



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CRISTINA MEDINA GUILLÉN

ESTADO DA TOLERÂNCIA PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL CONTÍNUA DE AUTOANTÍGENO NA DIABETES AUTOIMUNE

Campinas
2024

ANA CRISTINA MEDINA GUILLÉN

ESTADO DA TOLERÂNCIA PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL CONTÍNUA DE AUTOANTÍGENO NA DIABETES AUTOIMUNE

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Genética e Biologia
Molecular, **na área de Imunologia.***

Orientador: Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA ANA CRISTINA MEDINA GUILLÉN, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. ALESSANDRO DOS
SANTOS FARIAS.

Campinas

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gilberto Martins Vicentin - CRB 8/8620

G945e Guillén, Ana Cristina Medina, 1994-
Estado da tolerância pela administração oral contínua de autoantígeno na diabetes autoimune / Ana Cristina Medina Guillén. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Alessandro dos Santos Farias.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Autoimunidade. 2. Tolerância oral. 3. Linfócitos T CD4-positivos. 4. Linfócitos T reguladores. 5. Diabetes mellitus tipo 1. I. Farias, Alessandro dos Santos, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Condition of tolerance by continuous oral administration of autoantigen in autoimmune diabetes

Palavras-chave em inglês:

Autoimmunity

Oral tolerance

CD4-positive T-Lymphocytes

T-Lymphocytes, regulatory

Diabetes mellitus, type 1

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandro dos Santos Farias [Orientador]

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Denise Moraes da Fonseca

Data de defesa: 29-05-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5093-0068>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6083306200869917>

Campinas, 29 de maio de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias (Orientador)

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Profa. Dra. Denise Moraes da Fonseca

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

***Aos meus pais e ao meu companheiro de vida, pelo,
apoio, ensinamentos e amor durante toda essa
jornada.***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida e por me dar forças e determinação para seguir sempre em frente. Aos meus pais, Rita e Nicolas, pelo carinho e ensinamentos que fazem de mim o que sou hoje. Desde pequena via eles sempre estudando e indo atrás de conhecimento e isso sempre me motivou. Agradeço, especialmente, a minha mãe Rita que, apesar de todas as adversidades da vida, ela sempre se manteve de pé e pronta para seguir em frente, admiro muito isso nela. Agradeço também ao meu melhor amigo e noivo, Rafael, por estar sempre ao meu lado em cada detalhe da minha vida. Não tenho palavras para agradecer pelo seu amor, paciência, compreensão e apoio! Durante a pandemia, estava começando meu mestrado e muitos medos vieram à tona, isso me desmotivou muito. Mas ele sempre dava um jeitinho de me motivar a continuar, seja com palavras, carinho ou até com um prato super gostoso que ele fazia para alegrar meu dia.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias, que foi meu professor de Imunologia na graduação e despertou em mim um encantamento pela imunologia. Agradeço por permitir fazer parte do laboratório de Autoimunidade e iniciar minha vida na pesquisa, por compartilhar seu conhecimento científico, pela ajuda, sugestões e paciência durante essa jornada.

Agradeço ao pessoal do laboratório que não faz mais parte do grupo, Carolina Francelin, que me acompanhou durante a iniciação científica e foi fundamental para meu crescimento científico. Ao Fernando, que compartilhou seus conhecimentos teóricos e práticos. E a toda a equipe que sempre estava disposta a ajudar em algum experimento e manter a rotina do laboratório: Bruna, Stephanie, Rani, Maurílio, Vitor e Vinícius.

Agradeço as meninas do laboratório que estiveram presentes durante meu mestrado, Ana Marques, Natália Brunetti e Natália Munhoz, pelo companheirismo, conversas, almoços, auxílio em experimentos e troca de conhecimentos. Em especial, agradeço a Ana Marques que se tornou uma grande amiga e é meu espelho como cientista, sempre me motivando e dizendo as palavras certas na hora certa. Agradeço também aos amigos e colegas de outros laboratórios do departamento que sempre estiveram dispostos a colaborar com os projetos do nosso grupo, especialmente ao grupo do laboratório da Prof^a Leonilda Maria Barbosa dos Santos.

Agradeço aos amigos de graduação que a Unicamp me presenteou, Rafael, Ana Beatriz, Bryan, Ken e Nathan, cada um tem um espacinho em meu coração por toda amizade que construímos ao longo da graduação, pelas conversas, motivações, viagens, trabalhos e união. Mesmo atualmente alguns estando longe fisicamente, a amizade continua e aos que ainda estão por perto, agradeço pelas conversas motivadoras, troca de experiências e momentos de nostalgia que sempre alegram.

Não poderia deixar de agradecer também a todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória até o momento, amigos, familiares e professores que de alguma forma me ajudaram e apoiaram minhas decisões. Especialmente minhas queridas amigas Beatriz e Ana Paula, que sempre se mostraram presentes e dispostas a me ouvirem.

Agradeço à Unicamp, ao Instituto de Biologia, ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia por todo o suporte prestado durante a minha formação como bióloga e agora como mestra em Genética e Biologia Molecular.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro da FAEPEX (Fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão da Unicamp) que também possibilitou a realização do presente trabalho.

RESUMO

A tolerância imunológica oral ocorre pela inibição da resposta imune específica a antígenos solúveis administrados pela via oral, expostos previamente ao trato gastrointestinal. Esse mecanismo regula e protege o organismo contra a hipersensibilidade causada por antígenos alimentares e microorganismos comensais. A indução da tolerância por administração oral de autoantígeno é uma abordagem que vem sendo classificada como tratamento alternativo para algumas doenças autoimunes humanas, tais como a artrite reumatoide, diabetes mellitus e esclerose múltipla. Entretanto, estudos demonstraram a indução de uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) como resultado da administração oral de autoantígeno em camundongos ao invés da indução da tolerância, o que levou ao aparecimento de doença autoimune. Os mecanismos envolvidos na indução da tolerância por via oral não são totalmente conhecidos e isso afeta negativamente o avanço de novos tratamentos para doenças autoimunes. Sendo assim, o objetivo principal deste estudo foi induzir a quebra da tolerância imunológica e avaliar o perfil e a atividade fenotípica de células TCD4⁺ Foxp3⁺ (células T regulatórias – Tregs) tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos em camundongos que expressam ovalbumina (OVA) no pâncreas (RIP-mOVA), durante a evolução clínica da indução de diabetes mellitus em decorrência da administração contínua de autoantígeno pela via oral, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos. Nossos resultados mostraram uma diminuição de células TCD4⁺ Foxp3⁺ nos linfonodos mesentéricos e baço dos animais RIP-mOVA ao administrar oralmente OVA por 10 semanas. Além disso, foi visto um aumento de TCRs específicos para resposta contra o autoantígeno após o período de tratamento com OVA. Nossos dados nos levam a hipótese de que se continuarmos o estímulo oral do autoantígeno a longo prazo, haverá uma queda mais expressiva de Tregs concomitante com o aparecimento de diabetes mellitus nos animais. Podendo, assim, causar a quebra da autotolerância imunológica e a possível geração da resposta autoagressiva pela presença contínua do autoantígeno. Nossa pesquisa auxilia no entendimento dos eventos imunológicos atrás da continuidade do estímulo autoantigênico, utilizado comumente para a indução da tolerância oral. Compreender esses eventos proporciona a elaboração de novas estratégias para o uso da tolerância oral como tratamento alternativo de doenças autoimunes como a diabetes mellitus do tipo 1.

ABSTRACT

Oral immunological tolerance prevents the specific immune response to soluble antigens administered orally, previously exposed to the gastrointestinal tract. This mechanism regulates and protects the body against hypersensitivity caused by food antigens and commensal microorganisms. Tolerance induction by oral administration of autoantigen is an approach that has been used as an alternative treatment for some human autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, diabetes mellitus, and multiple sclerosis. However, studies have demonstrated the induction of a cytotoxic T lymphocyte (CTL) response due to oral administration of autoantigen in mice rather than the induction of tolerance, which led to the onset of autoimmune disease. The mechanisms involved in the induction of tolerance orally are not fully known, negatively affecting the advantages of advancing new treatments for autoimmune diseases. Therefore, the main objective of this study was to induce the breakdown of immunological tolerance and evaluate the profile and phenotypic activity of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells (regulatory T cells – Tregs) in both the spleen and mesenteric lymph nodes in mice that express ovalbumin (OVA) in the pancreas (RIP-mOVA), during the clinical evolution of the induction of diabetes mellitus as a result of continuous oral administration of autoantigen, to elucidate the mechanisms involved. Our results showed a decrease in CD4⁺ Foxp3⁺ T cells in the mesenteric lymph nodes and spleen of RIP-mOVA mice when orally administering OVA for 10 weeks. Furthermore, an increase in specific TCRs to the response against the self-antigen was seen after the OVA treatment period. Our data lead us to the hypothesis that if we continue oral stimulation of the autoantigen in the long term, there will be a more significant drop in Tregs concomitant with the induction of diabetes mellitus in mice. Therefore, this could cause the breakdown of immunological self-tolerance and the possible generation of a self-aggressive response due to the continuous presence of the self-antigen. Our research helps to understand the immunological events behind the continuity of the autoantigenic stimulus, commonly used to induce oral tolerance. Understanding these events leads to the development of new strategies for oral tolerance as an alternative treatment for autoimmune diseases such as type 1 diabetes mellitus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIRE	Regulador autoimune
APC	Célula apresentadora de antígeno
AR	Artrite reumatoide
B6	C57Bl/6
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFA	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DC	Célula dendrítica
DM1	Diabetes mellitus 1
DTH	Hipersensibilidade tardia
EM	Esclerose múltipla
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GATA3	GATA ligada a proteína 3
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFA	Adjuvante incompleto de <i>Freund</i>
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LM	Linfonodo mesentérico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NKT	Célula T <i>Natural Killer</i>
NOD	Camundongo diabético não obeso
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino

PP	Placa de Peyer
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RIP	Promotor de insulina de rato
RORyt	Receptor órfão gama relacionado ao RAR
T-bet	Fator de transcrição T <i>box</i> TBX21
TCR	Receptor do linfócito T
Tfh	Linfócito T folicular
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TO	Tolerância oral
TRA	Antígenos restritos a tecidos
Treg	Linfócito T regulador

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1. Breve introdução ao sistema imunológico.....	14
2. Linfócitos.....	16
2.1 Desenvolvimento e maturação	16
2.2 Linfócitos efetores e de memória.....	18
3. Autoimunidade e tolerância	20
3.1 Respostas e doenças autoimunes	20
3.2 Tolerância imunológica.....	21
4. Tolerância Oral	23
4.1 Definição e breve história.....	23
4.2 Mecanismos da tolerância oral	25
4.3 Modelos experimentais de tolerância imunológica	29
JUSTIFICATIVA.....	31
OBJETIVOS	32
1. Objetivo geral	32
2. Objetivos específicos	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1. Animais	33
1.1 Instalação e manutenção	33
1.2 Genotipagem	33
2. Modelo experimental de diabetes mellitus do tipo I	34
2.1 Gavagem	34
2.2 Monitoramento da glicemia	34
2.3 Ingestão voluntária	35
3. Obtenção de células	36
4. Análises das células por citometria de fluxo	36
5. Preparação e avaliação histológica do pâncreas.....	37
6. Análise estatística	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1. Manutenção e genotipagem dos animais RIP-mOVA	39
2. Administração oral de OVA via gavagem e monitoramento da glicemia	39
3. Administração oral de OVA via ingestão voluntária e monitoramento da glicemia	42
4. Análise morfológica e imunohistológica do pâncreas.....	46

5. Análise celular dos linfócitos T CD4 ⁺	51
6. Análise do receptor inibitório CTLA-4 em células T regulatórias	57
7. Análise do repertório do receptor de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	60
CONCLUSÃO.....	68
IMPLICAÇÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS.....	79

INTRODUÇÃO

1. Breve introdução ao sistema imunológico

O sistema imunológico compreende um conjunto de mecanismos especializados que visam manter a homeostase do organismo hospedeiro. Ele atua como um estado protetor, defendendo contra lesões e patógenos, a fim de preservar a identidade do organismo como um todo¹. O sistema imune pode reagir contra células, órgãos ou tecidos próprios do organismo e pode afetar diretamente seu funcionamento, distanciando-se da sua identidade e causando a autoimunidade^{2,3}. Em certo grau, as respostas contra o próprio são consideradas normais e até necessárias nos indivíduos, sem que haja alteração significativa na homeostase do sistema imune. Entretanto, dependendo da intensidade e continuidade dessas respostas, podem levar à alteração da homeostase do sistema imune inato e/ou adaptativo, provocando lesão tecidual e resultando em distúrbios inflamatórios ou doenças autoimunes⁴.

O sistema de defesa contra agentes externos do organismo é composto classicamente pelas barreiras anatômicas e fisiológicas, e pelo sistema de resposta imune que compõe a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata é um sistema evolutivo de resposta de defesa que abrange praticamente todos os tecidos do organismo e inclui componentes hematopoiéticos e não-hematopoiéticos. As células do sistema imune inato possuem receptores de reconhecimento codificados pela linhagem germinativa (receptores de reconhecimento de padrões – PRR), como os receptores do tipo Toll (TLR), que reconhecem estruturas microbianas expressas por uma grande variedade de patógenos⁵. Esses PRRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são ativados durante uma resposta inflamatória e se diferenciam em células efetoras de vida curta para eliminar a infecção⁶. Os PAMPs são produzidos exclusivamente por microorganismos, sendo cruciais para sua sobrevivência e patogenicidade. O sistema abrange também as barreiras epiteliais, de mucosas e secreções, que atuam prevenindo o acesso dos microorganismos ao hospedeiro⁷. A defesa celular primária é complementada por componentes humorais. As proteínas circulantes do sistema imune inato reconhecem microorganismos que influenciam os mecanismos efetores para facilitar a eliminação da infecção.

Para identificar danos teciduais causados pelos padrões moleculares, as células da imunidade inata têm a capacidade de reconhecer células modificadas (p. ex. células tumorais ou infectadas com patógenos) de células saudáveis do hospedeiro por meio da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Essa molécula é expressa por células saudáveis e não é expressa nas células infectadas ou nos patógenos⁸. Em vista disso, o reconhecimento do MHC indica que a célula é própria organismo, inibindo, assim, a ativação do sistema imune inato contra o tecido normal do hospedeiro. Caso contrário, a imunidade inata sinaliza a presença de uma infecção que, por sua vez, influenciam a ativação do sistema imune adaptativo. Essa sinalização faz com que as células da imunidade inata gerem uma resposta inespecífica inflamatória em poucos minutos após a exposição ao patógeno, sem gerar memória imunológica⁶. Além disso, estudos comprovaram que além do reconhecimento de células infectadas, as células do sistema imune, tais como as *Natural killers* (NK), podem reconhecer e eliminar células saudáveis que falham na expressão ou possuem alguma alteração no MHC de classe I, essa é uma hipótese conhecida como “*missing self*”⁹. As células dendríticas (DCs), especializadas na captura e apresentação de antígenos aos linfócitos, desempenham um papel crucial fazendo uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa. As DCs são induzidas e ativadas por elementos da resposta inata, permitindo a sensibilização dos linfócitos T na resposta imune adaptativa¹⁰.

Ao contrário da inata, a imunidade adaptativa consiste em respostas imunes específicas que se desenvolvem de forma mais lenta, pois são construídas e adaptadas para o dano causado pelo agente infeccioso específico que resultam em memória imunológica¹¹. Esse mecanismo facilita as futuras respostas imunes a esse patógeno após exposições repetidas do mesmo⁷. A especificidade da resposta se origina pelo mecanismo de rearranjo de genes de receptores específicos e estruturalmente únicos das células que compõe o sistema imune adaptativo e o humoral, os linfócitos ou células T e B, gerando uma grande variedade de receptores de antígenos que reconhecem, assim, uma grande variedade de agentes infecciosos e não infecciosos⁵.

A construção molecular da imunidade inata é encontrada em plantas e animais, então pode-se dizer que este tipo de resposta imunológica é uma parte evolutivamente antiga dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o que significa que surgiu antes da divisão

desses dois reinos¹². Já a resposta imune adaptativa pode ser gerada exclusivamente pelos vertebrados, apresentando-se relativamente recente no cenário evolutivo⁵.

2. Linfócitos

2.1 Desenvolvimento e maturação

O estabelecimento e manutenção da homeostase, tolerância e memória imunológica dependem dos linfócitos T e B, nos quais expressam receptores com capacidade de reconhecer uma diversidade de antígenos de patógenos, de tumores e do ambiente¹³.

Tanto as células B quanto as T são originadas de progenitores linfoides em órgãos linfoides primários fetais e adultos, tais como o fígado e a medula óssea. O desenvolvimento das subpopulações dessas células é um processo em camadas¹⁴, ou seja, os subtipos dos linfócitos B e T são derivados de diferentes progenitores que surgem em momentos diferentes durante o desenvolvimento do organismo¹⁵.

O processo de maturação dos linfócitos B ocorre principalmente na medula óssea, já os precursores de linfócitos T migram da medula óssea para o timo, onde ocorre o desenvolvimento dos linfócitos T imaturos (timócitos). A maturação de ambos linfócitos ocorre de forma semelhante, sinais celulares promovem a proliferação dos progenitores que dão início ao rearranjo sequencial de genes dos receptores de antígenos específicos. Esse é um evento-chave para o comprometimento de uma célula progenitora com a linhagem do linfócito T ou B⁷. Através de processos de seleção celular, são preservadas as células com receptores funcionais e são eliminadas àquelas potencialmente não-funcionais. Finalizando o processo de maturação, ocorre a diferenciação das células B ou T em subpopulações robustas para uma resposta específica na periferia do sistema imune. As células B se desenvolvem em células foliculares, células da zona marginal e em B-1; já as células T se desenvolvem em linfócitos T $\alpha\beta$ com correceptores CD4⁺ e CD8⁺, células NKT e células $\gamma\delta$ ¹⁶.

Um componente crucial para a construção dos receptores dos linfócitos T (TCR) e sua transdução de sinal é o complexo de proteínas CD3 citoplasmáticas. As células duplo-negativas, linfócitos T que ainda não possuem seus correceptores (T CD4⁻CD8⁻), passam a expressar TCR após recombinações de genes das cadeias α , β , γ e δ , no córtex tímico¹⁷. Mais de 90% dos linfócitos, tanto em humanos quanto em camundongos, possuem receptor $\alpha\beta$ enquanto que o restante possui receptor $\gamma\delta$ ¹⁸. A população de células T com TCR $\alpha\beta$ é

mediadora-chave da imunidade adaptativa, pois possui a capacidade de responder a uma vasta variedade de antígenos pelo seu grande repertório. Por outro lado, as células T com receptores de cadeias $\gamma\delta$ apresentam uma menor variedade em comparação ao TCR $\alpha\beta$ e residem em tecidos epiteliais, sugerindo que os ligantes para o TCR $\gamma\delta$ são conservados e não-variantes¹⁹. Apesar disso, essa população exerce uma importante função na defesa do hospedeiro contra um conjunto específico de patógenos e até autoantígenos que podem causar estresse celular. Esta população representa um elo entre a resposta imune inata e adaptativa²⁰.

As etapas combinadas de seleção celular positiva e negativa durante o processo de maturação resultam em um repertório de linfócitos T $\alpha\beta$ que é restrito ao MHC. A população de linfócito T $\gamma\delta$ parece reconhecer o antígeno diretamente, ou seja, não requer apresentação por uma proteína do MHC ou outras moléculas e não dependem do processamento do antígeno²⁰. No córtex tímico, durante a maturação, os timócitos $\alpha\beta$ já expressam correceptores CD4 e CD8 (duplo-positivos) e entram em contato com o complexo de antígenos próprios (autoantígenos) ligados a moléculas do MHC. Entrando na medula tímica, os timócitos passam por uma seleção positiva, logo, os receptores que reconhecem com uma certa afinidade o complexo MHC-antígeno são selecionados para sobreviver¹⁶. Além disso, essa interação define a diferenciação do timócito em linfócito T CD4⁺ (auxiliar) ou CD8⁺ (citotóxico) pelo reconhecimento do MHC de classe II ou I com o TCR, respectivamente²¹. As moléculas do MHC de classe II geralmente apresentam peptídeos derivados de antígenos exógenos que entram na célula pela via endocítica, por outro lado, as moléculas do MHC de classe I apresentam antígenos endógenos, sintetizados no interior da célula que apresenta o antígeno²². Ainda na medula tímica, os timócitos T $\alpha\beta$ entram em contato com células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como as células dendríticas e macrófagos, que também apresentam antígenos próprios associados ao MHC. Os timócitos com receptores que possuem alta afinidade por esses autoantígenos sofrem seleção clonal negativa (apoptose), a fim de evitar o dano permanente da autoimunidade, sendo esse um evento essencial da seleção negativa, denominado também como tolerância central²³. Consequentemente, as células T $\alpha\beta$ CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺ (simples-positivas) com baixa afinidade ao complexo autoantígeno-MHC sobrevivem, finalizando sua maturação e partem

do timo para a periferia do sistema imune, localizado nos órgãos linfoides secundários onde irão formar o repertório de células T periféricas virgens^{21,23}.

A tolerância central é um evento importante para o sistema imune por educar as células T para que tenham a capacidade de tolerar os antígenos próprios e reconheçam antígenos estranhos ao organismo, quando apresentados pelo MHC próprio, para responder contra o nocivo e evitar o dano autoagressivo. Além desse mecanismo de regulação, o sistema dispõe de outros para evitar o dano autoimune nos quais serão abordados posteriormente.

2.2 Linfócitos efetores e de memória

As células T CD4⁺ orquestram outras células do sistema imune, seja através de citocinas secretadas ou por contato direto célula-célula, por isso são denominadas células T auxiliares, ou *helper* em inglês (Th). Essas células possuem um papel fundamental na proteção imunológica contra infecções bacterianas, virais, parasitárias e fúngicas; regulando as respostas humorais das células B²⁴, respostas do linfócitos T CD8⁺ e macrófagos. Por outro lado, as células T CD8⁺ são capazes de realizar lise de células-alvo infectadas por meio da liberação de grânulos contendo granzimas e perforinas, sendo envolvidas principalmente nas respostas antivirais ou antitumorais²⁵ e são, portanto, denominadas células T citotóxicas. Ambos tipos de células T circulam desde o sangue periférico até os órgãos linfoides secundários, sempre em busca da apresentação do seu antígeno específico para o controle de patógenos intracelulares¹⁹.

Os linfócitos B são ativados pelo reconhecimento de antígenos por meio do seu receptor, no qual resulta na geração de plasmócitos secretores de anticorpos e/ou de células B de memória. Como já mencionado anteriormente, as respostas de anticorpos a antígenos específicos são T-dependentes, requerem que o antígeno seja internalizado por células B específicas e apresentados aos linfócitos Th CD4⁺, resultando na ativação da célula B²⁴.

A ativação dos linfócitos T CD4⁺ virgens ocorre quando seu receptor reconhece peptídeos apresentados pelo MHC de classe II, na presença de moléculas coestimulatórias em APCs que apresentam os patógenos. Uma vez ativados, ocorre expansão clonal e adquirem funções efetoras em órgãos linfoides secundários, garantindo a quantidade necessária de clones específicos de antígeno para combater patógenos nos locais de

infecção²⁶. Dependendo do tipo de patógeno e da produção de citocinas específicas para gerar resposta contra esse patógeno, as células T CD4⁺ virgens podem se diferenciar em várias subpopulações especializadas de Th definidas por suas características funcionais²⁷.

As respostas das células Th que determinam o comprometimento com a linhagem são geradas predominantemente pelo perfil de citocinas secretadas pelas células T expostas ao patógeno ou antígeno estranho. Além disso, a força do sinal do TCR também regula esse processo de diferenciação das células T CD4⁺ efectoras. A força desse sinal é influenciada por diversos fatores associados às células T, como a qualidade do engajamento entre as moléculas do MHC com o TCR, a quantidade de antígeno e o grau de coestimulação²⁸. As células Th são classicamente categorizadas em cinco subconjuntos principais, baseados nos fatores mencionados anteriormente e na indução de fatores de transcrição mestres específicos de cada linhagem que determinam suas funções. A linhagem de células Th do tipo 1 (Th1) produz citocinas interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-12 que induzem o fator de transcrição T-bet e, conseqüentemente, desencadeia respostas específicas principalmente para patógenos intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários, ativando macrófagos do tipo 1²⁹. Já o subconjunto de células Th do tipo 2 (Th2) produzem citocinas IL-4, IL-5, IL-13 que ativa o fator de transcrição GATA3 e medeiam respostas imunes contra infecções por parasitas extracelulares, como helmintos, ativando macrófagos do tipo 2. Também auxilia no recrutamento de eosinófilos, basófilos e mastócitos para os locais de infecções³⁰. As células Th17 desencadeiam respostas do tipo 3 que produzem citocinas IL-17 e IL-22, induzindo o fator de transcrição ROR γ t. Essas respostas são específicas para a eliminação de bactérias e fungos extracelulares, auxiliam no recrutamento de neutrófilos e estimulam células nas barreiras mucosas para produzir peptídeos antimicrobianos³¹. As células T CD4⁺ virgens também podem desenvolver-se em células T foliculares (Tfh), nas quais produzem a citocina IL-21 que induzem o regulador Bcl6. Essa subpopulação auxilia as células B a gerarem respostas humorais, promovendo a formação do centro germinativo, a maturação da afinidade e a recombinação da troca de classe de imunoglobulina³². As células T reguladoras (Tregs) podem ser induzidas por meio de células T CD4⁺ virgens na periferia, secretam citocinas IL-10, fator transformador de crescimento (TGF)- β e IL-35, e são regulados pelo seu fator de transcrição mestre Foxp3²⁹. Essas células juntamente com as Tregs derivadas do timo regulam as repostas imunes, controlando a diferenciação e as funções das células T

efetoras, além de manter a tolerância imunológica³³. Posteriormente será abordado esse subconjunto mais a fundo.

Os subconjuntos de células Th, tanto os principais quanto outros que possuem menos embasamento literário, são derivados de células T CD4⁺ virgens maduras. No entanto, algumas dessas células podem se diferenciar com características similares às células T CD8, por induzirem apoptose em células-alvo por meio da secreção de granzima B e perforina, de maneira restrita ao MHC de classe II. Citocinas específicas que induzem fatores de transcrição como Eomes, T-bet, Blimp-1, entre outros, induzem a expressão de genes associados à citotoxicidade nessas células, denominadas T CD4 citotóxicas (CD4-CTLs)³⁴. As células T CD4 CTLs são importantes na proteção do hospedeiro contra infecções virais crônicas, sendo potencializada quando a atividade citotóxica das células T CD8 é prejudicada pela estratégia de fuga do vírus. Além disso, as T CD4 CTLs estão envolvidas em respostas imunes antitumorais e na patologia de várias doenças autoimunes³⁵.

A maioria das células T e B efetoras ativadas têm curta duração de vida, por outro lado algumas podem ser geradas ou sobreviver como células T ou B de memória de longa duração, dependendo da capacidade de migração para o local de infecção, localização no tecido periférico e autorrenovação¹³. O tráfego de células T de memória nos tecidos pode permitir uma proteção rápida contra reinfecção, enquanto as células de memória presentes nos órgãos linfoides secundários se mobilizam. Contudo, apesar do desenvolvimento de células de longa duração circulantes, a proteção nos tecidos periféricos tende a diminuir após infecções crônicas, nas quais o antígeno e a inflamação persistem de forma frequente em níveis elevados. Ou seja, esses quadros podem favorecer a geração de células efetoras de vida curta ao invés de células de memória de vida longa independentes do antígeno³⁶.

3. Autoimunidade e tolerância

3.1 Respostas e doenças autoimunes

A autoimunidade é uma consequência natural dos repertórios dos receptores das células B e T, na qual lhes permite reconhecer e responder contra componentes normais do sistema imune (autoantígenos). Essas células autorreativas podem permanecer inofensivas em condições fisiológicas normais e auxiliam na vigilância imunológica e na reparação de tecidos. Ademais, desempenham um papel importante na eliminação de infecções e

manutenção da homeostase tecidual³⁷. Portanto, as respostas autoimunes transitórias são comuns e necessárias para o organismo, tornando-se prejudiciais quando a quantidade e qualidade da resposta autoimune é alterada, ou seja, quando a intensidade dessa resposta é suficiente para afetar a função dos tecidos, órgãos ou das células³⁸. As respostas imunes inatas e adaptativas estão intimamente associadas e o desequilíbrio entre essas respostas podem levar a alguns distúrbios autoimunes³⁹.

Doenças autoinflamatórias são caracterizadas por episódios inflamatórios induzidos pela ativação exacerbada da imunidade inata na ausência de células T autoagressivas e autoanticorpos, geralmente oriunda de alterações monogênicas do sistema imune inato³⁹. Em contraste, as doenças autoimunes envolvem a falha da imunidade adaptativa por meio de respostas irregulares e prolongadas a um autoantígeno, na qual levam a produção de autoanticorpos. São mediadas por células T e B e geralmente a incidência dessas doenças envolvem fatores genéticos, hormonais ou ambientais³.

As doenças autoimunes associadas com lesão tecidual podem ser classificadas como órgão-específicas, como a diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e esclerose múltipla (EM); e/ou podem ser classificadas como sistêmicas na qual englobam múltiplos órgãos, tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR)². Ambas classificações são sustentadas pela presença de autoanticorpos ou células T citotóxicas que vão diretamente contra os seus correspondentes autoantígenos, ou seja, ocorre a perda da tolerância aos antígenos específicos do próprio organismo^{40,41}.

A tolerância imunológica, termo geral que engloba o assunto do presente trabalho, refere-se a um processo ativo pelo qual uma resposta imune potencialmente prejudicial é evitada, suprimida ou desviada para uma categoria de resposta imune não prejudicial. A tolerância está relacionada ao autorreconhecimento produtivo, resultante da reação aos sinais de perigo que confrontam o sistema imunológico, tais como prevenir a autoagressividade³⁷.

3.2 Tolerância imunológica

O sistema imunológico dispõe de diversos mecanismos de tolerância central e periférica para estabelecer e manter a falta de resposta imune a alguns autoantígenos (autotolerância imunológica) ao longo da vida. Esses mecanismos controlam a

autoagressividade, prevenindo o surgimento de doenças autoimunes e mantendo a homeostase do sistema imune.

O processo da tolerância central, que se refere a eliminação tanto de células T quanto B autoagressivas expostas a autoantígenos durante os estágios de maturação, é um mecanismo muito importante. Entretanto, como já mencionado anteriormente, esse processo não elimina todos os linfócitos potencialmente prejudiciais durante o processo de maturação dos linfócitos T, e muitas células autoagressivas são encontrados na periferia⁴². Essas células possuem interações de alta afinidade com autoantígenos ligados ao MHC II enquanto estão passando pela sua maturação no timo, na qual geram as subpopulações Tregs naturais⁴³. As Tregs também podem ser geradas na periferia em resposta a baixa intensidade do sinal por meio do TCR de células TCD4⁺ virgens e pela secreção das citocinas TGF- β e IL-2⁴⁴. Essa subpopulação de células é altamente especializada para função supressora da resposta imune à autoantígenos na periferia, possui uma alta expressão da molécula CD25⁺ (cadeia α do receptor IL-2) e também do fator de transcrição *Forkhead box P3* (Foxp3), no qual é crucial para o desenvolvimento e função das células T regulatórias (Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺)⁴⁵. Além disso, múltiplos mecanismos podem ser desencadeados pelas Tregs, concedendo-lhes a capacidade de controlar uma ampla gama de populações de células-alvo em diferentes contextos⁴⁶. Deficiências genéticas consequentes de mutações em Foxp3, tanto em humanos quanto em camundongos, podem comprometer o desenvolvimento das Tregs, gerando distúrbios autoimunes que podem afetar múltiplos órgãos por meio da hiperativação de células autoagressivas e consequente perda da tolerância periférica⁴⁷.

Além das células T reguladoras Foxp3⁺, há outras populações de células T reguladoras que não possuem expressão de Foxp3 e contribuem criticamente para a regulação imunológica. Células T CD4⁺ que produzem grandes quantidades de IL-10 e que inibem as respostas imunes são um exemplo dessas populações, chamadas de células reguladoras do tipo 1 (Tr1)⁴⁸. A capacidade reguladora das células Tr1 depende de muitos mecanismos, incluindo secreção de citocinas supressoras, contatos célula-célula, citotoxicidade e regulação metabólica. Por outro lado, há também outra população chamada de células Th3 que são linfócitos T CD4⁺ induzidos por antígeno oral nos linfonodos mesentéricos, possuem um fenótipo similar as Tregs convencionais, secretam TGF- β e IL-10,

além de expressarem IL-4. Essas células possuem um fenótipo similar das Tregs, com propriedades reguladoras ou supressoras que inibem os efeitos das células T autoagressivas³⁷.

O receptor coinibitório *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4 ou CD152) também é expresso nas Tregs e em células T ativadas, e possui função oposta do receptor coestimulatório CD28 de células T. Enquanto o estímulo do CD28 promove a ativação das células T, o CTLA-4 suprime as repostas das células T potencialmente prejudiciais, desempenhando um papel regulador do sistema imune. Ambos receptores interagem com os mesmos ligantes compartilhados, CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) que se ligam às moléculas B7 nas APCs⁴⁹. O CTLA-4 inibe a ativação de células T de maneira extrínseca à célula por endocitose desses ligantes compartilhados com CD28 e, além disso, pode inibir a ativação do TCR na ausência das moléculas B7⁵⁰. Polimorfismos no gene da CTLA-4 acarretam em doenças autoimunes, como a diabetes tipo 1, assim como o bloqueio do gene com um anticorpo específico pode induzir autoimunidade e/ou dando inflamatório intestinal⁵¹.

Outro regulador importante para manutenção da autotolerância é a proteína *Autoimmune regulator* (AIRE) que é expressa por células epiteliais tímicas maduras, nas quais promove a expressão gênica promíscua de vários antígenos restritos a tecidos (TRAs) que são apresentados aos timócitos na etapa de seleção negativa, fazendo com que o processo de maturação dos linfócitos seja eficiente⁵². Mutações no gene AIRE resultam no escape de timócitos autoagressivos para a periferia, causando autoimunidade e doenças autoimunes.

Os mecanismos celulares e moleculares desses e de vários outros reguladores ainda permanecem desconhecidos ou não tão claros, no entanto sabe-se que são fundamentais para manter a autotolerância imunológica.

4. Tolerância Oral

4.1 Definição e breve história

A tolerância oral (TO) é definida como a supressão ativa de respostas imunes celulares e/ou humorais específicas a antígenos por meio da administração previa dos mesmos pela via oral⁵³. Evolutivamente, a tolerância oral desenvolveu-se como um mecanismo imunológico para prevenir reações de hipersensibilidade a proteínas alimentares e a

diversos antígenos bacterianos comensais, nos quais estão presentes na microbiota do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital⁵⁴. Uma vez que esses antígenos externos ganham acesso às mucosas de forma natural, são tratados como componentes internos e se tornam parte do próprio organismo. A tolerância oral carrega uma importância imunológica única, visto que se trata de um evento imunológico natural contínuo desencadeado pelo estímulo do antígeno exógeno³⁷.

O fenômeno da tolerância oral foi demonstrado pela primeira vez em 1911 por Wells e Osbourne, no qual porquinhos-da-índia foram inicialmente submetidos à administração oral da proteína do milho e, logo após, foram alimentados com dieta contendo milho. Foi mostrado que esses animais eram resistentes ao zen, principal proteína do milho, em comparação àqueles que receberam dieta livre de milho. Sendo assim, os pesquisadores descreveram a tolerância oral como um estado em que a anafilaxia sistêmica em porquinhos-da-índia era prevenida pela alimentação previa com proteínas do milho⁵⁵. Ao longo do tempo (1946-1970) outros estudos relacionados com a tolerância oral, caracterizaram esse mecanismo como um evento imunológico envolvendo a ação de células T supressoras⁵⁶. Em 1953, Peter Medawar descreveu o termo “tolerância” pela primeira vez em um artigo publicado na *Nature*, conceituando como um mecanismo na qual o sistema imune previne a autoagressividade e, portanto, previne doenças autoimunes⁵⁷. Com a chegada da descrição da seleção tímica dos linfócitos T, das suas subpopulações e suas diferentes funções, assim como das células B e T autoagressivas em indivíduos saudáveis, estudos derivados demonstraram que a tolerância imunológica natural ao próprio é um processo ativo que depende da atividade das células T autoagressivas não-inflamatórias presentes no repertório normal do organismo^{42,58,59}. Assim, a observação de que os antígenos administrados por via oral poderiam suprimir as respostas imunes foi reconhecida muito antes da era da imunologia moderna.

Na tentativa de controlar a progressão clínica de doenças autoimunes humanas, várias drogas imunossupressoras são utilizadas, porém são pouco específicas e podem levar a um risco aumentado de infecções^{60,61}. Um tratamento terapêutico alternativo e supostamente ideal para o controle dessas doenças é a indução da tolerância imunológica, ou seja, a indução de um estado ativo de não-reatividade específico do sistema imune para um determinado antígeno, através da exposição prévia do mesmo⁵⁶. Essa falta de resposta

celular pode prevenir a autorreatividade dos linfócitos, reestabelecendo a tolerância imunológica. Em modelos experimentais de doenças autoimunes, onde ocorre a quebra da tolerância imunológica, tem sido possível a regeneração da tolerância pelo bloqueio da doença, através da administração de antígenos ou de peptídeos contra os quais a resposta imunológica ocorre. Dentre os meios terapêuticos de indução da tolerância, tais como intravenosa, sublingual ou inalatória, há a administração de antígenos específicos por via oral, baseada no mecanismo da tolerância oral⁵⁶. No final da década de 1980, estudos pioneiros usando modelos experimentais de doenças autoimunes evidenciaram o potencial uso clínico da via oral para inibir doenças inflamatórias⁶². Um elemento único e distintivo da via oral é a grande área de contato da mucosa intestinal e os diversos componentes imunorreguladores que ela engloba.

Clinicamente, a tolerância oral ocorre pela indução de um estado de não-responsividade imunológica sistêmica a um antígeno administrado oralmente após desafio subsequente com antígeno^{63,64}. Esse processo complexo se dá por meio da supressão de algumas respostas imunes e a indução de outras. A tolerância oral em humanos foi demonstrada por experimentos feitos por Husby e colegas em 1994⁶⁵. Após essas observações, vários estudos pré-clínicos e clínicos examinaram mais detalhadamente o potencial uso da administração oral de antígenos específicos como uma alternativa terapêutica para atenuar sinais clínicos de doenças inflamatórias⁵⁶. Para um efetivo uso da abordagem da tolerância oral induzida por antígeno no tratamento terapêutico de doenças autoimunes ou inflamatórias, é requerido um entendimento claro nos eventos imunológicos básicos que ocorrem nos órgãos e sítios da mucosa intestinal³⁷. Tais eventos abrangem respostas dicotômicas, sendo uma a imunidade inflamatória intestinal e a outra sendo a tolerância.

4.2 Mecanismos da tolerância oral

O intestino é um ambiente onde uma diversidade de micróbios comensais residem, formando a flora intestinal. As superfícies epiteliais do trato gastrointestinal estão constantemente expostas ao ambiente externo e são o local de entrada de muitos agentes microbianos patogênicos que frequentemente causam infecções e podem causar doenças locais ou sistêmicas. Portanto, estabelecer e manter um controle adequado na quantidade e

variedade desses microrganismos é crucial para prevenção de infecções oportunistas. A fim de esquivar-se dos danos inflamatórios dos agentes microbianos e manter tolerância imunológica à própria microbiota, o organismo desenvolveu uma rede complexa e diversa no trato gastrointestinal com vários tipos de células imunes e estruturas que agem por meio de mecanismos bem regulados que induzem a tolerância, nos quais estão presentes no tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT)⁶⁶. A mucosa do intestino delgado humano tem um tamanho estimado de 300m² e há por volta de 10¹² células linfoides por metro de intestino. Toda área intestinal e células residentes abrangem cerca de 130-190g de proteínas absorvidas da dieta diária e cerca de 10¹²/cm³ de bactérias comensais (microbiota) habitam o lúmen intestinal humano⁶⁷. O sistema imunológico intestinal hospeda cerca de 70% dos linfócitos periféricos para lidar com o grande número de bactérias comensais. Com isso, o intestino constitui virtualmente o maior tecido imunitário periférico do corpo⁶⁸.

O GALT consiste em uma rede bem organizada de estruturas multifoliculares linfoides separadas ou agregadas, tais como as placas de Peyer (PP) no intestino delgado. As placas de Peyer são estruturas linfáticas que controlam antígenos e bactérias nas áreas luminais, compreendem tanto o epitélio associado ao folículo quanto as células imunes residentes nos folículos linfoides. A interação das PP com os antígenos leva à defesa imunológica contra patógenos, assim como a tolerância imunológica⁶⁹. O epitélio intestinal associado ao folículo é composto principalmente por células M e vilosidades contendo enterócitos que recobrem as placas de Peyer, células caliciformes secretoras de muco e linfócitos intraepiteliais, nos quais residem difusamente na lâmina própria.⁷⁰ O epitélio associado ao folículo forma a interface entre o sistema linfoide intestinal e o ambiente luminal intestinal⁷¹. As células M são especializadas na captação de antígenos luminais e microorganismos intactos, tais como vírus e bactérias, que são apresentados às células imunes do folículo linfoide para gerar uma resposta imune. Já os antígenos solúveis podem ser adquiridos diretamente pelas células fagocíticas intestinais, ou passar através dos enterócitos ou passagens associadas às células caliciformes antes da captura pelas DCs na lâmina própria⁷⁰.

Os linfonodos mesentéricos (LMs) drenantes são considerados os principais locais indutivos das repostas imunes aos antígenos intestinais, enquanto a lâmina própria e o epitélio da mucosa possuem funções efectoras e de memória. A captura e processamento do antígeno luminal são iniciados nos locais indutores, onde as APCs ativam os linfócitos T CD4⁺,

T CD8⁺ e linfócitos B. Enquanto que os locais efetores alojam as células imunológicas que, uma vez ativadas, modulam a resposta imunológica e sinais inflamatórios. A célula efetora primária no epitélio intestinal é o linfócito intraepitelial, na qual é capaz de produzir citocinas. A lâmina própria abriga numerosas células efetoras, incluindo as células B produtoras de IgA, células T, macrófagos, DCs e mastócitos⁷². Além dos linfonodos mesentéricos, outras estruturas também são consideradas como locais indutivos, tais como as placas de Peyer. Porém, interessante, estudos demonstraram que os LMs são essenciais e suficientes para o estabelecimento da tolerância oral, na ausência das placas de Peyer^{73,74}.

Recentemente, foi evidenciado que os linfonodos drenantes intestinais são imunologicamente distintos⁷⁵, suportando diferentes respostas imunológicas contra antígenos luminais específicos dependendo do segmento intestinal que o linfonodo drena⁷⁶. Isso porque a sinalização dos genes de células dendríticas e estromais e a polarização das células T contra o mesmo antígeno luminal diferem funcionalmente entre os linfonodos intestinais drenantes. Os linfonodos intestinais proximais que drenam o duodeno e o jejuno, onde as proteínas alimentares são absorvidas e processadas, favorecem a indução da tolerância por alojarem um maior número de DCs CD103⁺ CD11b⁺ convencionais tolerogênicas e induzirem células Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ por meio da administração oral de antígeno. Por outro lado, os linfonodos distais que drenam o íleo e o cólon, onde a maior parte da microbiota intestinal está localizada, favorecem respostas inflamatórias pois hospedam mais DCs pró-inflamatórias e linfócitos Th17 após o estímulo com o antígeno⁷⁶. Essa divisão linfática favorece as atividades funcionais intestinais e previne conflitos imunológicos locais, fazendo com que o intestino responda contra infecção do cólon, concomitantemente garante a tolerância aos antígenos digeridos.

Os mecanismos de tolerância oral imunológica que produzem hiporresponsividade sistêmica após administração oral de antígeno dependem do antígeno, da dose e da configuração experimental utilizada. Esses mecanismos podem ser restritos ao compartimento dos linfócitos T CD4⁺, isso porque a depleção dessas células anula o efeito da falta de resposta imune⁷⁷ e, além disso, a transferência adotiva dessas células para um animal *naive* transfere também a tolerância⁷⁸. Outro ponto é que a tolerância das células B não é completa, uma vez que ocorre um bloqueio na produção de anticorpos resultante da

ausência do auxílio das células T helper para as células B⁷⁹.

O mecanismo primário associado a hiporresponsividade é a inativação direta de linfócitos (anergia ou deleção clonal), ou a modulação através das células T reguladoras (supressão ativa). A supressão ativa é mediada pela indução de Tregs no tecido linfoide intestinal, nas placas de Peyer. O processo inicia-se pela captura do antígeno na lâmina própria por DCs que expressam CD103⁺ e migram para os LMs onde induzem a diferenciação de células T virgens para Tregs⁸⁰, que então se expandem e migram para o sistema imunológico sistêmico. Doses baixas do antígeno favorecem a supressão ativa, fazendo com que as Tregs sejam capazes de suprimir ou prevenir a resposta de linfócitos autoagressivos pela produção de citocinas supressoras tais como o fator de crescimento de transformação β (TGF- β), IL-4 e IL-10, resultantes do estímulo antigênico⁸¹. Além disso, o sistema imune do GALT também favorece a indução de células Th2. O TGF- β é uma potente citocina imunossupressora e antiinflamatória, e importante mediador do componente ativo da tolerância oral, produzida tanto pelas células T CD4⁺ quanto CD8⁺. A geração da supressão ativa parece estar associada à diminuição da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) que ocorre após a ingestão do antígeno tolerogênico, sabe-se que o DTH é uma resposta de células Th1 inibida por células Th2 que produzem IL-4⁸². Por outro lado, doses mais altas do antígeno ingerido resulta em anergia ou deleção clonal. A anergia clonal corresponde a um estado de falta de resposta dos linfócitos ao antígeno, caracterizado pela ausência de proliferação celular e da secreção de IL-2⁸³. Este mecanismo está relacionado com a interação entre o TCR-antígeno-MHC, que na ausência de moléculas coestimulatórias nas APCs (B7-1 ou B7-2), os linfócitos autoagressivos se tornam não responsivos ao antígeno. Células epiteliais intestinais, em seu estado normal, não expressam as moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2, ou ICAM-1, responsáveis por sinais secundários ao longo do processo de ativação da célula T⁸⁴. Já a deleção se refere a apoptose de clones de células T autoagressivas. Todos esses mecanismos envolvidos na hiporresponsividade da tolerância oral, podem ocorrer simultaneamente e se sobrepor por possuírem algumas características similares, tais como a produção de citocinas e a função reguladora das células T anérgicas assim como das Tregs⁸⁵.

Portanto, a tolerância induzida pela administração por via oral de antígenos pode ser mediada pelos mecanismos de supressão e anergia, dependendo da dose do antígeno,

secreção de citocinas e o nível de tolerância periférica³⁵. A indução de supressão ativa ocorre inicialmente no GALT, enquanto a anergia ocorre tanto sistêmica ou localmente³⁴. Sendo assim, supõe-se que o principal mecanismo pelo qual os antígenos administrados oralmente induzem tolerância se baseia na interação de antígenos protéicos com o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal, e a geração subsequente de células T regulatórias ou supressoras.

4.3 Modelos experimentais de tolerância imunológica

A indução da tolerância pela administração via oral de antígeno ou imunoterapia oral é considerada como um tratamento alternativo para algumas doenças autoimunes, testadas em doenças como artrite reumatóide, diabetes do tipo 1 e esclerose múltipla⁸⁶. O uso da via oral para modular essas condições inflamatórias tem se mostrado eficaz na indução de mecanismos imunorreguladores específicos e inespecíficos⁶². Essa abordagem possui um diferencial vantajoso para o tratamento, uma vez que não causa imunossupressão. Além disso, não possui toxicidade, é de fácil administração e tem direcionamento a um antígeno específico. Em modelos de doenças autoimunes experimentais, foi possível a redução de anticorpos e imunidade mediada por células com terapia de tolerância oral⁸⁵.

A utilização de modelos experimentais, como camundongos transgênicos, é uma ferramenta essencial para estudos que envolvem o entendimento dos mecanismos da autoimunidade e da tolerância imunológica. Isso porque esses modelos fornecem antígenos específicos para determinados tecidos, e células T bem definidas com TCR que reconhecem esses antígenos. Além disso, o uso de camundongos transgênicos, nos quais o autoantígeno é conhecido facilita a análise para intervenções terapêuticas específicas para o antígeno⁸⁷. Um dos modelos experimentais utilizados para estudos de tolerância periférica é o camundongo promotor de insulina de rato que expressa um modelo de autoantígeno, a ovalbumina (OVA), ligada à membrana das células β pancreáticas, nos túbulos proximais do rim e no timo (RIP-mOVA)⁸⁸. Diferentemente dos camundongos diabéticos não obesos (NOD), os RIP-mOVA não desenvolvem diabetes autoimune espontaneamente. Para a indução da doença nos animais RIP-mOVA, um método comum envolve a transferência ou cruzamento com animais que possuem células que carregam TCRs específicos para o autoantígeno expresso nas células β pancreáticas dos animais RIP-mOVA. A transferência

dessas células liga a célula T ao antígeno OVA, levando a uma resposta proliferativa dependente de OVA, podendo acarretar ao desenvolvimento de diabetes autoimune nesses animais⁸⁹.

A insulina é um autoantígeno central na patogênese da diabetes autoimune, e a expressão de insulina nas células epiteliais tímicas sob o controle do Regulador Autoimune (Aire) é considerada um componente crucial para manter a tolerância à insulina. Isso porque foi visto que modelos deficientes em Aire escapam da seleção negativa tímica, uma vez que as células T específicas de insulina de alta afinidade são deletadas de maneira dependente de Aire dentro do timo⁹⁰.

Estudos demonstraram a eficácia da insulina oral em atrasar e, em alguns casos, prevenir o diabetes no modelo de camundongo NOD⁹¹, além de validarem a eficácia da administração oral de antígeno como tratamento alternativo de algumas doenças autoimunes experimentais^{86,92}. Por outro lado, foi visto a indução de uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) pela administração oral de alta dose de autoantígeno em camundongos RIP-mOVA, que levou ao início de doença autoimune^{93,94}. O estudo mostrou que a administração oral de autoantígeno (OVA), que levou a esses animais se tornarem diabéticos, induziu uma resposta CTL-específica mais efetiva quando uma única dose alta foi utilizada. Além disso, foi concluído que tratar oralmente com autoantígeno pode provocar mais do que prevenir doenças. Isto não quer dizer que sempre irá induzir uma resposta citotóxica, mas indica a possibilidade que o tratamento oral pode induzir dano autoimune⁹³.

Apesar da indução da tolerância oral ser um método atrativo e utilizado como tratamento alternativo de algumas doenças autoimunes experimentais, é necessária uma maior compreensão nos mecanismos envolvidos nesse método e, também, na forma de administração do antígeno. Visto que esse tratamento alternativo pode causar autoimunidade. Nosso grupo de pesquisa tem como foco geral estudos relacionados aos eventos iniciais da resposta autoimune mediada por linfócitos T CD4⁺. Diante do exposto, o objetivo principal deste estudo é avaliar celularmente a transformação das células T CD4⁺ em células autoagressivas, tanto da mucosa intestinal quanto dos linfonodos mesentéricos do modelo experimento RIP-mOVA, resultando na possível ativação de um perfil autoagressivo ao administrar continuamente autoantígeno pela via oral. Há pouco sustento na literatura que envolva a constância do estímulo antigênico oral, o enfoque do nosso

trabalho gira em torno do termo imunológico da continuidade. Nossa hipótese visa a quebra da tolerância e a geração de uma resposta autoagressiva pela contínua presença do autoantígeno.

JUSTIFICATIVA

As doenças autoimunes acometem cerca de 5% a 10% da população mundial atualmente, sendo parte das doenças crônicas não transmissíveis mais comuns. Os estudos já realizados ainda não são suficientes para saber claramente a origem dessas doenças, o que se sabe é que fatores genéticos, ambientais ou a combinação destes estão diretamente relacionados.

Doenças autoimunes crônicas como esclerose múltipla, diabetes mellitus do tipo I, artrite reumatoide entre várias outras ainda não possuem cura, para controlar os sintomas são necessárias algumas estratégias terapêuticas, principalmente a imunossupressão e modulares da resposta imunológica. Uma estratégia alternativa é a indução de tolerância oral. Essa abordagem induz um estado não-responsivo por meio da supressão celular e/ou humoral do sistema imune à um antígeno específico pela exposição prévia do mesmo antígeno. Dentre as vias de administração do antígeno para indução da tolerância imunológica, a via oral é muito comum para tal abordagem. No entanto, estudos mostraram que a administração de autoantígeno pela via oral poderia levar a uma resposta autoagressiva. Sendo assim, o presente trabalho se faz significativo para averiguar se essa resposta é resultado da quebra de tolerância pela administração oral contínua de autoantígeno. Os achados da pesquisa podem auxiliar para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução da tolerância imunológica oral, abrindo portas para estudos que envolvam alvos terapêuticos para o tratamento de doenças autoimunes, como a diabetes mellitus do tipo I.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Estudar e avaliar, a nível celular, a transformação das células TCD4⁺ em células autoagressivas, pela possível quebra da tolerância ao administrar continuamente autoantígeno pela via oral

2. Objetivos específicos

- Estabelecer a linhagem RIP-mOVA;
- Induzir e avaliar a progressão da diabetes autoimune em animais RIP-mOVA através do tratamento oral do autoantígeno Ovalbumina por um período contínuo;
- Analisar o perfil e a atividade regulatória de células TCD4⁺Foxp3⁺ na mucosa intestinal, linfonodos drenantes e no pâncreas durante a evolução clínica da diabetes autoimune em animais RIP-mOVA.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

1.1 Instalação e manutenção

Camundongos fêmeas e machos da linhagem RIP-mOVA e C57BL/6 (B6), com 6-8 semanas de idade, foram obtidos do Laboratório *Jackson (Bar Harbor, Maine, EUA)*, estabelecidos como colônia no Centro de Reprodução da Universidade de Campinas e foram alojados e mantidos em condições livres de patógenos no Biotério de Instalação e Manutenção do departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da mesma universidade. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração específica para roedores (NUVITAL). Foram mantidos a uma temperatura entre 21° e 25°C a um ciclo de 12 horas com luz e 12 horas no escuro. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as diretrizes propostas pelo Conselho Brasileiro de Cuidados com Animais e aprovadas pelo Comitê Universitário de Ética em Experimentação Animal (CEUA 5606-1/2020).

1.2 Genotipagem

Os animais RIP-mOVA descendentes da matriz foram genotipados após 4 semanas de vida, a fim de manter aqueles com o gene de interesse. As técnicas utilizadas para genotipagem seguiram protocolos padronizados em nosso laboratório, tais como extração de DNA via proteinase K, por meio da coleta de um pequeno pedaço da ponta da cauda dos animais; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional utilizando *primers* específicos para a linhagem (Tabela 1); e, por fim, eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 1: *Primers* específicos para a linhagem RIP-mOVA destinados para a reação de PCR dos animais.

<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de anelamento
OVA (direto)	CAA GCA CAT CGC AAC CA	61°C
OVA (reverso)	GCA ATT GCC TTG TCA GCA T	61°C
Controle positivo	CGA GCT CGA GCC TGC CTA TCT TTC	61°C

interno (direto)	AGG TC	
Controle positivo interno (reverso)	CGG GAT CCT AGT TGC AGT AGT TCT CCA G	61°C

2. Modelo experimental de diabetes mellitus do tipo I

2.1 Gavagem

Os camundongos da linhagem RIP-mOVA foram imunizados em dose única por via subcutânea com 50 µL de Ovalbumina (OVA) 5mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA – Cat n° A2512) em emulsão com adjuvante completo de *Freund* (CFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA – Cat n° F5881) suplementado com 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inativada por aquecimento (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA – Cat n° DF3114-33-8). Após 10 dias, alguns desses animais foram submetidos à administração oral pelo método de gavagem com 50 µL de Ovalbumina 60mg/0,5mL. Este método é feito pela administração de substâncias por via intragástrica em roedores, por meio de uma cânula rígida de aço inoxidável com extremidade arredondada. A substância é introduzida pela boca do animal, passando pelo esôfago e chegando ao estômago, onde é depositada. O restante dos animais imunizados via subcutânea com OVA, foram submetidos à administração oral de PBS 1x via gavagem, concomitante com o grupo que recebeu OVA oral. E por fim, outro grupo de animais RIP-mOVA foi submetido somente à administração oral via gavagem com 50 µL de Ovalbumina 60mg/0,5mL.

2.2 Monitoramento da glicemia

Foi medida a glicose dos animais em jejum de 3 horas com um glicosímetro padrão em dias alternados, desde o primeiro dia da administração oral por gavagem ou por ingestão voluntária. A coleta de sangue foi feita por meio de um pequeno corte da ponta da cauda do camundongo. Uma pequena gota de sangue da cauda foi colocada em uma tira e inserida no glicosímetro, na qual foi obtida a quantidade de glicose. Foi levado em consideração o diagnóstico de diabetes em camundongos com glicose no sangue acima de 250mg/dL^{95,96} em pelo menos duas medições subsequentes.

2.3 Ingestão voluntária

2.3.1 Tratamento com OVA por 3 semanas

Os camundongos RIP-mOVA com 9 semanas de vida foram divididos em três grupos, sendo um imunizado por via subcutânea com 100 µL de OVA 5mg/mL em emulsão com adjuvante completo de *Freund* (CFA) suplementado com 4mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inativada por aquecimento. Após 7 dias, os animais deste grupo foram submetidos a outra dose de 100 µL de OVA 5mg/mL em emulsão com adjuvante incompleto de *Freund* (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA – Cat n° F5506), para completar a imunização. Concomitante com o dia do grupo que recebeu a primeira dose de imunização, outro grupo foi montado para receber o tratamento oral de OVA 4mg/mL diluída na água dos bebedouros mantidas nas gaiolas, como única fonte de líquido para os animais, método denominado ingestão voluntária. Normalmente cada camundongo ingere cerca de 5 mL de água por dia, portanto, cada animal recebeu cerca de 20 mg de OVA em um período de 24 horas⁸¹, recebendo o antígeno gradualmente ao nível do intestino. Por fim, como grupo controle, os animais não receberam imunização e nem tratamento oral com OVA. O tratamento oral teve duração de 3 semanas.

2.3.2 Tratamento com OVA por 5 e 10 semanas

Os animais das linhagens C57Bl/6 e RIP-mOVA foram divididos em grupos por linhagem, e dentro de cada foram divididos em subgrupos por condição de tratamento. Um subgrupo foi imunizado por via subcutânea com 100µL de OVA 5mg/mL em emulsão com CFA suplementado com 4mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*. Após 7 dias, os animais foram submetidos a outra dose de 100µL de OVA 5mg/mL em emulsão com IFA, para completar a imunização. Simultaneamente com o dia do subgrupo que recebeu a primeira dose de OVA, outro subgrupo foi submetido ao tratamento oral com OVA 4mg/mL por meio do método de ingestão voluntária. Por fim, o subgrupo controle foi imunizado somente com CFA suplementado com 4mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*. A fim de testar o tratamento oral com OVA em períodos mais longos, os grupos experimentais ficaram em tratamento oral por 5 e 10 semanas.

3. Obtenção de células

Após a eutanásia dos animais por meio da sobredose do anestésico inalatório Isoflurano, foram retirados e utilizados os linfonodos mesentéricos e baço de todos os grupos de animais. Esses órgãos foram extraídos assepticamente e macerados em PBS 1x com auxílio de um êmbolo em um *cell strainer* de 40 e 100 µg. A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm por 8 minutos a 4°C. Excepcionalmente o baço foi tratado com tampão de lise de hemácias (ACK), lavado com PBS 1x e centrifugado a 1200 rpm por 8 minutos a 4°C. Ao fim da centrifugação, as células de cada órgão estavam prontas para o experimento.

4. Análises das células por citometria de fluxo

As suspensões celulares foram marcadas com um painel de anticorpos monoclonais *anti-mouse* CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, CTLA-4, T-bet e RorγT (BD-Biosciences) diluídos em PBS 1x na proporção de 1:200 para cada órgão de cada animal, tendo um painel específico desses anticorpos para cada período de tratamento dos grupos experimentais (Tabela 2). Os marcadores intracelulares foram marcados *overnight*, e logo após, as células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Symphony A5 (BD Biosciences). Os dados celulares obtidos pela citometria foram analisados pelo *software* FlowJo v10.8 (BD Life Sciences) e GraphPad Prism 8.0.1 (*Dotmatics*, Boston, Massachusetts, USA).

Tabela 2: Painéis de anticorpos utilizados para marcar as células dos órgãos dos animais segundo o período de tratamento de OVA oral.

Período de tratamento OVA Oral IV	Painel de anticorpos
3 semanas	CD4, CD8, CD25, Foxp3
5 semanas	CD3, CD4, CD25, CD8, Foxp3, CTLA-4, T-bet
10 semanas	CD3, CD4, CD25, CD8, Foxp3, CTLA-4, T-bet, RorγT

5. Preparação e avaliação histológica do pâncreas

Foram selecionados 3 animais RIP-mOVA e 3 C57Bl/6 referentes ao grupo de OVA oral por 10 semanas, e 2 de cada linhagem do grupo controle (sem tratamento), foram coletados os pâncreas, e armazenados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, as amostras passaram por processo de desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcoois, foram diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de paraplast. Foram feitos cortes histológicos de 5 μ m de espessura e montados em lâminas. Após, foi feita a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) nas lâminas para avaliação de presença ou ausência de infiltrado inflamatório nas células β pancreáticas. Para as reações de imunohistoquímica, as lâminas de cada animal foram mantidas em estufa a 60°C durante 12h para desparafinização. Logo após, as lâminas foram submetidas ao processamento de hidratação por imersão em xilol, soluções decrescentes de concentração de álcoois e água destilada. A recuperação antigênica foi feita através de aquecimento dos cortes em tampão citrato pH 6,0 por 10 minutos em aparelho microondas. Em seguida, foi utilizada a caneta hidrofóbica para isolar os cortes a fim de realizar o bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos. Após a lavagem, foi utilizado solução de *blocking buffer* para bloqueio das ligações inespecíficas e, em seguida, foi adicionado anticorpo primário *Insulin, rabbit policlonal* (Bio SB) e foi incubado *overnight*. Após lavagem, foi adicionado anticorpo secundário *anti-rabbit*. A reação foi revelada com DAB (DAKO) e contracorada com hematoxilina e, logo após, os cortes passaram pelo processo de desidratação em soluções com concentrações crescente de álcoois para finalização das lâminas.

Todas as lâminas contendo os cortes, tanto as de HE quanto as de imunohistoquímica, foram analisadas em microscópio óptico (Leica, modelo DM2500) *Upright* de Campo Claro para imagens em RGB acoplado à câmera fotográfica, por meio do *software* Prime 9.8 (Prime Life Science Corp.). O microscópio óptico fica localizado no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) na Universidade Estadual de Campinas.

Para análise morfométrica, foram selecionadas e fotografadas de quatro a cinco ilhotas aleatórias por secção para posterior dimensionamento total da ilhota e imunomarcado para insulina. Para as análises das áreas foi utilizado o *software* Image J 1.54g (*National Institutes of Health, USA*). Para análise da circularidade das ilhotas foi

aplicada a seguinte fórmula: $C=4\pi A/P^2$, onde C é a circularidade, A é a área média da ilhota e P é o perímetro da ilhota. A circularidade é uma medida de redondeza de um objeto, um círculo perfeito tem $C=1$ ⁹⁷. A partir dessas análises, foram feitos os cálculos para obtenção da porcentagem da área de insulina (fração da área imunomarcada com insulina pela área total da ilhota) e os resultados foram plotados em gráficos do software GraphPad Prism 8.0.1 (*Dotmatics*, Boston, Massachusetts, USA).

6. Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8.0.1 (*Dotmatics*, Boston, Massachusetts, USA). Inicialmente foi testada a distribuição normal dos dados. Para comparação entre os grupos experimentais e comparação das diferenças de cada grupo nos tempos 3, 5 e 10 semanas foi utilizado o teste Two-Way ANOVA, com pós-teste de comparações múltiplas Tukey e Sidak. O nível de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Manutenção e genotipagem dos animais RIP-mOVA

Para o desenvolvimento desta pesquisa experimental, os camundongos da linhagem RIP-mOVA (RIP) foram genotipados para confirmação da expressão do transgene que caracteriza a linhagem (proteína OVA na membrana de células β pancreáticas sob a influência do promotor da insulina de rato), utilizando técnicas já descritas anteriormente. Foi considerado positivo (+) ou negativo (-) para RIP-mOVA tendo como base o controle positivo interno localizado em 320pb no gel de agarose 1,5% (Figura 1A-B). Os animais positivos para a linhagem foram utilizados para realização dos experimentos e cruzamentos.

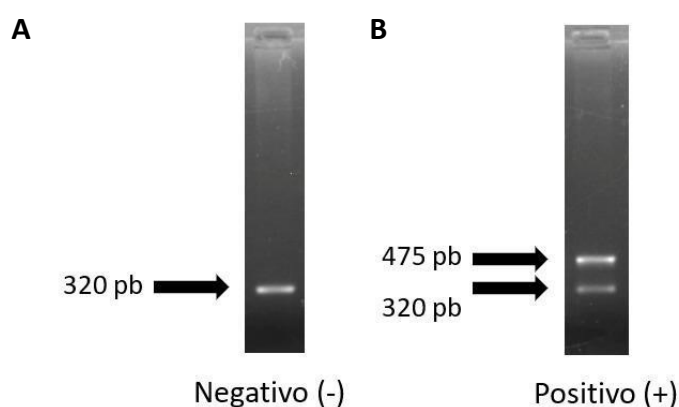


Figura 1: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 1,5% com bandas que representam (A) animais negativos, ou seja, expressam somente a banda do controle positivo interno (320pb) e (B) animais positivos para linhagem RIP-mOVA, que expressam a banda do controle positivo interno e do gene da OVA (475pb).

2. Administração oral de OVA via gavagem e monitoramento da glicemia

O método para administrar a proteína OVA pela via oral nos animais RIP-mOVA, *a priori*, foi por meio da gavagem, método baseado na ingestão involuntária. Esses animais foram divididos em três grupos segundo o tipo de administração da OVA (Tabela 3).

Tabela 3: Animais RIP-mOVA divididos em três grupos de acordo com o tipo de procedimento experimental (imunização via subcutânea e/ou via gavagem).

1	Imuniz. via subcutânea OVA	PBS 1x oral via gavagem
2	Imuniz. via subcutânea OVA	OVA Oral via gavagem
3	Não imunizado	OVA Oral via gavagem

Foi medida e monitorada a glicose sanguínea dos três grupos experimentais 3 vezes por semana a partir do dia que foi feita a administração oral de OVA e PBS via gavagem (dia 10), visando o surgimento de diabetes autoimune nos animais. Durante aproximadamente 9 semanas nenhum dos grupos adoeceu, visto que os valores de glicemia não chegaram a 250mg/dL^{95,96} (Fig. 2).

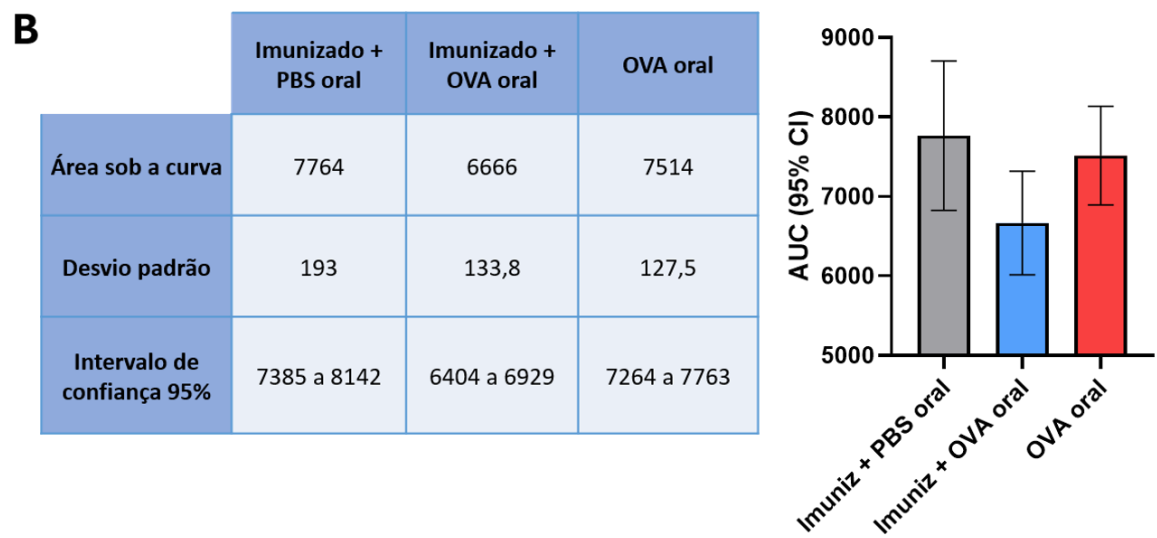
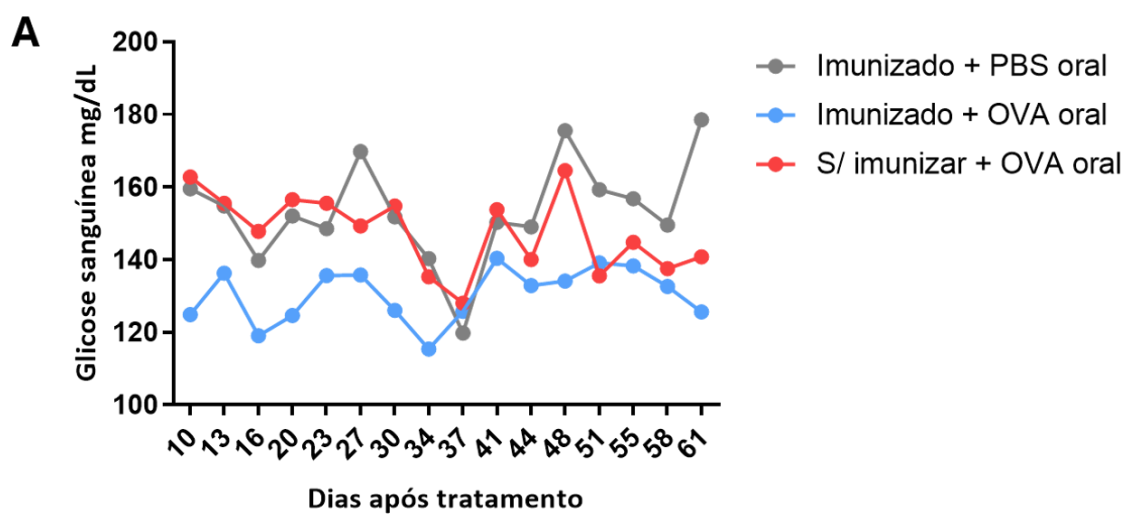


Figura 2: Desenvolvimento da glicemia dos grupos experimentais ao longo de 9 semanas representado pelo (A) gráfico de pontos, onde cada cor representa um grupo, e pela (B) tabela com dados baseados na análise estatística de área sob a curva definida pelo gráfico A. A tabela mostra o valor da área sob a curva, com seu respectivo desvio padrão e intervalo de confiança (CI) de 95% de cada grupo experimental. (n=4). Ao lado há um gráfico de barras representativo da área sob a curva definido pela tabela.

Apesar dos grupos não atingirem ao escore clínico indicativo da doença, houve uma tendência a hiperglicemia em dois dos grupos experimentais. O grupo que foi tratado somente com OVA oral via gavagem mostrou valores glicêmicos altos (entre 127 mg/dL a 165 mg/dL) em comparação aos outros dois grupos. Enquanto o grupo imunizado por via subcutânea com OVA e tratado oralmente com PBS 1x via gavagem obteve glicemia maior (entre 118 mg/dL a 177 mg/dL) em comparação aos outros dois grupos. Já o grupo imunizado com OVA e tratado oralmente com OVA via gavagem mostrou uma tendência a glicemia mais baixa (entre 116 mg/dL a 140 mg/dL), quando comparado aos outros dois grupos. Ou seja, os grupos que foram estimulados somente com uma única dose da OVA, de forma injetada ou oral, apresentaram nível glicêmico mais alto. O grupo que recebeu duas doses de OVA de forma injetada e oral apresentou a glicemia mais baixa e, além disso, os valores glicêmicos mantiveram-se mais estáveis em comparação aos outros dois grupos. Essa diferença entre os grupos foi avaliada estatisticamente pela área sob a curva (Fig. 2B) derivada do gráfico da glicemia dos grupos (Fig. 2A), onde o grupo que recebeu duas doses de OVA (Imunizado + OVA oral) resultou em um valor inferior da área sob a curva, assim como também o seu intervalo de confiança não chegou a um valor próximo do intervalo dos outros dois grupos. Em contrapartida, os grupos que receberam apenas uma dose de OVA (Imunizado + PBS oral e não imunizados + OVA oral), independente da via, resultaram em valores maiores da área sob a curva em relação ao grupo que recebeu duas doses de OVA. Ademais, os valores de intervalo de confiança dos dois grupos ficaram mais próximos entre si (Fig. 2B).

Nossos dados sugerem que a imunização injetável de OVA seguida da administração oral de OVA nos animais RIP-mOVA apresenta uma tendência de glicemia baixa e mais estável, em relação aos grupos que só receberam uma dose de OVA. Essas observações

podem indicar a uma tendência a tolerância do autoantígeno OVA nos animais RIP-mOVA, assim como descrito na literatura⁹⁸. Apesar da proteína OVA ser um autoantígeno para o animal RIP-mOVA, o estímulo do autoantígeno por meio de uma única via, independente da via de administração, pode ter levado a um estado menos tolerogênico, visando a glicemia mais alta e instável quando comparado aos outros que receberam duas doses. Apesar de não ter obtido resultados significativos, podemos indicar que a variação dos valores glicêmicos frente ao estímulo do autoantígeno depende da quantidade de doses do mesmo, independentemente da via de administração.

Decidimos suspender a abordagem da gavagem para os experimentos posteriores para evitar a possibilidade de causar lesões no esôfago dos animais e angústia associada à contenção. Embora a comprovação de sua eficácia, se trata de um método invasivo que poderia causar inflamação e levar a um evento paralelo que mascarasse os resultados dos experimentos. Levando em consideração esses possíveis fatores, decidimos adotar o método de ingestão voluntária para administração oral da proteína OVA nos animais para os experimentos posteriores.

3. Administração oral de OVA via ingestão voluntária e monitoramento da glicemia

Visando o objetivo da pesquisa, os camundongos RIP-mOVA e C57Bl/6 (B6) foram submetidos à OVA oral por ingestão voluntária em três períodos diferentes não paralelos, que serão melhor abordados posteriormente. Como grupo controle, os animais não foram tratados com OVA, ingerindo apenas água. Um dos períodos testados foi de 10 semanas, na qual foi monitorada a glicose sanguínea de cada grupo experimental (Tabela 4) ao longo desse período, a partir do primeiro dia que se iniciou o tratamento oral de OVA ao longo desse período.

Tabela 4: Grupos experimentais das linhagens RIP-mOVA e C57Bl/6 (controle), sendo um dos grupos de cada linhagem tratados com OVA oral durante 10 semanas.

Linhagem	Tratamento	
	Sem tratamento	OVA Oral por ingestão voluntária
C57Bl/6		

RIP-mOVA	Sem tratamento	OVA Oral por ingestão voluntária
----------	-------------------	-------------------------------------

Por meio do monitoramento da glicemia, pudemos observar uma diferença nítida de valores glicêmicos entre as linhagens, os dois grupos de animais RIP-mOVA tiveram valores mais elevados em relação aos C57Bl/6 (Fig. 3A-B). Esses resultados sugerem que os animais RIP parecem ter a glicemia elevada naturalmente mesmo sem nenhum estímulo antigênico oral. Quanto a diferença entre grupos de cada linhagem, o grupo de animais RIP-mOVA que recebeu o tratamento de OVA oral contínua, teve a glicemia um pouco mais alta em relação ao seu grupo controle. É possível observar uma tendência dessa diferença pela análise estatística de área sob a curva derivada do gráfico da figura 3B. Enquanto o grupo que recebeu tratamento oral de OVA dos animais B6 tendeu a uma glicemia menor que o mesmo grupo dos animais RIP-mOVA (Fig. 3C).

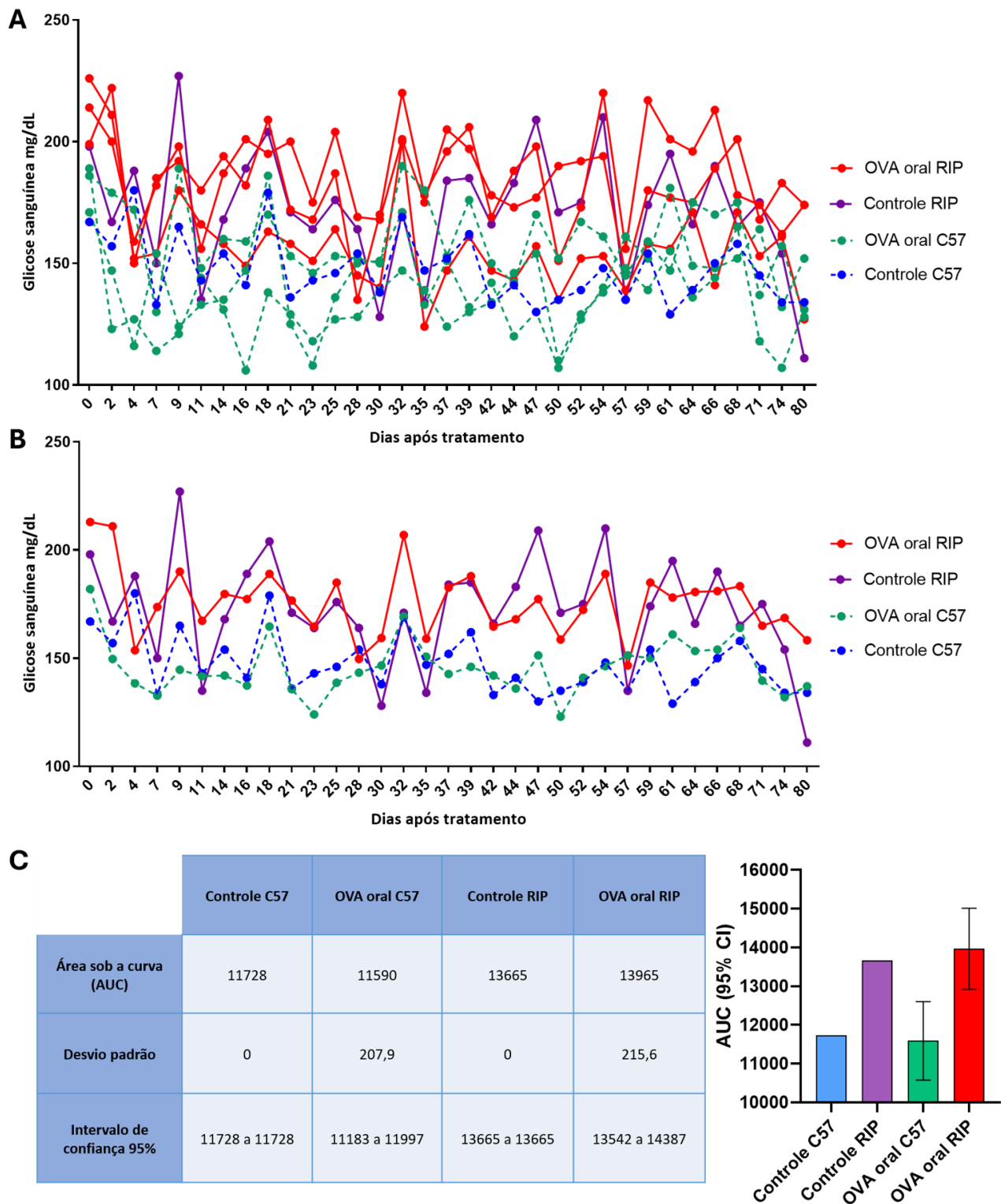


Figura 3: Desenvolvimento da glicemia dos grupos experimentais ao longo de 10 semanas representado pelo (A) gráfico de pontos sobrepostos dos valores individuais de cada grupo, (B) gráfico de pontos sobrepostos da média dos valores de cada grupos, onde cada cor representa um grupo, e pela (C) tabela com dados baseados na análise estatística da área

sob a curva (AUC) definida pelo gráfico B. A tabela mostra o valor da área sob a curva, com seu respectivo desvio padrão e intervalo de confiança (CI) de 95% de cada grupo experimental (n=3). Ao lado há um gráfico de barras representativo da área sob a curva definido pela tabela.

Nossos dados apontam que o estímulo contínuo da OVA pela via oral ao longo de 10 semanas em animais que expressam OVA, tendem a ter um perfil glicêmico mais elevado. Outra observação interessante obtida por meio do monitoramento glicêmico foi que a glicemia dos animais RIP-mOVA de ambos os grupos apresentou um perfil mais instável em comparação aos grupos da linhagem C57Bl/6 (Fig. 3B). Essa instabilidade nos valores glicêmicos ao longo do período se mostrou mais evidente no grupo de animais RIP-mOVA que foram tratados com OVA oral, enquanto seu grupo controle manteve a variação mais parecida com os grupos da linhagem C57Bl/6, tendo um perfil glicêmico mais estável (Tabela 5). Pode-se dizer que o estímulo contínuo do autoantígeno OVA para os animais RIP-mOVA resultou em uma tendência a glicemia alta e instável ao longo de 10 semanas, em relação ao grupo controle, chegando próximo ao valor referente da diabetes autoimune (250mg/dL^{95,96}).

Tabela 5: Variação da média da glicemia em mg/dL dos grupos experimentais de cada linhagem ao longo de 10 semanas, do valor mínimo ao valor máximo.

	C57Bl/6	RIP-mOVA
Controle	129 a 180mg/dL	111 a 227mg/dL
OVA Oral	123 a 182mg/dL	146 a 213mg/dL

Ao compararmos o gráfico da glicemia dos animais tratados com OVA oral por ingestão voluntária (Fig. 3) com o gráfico da glicemia dos animais tratados com OVA oral por gavagem (Fig. 2), podemos confirmar que uma dose de OVA não afeta significativamente os valores glicêmicos de animais RIP-mOVA. Isso porque o grupo que foi imunizado com OVA e o grupo que recebeu OVA oral por gavagem, além de apresentarem uma glicemia mais alta

quando comparados com o grupo que recebeu duas doses de OVA, também tiveram valores mais variáveis (Fig. 2A). Esse perfil glicêmico pode ser considerado normal nos animais RIP-mOVA, visto que esses animais sem nenhum tipo de tratamento mantiveram esse perfil ao longo de 10 semanas (Fig. 3B). Desse modo, pode-se dizer que duas doses de OVA (via imunização subcutânea e via oral por gavagem) administradas aos animais RIP, fizeram com que a glicemia se mantivesse mais baixa e mais estável, diferentemente do estímulo de uma única dose ou do estímulo contínuo de OVA, onde os níveis glicêmicos se mostraram altos.

4. Análise morfológica e imunohistológica do pâncreas

Após 10 semanas de tratamento oral com OVA, os animais foram eutanasiados e os pâncreas foram retirados para experimentos histológicos. As secções histológicas dos pâncreas dos grupos de animais RIP-mOVA e C57Bl/6 foram corados com HE a fim de localizar as ilhotas pancreáticas (ilhotas de Langerhans) e verificar as suas características morfológicas (Fig. 4).

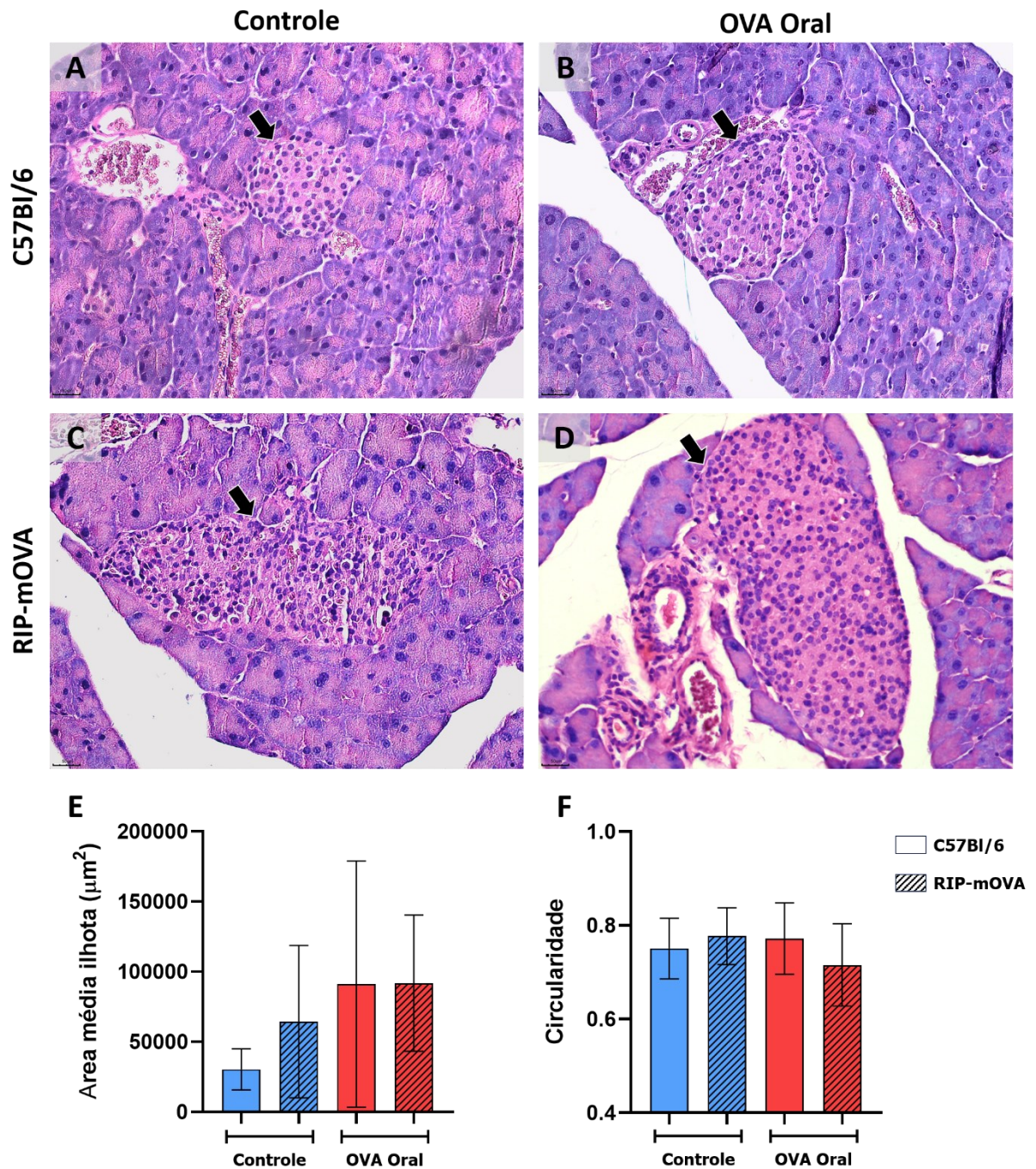


Figura 4: Secções histológicas coradas com HE do tecido pancreático representando ilhotas pancreáticas (setas) dos animais da linhagem (A-B) C57Bl/6 e (C-D) RIP-mOVA dos grupos (A-C) controle e (B-D) tratados com OVA pela via oral por 10 semanas. (E) Área média e (F) circularidade média das ilhotas de cada grupo/linhagem (n=4-5). Na circularidade, quanto mais perto do valor 1, mais próximo a um círculo perfeito. A cor azul representa o grupo controle e a cor vermelha representa o grupo tratado com OVA oral por 10 semanas. Ampliação x200, barra de escala = 50 μm .

As ilhotas pancreáticas dos animais da linhagem C57Bl/6 mostraram-se menores em área (Fig. 4E) e apresentaram citoarquitetura mais preservada (redondas), principalmente o grupo controle (Fig. 4A). Enquanto que algumas ilhotas dos animais RIP-mOVA do grupo controle apresentaram uma aparente área maior em relação aos animais B6, e outras menores, sem seguir um padrão. A citoarquitetura das ilhotas pancreáticas dos animais RIP controle mostrou-se variável, preservando o formato padrão na maioria das ilhotas. Por fim, as ilhotas pancreáticas dos animais RIP tratados com OVA oral não apresentaram diferenças significativas no tamanho da área em relação ao grupo RIP-mOVA controle (Fig. 4E). No entanto, houve uma maior densidade de ilhotas de tamanhos grandes em relação a pequenas por secção entre os animais RIP-mOVA tratados com OVA oral comparados ao grupo controle. Além disso, a citoarquitetura da maioria das ilhotas do grupo de animais RIP que recebeu OVA oral apresentou uma tendência fora do padrão morfológico, com formato não redondo, em comparação ao grupo controle da mesma linhagem (Fig. 4F).

Para identificar a função ativa das células β pancreáticas nas ilhotas dos grupos experimentais, foi realizado o método de imunohistoquímica. A coloração marrom caracteriza a expressão de insulina nas ilhotas dos animais (Fig. 5).

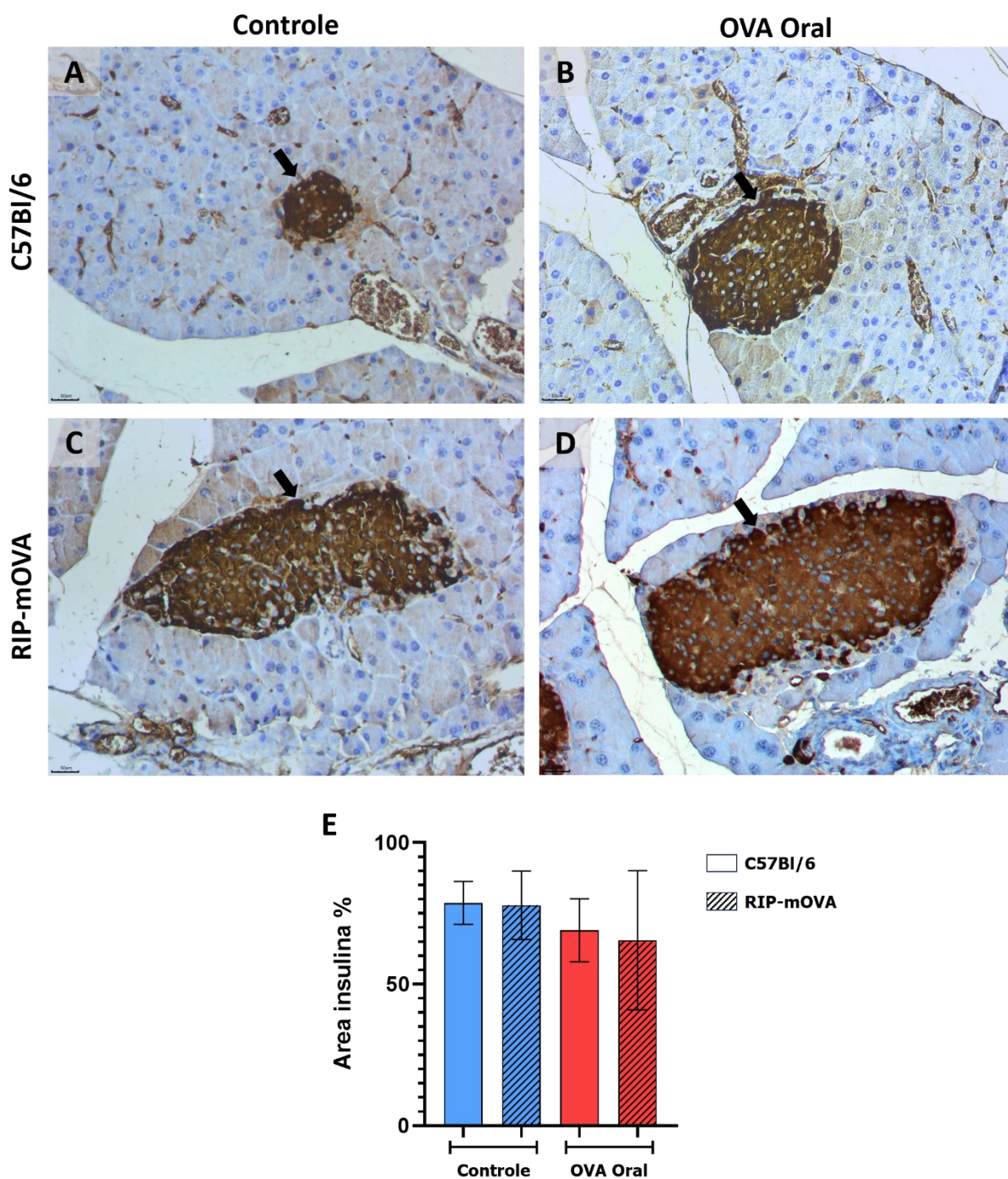


Figura 5: Secções histológicas marcadas com anti-insulina do tecido pancreático representando ilhotas pancreáticas (setas) dos animais da linhagem (A-B) C57Bl/6 e (C-D) RIP-mOVA dos grupos (A-C) controle e (B-D) tratados com OVA pela via oral por 10 semanas. (E) Área fracional de insulina (expressão de insulina) das ilhotas de cada grupo/linhagem. A cor azul representa o grupo controle e a cor vermelha representa o grupo tratado com OVA oral por 10 semanas. Ampliação x200, barra de escala = 50µm.

Na figura 5 pode-se observar uma forte marcação representando a alta expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas de todos os grupos/linhagens. Embora não houver diferença significativa na expressão de insulina entre os grupos (Fig. 5E), algumas das ilhotas dos animais RIP-mOVA que recebeu OVA oral apresentaram uma menor expressão de insulina aparente, especialmente aquelas que eram menores em tamanho (Fig. 6).

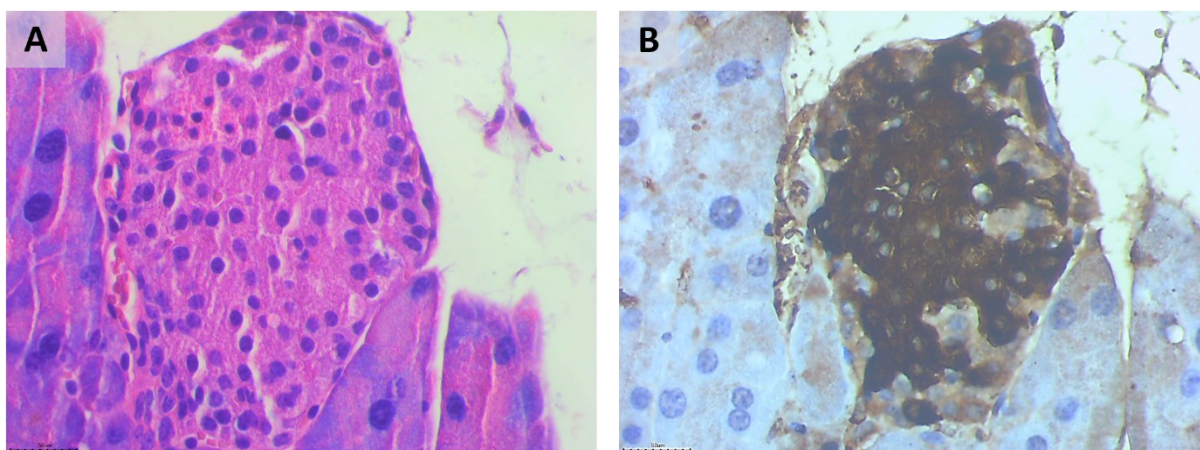


Figura 6: Secções histológicas das ilhotas pancreáticas dos animais RIP-mOVA tratados com OVA oral por 10 semanas, marcadas com (A) HE e (B) anti-insulina. Ampliação x400, barra de escala = 50µm.

Sabe-se que durante a progressão clínica da DM1, uma das características histológicas do pâncreas é a redução do tamanho das ilhotas assim como a redução de volume e densidade, refletindo uma deficiência na secreção de insulina pela destruição de células β ⁹⁹. A área de algumas ilhotas nos animais RIP-mOVA controle apresentaram-se grandes, em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6, sugerindo que esse tamanho pode ser considerado característico da linhagem em condições normais. Pode-se relacionar a área grande com a idade dos animais RIP, e não com algum fator fisiológico, visto que com o passar do tempo as ilhotas desses animais se expandem¹⁰⁰. Apesar de não haver diferença significativa na área das ilhotas dos animais RIP-mOVA que receberam OVA oral por 10 semanas, houve uma aparente alteração na citoarquitetura na maioria das ilhotas, em comparação ao grupo controle. Além disso, na maioria das ilhotas a insulina mostrou-se fortemente marcada, indicando a atividade regular das células β pancreáticas. No entanto, algumas ilhotas dos animais RIP tratados com OVA oral, principalmente as menores, apresentaram menor área fracional de insulina. Baseado no tópico anterior, esse grupo de

animais não chegou a desenvolver doença, mas obtiveram valores glicêmicos elevados. Assim como não houve redução das ilhotas pancreáticas nesse grupo, porém houve uma tendência a alteração no formato e na expressão de insulina.

5. Análise celular dos linfócitos T CD4⁺

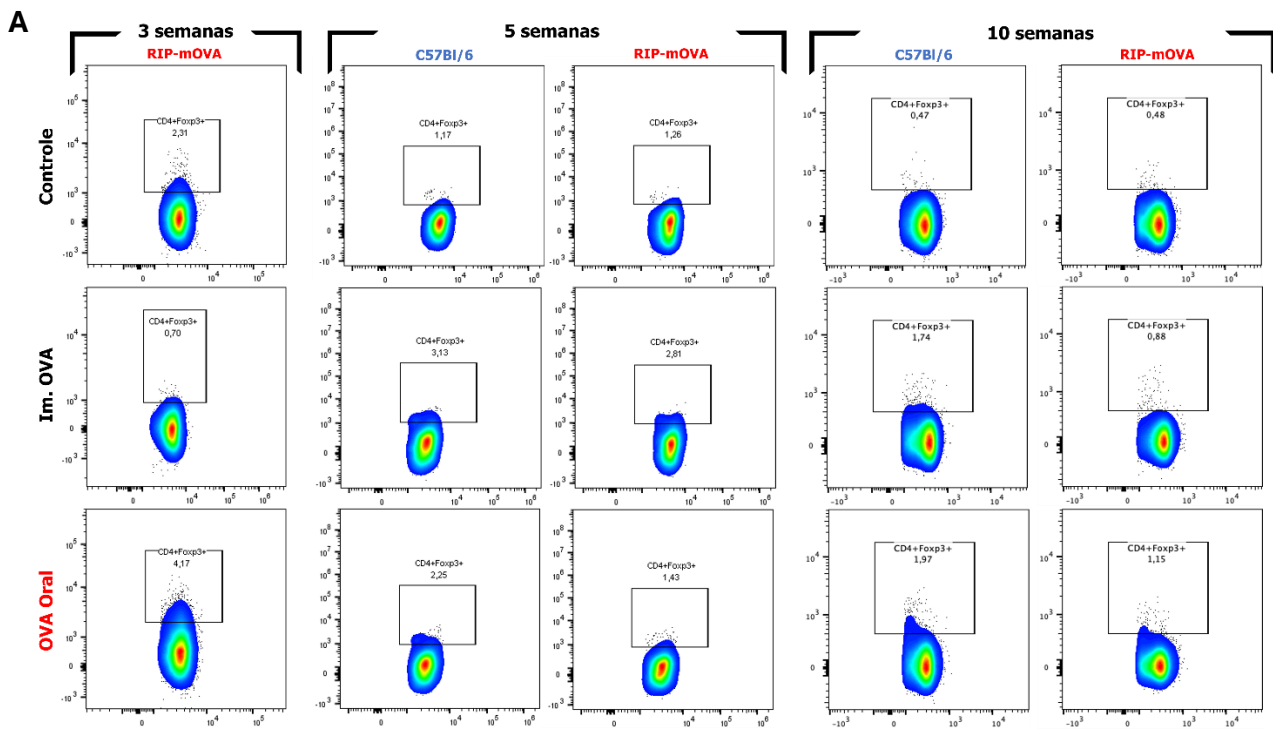
Em um primeiro momento foi realizado o tratamento de OVA oral por ingestão voluntária somente com os animais RIP-mOVA durante o período de 3 semanas. Estes foram divididos em três grupos seguindo a condição de tratamento recebida. A partir do tratamento de OVA oral por 5 semanas, foram adicionados animais da linhagem C57BL/6J a fim de obter resultados celulares e clínicos comparativos entre a linhagem-alvo (RIP-mOVA) com a linhagem *background* (C57BL/6J). Os grupos experimentais criados para cada período de tratamento mantiveram-se similares, com pequenas modificações entre eles (Tabela 6). Cada período de tratamento foi determinado baseado nos resultados do experimento anterior, visando a indução da quebra da tolerância pelo tempo do estímulo antigênico contínuo.

Tabela 6: Grupos experimentais divididos de acordo com o tipo de procedimento utilizado durante o tratamento de OVA oral de 3, 5 e 10 semanas. O tratamento por 3 semanas envolveu somente os animais RIP-mOVA.

3 semanas (RIP-mOVA)	5 semanas (RIP-mOVA e C57BL/6J)	10 semanas (RIP-mOVA e C57BL/6J)
OVA Oral por ingestão voluntária	OVA Oral por ingestão voluntária	OVA Oral por ingestão voluntária
Imuniz. via subcutânea OVA (2 doses)	Imuniz. via subcutânea OVA (2 doses)	Imuniz. via subcutânea OVA (2 doses)
Controle	Imuniz. via subcutânea Adjuvante	Imuniz. via subcutânea Adjuvante

A fim de observar e comparar o perfil celular da resposta regulatória do sistema imune ao estímulo contínuo da OVA oral em cada período e cada grupo, analisamos a expressão de células T CD4⁺ Foxp3⁺ (Tregs) no baço e nos linfonodos mesentéricos provenientes de animais RIP-mOVA e C57BL/6. Com esses dados foi possível verificar o

engajamento das células Tregs frente ao estímulo oral contínuo de OVA, como um autoantígeno e como um antígeno não próprio, administrada pela via oral de forma contínua por determinados períodos. A figura 7A-B representa os gráficos da porcentagem populacional de células T $CD4^+ Foxp3^+$ do baço e linfonodos mesentéricos dos grupos experimentais que receberam OVA oralmente durante o período de 3, 5 e 10 semanas (Tabela 6).



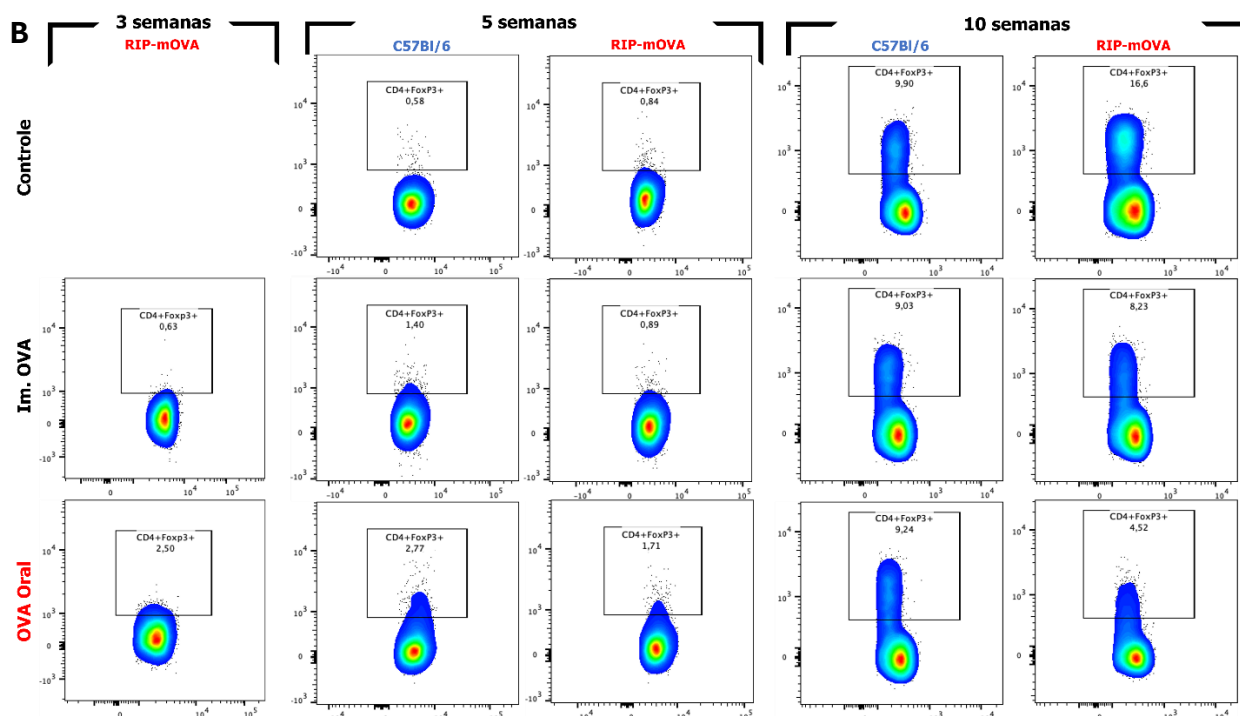


Figura 7: Gráficos representativos de citometria de fluxo com *gates* de células T CD4⁺ Foxp3⁺ demonstrando o perfil da porcentagem dessas células no (A) baço e (B) linfonodos mesentéricos de camundongos após os períodos da administração contínua de OVA oral (da esquerda para direita: 3, 5 e 10 semanas). Obs.: O grupo controle referente ao período de 3 semanas não foi imunizado e nem tratado com OVA oral, enquanto que o controle de 5 e 10 semanas foi imunizado somente com adjuvante completo de *Freund*.

Pudemos observar maior porcentagem de células T CD4⁺ Foxp3⁺, tanto em porcentagem quanto em intensidade, no baço dos animais do grupo que recebeu OVA oral por 3 semanas em comparação a todos os outros grupos, incluindo o dos períodos mais longos (Fig. 7A e 8A – 3 semanas). Sabe-se que os animais RIP-mOVA expressam OVA nas células β pancreáticas e são tolerantes a OVA exógena⁹⁸. Devido a isso, há uma grande participação das células regulatórias em resposta ao estímulo oral do autoantígeno nesses animais para formar um ambiente tolerogênico. Nossos dados mostraram que esse engajamento de Tregs ocorre mesmo com o estímulo oral antigênico contínuo durante 3 semanas. Além disso, o grupo que recebeu imunização de OVA via subcutânea mostrou uma menor expressão em porcentagem de Foxp3 pelas células T CD4⁺ em relação aos outros dois grupos do mesmo período (Fig. 7A e 8A – 3 semanas).

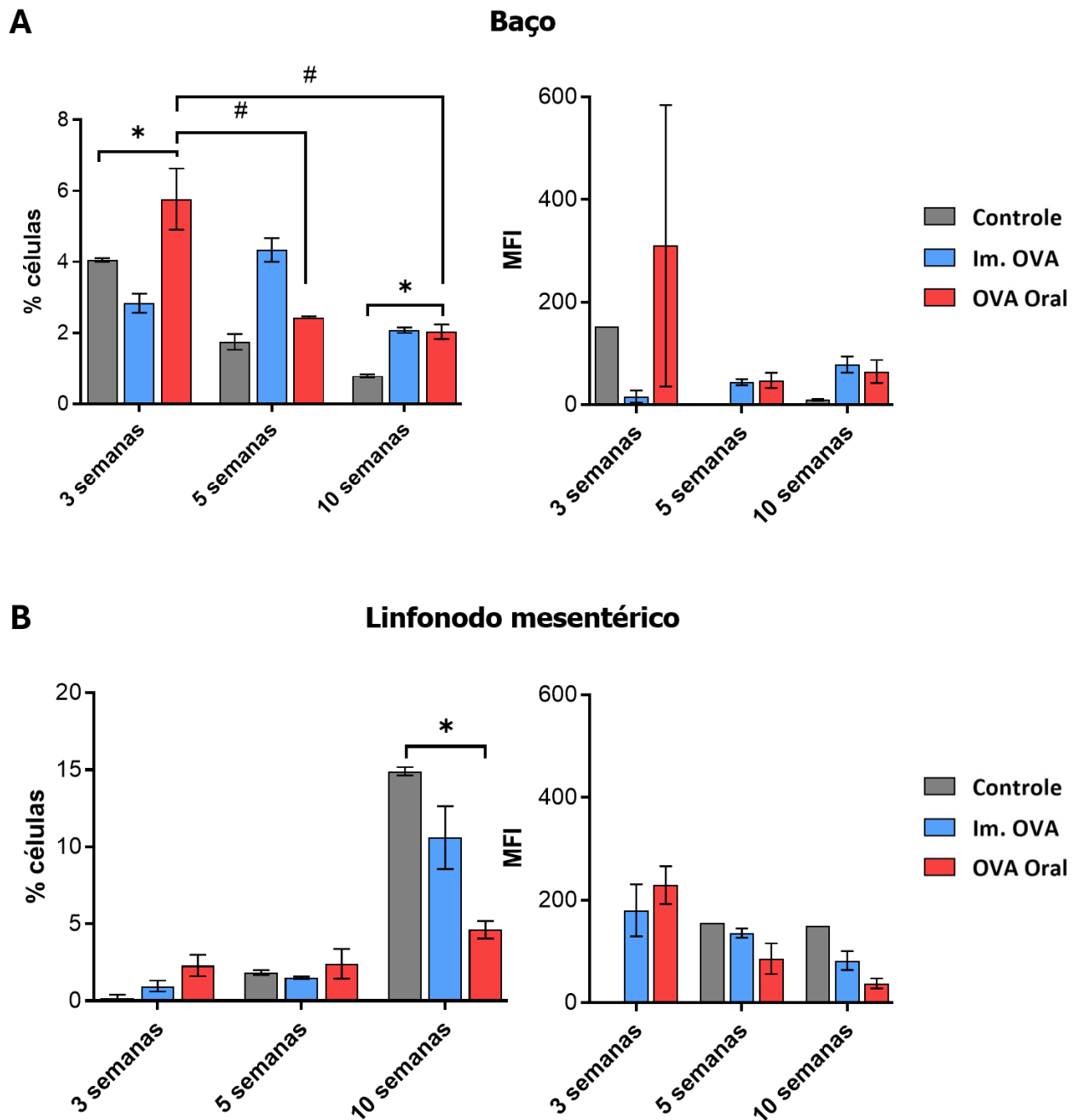


Figura 8: Porcentagem e intensidade média de fluorescência (MFI) de células T CD4⁺ Foxp3⁺ representados em gráficos de coluna comparativos do (A) baço e dos (B) linfonodos mesentéricos dos grupos de animais RIP-mOVA divididos em cores. Os grupos são comparados entre os períodos que foram tratados com OVA oral. Obs.: O grupo controle referente ao período de 3 semanas não foi imunizado e nem tratado com OVA oral, enquanto que o controle de 5 e 10 semanas foi imunizado somente com adjuvante completo

de *Freund*. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM (n=3-4). * P < 0,05, Controle vs OVA oral; # P < 0,05, OVA oral vs OVA oral 3 semanas.

No baço dos animais da linhagem controle, tanto tratados por 5 ou 10 semanas com OVA oral, apresentaram uma expressão populacional de células T CD4⁺ Foxp3⁺ maior em relação aos animais RIP-mOVA (Fig. 7A). Ao acompanhar o fenótipo das células T regulatórias periféricas dos animais que foram estimulados oralmente com OVA ao longo dos períodos, foi possível observar a decrescente porcentagem dessas células, especialmente nos animais que expressam OVA. Outra observação foi em relação ao grupo que recebeu imunização com OVA, a porcentagem de células T CD4⁺ Foxp3⁺ no baço dos animais RIP-mOVA não revelou uma linearidade crescente nem decrescente ao longo dos períodos.

Nos linfonodos mesentéricos dos animais, a porcentagem de células T CD4⁺ Foxp3⁺ entre os grupos e linhagens se mostrou diferente do baço. No grupo tratado com OVA oral dos animais RIP-mOVA, houve uma diminuição de Tregs no período de 3 para 5 semanas, no entanto no período de 10 semanas houve um aumento dessas células (Fig. 7B) em relação aos períodos anteriores. No entanto, se observarmos o perfil de intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador de Tregs, há uma diminuição da expressão dessas células ao longo dos períodos (Fig. 8B). Ao analisar todos os grupos de ambas linhagens do período de 10 semanas em comparação aos outros dois períodos, a porcentagem de Tregs aumentou expressivamente (Fig. 7B e 8B). Apesar desse aumento, os animais RIP-mOVA do grupo que recebeu OVA oral foram os que tiveram uma menor expressão de Foxp3, tanto em porcentagem de população quanto de MFI, em relação ao grupo controle e o grupo imunizado com OVA do período de 10 semanas (Fig. 8B).

Sabe-se que o perfil de células T regulatórias que ativam outras células e citocinas para induzir um ambiente tolerogênico a um determinado antígeno depende de diversos fatores, tais como a via de indução, o tipo de estímulo antigênico, quantidade do estímulo, origem, entre outros. Visto isso, nossos resultados mostraram que em uma situação de autoantígeno, por meio do estímulo contínuo pela via oral, há uma diminuição de Tregs a longo prazo (10 semanas). Acreditamos que o contato contínuo da OVA no intestino dos animais RIP-mOVA por meio da administração oral durante 3 semanas, manteve o fenótipo normal das Tregs ao autoantígeno oral pois estimulou uma via tolerogênica. Além disso, o

período curto e constante do estímulo também favoreceu um maior recrutamento de células T CD4⁺ Foxp3⁺ em resposta ao autoantígeno nos animais RIP-mOVA, propício a um ambiente tolerogênico. Contudo, ao estimular de forma persistente, houve tanto uma queda de células T regulatórias quanto um aumento da glicemia, podendo tender a uma perda de tolerância ao autoantígeno. Isso porque ao tratar os animais RIP-mOVA com OVA oral, foi perceptível a queda de células T CD4⁺ Foxp3⁺ ao longo dos períodos. Interessantemente, no baço dos animais RIP-mOVA houve maior porcentagem de células Tregs do que a intensidade média de fluorescência do marcador dessas células, em contrapartida, nos linfonodos mesentéricos desses animais ocorreu o oposto em todos os períodos de tratamento. Relacionamos esse dado com a literatura, visto que a administração oral com antígeno pode gerar tolerância principalmente em grande parte no sistema imunológico da mucosa local, apesar de poder ocorrer tolerância sistêmica em certo nível. E dentre os tecidos linfoides locais, estudos indicam que os linfonodos mesentéricos são os principais locais de indução de tolerância oral¹⁰¹. Sendo assim, parece haver uma maior quantidade de Tregs nos linfonodos mesentéricos do que no baço.

Consideramos que a continuidade do estímulo antigênico em dose baixa⁵⁶ é um fator que influencia a mudança ou manutenção do fenótipo de células T regulatórias, dependendo do tempo do estímulo. A indução da tolerância é dependente da dose do antígeno⁴⁴, quando se administra uma dose alta de OVA nos animais RIP-mOVA pode levar a respostas autoimunes, levando ao diabetes do tipo 1. Enquanto que a dose baixa do antígeno pode levar a indução da tolerância⁸⁸. Em nossos dados, o estímulo via gavagem com duas doses de OVA foi considerada uma dose baixa que resultou em baixos níveis de glicemia, assim como o estímulo contínuo do antígeno em dose baixa por 3 semanas resultou na alta porcentagem de Tregs. Por outro lado, a persistência do estímulo antigênico ao aumentar o tempo (10 semanas) resultou na mudança de fenótipo das Tregs e no aumento da glicemia. Logo podemos dizer que o estímulo foi em dose alta se considerarmos todo o período de tratamento oral.

Os grupos controles do período de 5 e 10 semanas tiveram um perfil baixo de células Tregs similares entre as linhagens de cada período, isso porque o estímulo com adjuvante contém produtos microbianos que representam PAMPs e desencadeiam a imunidade, fazendo com que uma resposta imune seja induzida.

6. Análise do receptor inibitório CTLA-4 em células T regulatórias

Analizamos a presença da molécula coinibitória CTLA-4 dentro da população de células T $CD4^+$ Foxp3 $^+$ do baço e linfonodos mesentéricos dos animais RIP-mOVA. As células T $CD4^+$ foram identificadas por citometria de fluxo (Fig. 9A e 10A).

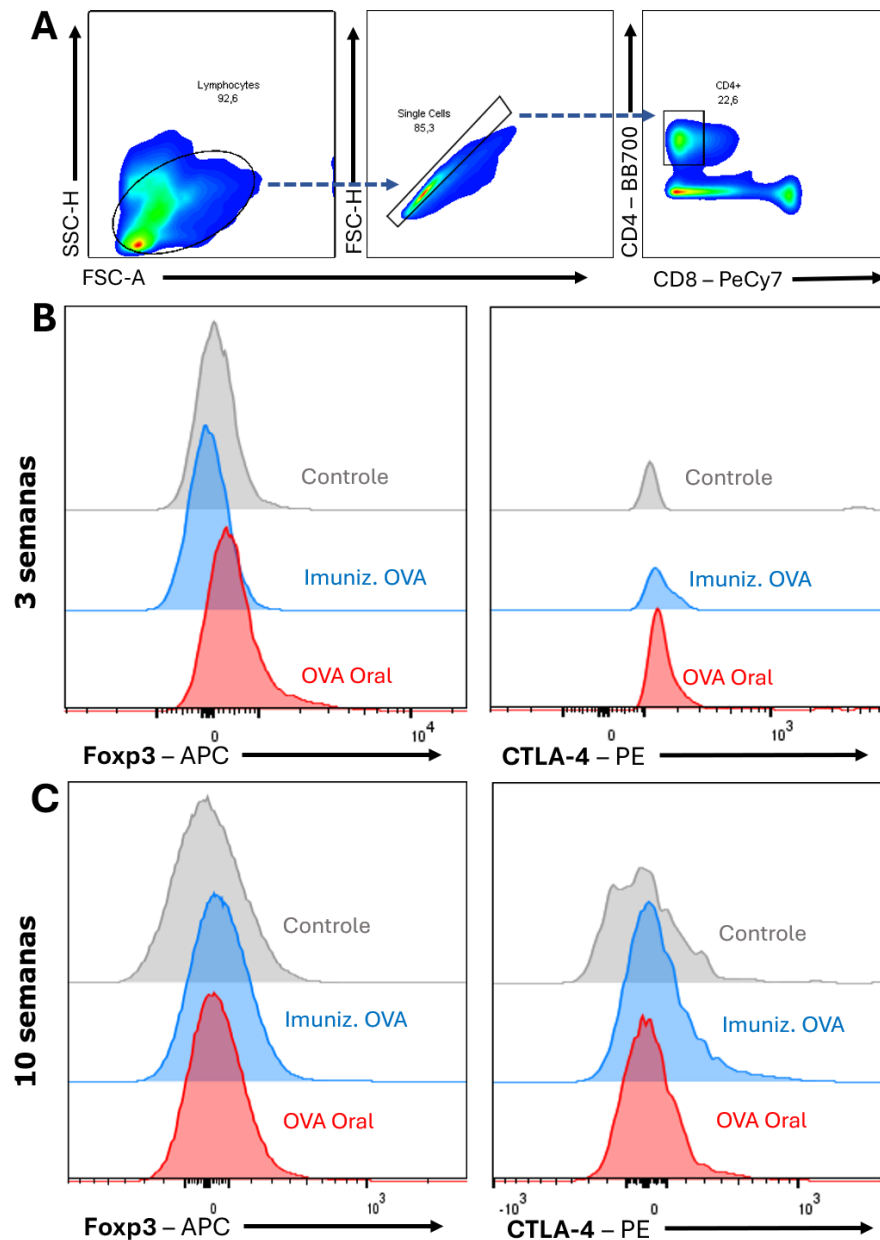


Figura 9 – Frequência de Foxp3 e CTLA-4 (BAÇO): Gráficos representativos de marcadores dentro de células T $CD4^+$ do baço dos animais RIP-mOVA, sendo **(A)** a estratégia de *gate* para identificação de linfócitos T $CD4^+$, e **(B-C)** histogramas dos marcadores para células T $CD4^+$ Foxp3 $^+$ (esquerda) e do receptor inibitório CTLA-4 (direita) expresso nas células T $CD4^+$

Foxp3⁺. Além dos grupos experimentais, os histogramas foram comparados baseado nos períodos de tratamento oral de OVA, sendo (B) do período de 3 semanas e (C) de 10 semanas.

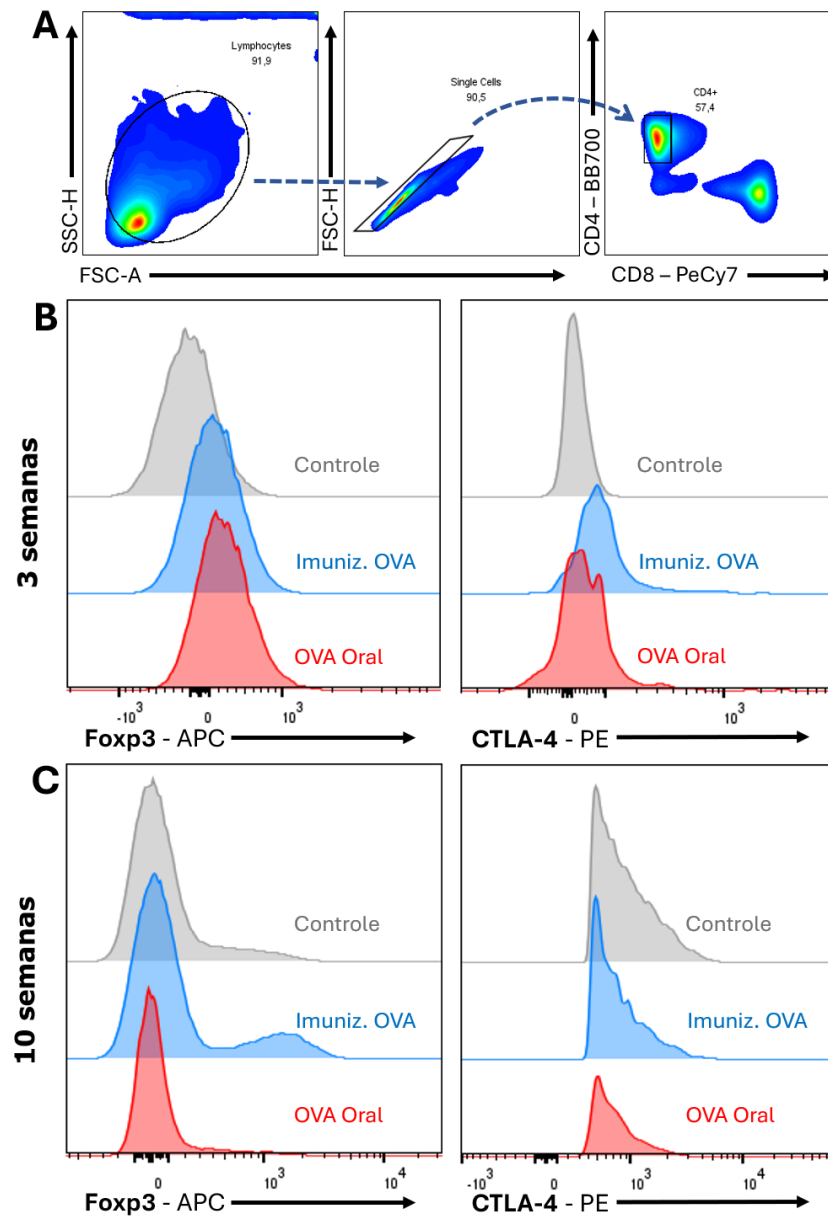


Figura 10 – Frequência de Foxp3 e CTLA-4 (LINFONODO MESENTÉRICO): Gráficos representativos de marcadores dentro de células T CD4⁺ dos linfonodos mesentéricos dos animais RIP-mOVA, sendo (A) a estratégia de *gate* para identificação de linfócitos T CD4⁺, e (B-C) histogramas dos marcadores para células T CD4⁺ Foxp3⁺ (esquerda) e do receptor inibitório CTLA-4 (direita) expresso nas células T CD4⁺ Foxp3⁺. Além dos grupos

experimentais, os histogramas foram comparados baseado nos períodos de tratamento oral de OVA, sendo **(B)** do período de 3 semanas e **(C)** de 10 semanas.

A frequência das Tregs mostrou-se maior no baço e nos linfonodos mesentéricos do grupo que recebeu OVA oral durante 3 semanas (Fig. 9B e 10B), quando comparado com o grupo controle e o imunizado com OVA. Assim como discutido no tópico anterior, se tratando da linhagem RIP-mOVA que recebe OVA pela via oral, é esperado a indução de células tolerantes a esse autoantígeno. Nossos resultados mostram que há um recrutamento grande de Tregs ao estímulo antigênico por um curto período de tempo. No baço dos animais, a frequência de CTLA-4 em células T CD4⁺ Foxp3⁺ também mostrou-se maior em relação aos outros dois grupos, como mostrado no histograma de 3 semanas (Fig. 9B). Curiosamente, no mesmo período, o grupo que foi imunizado com OVA apresentou frequência de CTLA-4 maior nos LMs, apesar da frequência baixa de Tregs em comparação ao grupo que recebeu OVA oral (Fig. 10B). O CTLA-4 auxilia a regulação das respostas das células T, sendo importante para indução e manutenção da tolerância imunológica^{102,103}. Portanto, a presença dessa molécula nas Tregs indica uma coestimulação negativa que propicia um ambiente tolerogênico, pela inibição da sinalização do TCR que ativa células T¹⁰³. No tratamento oral de OVA nos animais RIP-mOVA durante 10 semanas, é possível visualizar uma menor frequência do marcador de células T regulatórias em comparação aos outros grupos (Fig. 9C e 10C), particularmente nos linfonodos mesentéricos (Fig. 10C). Ainda nos LMs, a frequência da expressão da molécula CTLA-4 nas Tregs desses animais se mostrou baixa em relação aos outros grupos, e menor em relação ao mesmo grupo do período de 3 semanas. Isso indica uma mudança fenotípica das Tregs nesses animais, supostamente pelo estímulo contínuo do autoantígeno por um período maior.

Nossos dados mostram um grande recrutamento tanto de células T CD4⁺ Foxp3⁺ quanto da molécula inibitória CTLA-4 nos animais RIP-mOVA, quando há um estímulo contínuo considerado curto (3 semanas). O contrário foi visto quando os animais foram tratados com OVA oral por 10 semanas, ou seja, a expressão de Tregs e CTLA-4 foram menores, principalmente nos linfonodos mesentéricos. Pode-se dizer que o fenótipo das Tregs foi alterado nos LM pelo contato contínuo do autoantígeno por um longo período,

enquanto que no baço parece que o sistema imune teve uma insistência maior em manter o fenótipo característico das Tregs.

7. Análise do repertório do receptor de células T CD4⁺ e CD8⁺

Para investigar a expressão, em porcentagem, das cadeias V β dos receptores de células T do baço e linfonodos mesentéricos, analisamos o repertório de TCR das células T CD4⁺ e CD8⁺ dos órgãos linfoides dos animais RIP-mOVA e C57Bl/6 que foram tratados com OVA oral por 10 semanas. Sabe-se que o epítipo OVA₂₅₇₋₂₆₄ (H-2K^b) no complexo MHC apresentado de forma cruzada nos órgãos linfoides dos animais da linhagem RIP-mOVA, se liga especificamente ao TCR V β 5.2 para direcionar as células T CD8⁺ ao reconhecimento do ligante do epítipo¹⁰⁴. Além disso, as células T CD4⁺ que expressam o TCR V β 5.1, 5.2 se ligam especificamente ao epítipo da OVA₃₂₃₋₃₃₉ (I-A^b) no complexo MHC^{105,106}. Sendo assim, levamos em consideração o TCR V β 5.1/5.2 e observamos que houve alterações nesse TCR das células T CD4⁺ (Fig. 11), quando comparados entre os animais RIP-mOVA e C57Bl/6 que foram estimulados com OVA oral de forma contínua por 10 semanas. Também vimos um aumento expressivo do V β 6 no baço dos animais RIP-mOVA (Fig. 11A).

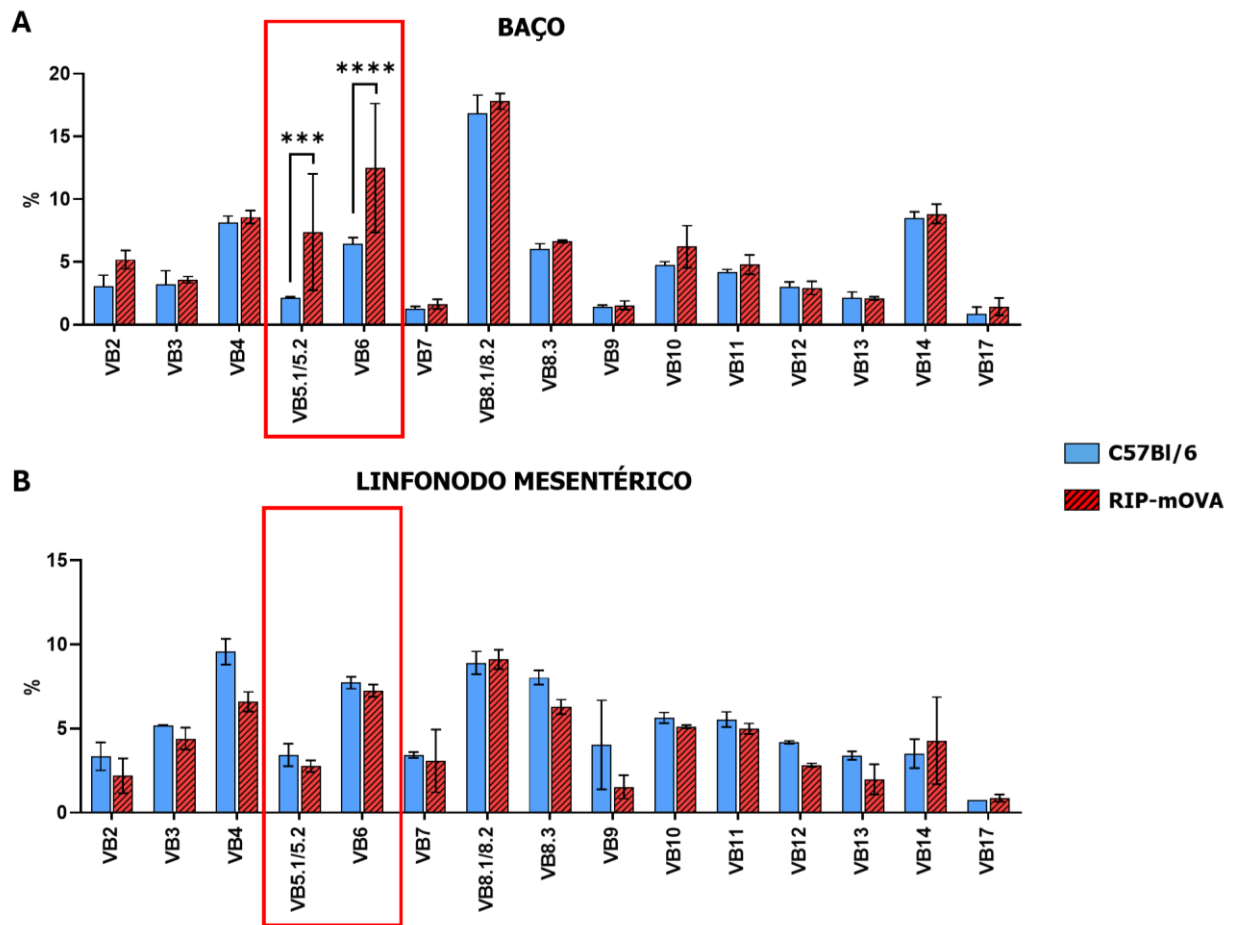


Figura 11 – Repertório Vβ dos linfócitos T CD4⁺ (RIP-mOVA e C57Bl/6): Gráficos comparativos das porcentagens de Vβ dos receptores de células T CD4⁺ no (A) baço e nos (B) linfonodos mesentéricos dos animais da linhagem RIP-mOVA (vermelho listrado) e C57Bl/6 (azul) tratados com OVA oral por 10 semanas. Os valores estão representados como média ± EPM (n=3). *** P < 0,05, C57Bl/6 vs RIP-mOVA Vβ 5.1/5.2; **** P < 0,001, C57Bl/6 vs RIP-mOVA Vβ 6.

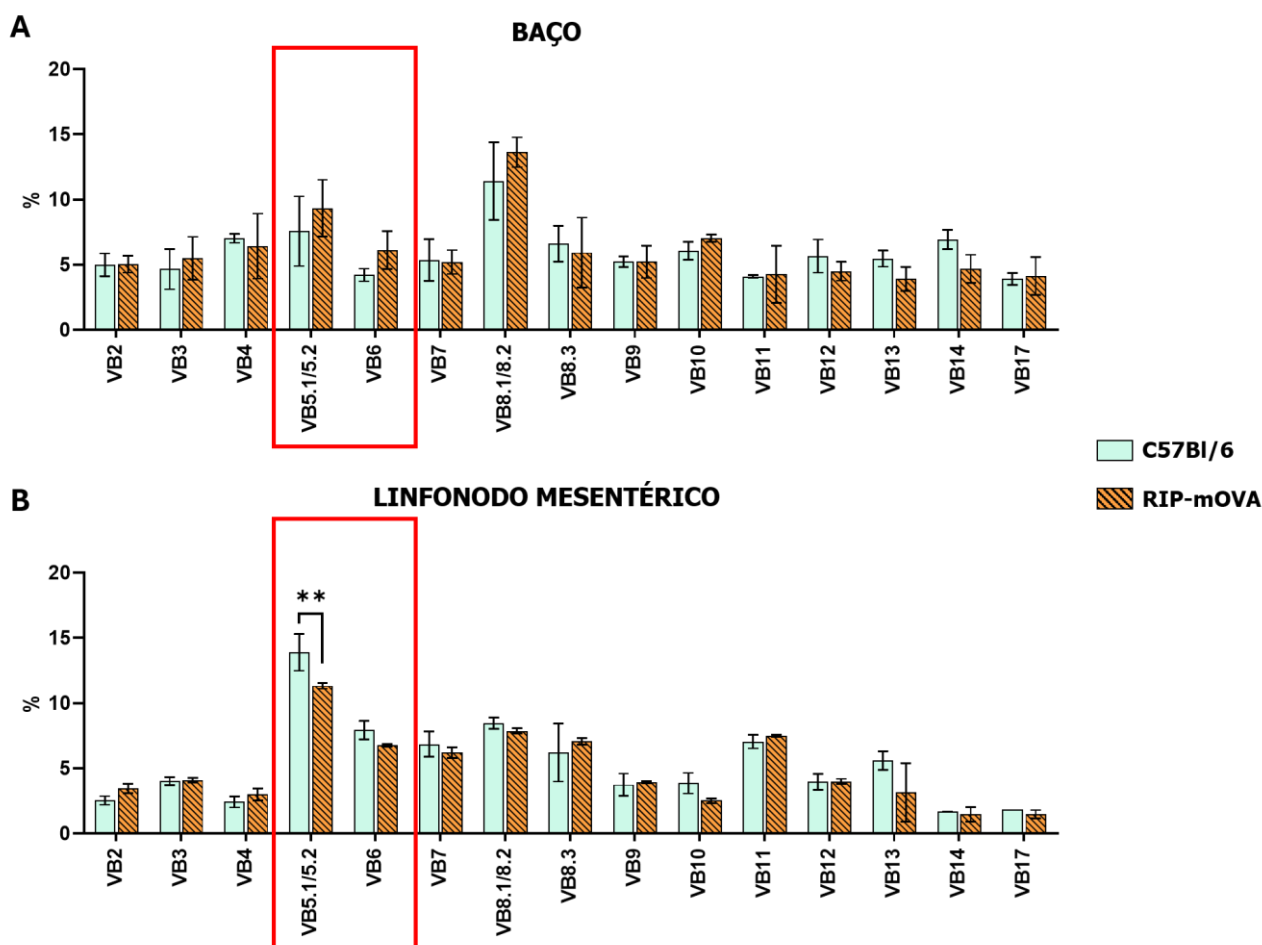


Figura 12 – Repertório Vβ dos linfócitos T CD8⁺ (RIP-mOVA e C57Bl/6): Gráficos comparativos das porcentagens de Vβ dos receptores de células T CD8⁺ no (A) baço e nos (B) linfonodos mesentéricos dos animais da linhagem RIP-mOVA (laranja listrado) e C57Bl/6 (verde) tratados com OVA oral por 10 semanas. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM (n=3). ** P < 0,05, C57Bl/6 vs RIP-mOVA Vβ 5.1/5.2.

Pudemos observar que em 10 semanas de tratamento com OVA oral, houve uma maior expressão dos TCRs Vβ 5 e 6 no baço dos animais RIP-mOVA, principalmente nas células T CD4⁺ (Fig. 11A), em comparação aos animais C57Bl/6 que receberam o mesmo tratamento. Não houve variações significativas no repertório de TCR dos linfonodos mesentéricos nas células T CD4⁺ (Fig. 11B). Entretanto, curiosamente, o TCR Vβ 5.1/5.2 mostrou-se menor no compartimento de células T CD8⁺ nos LM dos animais RIP-mOVA (Fig. 12B). Enquanto houve uma tendência de maior porcentagem do mesmo TCR no baço, apesar de não significativa (Fig. 12A). Ao juntarmos os dados da diminuição de células T

regulatórias com os do repertório de TCR CD4⁺ no contexto de tratamento oral com OVA nos animais RIP-mOVA, é possível relacionar a perda de Tregs ao longo do período com uma maior expressão do TCR V β 5.1/5.2, no qual se liga especificamente ao epítipo da OVA. Além disso, essa alteração da porcentagem de TCR ocorreu de maneira global e não local, isso porque há uma maior expressão do V β 5 nas células T CD4⁺ no baço dos animais RIP e não houve diferença significativa nos LMs. Curiosamente, não encontramos na literatura uma relação direta do TCR V β 6 com a proteína OVA, no entanto, foi demonstrado que esse TCR está relacionado com a evolução de T1D em camundongos NOD¹⁰⁷.

Visto que houve uma maior alteração do TCR V β 5 e 6 nas células T CD4⁺ no baço dos animais, analisamos mais detalhadamente a expressão do TCR tanto nas células T CD4⁺ (Fig. 13) quanto CD8⁺ (Fig. 14) do baço dos animais RIP-mOVA e C57Bl/6 tratados com OVA oral contínua por 10 semanas.

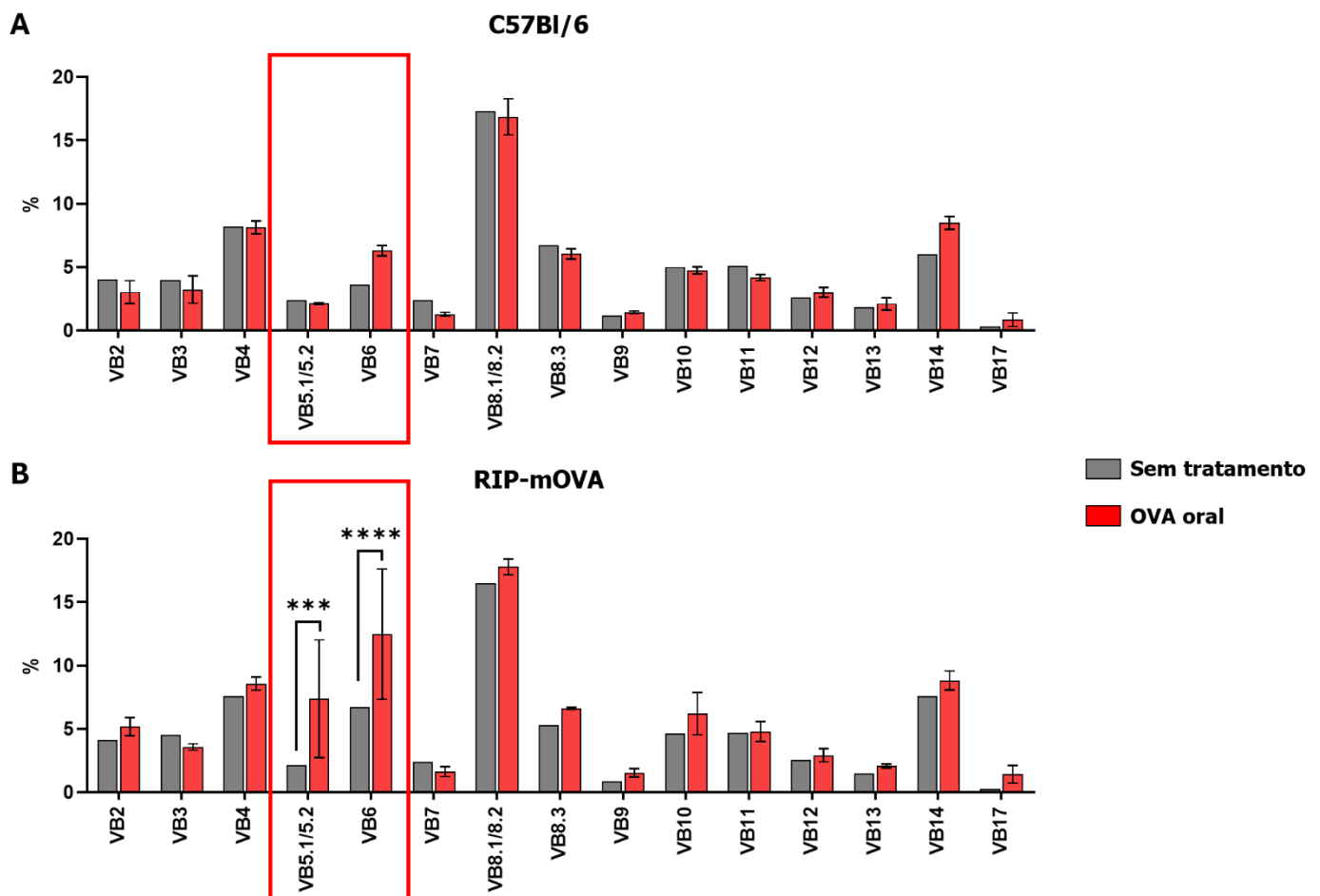


Figura 13 – Repertório V β dos linfócitos T CD4⁺ (RIP-mOVA): Gráficos comparativos das porcentagens de V β dos receptores de células T CD4⁺ no baço dos animais da linhagem (A) C57Bl/6 e (B) RIP-mOVA tratados com OVA oral (vermelho) e não tratados (cinza) por 10 semanas. O enfoque da análise do repertório foi em cima dos TCRs V β 5.2 e V β 6, uma vez que tiveram evidentes alterações. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM (n=3). *** P < 0,05, sem tratamento vs OVA oral V β 5.1/5.2; **** P < 0,001, sem tratamento vs OVA oral V β 6.

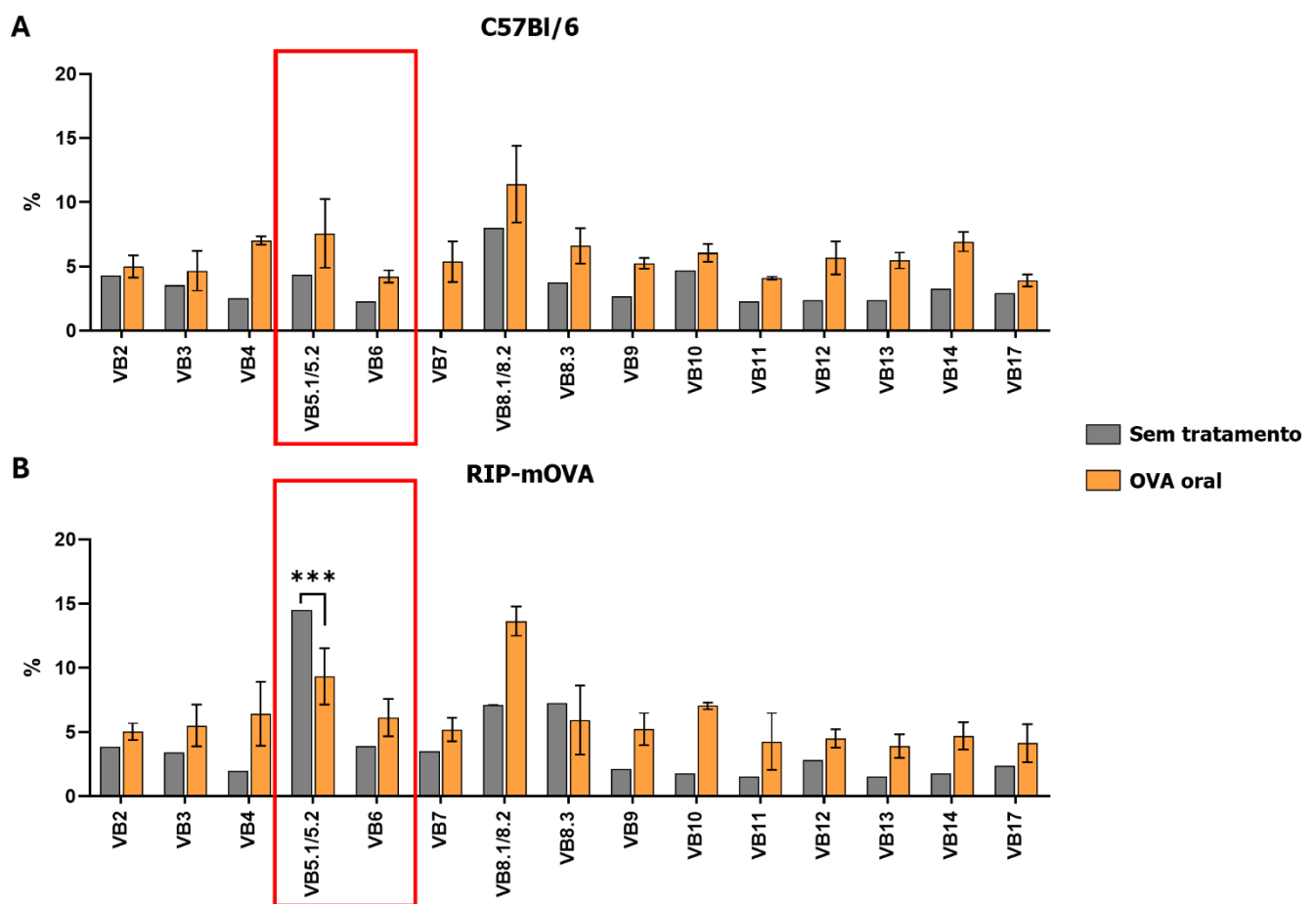


Figura 14 – Repertório V β dos linfócitos T CD8⁺ (RIP-mOVA): Gráficos comparativos das porcentagens de V β dos receptores de células T CD8⁺ no baço dos animais da linhagem (A) C57Bl/6 e (B) RIP-mOVA tratados com OVA oral (vermelho) e não tratados (cinza) por 10 semanas. O enfoque da análise do repertório foi em cima dos TCRs V β 5.2 e V β 6, uma vez que tiveram evidentes alterações. Os valores estão representados como média $\pm$ EPM (n=3). *** P < 0,05, sem tratamento vs OVA oral V β 5.1/5.2.

No baço dos animais RIP-mOVA tratados com OVA oral, houve uma maior porcentagem do TCR V β 5 e 6 das células T CD4⁺ em relação ao grupo controle (sem tratamento) (Fig. 13B), e não houve diferença significativa entre os grupos da linhagem C57Bl/6 (Fig. 13A). Em contraste, nas células T CD8⁺ foi visto uma baixa expressão do V β 5 no grupo de animais RIP que foi tratado com OVA (Fig. 14B), quando comparado ao grupo controle. Nossos dados apontam que concomitante com a diminuição de células T regulatórias pelo estímulo constante de autoantígeno por 10 semanas, há uma manifestação grande do TCR específico de OVA no baço dos animais RIP-mOVA, especificamente no compartimento de células T CD4⁺. E, curiosamente, há uma diminuição desse TCR no compartimento de células T CD8⁺ nesses animais com as condições citadas. Além disso, também é nítida a participação do TCR V β 6 nas células T CD4⁺. Sabe-se que as células T CD4⁺ iniciam o processo da resposta contra o autoantígeno OVA, no contexto da linhagem RIP-mOVA. Isso ocorre através da apresentação cruzada da OVA exógena por APC-Th capazes de estimular respostas CTLs de células T CD8⁺ específicas de OVA, levando a destruição das células β pancreáticas por infiltração e, consequentemente, resulta em diabetes em RIP-mOVA¹⁰⁵. Portanto, podemos relacionar a diminuição de Tregs e a alta expressão do TCR específico de OVA nas células T CD4⁺, e não nas T CD8⁺, do baço a um possível início de resposta contra o autoantígeno, ou seja, possível início da quebra da tolerância de autoantígeno nos animais RIP-mOVA. Uma vez que a diminuição de Tregs em 10 semanas ocorre paralelamente com o aumento do TCR que se liga e responde contra a OVA, nas células onde reconhecidamente iniciam o processo de autoimunidade nesses animais. Apesar de não estar claro na literatura a relação do TCR V β 6 com a OVA, a participação desse TCR parece estar envolvida com o aparecimento da DM1. Sendo assim, há uma relação lógica do aumento desse TCR no ambiente imunológico onde há diminuição de Tregs e aumento de valores glicêmicos, assim como nossos dados apontam. Nesse sentido, são necessários estudos mais aprofundados da relação do TCR V β 6 com o autoantígeno OVA.

Possivelmente, se continuarmos o estímulo antigênico contínuo a longo prazo, o repertório de TCR poderá ir em direção a resposta contra o autoantígeno OVA. Baseado nos nossos dados, a expressão do TCR V β 5 e 6 poderiam ser maiores a longo prazo nas células T CD4⁺ e, principalmente, nas CD8⁺, que junto com o complexo peptídeo-MHC se tornariam as células efectoras que destruiriam as ilhotas pancreáticas. Assim como também haveria um

declínio maior de células T regulatórias e valores glicêmicos altos nos animais RIP-mOVA. A análise de repertório da região variável do receptor de células T do gene β (TCR V β) é de grande importância para mostrar a expansão seletiva de células T em doenças autoimunes¹⁰⁸, na qual faz relevante a variação dos TCR V β 5 e 6 relacionado com uma tendência a diabetes autoimune.

Em suma, nossos dados mostraram que há uma alta expressão de células T CD4⁺ regulatórias em camundongos RIP-mOVA quando há um estímulo curto (3 semanas) e contínuo de OVA pela via oral. Além disso, a glicemia desses animais tende a ser menor ao administrar uma dose de OVA oral via gavagem após imunização do mesmo antígeno, resultando em uma possível tolerância ao autoantígeno OVA. Portanto, em nossa pesquisa, foi possível a reprodução da indução da tolerância oral ao autoantígeno nos animais RIP-mOVA, assim como é mostrado na literatura. A proteína OVA é expressa principalmente nas células β pancreáticas desses animais, fazendo com que o sistema imune não reaja contra esse componente próprio do animal. No entanto, ao dar o enfoque na continuidade do estímulo antigênico oral por um período maior (10 semanas), nossos resultados mostraram que há uma tendência a reversão do estado tolerogênico. Isso foi visto através da baixa expressão de Tregs que alterou seu fenótipo, e pela alta expressão do TCR que se liga especificamente a OVA, concomitante com o aumento dos valores glicêmicos dos animais ao longo do período do tratamento. Nossas observações indicam que possivelmente o estímulo externo do autoantígeno de forma crônica fez com que as Tregs entrassem em um início de supersaturação pelo estímulo persistente.

A literatura mostra que o modelo experimental RIP-mOVA desenvolve diabetes após infectado com vírus, coexpressando o TCR específico a OVA⁸⁹. Apesar disso e mesmo lidando com uma via tolerogênica (antígeno OVA para RIP-mOVA), podemos dizer que a combinação dos fatores tempo e continuidade do estímulo autoantigênico levaram a uma tendência a perda de tolerância imunológica. Ao comparar a expressão de células regulatórias em um período de 3 semanas e 10 semanas, é perceptível sua diminuição entre os períodos. O que nos leva a pensar que se continuarmos o estímulo oral de OVA por um período maior, os animais podem desenvolver diabetes autoimune pela total desistência das Tregs ao estímulo contínuo do antígeno. Apesar de não chegarem a valores clínicos indicativo da doença, em 10 semanas de tratamento oral de OVA, os animais RIP-mOVA tiveram uma glicemia elevada

e instável, chegando próximo ao escore clínico da doença. O contrário ocorreu nos animais controle, nos quais a OVA não é uma proteína própria em seu organismo, seus níveis glicêmicos se apresentaram baixos e estáveis, assim como também houve uma baixa expressão de Tregs em comparação aos animais RIP-mOVA.

Outro dado importante foi em relação ao repertório de TCR nas células T CD4⁺ e CD8⁺ dos órgãos linfoides dos animais que foram tratados com OVA oral no período mais longo deste trabalho. Interessantemente, vimos que de forma global, mas não local, o estímulo antigênico oral contínuo fez com que o TCR específico a OVA fosse mais expresso nas células T CD4⁺ do que nas T CD8⁺. O TCR que está relacionado com o aparecimento de DM1 em camundongos também se apresentou alto. Paralelamente com a diminuição das Tregs ao longo do período do tratamento, o aparecimento do TCR específico de OVA e do TCR relacionado ao desenvolvimento da diabetes dizem respeito a um possível início de resposta contra o autoantígeno nos animais RIP-mOVA no compartimento de células T CD4⁺. O epítipo de OVA é apresentado de forma cruzada pelas DCs com células Th, e essa apresentação pode induzir a destruição das células β pancreáticas quando há uma baixa avidade de células T CD8⁺ com o antígeno¹⁰⁵. Vimos que as células T CD8⁺ apresentaram uma menor expressão do TCR específico a OVA em 10 semanas de tratamento e que apesar dos níveis altos de glicemia, os animais não chegaram a ter diabetes, ou seja, possivelmente não houve infiltração completa das células T CD8⁺. No entanto, o indicativo do início da resposta imune contra o autoantígeno é visto pelas células T CD4⁺ que expressaram maiores níveis do TCR. É crucial a atividade das células T CD4⁺ para o desenvolvimento da doença nos animais RIP-mOVA, uma vez que esses animais não desenvolvem diabetes quando imunizados e injetados com células T CD8⁺ específicas a OVA na ausência da ajuda de células T CD4⁺ específicas. Isso ocorre devido a deleção de células T por meio da tolerância cruzada de células dendríticas¹⁰⁹.

Embora os dados morfológicos e imunohistológicos não resultarem em diferenças significativas, houve uma aparente alteração na citoarquitetura das ilhotas pancreáticas dos animais RIP-mOVA que receberam OVA oral por 10 semanas. Além disso, algumas das ilhotas tenderam a apresentar uma área fracional menor de insulina. Esses dados corroboram com a nossa hipótese do possível início da alteração do sistema imune em relação ao antígeno OVA nesses animais.

CONCLUSÃO

Concluimos que o modelo experimental RIP-mOVA, que expressa ovalbumina (OVA) no pâncreas, pode ser considerado tolerante a OVA exógena administrada oralmente por ingestão voluntária em um período de 3 semanas. O aumento da porcentagem de células T CD4⁺ Foxp3⁺ (regulatórias) e os baixos níveis de glicemia ao ser administrado o antígeno por gavagem indica a propensão de um ambiente tolerogênico, na qual é necessário para o estabelecimento da tolerância oral. No entanto, ao aumentar o tempo da administração oral contínua do autoantígeno, houve uma queda de células T CD4⁺ Foxp3⁺, ou seja, houve uma mudança no fenótipo das Tregs nos linfonodos mesentéricos e no baço. Essa queda ocorreu concomitante com o aumento do TCR V β 5, específico a OVA, e o aumento do TCR V β 6, no qual está relacionado com o aparecimento da diabetes autoimune. Apesar dos animais RIP-mOVA não terem chegado a ter diabetes autoimune, os valores glicêmicos mostraram-se mais altos e mais instáveis quando os animais foram administrados com OVA oral por um período de 10 semanas. Nossos dados nos levam a hipótese de que se continuarmos o estímulo oral do autoantígeno a longo prazo, haverá uma queda mais expressiva de Tregs concomitante com um aumento na glicemia dos animais, chegando ao escore clínico da doença. Portanto, o estímulo autoantigênico persistente a longo prazo afeta a quantidade de células regulatórias no baço e linfonodos mesentéricos dos animais RIP-mOVA. Novos estudos são necessários para uma melhor compreensão e verificação da quebra de tolerância pelo estímulo contínuo de autoantígeno, tais como a ação das Tregs nos sítios efetores. Nosso trabalho auxilia no entendimento dos eventos imunológicos atrás da continuidade do estímulo autoantigênico, utilizado comumente para a indução da tolerância oral. Também auxilia no entendimento do sistema imune do modelo experimental RIP-mOVA frente ao estímulo do autoantígeno. Compreender esses eventos proporciona a elaboração de novas estratégias para o uso da tolerância oral como tratamento alternativo de doenças autoimunes como a diabetes mellitus do tipo 1.

IMPLICAÇÕES

Houve um atraso nos experimentos para realização do presente trabalho devido a pandemia do Covid-19, visto que a Unicamp aderiu a paralisação das atividades durante a pandemia em 2020. No ano seguinte as atividades foram retornando gradualmente, e contando com os cruzamentos dos animais, com a obtenção do n e do genótipo dos grupos experimentais, além de outras adversidades, os experimentos voltados ao tratamento oral em si foram iniciados em 2022. As limitações impediram que tratássemos os animais com OVA oral por períodos maiores para obter resultados mais precisos.

REFERÊNCIAS

1. Tauber, A. I. *Immunity: the evolution of an idea*. (Oxford University Press, 2017).
2. Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. & Baccala, R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat. Immunol.* **18**, 716–724 (2017).
3. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B. L. Autoimmune disease: Why and where it occurs. *Nat. Med.* **7**, 899–905 (2001).
4. Park, H., Bulua Bourla, A., Kastner, D. L., Colbert, R. A. & Siegel, R. M. diseases. *Nat Rev Immunol.* **12**, 570–580 (2014).
5. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
6. Kaur, B. P. & Secord, E. Innate Immunity. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **41**, 535–541 (2021).
7. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1262 p. *Imunidade celular e molecular. Immunol. Cel. e Mol.* **1260** (2015).
8. Joncker, N. T. & Raulet, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Bone* **224**, 85–97 (2008).
9. Ljunggren, H.-G. & Karre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 1225–1225 (1990).
10. Cruvinel, W. de M. *et al.* Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.* **50**, 434–461 (2010).
11. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. **352**, 1–23 (2016).
12. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (80-.)*. **284**, 1313–1318 (1999).
13. Kumar, B. V., Connors, T. J. & Farber, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **48**, 202–213 (2018).
14. Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. Toward a layered immune system. *Cell* **59**, 953–954 (1989).

15. Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. The layered development of mouse B and T Cells. *Immunol. Rev.* 1–10 (2022) doi:10.1111/imr.13181.
16. Júnior, D. M. *et al.* Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev. Bras. Reum.* **50**, (2010).
17. Mousset, C. M. *et al.* Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytom. Part A* **95**, 647–654 (2019).
18. Rodríguez-Caparrós, A. *et al.* Regulation of T-cell receptor gene expression by three-dimensional locus conformation and enhancer function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23 (2020).
19. Skapenko, A., Leipe, J., E Lipsky, P. & Schulze-Koops, H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **7**, (2005).
20. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
21. Levelt, C. N., Carsetti, R. & Eichmann, K. Regulation of Thymocyte Development through CD3. II. Expression of T Cell Receptor β CD3e and Maturation to the CD4+8+ Stage Are Highly Correlated in Individual Thymocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 1867–1875 (1993).
22. Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 126–134 (2001).
23. Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C. & Mathis, D. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science (80-.).* **348(6234)**, 589–594 (2015).
24. Treanor, B. B-cell receptor: From resting state to activate. *Immunology* **136**, 21–27 (2012).
25. Zlotoff, D. A. & Bhandoola, A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1217**, 122–138 (2011).
26. Bhattacharyya, N. D. & Feng, C. G. Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. *Front. Immunol.* **11**, 1–14 (2020).
27. Geginat, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin. Immunol.* **25**, 252–262 (2013).
28. Corse, E., Gottschalk, R. A. & Allison, J. P. Strength of TCR–Peptide/MHC Interactions

- and In Vivo T Cell Responses. *J. Immunol.* **186**, 5039–5045 (2011).
29. Zhu, X. & Zhu, J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–26 (2020).
 30. Gurram, R. K. & Zhu, J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 225–235 (2019).
 31. Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 535–544 (2017).
 32. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
 33. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
 34. Preglej, T. & Ellmeier, W. CD4+ Cytotoxic T cells – Phenotype, Function and Transcriptional Networks Controlling Their Differentiation Pathways. *Immunol. Lett.* **247**, 27–42 (2022).
 35. Juno, J. A. *et al.* Cytotoxic CD4 T cells-friend or foe during viral infection? *Front. Immunol.* **8**, 1–16 (2017).
 36. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 137–161 (2013).
 37. Weiner, H. L. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection* vol. 3 947–954 (2001).
 38. Zhang, X. M., Liu, C. Y., Shao, Z. H. & Guo, L. S. Advances in the role of helper T cells in autoimmune diseases. *Chin. Med. J. (Engl.)* **133**, 968–974 (2020).
 39. Marcuzzi, A. *et al.* Autoinflammatory diseases and cytokine storms-imbances of innate and adaptative immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 40. Amaya-Urbe, L., Rojas, M., Azizi, G., Anaya, J. M. & Gershwin, M. E. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* **99**, 52–72 (2019).
 41. Fridkis-Hareli, M. Immunogenetic mechanisms for the coexistence of organ-specific and systemic autoimmune diseases. *J. Autoimmune Dis.* **5**, 1–7 (2008).
 42. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 531–562 (2004).
 43. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the

- thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
44. Luciana L. Molinero*, Michelle L. Miller*, César Evaristo*, and M.-L. A. TCR Stimuli Prevent iTreg Differentiation in an NF- κ B- Dependent Manner. *J Immunol* **186**, 4609–4617 (2013).
 45. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**, 345–352 (2005).
 46. Tang, Q. & Bluestone, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239–244 (2008).
 47. Ben-skowronek, I. Ipex syndrome: Genetics and treatment options. *Genes (Basel)*. **12**, 1–13 (2021).
 48. Geginat, J. *et al.* Eomesodermin-expressing type 1 regulatory (EOMES+Tr1)-like T cells: Basic biology and role in immune-mediated diseases. *Eur. J. Immunol.* **53**, 1–10 (2023).
 49. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (80-.).* **332**, 600–603 (2011).
 50. Barnes, M. J. *et al.* CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol.* **6**, 324–334 (2013).
 51. Read, S. *et al.* Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ Regulatory T Cells Abrogates Their Function In Vivo. *J. Immunol.* **177**, 4376–4383 (2006).
 52. Bruserud, Ø., Oftedal, B. E., Wolff, A. B. & Husebye, E. S. AIRE-mutations and autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* **43**, 8–15 (2016).
 53. Weiner, H. L. *et al.* Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 809–837 (1994).
 54. Satitsuksanoa, P., Jansen, K., Głobińska, A., van de Veen, W. & Akdis, M. Regulatory immune mechanisms in tolerance to food allergy. *Front. Immunol.* **9**, 1–9 (2018).
 55. Wells, H. G. & Osborne, T. B. The biological reactions of the vegetable proteins i. anaphylaxis. *J. Infect. Dis.* **8**, 66–124 (1911).
 56. Faria, A. M. C. & Weiner, H. L. Oral tolerance: Mechanisms and therapeutic applications. *Adv. Immunol.* **73**, 153–264 (1999).
 57. Billingham, R., Brent, L. & Medawar, P. © 1953 Nature Publishing Group. *Nature* **172**,

- 603–606 (1953).
58. Cohen, I. R. & Young, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* **12**, 105–110 (1991).
 59. Modigliani, Y. *et al.* Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1807–1815 (1996).
 60. Bueno, V. & Pacheco-Silva, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **45**, 79–85 (1999).
 61. Abrantes, F. F. *et al.* Immunosuppressors and immunomodulators in Neurology - Part I: A guide for management of patients under immunotherapy. *Arq. Neuropsiquiatr.* **79**, 1012–1025 (2021).
 62. Pinheiro-Rosa, N. *et al.* Oral tolerance as antigen-specific immunotherapy. *Immunother. Adv.* **1**, 1–21 (2021).
 63. Faria, A. M. C. & Weiner, H. L. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* **206**, 232–259 (2005).
 64. Rezende, R. M. & Weiner, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin. Immunol.* **30**, 3–11 (2017).
 65. Husby, S., Mestecky, J., Moldoveanu, Z. & Elson, C. O. Oral tolerance in humans: T cell but not B cell tolerance to a soluble protein antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371**, 1225–1228 (1995).
 66. Peron, J. P. S., Ligeiro de Oliveira, A. P. & Rizzo, L. V. It takes guts for tolerance: The phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. *Autoimmun. Rev.* **9**, 1–4 (2009).
 67. Rezende, R. M. & Weiner, H. L. Oral tolerance: an updated review. *Immunol. Lett.* **245**, 29–37 (2022).
 68. MacPherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* **1**, 11–22 (2008).
 69. Donaldson, D. S., Else, K. J. & Mabbott, N. A. The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. *J. Virol.* **89**, 9532–9547 (2015).
 70. Ohno, H. Intestinal M cells. *J. Biochem.* **159**, 151–160 (2015).
 71. Corr, S. C., Gahan, C. C. G. M. & Hill, C. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 2–

- 12 (2008).
72. Martin, C. R. & Walker, W. A. *Innate and mucosal immunity in the developing gastrointestinal tract: Relationship to early and later disease. Avery's Diseases of the Newborn* (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-1-4377-0134-0.10070-8.
 73. Kraus, T. A. *et al.* Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops. *J. Clin. Invest.* **115**, 2234–2243 (2005).
 74. Spahn, T. W. *et al.* Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1278–1287 (2001).
 75. Houston, S. A. *et al.* The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol.* **9**, 468–478 (2016).
 76. Esterházy, D. *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature* **569**, 126–130 (2019).
 77. Garside, P., Steel, M., Liew, F. Y. & Mowat, A. M. CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int. Immunol.* **7**, 501–504 (1995).
 78. Chen, Y., Inobe, J. & Weiner, H. L. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J. Immunol.* **155**, 910–916 (1995).
 79. Smith, K. M., McAskill, F. & Garside, P. Orally Tolerized T Cells Are Only Able to Enter B Cell Follicles Following Challenge with Antigen in Adjuvant, but They Remain Unable to Provide B Cell Help. *J. Immunol.* **168**, 4318–4325 (2002).
 80. Tordesillas, L. & Berin, M. C. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **55**, 107–117 (2018).
 81. Faria, A. M. C. *et al.* Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **31**, 35–48 (1998).
 82. Fowler, E. & Weiner, H. L. Oral tolerance: Elucidation of mechanisms and application to treatment of autoimmune diseases. *Biopolymers* **43**, 323–335 (1997).
 83. Charlton, B., Auchincloss, H. & Fathman, C. G. Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 707–734 (1994).
 84. Kagnoff, M. F. Mucosal immunology: New frontiers. *Immunol. Today* **17**, 57–59 (1996).
 85. Wang, X. *et al.* Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Adv.*

- Drug Deliv. Rev.* **65**, 759–773 (2013).
86. Weiner, H. L. Current issues in the treatment of human diseases by mucosal tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1029**, 211–224 (2004).
 87. Miyagawa, F., Gutermuth, J., Zhang, H. & Katz, S. The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance Fumi. *J Autoimmun* **35**, 192–198 (2010).
 88. Kurts, C. *et al.* CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* **186**, 2057–2062 (1997).
 89. Koehli, S., Naeher, D., Galati-Fournier, V., Zehn, D. & Palmer, E. Optimal T-cell receptor affinity for inducing autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17248–17253 (2014).
 90. Smith, J. A. *et al.* Aire mediates tolerance to insulin through thymic trimming of high-affinity T cell clones. *PNAS Immunol. Inflamm.* **120**, 2017 (2024).
 91. Zhang, Z. J., Davidson, L., Eisenbarth, G. & Weiner, H. L. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10252–10256 (1991).
 92. Hancock, W. W., Khoury, S. J., Carpenter, C. B. & Sayegh, M. H. Differential Effects of Oral Versus Intrathymic Administration of Polymorphic Major Histocompatibility Complex Class II Peptides on Mononuclear and Endothelial Cell Activation and Cytokine Expression during a Delayed-Type Hypersensitivity Response. *Am. J. Pathol.* **144**, 1149–1158 (1994).
 93. Blanas, E. & Heath, W. R. Oral administration of antigen can lead to the onset of autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.* **18**, 217–228 (1999).
 94. Blanas, E., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. A. P. & Heath, W. R. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science (80-.).* **274**, 1707–1709 (1996).
 95. Chen, D., Thayer, T. C., Wen, L., Wong, F. S. & Haven, N. (NOD) Mouse. 87–92 (2021) doi:10.1007/978-1-0716-0385-7.
 96. Ryan, G. A. *et al.* B1 Cells Promote Pancreas Infiltration by Autoreactive T Cells. *J. Immunol.* **185**, 2800–2807 (2010).

97. De La Garza-Rodea, A. S., Knaän-Shanzer, S., Den Hartigh, J. D., Verhaegen, A. P. L. & Van Bakkum, D. W. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **49**, 40–44 (2010).
98. Kurts, C. *et al.* CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12703–12707 (1999).
99. Guo, Q. *et al.* Reduced volume of diabetic pancreatic islets in rodents detected by synchrotron X-ray phase-contrast microtomography and deep learning network. *Heliyon* **9**, (2023).
100. Kurts, C., Miller, J. F. A. P., Subramaniam, R. M., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* **188**, 409–414 (1998).
101. Macpherson, A. J. & Smith, K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.* **203**, 497–500 (2006).
102. Chen, Y., Ma, Y. & Chen, Y. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology* **105**, 171–180 (2002).
103. Fowler, S. & Powrie, F. CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2997–3006 (2002).
104. Dillon, S. R., Jameson, S. C. & Fink, P. J. V beta 5+ T cell receptors skew toward OVA+H-2Kb recognition. *J. Immunol.* **152**, 1790–1801 (1994).
105. Ye, Z. *et al.* Active CD4+ helper T cells directly stimulate CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in wild-type and MHC II gene knockout C57BL/6 mice and transgenic RIP-mOVA mice expressing islet b-cell ovalbumin antigen leading to diabetes. *Autoimmunity* **41**, 501–511 (2008).
106. Sharma, R., Chiao-Ying Ju, A., Kung, J. T. & Man Fu, S. Rapid and Selective Expansion of Nonclonotypic T Cells in Regulatory T Cell-Deficient, Foreign Antigen-Specific TCR-Transgenic Scurfy Mice: Antigen-Dependent Expansion and TCR Analysis. *J Immunol* **23**, 6934–6941 (2009).
107. Marrero, I., Hamm, D. E. & Davies, J. D. High-Throughput Sequencing of Islet-Infiltrating Memory CD4+ T Cells Reveals a Similar Pattern of TCR V β Usage in

- Prediabetic and Diabetic NOD Mice. *PLoS One* **8**, 1–16 (2013).
108. Nozawa, H. *et al.* Selective expansion of T cell receptor (TCR) V beta 6 in tonsillar and peripheral blood T cells and its induction by in vitro stimulation with *Haemophilus parainfluenzae* in patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 25–33 (2008).
109. Williams, E. E. TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 183–183 (2005).

ANEXOS

Anexo I



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Análise de células T CD4+ autoagressivas pela indução de diabetes autoimune via administração oral de autoantígeno**, registrada com o nº **5606-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias e Ana Cristina Medina Guillén**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) 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**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/09/2020**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	19/10/2020 a 19/10/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/09/2020 a 19/10/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6-Tg(Ins2- TFRC/OVA)296Wehi /WehiJ
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.Cg-Tg(Tcra Tcrb)425Cbn/J
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / C57BL/6-Tg(Ins2- TFRC/OVA)296Wehi /WehiJ X B6.Cg-Tg
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Origem:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **21 de outubro de 2020**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

CERTIFICADO CEUA nº 10/2020

Documento assinado eletronicamente por **Wagner Jose Favaro, PROFESSOR DOUTOR I**, em 22/10/2020, às 15:41 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 22/10/2020, às 14:39 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
E40229E7 AA8545C3 B4F865F3 FF07B485

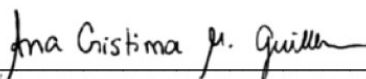


Anexo II

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estado da tolerância pela administração oral contínua de autoantígeno na diabetes autoimune**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 29 de Julho de 2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Ana Cristina Medina Guillén**
RG n.º 42623204-5

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Alessandro dos Santos Farias**
RG n.º 35501186-4