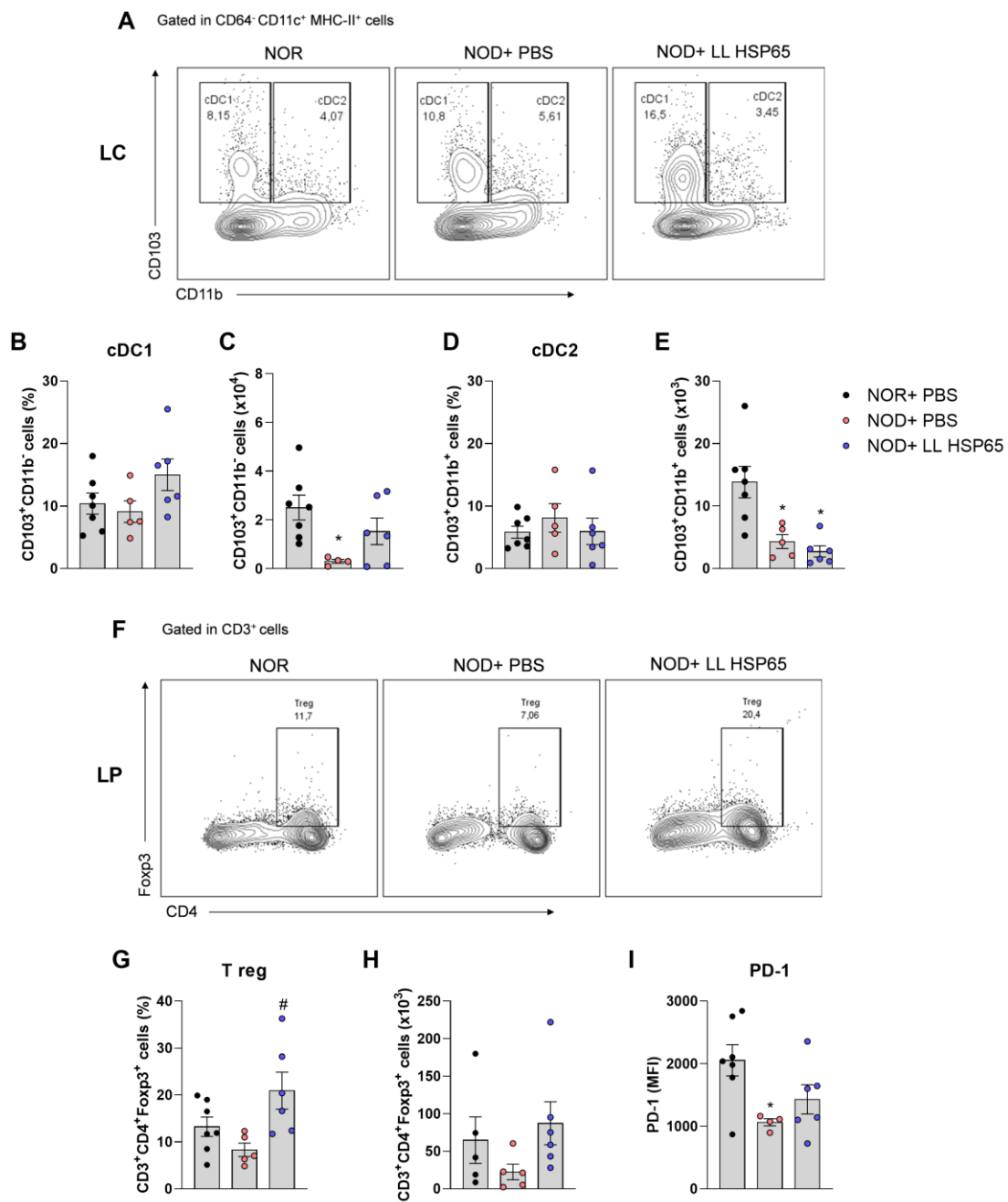
Fig. Supl. 3

**FIGURA SUPLEMENTAR 3. *L. lactis* aumenta cDC1 PD-L1+ no linfonodo cecal no modelo de DM1.**

Porcentagem de cDC1 PD-L1<sup>+</sup> avaliada por citometria de fluxo no linfonodo cecal (A). Número absoluto de cDC1 PD-L1<sup>+</sup> no linfonodo cecal (B). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-L1 em cDC1 no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (C). Porcentagem de cDC2 PD-L1<sup>+</sup> avaliada por citometria de fluxo no linfonodo cecal (D). Número absoluto de cDC2 PD-L1<sup>+</sup> no linfonodo cecal (E). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-L1 em cDC2 no linfonodo cecal determinada por citometria de fluxo (F). Os dados estão expressos como média ± EPM e são representativos de um experimento realizado (n = 4-5 animais por grupo) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

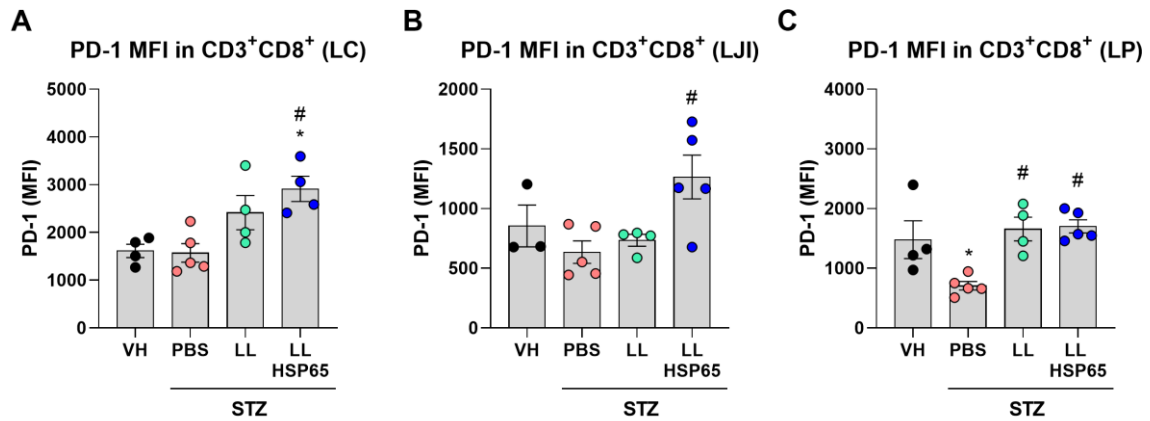


**Fig. Supl. 4**



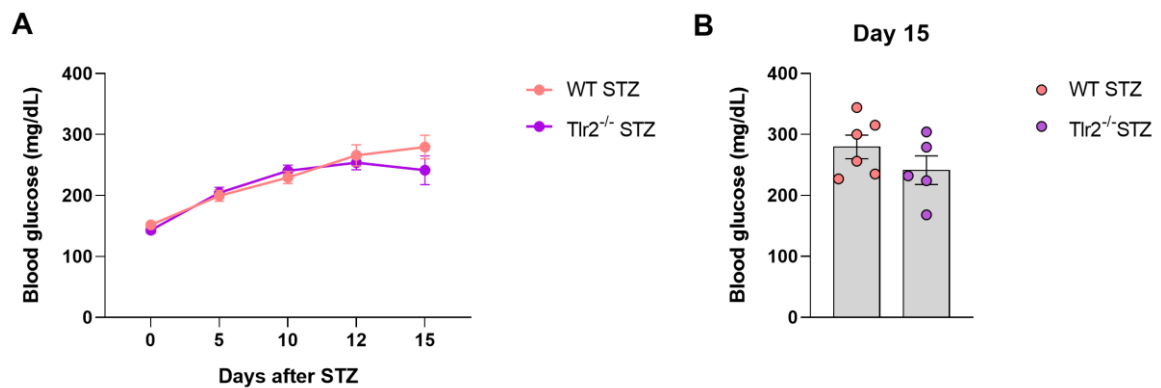
**FIGURA SUPLEMENTAR 4. *L. lactis*-HSP65 não altera cDC1 no linfonodo cecal mas aumenta Tregs nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD.** *Contour plots* representativas das populações cDC1 e cDC2 no linfonodo cecal avaliadas por citometria de fluxo (A). Porcentagem de cDC1 no linfonodo cecal (B). Número absoluto de cDC1 no linfonodo cecal (C). Porcentagem de cDC2 no linfonodo cecal (D). Número absoluto de cDC2 no linfonodo cecal (E). *Contour plots* representativas da porcentagem de Treg nos linfonodos pancreáticos avaliada por citometria de fluxo (F). Porcentagem de Tregs nos linfonodos pancreáticos (G). Número absoluto de Tregs nos linfonodos pancreáticos (H). Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 nas Tregs dos linfonodos pancreáticos (I). Dados expressos como média ± EPM representativas de um experimento realizado (n = 4-6 animais por grupo) e analisados pelo teste ANOVA One-way e Tukey no pós-teste, sendo consideradas estatisticamente diferentes quando p < 0,05. \* vs NOR, # vs NOD+ PBS.

**Fig. Supl. 5**



**FIGURA SUPLEMENTAR 5.** *L. lactis* aumenta a expressão de PD-1 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> no modelo de DM1. Intensidade média de fluorescência (MFI) de PD-1 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> no linfonodo cecal (A), nos linfonodos jejun-ileais (B) e nos linfonodos pancreáticos (C), determinada por citometria de fluxo. Os dados estão expressos como média ± EPM e são representativos de um experimento realizado (n = 4-5 animais por grupo) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* vs VH, # vs STZ+PBS, & *L. lactis* selvagem vs *L. lactis* HSP65.

**Fig. Supl. 6**



**FIGURA SUPLEMENTAR 6.** A deficiência de TLR2 não altera o desenvolvimento de DM1 induzida por STZ. *Time course* da glicemia de jejum de camundongos WT e de deficientes de TLR2 durante indução de DM1 com STZ (A). Glicemia de jejum no 15º dia após início da administração de STZ (B). Os dados estão expressos como média ± EPM e são representativos de um experimento realizado (n = 5-6 animais por grupo) e analisados pelo teste One-way ANOVA e Tukey no pós-teste. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . \* vs WT STZ.

## Publicações obtidas durante o doutorado

1.



MINI REVIEW  
published: 11 August 2020  
doi: 10.3389/fimmu.2020.01810



## NLR and Intestinal Dysbiosis-Associated Inflammatory Illness: Drivers or Dampers?

Jefferson Elias-Oliveira<sup>1</sup>, Jefferson Antônio Leite<sup>1</sup>, Ítalo Sousa Pereira<sup>1</sup>, Jhefferson Barbosa Guimarães<sup>1</sup>, Gabriel Martins da Costa Manso<sup>1</sup>, João Santana Silva<sup>1</sup>, Rita Cássia Tostes<sup>2</sup> and Daniela Carlos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

### OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Alessio Fasano,  
Massachusetts General Hospital and  
Harvard Medical School,  
United States

**Reviewed by:**  
Charles Kelly,  
King's College London,  
United Kingdom  
Megan K. L. MacLeod,  
University of Glasgow,  
United Kingdom

**\*Correspondence:**  
Daniela Carlos  
danicar@usp.br

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Mucosal Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 15 May 2020  
**Accepted:** 07 July 2020  
**Published:** 11 August 2020

**Citation:**  
Elias-Oliveira J, Leite JA, Pereira IS,  
Guimarães JB, Manso GMdC,  
Silva JS, Tostes RC and Carlos D  
(2020) NLR and Intestinal  
Dysbiosis-Associated Inflammatory  
Illness: Drivers or Dampers?  
Front. Immunol. 11:1810.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.01810

The intestinal microbiome maintains a close relationship with the host immunity. This connection fosters a health state by direct and indirect mechanisms. Direct influences occur mainly through the production of short-chain fatty acids (SCFAs), gastrointestinal hormones and precursors of bioactive molecules. Indirect mechanisms comprise the crosstalk between bacterial products and the host's innate immune system. Conversely, intestinal dysbiosis is a condition found in a large number of chronic intestinal inflammatory diseases, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, as well as in diseases associated with low-grade inflammation, such as obesity, type 1 and 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases. NOD-Like receptors (NLRs) are cytoplasmic receptors expressed by adaptive and innate immune cells that form a multiprotein complex, termed the inflammasome, responsible for the release of mature interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18. NLRs are also involved in the recognition of bacterial components and production of antimicrobial molecules that shape the gut microbiota and maintain the intestinal homeostasis. Recent novel findings show that NLRs may act as positive or negative regulators of inflammation by modulating NF- $\kappa$ B activation. This mini-review presents current and updated evidence on the interplay between NLRs and gut microbiota and their dual role, contributing to progression or conferring protection, in diabetes and other inflammatory diseases.

**Keywords:** NLRs, microbiota, gut dysbiosis, diabetes, inflammatory diseases

### INTRODUCTION

The healthy human intestine is colonized by several microorganisms, including fungi, viruses, and bacteria belonging to different families (1). Studies on the gut microbiome show a high number of bacteria from the Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, and Ruminococcaceae families in the colon (2). On the other hand, the small intestine is mainly colonized by bacteria from the Lactobacillaceae and Enterobacteriaceae families (3). In recent years, sequencing analysis of the 16S rRNA gene revealed an association between the gut microbiota and inflammatory diseases (4). Changes in the composition of the intestinal microbiota, a process called dysbiosis, play a key role in the pathogenesis of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (5), atherosclerosis (6), ulcerative colitis, Crohn's disease (7), and diabetes mellitus type 1 and 2 (8, 9). Accordingly, modulation of the gut microbiota by prebiotics and probiotics, as preventive or therapeutic strategies to mitigate the pathogenesis of inflammatory diseases, has been increasingly investigated (10).

2.



## Article

**NLRP1 acts as a negative regulator of Th17 cell programming in mice and humans with autoimmune diabetes**Frederico R.C. Costa,<sup>1</sup> Jefferson A. Leite,<sup>1</sup> Diane M. Rassi,<sup>2</sup> Josiane F. da Silva,<sup>2</sup> Jefferson Elias-Oliveira,<sup>1</sup> Jhefferson B. Guimarães,<sup>1</sup> Maria C. Foss-Freitas,<sup>3,4</sup> Niels O.S. Câmara,<sup>5,6</sup> Alessandra Pontillo,<sup>9</sup> Rita C. Tostes,<sup>2</sup> João S. Silva,<sup>1,7</sup> and Daniela Carlos<sup>1,8,\*</sup><sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil<sup>3</sup>Department of Clinical Medicine, Internal Medicine Division, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil<sup>4</sup>Division of Metabolism, Endocrinology & Diabetes, Department of Internal Medicine, and Caswell Diabetes Institute University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA<sup>5</sup>Department of Immunology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil<sup>6</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil<sup>7</sup>Fiocruz- Bi-Institutional Translational Medicine Platform, Ribeirão Preto, SP, Brazil<sup>8</sup>Lead contact

\*Correspondence: danicar@usp.br

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109176>**SUMMARY**

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic  $\beta$  cells. We show here that the protein NOD-like receptor family pyrin domain containing 1 (NLRP1) has a key role in the pathogenesis of mouse and human T1D. More specifically, downregulation of NLRP1 expression occurs during T helper 17 (Th17) differentiation, alongside greater expression of several molecules related to Th17 cell differentiation in a signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3)-dependent pathway. These changes lead to a consequent increase in interleukin 17 (IL-17) production within the pancreas and higher incidence of diabetes in streptozotocin (STZ)-injected mice. Finally, in patients with T1D and a SNP (rs12150220) in *NLRP1*, there is a robust decrease in IL-17 levels in serum and in memory Th17 cells from peripheral blood mononuclear cells. Our results demonstrate that NLRP1 acts as a negative regulator of the Th17 cell polarization program, making it an interesting target for intervention during the early stages of T1D.

**INTRODUCTION**

Type 1 diabetes (T1D) is a T-cell-mediated disease characterized by the autoimmune destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells (Atkinson et al., 2014; Haller et al., 2018). The incidence of the disease has increased during the past 30 years (Patterson et al., 2009), which can only be explained by alterations in the environment or lifestyle (Rewers and Ludvigsson, 2016). In that context, several environmental factors have been proposed as possible triggers for this disease, such as viral infections (Filippi and von Herrath, 2008) and alterations in the composition of the gut microbiota (dysbiosis) (Vaarala, 2008). Thus, a better understanding of the environmental triggers involved in the development of T1D is of extreme importance to delay or even prevent the onset of the disease. Most of our knowledge on the pathophysiology of T1D comes from studies on the adaptive immune response, demonstrating a pathogenic role for both T helper 1 (Th1) (Arif et al., 2011) and Th17 (Honkanen et al., 2010) cells. Although studies on the role of the innate immune response in the development of T1D

are scarce (Herold et al., 2013), macrophages have been identified in the pancreas of patients with T1D (Uno et al., 2007), and dendritic cells (DCs) were shown to capture antigens released by apoptotic  $\beta$  cells and present them to antigen-specific T cells in the pancreatic lymph nodes (PLNs) (Marleau et al., 2008). Surprisingly, despite several studies demonstrating the presence of cells from the innate immune response in the pathogenesis of T1D, the mechanisms by which pattern-recognition receptors (PRRs) are activated in these cells and how they initiate the autoimmune destruction of the insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells remain poorly understood. Our group and others have shown that the lack of the NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), a member of the NOD-like receptor (NLR) family, protects both nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin (STZ)-injected C57BL/6 mice from developing diabetes (Carlos et al., 2017; Hu et al., 2015). Toll-like receptor 2 (TLR2) also has a pathogenic role in the disease, through the production of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-12p70, and nitric oxide (NO) (Kim et al., 2007). Therefore, it is critical to better understand the







AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY

## HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY

*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 321: H275–H291, 2021.  
First published June 18, 2021; doi:10.1152/ajpheart.00225.2021

### REVIEW

*Integrative Cardiovascular Physiology and Pathophysiology*

## Ethanol: striking the cardiovascular system by harming the gut microbiota

Carla B. P. Silva,<sup>1,2</sup> Jefferson Elias-Oliveira,<sup>2</sup> Cameron G. McCarthy,<sup>3</sup> Camilla F. Wenceslau,<sup>3</sup> Daniela Carlos,<sup>2</sup> and Rita C. Tostes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; and

<sup>3</sup>Department of Physiology and Pharmacology, The University of Toledo College of Medicine and Life Sciences, Toledo, Ohio

### Abstract

Ethanol consumption represents a significant public health problem, and excessive ethanol intake is a risk factor for cardiovascular disease (CVD), one of the leading causes of death and disability worldwide. The mechanisms underlying the effects of ethanol on the cardiovascular system are complex and not fully comprehended. The gut microbiota and their metabolites are indispensable symbionts essential for health and homeostasis and therefore, have emerged as potential contributors to ethanol-induced cardiovascular system dysfunction. By mechanisms that are not completely understood, the gut microbiota modulates the immune system and activates several signaling pathways that stimulate inflammatory responses, which in turn, contribute to the development and progression of CVD. This review summarizes preclinical and clinical evidence on the effects of ethanol in the gut microbiota and discusses the mechanisms by which ethanol-induced gut dysbiosis leads to the activation of the immune system and cardiovascular dysfunction. The cross talk between ethanol consumption and the gut microbiota and its implications are detailed. In summary, an imbalance in the symbiotic relationship between the host and the commensal microbiota in a holobiont, as seen with ethanol consumption, may contribute to CVD. Therefore, manipulating the gut microbiota, by using antibiotics, probiotics, prebiotics, and fecal microbiota transplantation might prove a valuable opportunity to prevent/mitigate the deleterious effects of ethanol and improve cardiovascular health and risk prevention.

*cardiovascular system; dysbiosis; ethanol; gut microbiota; immune system*

### STATING THE PROBLEM

#### Ethanol and the Cardiovascular System

Cardiovascular disease (CVD) is a group of disorders that affects the heart and blood vessels (1) and is among the leading causes of death and disability worldwide (1, 2). In 2016, 17.9 million deaths globally were attributed to CVD (3). Age, sex, genetic factors, unhealthy diet, sedentary lifestyle, metabolic diseases, tobacco use, and excessive consumption of ethyl alcohol (ethanol) are essential factors contributing to CVD development (4–6).

Excessive ethanol consumption itself is responsible for more than 3 million deaths every year or ~5% of all deaths worldwide (3). In the United States, excessive alcohol intake is the third leading cause of premature death, behind only smoking and obesity (7). Although excessive ethanol consumption is a significant public health problem and contributes to elevated mortality, morbidity, and disability (8), the exact amount of ethanol that induces tissue/organ damage or contributes to the development of diseases is unclear. In

addition, ethanol has distinctive effects that are modulated by several factors, including sex, age, genetic factors, ethnicity, body mass index, medications, diets, duration of ethanol use, drinking pattern behavior, type of alcoholic beverage consumed (fermented or distilled), and comorbidities (9–11).

The relationship between ethanol consumption and CVD is represented by a J-shaped curve (7, 12–14), indicating that low-to-moderate ethanol intake (1 drink/day for women or up to 2 drinks/day for men) poses a low risk for cardiovascular morbidity and mortality (12, 15). Low doses of ethanol regulate lipid metabolism and fibrinolysis, increase adiponectin and high-density lipoprotein (HDL) levels, decrease blood coagulation rate, modulate platelet activity and thrombotic factors, and inhibit atheroma formation. Accordingly, low doses of ethanol benefit endothelial function, decrease inflammation, and improve insulin sensitivity and glucose metabolism (7, 12, 14, 16–20). In stark contrast, heavy (>4 drinks/day) and binge drinking (≥5 drinks within a few hours) are linked to adverse outcomes, increasing the risk of death and CVD (3, 7, 21).

Correspondence: R. C. Tostes (rtostes@usp.br).

Submitted 27 April 2021 / Revised 16 June 2021 / Accepted 16 June 2021

<http://www.ajpheart.org>

0363-6135/21 Copyright © 2021 the American Physiological Society

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpheart at CAPES-USP (143.107.199.151) on July 15, 2021.



H275



# Akkermansia muciniphila and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes

Vanessa Fernandes Rodrigues, Jefferson Elias-Oliveira, Ítalo Sousa Pereira, Jéssica Assis Pereira, Sara Cândida Barbosa, Melissa Santana Gonzalez Machado and Daniela Carlos\*

Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

*Akkermansia muciniphila* is a Gram-negative anaerobic mucus-layer-degrading bacterium that colonizes the intestinal mucosa of humans and rodents. Metagenomic data have shown an inverse correlation between the abundance of *A. muciniphila* and diseases such as inflammatory bowel disease (IBD), obesity, and diabetes. Thus, in recent decades, the potential of this bacterium as an immunomodulatory probiotic for autoimmune and chronic inflammatory diseases has been explored in experimental models. Corroborating these human correlation data, it has been reported that *A. muciniphila* slows down the development and progression of diabetes, obesity, and IBD in mice. Consequently, clinical studies with obese and diabetic patients are being performed, and the preliminary results are very promising. Therefore, this mini review highlights the main findings regarding the beneficial roles of *A. muciniphila* and its action mechanisms in autoimmune and chronic inflammatory diseases.

**Keywords:** *Akkermansia muciniphila*, gut dysbiosis, obesity, diabetes, inflammatory bowel diseases

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jian Tan,  
The University of Sydney, Australia

### Reviewed by:

Fatemeh Ashrafi,  
Pasteur Institute of Iran (PII), Iran

### \*Correspondence:

Daniela Carlos  
danicar@usp.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Nutritional Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 02 May 2022

**Accepted:** 13 June 2022

**Published:** 07 July 2022

### Citation:

Rodrigues VF, Elias-Oliveira J,  
Pereira IS, Pereira JA, Barbosa SC,  
Machado MSG and Carlos D (2022)  
*Akkermansia muciniphila* and Gut  
Immune System: A Good Friendship  
That Attenuates Inflammatory Bowel  
Disease, Obesity, and Diabetes.  
*Front. Immunol.* 13:934695.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.934695

## INTRODUCTION

The intestine is mainly colonized by four phyla of bacteria: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, and Actinobacteria (1). Several factors, such as the use of antibiotics, diet, and pH can interfere with the gut microbiota. It is known that alterations in the gut microbiota (dysbiosis) are capable of inducing abnormal immune responses in the gut-associated lymphatic tissue and that these alterations can compromise the systemic immune response (2). The gut microbiota regulates the host immune response through two main mechanisms: activating the innate immune response *via* the Toll-like receptor (TLR) (3) and/or activating free fatty acid receptors (FFAR) *via* microbial metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs), including acetate, propionate, and butyrate. In addition, these metabolites can induce the differentiation of naive T cells into regulatory T cells (Tregs) or their migration into the intestine (4). Intestinal dysbiosis can lead to excessive activation of TLRs and a low production of SCFAs, contributing to the development of a number of gastrointestinal diseases, obesity, and diabetes (5–7). Because some probiotic bacteria in the gut can suppress chronic inflammatory and autoimmune diseases, the use of probiotics, like Bifidobacteria, Lactobacilli, Lactococci, and Streptococci, as prebiotics and/or





Open access

Original research



# Mast cell-T cell axis alters development of colitis-dependent and colitis-independent colorectal tumours: potential for therapeutically targeting via mast cell inhibition

Juliana Y Sakita,<sup>1</sup> Jefferson Elias-Oliveira,<sup>2</sup> Daniela Carlos,<sup>2</sup> Emerson de Souza Santos,<sup>3</sup> Luciana Yamamoto Almeida,<sup>4</sup> Tathiane M Malta,<sup>3</sup> Mariângela O Brunaldi,<sup>5</sup> Sergio Albuquerque ,<sup>3</sup> Cleide Lúcia Araújo Silva,<sup>6</sup> Marcus V Andrade,<sup>7</sup> Vania L D Bonato,<sup>2</sup> Sergio Britto Garcia,<sup>5</sup> Fernando Queiroz Cunha,<sup>8</sup> Guilherme Cesar Martellosi Cebinelli,<sup>8</sup> Ronaldo B Martins,<sup>9</sup> Jason Matthews,<sup>10,11</sup> Leandro Colli,<sup>12</sup> Francis L Martin,<sup>13,14</sup> Sergio A Uyemura,<sup>3</sup> Vinicius Kannen <sup>1,10</sup>

**To cite:** Sakita JY, Elias-Oliveira J, Carlos D, *et al.* Mast cell-T cell axis alters development of colitis-dependent and colitis-independent colorectal tumours: potential for therapeutically targeting via mast cell inhibition. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;10:e004653. doi:10.1136/jitc-2022-004653

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2022-004653>).

SAU and VK are joint senior authors.

Accepted 07 September 2022



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Dr Vinicius Kannen;  
vinicius.kannen@utoronto.ca

## ABSTRACT

**Background** Colorectal cancer (CRC) has a high mortality rate and can develop in either colitis-dependent (colitis-associated (CA)-CRC) or colitis-independent (sporadic (s)CRC) manner. There has been a significant debate about whether mast cells (MCs) promote or inhibit the development of CRC. Herein we investigated MC activity throughout the multistep development of CRC in both human patients and animal models.

**Methods** We analyzed human patient matched samples of healthy colon vs CRC tissue alongside conducting a The Cancer Genome Atlas-based immunogenomic analysis and multiple experiments employing genetically engineered mouse (GEM) models.

**Results** Analyzing human CRC samples revealed that MCs can be active or inactive in this disease. An activated MC population decreased the number of tumor-residing CD8 T cells. In mice, MC deficiency decreased the development of CA-CRC lesions, while it increased the density of tumor-based CD8 infiltration. Furthermore, co-culture experiments revealed that tumor-primed MCs promote apoptosis in CRC cells. In MC-deficient mice, we found that MCs inhibited the development of sCRC lesions. Further exploration of this with several GEM models confirmed that different immune responses alter and are altered by MC activity, which directly alters colon tumorigenesis. Since rescuing MC activity with bone marrow transplantation in MC-deficient mice or pharmacologically inhibiting MC effects impacts the development of sCRC lesions, we explored its therapeutic potential against CRC. MC activity promoted CRC cell engraftment by inhibiting CD8+ cell infiltration in tumors, pharmacologically blocking it inhibits the ability of allograft tumors to develop. This therapeutic strategy potentiated the cytotoxic activity of fluorouracil chemotherapy.

**Conclusion** Therefore, we suggest that MCs have a dual role throughout CRC development and are potential druggable targets against this disease.

## WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

⇒ The role of mast cells (MCs) in colorectal cancer (CRC) is controversial as they can either promote or inhibit it. Studying this issue may reveal druggable targets for oncostatic therapies.

## WHAT THIS STUDY ADDS

⇒ Our study shows that an MC-lymphocyte axis alters the development of both CA-CRC and sporadic CRC. However, several immune mechanisms can also change MCs' function and CRC development. Moreover, pharmacologically inhibiting MC activity blocks the growth of CRC and melanoma tumors. This therapeutic strategy can be combined with a chemotherapeutic compound.

## HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

⇒ Our findings define specific conditions in which MCs can promote or block CRC development. They also highlight MCs as a versatile druggable target against melanoma and CRC.

## INTRODUCTION

Mast cells (MCs) have been suggested to play a pivotal yet complex role in several immune-mediated reactions in the body.<sup>1–3</sup> Bone marrow releases immature MCs that migrate towards their patrolling sites that are then activated according to immediate region-specific needs. Also, MCs synthesize inflammatory factors towards antigens binding to the Fc region of IgE coating their membrane.<sup>2–4</sup>

In human colorectal cancer (CRC), a reduced MC population has been associated



Contents lists available at ScienceDirect

Regenerative Therapy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/reth>

Original Article

## Xenogeneic mesenchymal stem cell biocurative improves skin wounds healing in diabetic mice by increasing mast cells and the regenerative profile



Gabriel Martins da Costa Manso<sup>a</sup>, Jefferson Elias-Oliveira<sup>a</sup>,  
 Jhefferson Barbosa Guimarães<sup>a</sup>, Ítalo Sousa Pereira<sup>a</sup>, Vanessa Fernandes Rodrigues<sup>a</sup>,  
 Beatriz Burger<sup>b</sup>, Dianne Maciely Carvalho Fantacini<sup>c,d</sup>,  
 Lucas Eduardo Botelho de Souza<sup>d</sup>, Hosana Gomes Rodrigues<sup>b</sup>,  
 Vânia Luiza Deperon Bonato<sup>a</sup>, João Santana Silva<sup>a,e</sup>, Simone Gusmão Ramos<sup>f</sup>,  
 Rita Cassia Tostes<sup>g</sup>, Adriana Oliveira Manfiolli<sup>g</sup>, Carolina Caliarri-Oliveira<sup>h</sup>,  
 Daniela Carlos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Nutrients and Tissue Repair, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, Brazil

<sup>c</sup> Biotechnology Nucleus of Ribeirão Preto/Butantan Institute, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Center for Cell-Based Therapy, Hemotherapy Center of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Fiocruz-Bi-Institutional Translational Medicine Platform, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Department of Pathology and Legal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>g</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>h</sup> In Situ Cell Therapy, Supera Innovation Technology Park, Ribeirão Preto, São Paulo, 14056-680, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 November 2022

Received in revised form

19 December 2022

Accepted 22 December 2022

#### Keywords:

Diabetes mellitus

Wound healing

Cell therapy

Mesenchymal stem cells

3D bioprinting

### ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease and a major cause of mortality and morbidity worldwide. The hyperglycemia caused by DM induces micro and macrovascular complications that lead, among other consequences, to chronic wounds and amputations. Cell therapy and tissue engineering constitute recent therapeutic alternatives to improve wound healing in diabetic patients. The current study aimed to analyze the effectiveness of biocuratives containing human mesenchymal stem cells (MSCs) associated with a hydrogel matrix in the wound healing process and related inflammatory cell profile in diabetic mice.

**Methods:** Biocuratives containing MSCs were constructed by 3D bioprinting, and applied to skin wounds on the back of streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetic (T1D) mice. The healing process, after the application of biocuratives with or without MSCs was histologically analyzed. In parallel, genes related to growth factors, mast cells (MC), M1 and M2 macrophage profiles were evaluated by RT-PCR. Macrophages were characterized by flow cytometry, and MC by toluidine blue staining and flow cytometry.

**Results:** Mice with T1D exhibited fewer skin MC and delayed wound healing when compared to the non-diabetic group. Treatment with the biocuratives containing MSCs accelerated wound healing and improved skin collagen deposition in diabetic mice. Increased TGF- $\beta$  gene expression and M2 macrophage-related markers were also detected in skin of diabetic mice that received MSCs-containing biocuratives. Finally, MSCs upregulated IL-33 gene expression and augmented the number of MC in the skin of diabetic mice.

\* Corresponding author.

E-mail address: [danicar@usp.br](mailto:danicar@usp.br) (D. Carlos).

Peer review under responsibility of the Japanese Society for Regenerative Medicine.

<https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.12.006>

2352-3204/© 2023, The Japanese Society for Regenerative Medicine. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).





## Article

# The Microbiota-Dependent Worsening Effects of Melatonin on Gut Inflammation

Jefferson Luiz da Silva <sup>1,†</sup>, Lia Vezenard Barbosa <sup>1,†</sup>, Camila Figueiredo Pinzan <sup>1,2</sup>, Viviani Nardini <sup>1</sup>,  
Irislene Simões Brigo <sup>1</sup>, Cássia Aparecida Sebastião <sup>1</sup>, Jefferson Elias-Oliveira <sup>2</sup>, Vânia Brazão <sup>1</sup>,  
José Clóvis do Prado Júnior <sup>1</sup>, Daniela Carlos <sup>2</sup> and Cristina Ribeiro de Barros Cardoso <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto 14040-903, SP, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-903, SP, Brazil

\* Correspondence: cristina@fcfrp.usp.br; Tel.: +55-(16)-3315-0257; Fax: +55-(16)-3315-4725

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Dysbiosis and disturbances in gut homeostasis may result in dysregulated responses, which are common in inflammatory bowel diseases (IBD). These conditions may be refractory to the usual treatments and novel therapies are still necessary to reach a more successful regulation of intestinal immunity. The hormone melatonin (MLT) has been raised as a therapeutic alternative because of its known interactions with immune responses and gut microbiota. Hence, we evaluated the effects of MLT in experimental colitis that evolves with intestinal dysbiosis, inflammation and bacterial translocation. C57BL/6 mice were exposed to dextran sulfate sodium and treated with MLT. In acute colitis, the hormone led to increased clinical, systemic and intestinal inflammatory parameters. During remission, continued MLT administration delayed recovery, increased TNF, memory effector lymphocytes and diminished spleen regulatory cells. MLT treatment reduced Bacteroidetes and augmented Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla in mice feces. Microbiota depletion resulted in a remarkable reversion of the colitis phenotype after MLT administration, including a counter-regulatory immune response, reduction in TNF and colon macrophages. There was a decrease in Actinobacteria, Firmicutes and, most strikingly, Verrucomicrobia phylum in recovering mice. Finally, these results pointed to a gut-microbiota-dependent effect of MLT in the potentiation of intestinal inflammation.

**Keywords:** microbiota; IBD; melatonin; intestinal dysbiosis; inflammation



**Citation:** da Silva, J.L.; Barbosa, L.V.; Pinzan, C.F.; Nardini, V.; Brigo, I.S.; Sebastião, C.A.; Elias-Oliveira, J.; Brazão, V.; Júnior, J.C.d.P.; Carlos, D.; et al. The Microbiota-Dependent Worsening Effects of Melatonin on Gut Inflammation. *Microorganisms* **2023**, *11*, 460. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020460>

Academic Editors: Shuangjiang Liu, Changtao Jiang, Zhongze Fang, Hongwei Liu and Jun Wang

Received: 22 December 2022

Revised: 31 January 2023

Accepted: 9 February 2023

Published: 11 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The intestinal microbiota is essential for numerous physiological processes, including the digestion of food, development of the intestinal immune system and protection against pathogenic microorganisms [1–3]. Thus, the dysbiosis and the breakdown of gut homeostasis may result in a dysregulated immune responses and tissue damage [4,5]. Inflammatory bowel diseases (IBD), which include ulcerative colitis and Crohn’s disease, are chronic disorders of the gastrointestinal tract that result from uncontrolled mucosal reactions, related to genetic susceptibility, environmental factors and intestinal microbes [6].

Patients affected by IBD present variations in the bacteria, fungi, viruses and other populations in the intestine, along with an imbalance between commensal and pathogenic microorganisms [7]. As a result of the breakdown in immunological tolerance and gut dysbiosis, inflammatory cells accumulate in the tissues and the exacerbated resulting reactions driven by cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-17 and IFN- $\gamma$  [7–9] lead to leukocyte activation, epithelial disruption and gut destruction.

IBD treatment requires the use of immunosuppressive and biological drugs, aimed at controlling the intestinal exacerbated inflammation. However, some patients with



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Rashmi Singh,  
Banaras Hindu University, IndiaREVIEWED BY  
Md Tajmul,  
National Institute of Diabetes and Digestive  
and Kidney Diseases (NIH), United States  
Alexandra Kendall,  
The University of Manchester,  
United Kingdom\*CORRESPONDENCE  
Hosana Gomes Rodrigues  
✉ hosanagr@unicamp.brRECEIVED 10 January 2023  
ACCEPTED 15 May 2023  
PUBLISHED 09 June 2023CITATION  
Burger B, Sagiorato RN, Silva JR,  
Candrea T, Pacheco MR, White D,  
Castelucci BG, Pral LP, Fisk HL, Rabelo ILA,  
Elias-Oliveira J, Osório WR, Consonni SR,  
Farias AdS, Vinolo MAR, Lameu C, Carlos D,  
Fielding BA, Whyte MB, Martinez FO,  
Calder PC and Rodrigues HG (2023)  
Eicosapentaenoic acid-rich oil  
supplementation activates PPAR- $\gamma$  and  
delays skin wound healing in type 1  
diabetic mice.  
*Front. Immunol.* 14:1141731.  
doi: 10.3389/fimmu.2023.1141731COPYRIGHT  
© 2023 Burger, Sagiorato, Silva, Candrea,  
Pacheco, White, Castelucci, Pral, Fisk,  
Rabelo, Elias-Oliveira, Osório, Consonni,  
Farias, Vinolo, Lameu, Carlos, Fielding,  
Whyte, Martinez, Calder and Rodrigues. This  
is an open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Eicosapentaenoic acid-rich oil supplementation activates PPAR- $\gamma$ and delays skin wound healing in type 1 diabetic mice

Beatriz Burger<sup>1</sup>, Roberta Nicolli Sagiorato<sup>1</sup>,  
Jéssica Rondoni Silva<sup>1</sup>, Thamiris Candrea<sup>1</sup>,  
Mariana R. Pacheco<sup>1</sup>, Daniel White<sup>2</sup>, Bianca G. Castelucci<sup>3</sup>,  
Laís P. Pral<sup>4</sup>, Helena L. Fisk<sup>5</sup>, Izadora L. A. Rabelo<sup>6</sup>,  
Jefferson Elias-Oliveira<sup>7</sup>, Wislei Riuper Osório<sup>8</sup>,  
Silvio Roberto Consonni<sup>3</sup>, Alessandro dos Santos Farias<sup>9</sup>,  
Marco Aurélio Ramirez Vinolo<sup>4</sup>, Claudiana Lameu<sup>6</sup>,  
Daniela Carlos<sup>7</sup>, Barbara A. Fielding<sup>10</sup>, Martin Brunel Whyte<sup>11,12</sup>,  
Fernando O. Martinez<sup>13</sup>, Philip C. Calder<sup>5,14</sup>  
and Hosana Gomes Rodrigues<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Laboratory of Nutrients and Tissue Repair, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, Brazil, <sup>2</sup>Department of General Surgery, The Royal Surrey National Health Service (NHS) Foundation Trust Hospital, Guildford, United Kingdom, <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil, <sup>4</sup>Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil, <sup>5</sup>School of Human Development & Health, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom, <sup>6</sup>Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>7</sup>Departments of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>8</sup>Laboratory of Manufacturing Advanced Materials, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, Brazil, <sup>9</sup>Autoimmune Research Lab, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil, <sup>10</sup>Department of Nutritional Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, United Kingdom, <sup>11</sup>Department of Medicine, King's College Hospital National Health Service (NHS) Foundation Trust, London, United Kingdom, <sup>12</sup>Department of Clinical & Experimental Medicine, School of Biosciences and Medicine, University of Surrey, Guildford, United Kingdom, <sup>13</sup>Department of Biochemical Sciences, School of Biosciences and Medicine, University of Surrey, Guildford, United Kingdom, <sup>14</sup>National Institute for Health and Care Research (NIHR) Southampton Biomedical Research Centre, University Hospital Southampton National Health Service (NHS) Foundation Trust and University of Southampton, Southampton, United Kingdom

Delayed wound healing is a devastating complication of diabetes and supplementation with fish oil, a source of anti-inflammatory omega-3 ( $\omega$ -3) fatty acids including eicosapentaenoic acid (EPA), seems an appealing treatment strategy. However, some studies have shown that  $\omega$ -3 fatty acids may have a deleterious effect on skin repair and the effects of oral administration of EPA on wound healing in diabetes are unclear. We used streptozotocin-induced diabetes as a mouse model to investigate the effects of oral administration of an EPA-rich oil on wound closure and quality of new tissue formed. Gas chromatography analysis of serum and skin showed that EPA-rich oil increased the incorporation of  $\omega$ -3 and decreased  $\omega$ -6 fatty acids, resulting in reduction of the  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio. On the tenth day after wounding, EPA increased production of



## AT<sub>1</sub> receptors modulate ethanol-induced loss of anticontractile effect of perivascular adipose tissue

Wanessa M.C. Awata<sup>a,b</sup>, Arthur H. Sousa<sup>a,b</sup>, Marcela M.B. de Mello<sup>a</sup>, Thales M.H. Dourado<sup>a,b</sup>, Lucas C. Pinheiro<sup>b</sup>, Jefferson Elias-Oliveira<sup>c</sup>, Vanessa F. Rodrigues<sup>c</sup>, Daniela Carlos<sup>c</sup>, Michele M. Castro<sup>a</sup>, Carlos R. Tirapelli<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Farmacologia, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Ethanol  
Angiotensin II  
Perivascular adipose tissue  
Renin-angiotensin-aldosterone system  
Blood pressure

### ABSTRACT

Ethanol consumption activates renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), which plays a major role in the pro-contractile and hypertensive effects linked to ethanol. We hypothesized that ethanol consumption induces loss of the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) through RAAS-mediated mechanisms. We examined the contribution of angiotensin II type 1 receptors (AT<sub>1</sub>R) to ethanol-induced PVAT dysfunction. With this purpose, male Wistar *Hannover* rats were treated with ethanol 20 % (in volume ratio) and/or losartan (antagonist of AT<sub>1</sub>R; 10 mg/kg/day, gavage) for 9 weeks. Losartan prevented the increase in blood pressure and the loss of the anticontractile effect of PVAT induced by ethanol consumption. PVAT dysfunction occurred after 3 and 9 weeks of treatment with ethanol in an endothelium-dependent manner. Blockade of AT<sub>1</sub>R prevented ethanol-induced reduction of adiponectin levels in PVAT from ethanol-treated rats. Functional assays revealed that ethanol impaired the anticontractile effect of PVAT-derived angiotensin (1–7) and endothelial nitric oxide (NO). In conclusion, AT<sub>1</sub>R are implicated in ethanol-induced loss of the anticontractile effect of PVAT. In PVAT, AT<sub>1</sub>R activation decreases the production of adiponectin, a PVAT-derived factor that promotes vasorelaxation in an endothelium-dependent manner. In the endothelium, AT<sub>1</sub>R favors the production of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) leading to a reduction in NO bioavailability. These responses impair the vasodilator action induced by PVAT-derived angiotensin (1–7), which occurs via Mas receptors located in endothelial cells. Ethanol-induced PVAT dysfunction favors vascular hypercontractility, a response that could contribute to the hypertensive state associated with ethanol consumption.

### 1. Introduction

Clinical, epidemiological and experimental studies established a clear relationship between consumption of high amounts of ethanol and hypertension [1,2]. There is interplay between neuroendocrine changes and vascular hypercontractility in promoting the hypertensive state induced by ethanol [3]. Consumption of ethanol promotes activation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), which is the final

mediator of the pro-contractile and hypertensive effects of ethanol [4,5].

Perivascular adipose tissue (PVAT) is an important regulator of the vascular tonus. This tissue is composed predominantly by adipocytes, but resident immune cells (e.g. macrophages and neutrophils) are also present in PVAT [4]. Brown-like adipose tissue phenotype is found in PVAT surrounding thoracic aorta, while a mixture of white-like and brown-like adipocytes composes PVAT that surrounds the abdominal aorta and coronary arteries. Conversely, white-like adipose tissue is

**Abbreviations:** AT<sub>1</sub>R, Angiotensin II type 1 receptors; DHE, Dihydroethidium; DAF-2DA, 5,6-diaminofluorescein diacetate; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein; MPO, Myeloperoxidase; NAG, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase; L-NAME, NG-nitro-L-arginine methyl ester; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO, Nitric oxide; PVAT, Perivascular adipose tissue; PGI<sub>2</sub>, Prostacyclin I<sub>2</sub>; ROS, Reactive oxygen species; RAAS, Renin-angiotensin-aldosterone system; SOD, Superoxide dismutase; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor- $\alpha$ .

\* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, CEP 14040-902, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: [crtirapelli@eerp.usp.br](mailto:crtirapelli@eerp.usp.br) (C.R. Tirapelli).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115840>

Received 25 August 2023; Received in revised form 28 September 2023; Accepted 29 September 2023

Available online 1 October 2023

0006-2952/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.



## Inulin prebiotic ameliorates type 1 diabetes dictating regulatory T cell homing via CCR4 to pancreatic islets and butyrogenic gut microbiota in murine model

Jefferson Barbosa Guimarães,<sup>1</sup> Vanessa Fernandes Rodrigues,<sup>1</sup> Ítalo Sousa Pereira,<sup>1</sup> Gabriel Martins da Costa Manso,<sup>1</sup> Jefferson Elias-Oliveira,<sup>1</sup> Jefferson Antônio Leite,<sup>1</sup> Mariana Camila Gonçalves Miranda Waldetario,<sup>2</sup> Sarah de Oliveira,<sup>3</sup> Arilson Bernardo dos Santos Pereira Gomes,<sup>3</sup> Ana Maria Caetano Faria,<sup>4</sup> Simone Gusmão Ramos,<sup>5</sup> Vânia L.D. Bonato,<sup>6</sup> João Santana Silva,<sup>7</sup> Marco Aurélio Ramirez Vinolo,<sup>3</sup> Ulliana Marques Sampaio,<sup>8</sup> Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici,<sup>8</sup> and Daniela Carlos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunoregulation of Metabolic Diseases, Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ave. Bandeirantes, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

<sup>2</sup>Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, United States

<sup>3</sup>Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics and Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Pathology, Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ave. Bandeirantes, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

<sup>6</sup>Laboratory of Immunology and Pulmonary Inflammation, Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ave. Bandeirantes, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

<sup>7</sup>Fiocruz-Bi-Institutional Translational Medicine Platform, University of São Paulo, Ave. Bandeirantes, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

<sup>8</sup>Department of Food Science and Nutrition, School of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

\*Corresponding author: Email: [danicar@usp.br](mailto:danicar@usp.br)

### Abstract

Gut dysbiosis is linked to type 1 diabetes mellitus (T1D). Inulin (INU), a prebiotic, modulates the gut microbiota, promoting beneficial bacteria that produce essential short-chain fatty acids for immune regulation. However, how INU affects T1D remains uncertain. Using a streptozotocin-induced (STZ) mouse model, we studied INU's protective effects. Remarkably, STZ + INU mice resisted T1D, with none developing the disease. They had lower blood glucose, reduced pancreatic inflammation, and normalized serum insulin compared with STZ + SD mice. STZ + INU mice also had enhanced mucus production, abundant *Bifidobacterium*, *Clostridium* cluster IV, *Akkermansia muciniphila*, and increased fecal butyrate. In cecal lymph nodes, we observed fewer CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells expressing CCR4 and more Foxp3<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> cells in pancreatic islets, with higher CCL17 expression. This phenotype was absent in CCR4-deficient mice on INU. INU supplementation effectively protects against experimental T1D by recruiting CCR4<sup>+</sup> regulatory T cells via CCL17 into the pancreas and altering the butyrate-producing microbiota.

**Keywords:** gut microbiota, immunoregulation, inulin, prebiotic, regulatory T cells, Treg, type 1 diabetes

### 1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease that occurs with a progressive loss of tolerance to the self-antigens of insulin-producing pancreatic cells, which leads to the selective destruction of these cells, generating insulinitis that culminates in blood hyperglycemia.<sup>1</sup> The disease develops mainly due to an imbalance between regulatory T (Treg) lymphocyte responses and autoreactive effector T lymphocytes.<sup>2</sup> Although the exact etiology of the disease is not fully understood, its development is known to occur in genetically susceptible individuals affected by certain environmental factors, such as the gut microbiota, which trigger T1D.<sup>3</sup> In this context, there are 2 main models to study T1D: nonobese diabetic mice (NOD) that develop the disease spontaneously and mice induced by chemical substances, such as streptozotocin (STZ).<sup>4,5</sup> Although NOD mice are mainly used to study TD1, they have some limitations that generate differences in the effects from those in human clinical trials when some treatments are applied to modulate the experimental disease. These mice have much stronger pancreatic insulinitis than

the insulinitis observed in humans who develop TD1.<sup>6</sup> Thus, this is similar to examining different diseases. The STZ model is an excellent alternative because the disease that mice develop is similar in many aspects to that observed in humans,<sup>7,8</sup> such as the infiltration of leukocytes into pancreatic islets, generating an immune-mediated response. In addition, anti-insulin antibodies were present in the serum of naïve C57BL/6 mice, demonstrating another sign of an autoimmune response in this model.<sup>9</sup>

Because the development of T1D is chronic and mediated by environmental factors, such as the influence of gut microbiota, investigating the effect of prebiotic interventions in inducing Treg cells is reasonable because the generation of these cells strongly depends on the microenvironment in which they are generated, as well as on gut microbiota homeostasis.<sup>10</sup> Treg cells are involved in the prevention of autoimmune diseases by suppressing pathogenic T lymphocytes and other adaptive and innate cells,<sup>11</sup> ameliorating T1D. This finding demonstrates the relevance of Treg cells in controlling the immune response to self and non-self-antigens

Received: November 29, 2022. Revised: September 4, 2023. Accepted: October 14, 2023. Corrected and Typeset: November 21, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Society for Leukocyte Biology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

**APÊNDICE C - PREMIAÇÕES**

- 3ª Melhor aula ministrada "Imunidade de mucosas" - XIV Curso de Inverno em Imunologia, FMRP USP (2022).
- Bursary Award Winner - for participation in "Microbiome Interactions in Health and Disease", in Hinxton (United Kingdom), Wellcome Connecting Science Learning and training. Work presented: TLR2 is essential for induction of cDC1 and regulatory T cells in protection mediated by *Lactococcus lactis* expressing HSP65 in type 1 diabetes” (2024).

## ANEXO A – AUTORIZAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Efeito da administração do Lactococcus lactis expressando hsp65, na indução de tolerância mediada por células T reguladoras e na imunorregulação do DMI em modelo experimental*”, registrado com o número do protocolo **007/2020**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Daniela Carlos Sartori**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 27 de janeiro de 2020.

Colaboradores: Jefferson Elias Oliveira  
Jheferson Barbosa Guimarães  
Prof. Dr. Célio Lopes Silva

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			27/01/2020 a 30/12/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	198	21g / 60 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / TLR2 KO	30	21g / 60 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais
Camundongo / FOXP3GFP	30	21g / 60 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais
Camundongo / NOD	120	19g / 30 dias	Fêmea	Centro de Criação de Camundongos Especiais
Camundongo / NOR	18	19g / 30 dias	Fêmea	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2020

  
**Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP