

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas

Débora Moreira Alvarenga

***Lactococcus lactis* como terapia
alternativa na condição alérgica induzida
pela ingestão aguda de etanol**

Belo Horizonte

2012

Débora Moreira Alvarenga

***Lactococcus lactis* como terapia
alternativa na condição alérgica induzida
pela ingestão aguda de etanol**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof^a Dr.^a Denise Carmona Cara Machado

Departamento de Morfologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Prof^a Dr.^a Mariléia Chaves Andrade

Universidade Estadual de Montes Claros

Belo Horizonte

2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro do CNPq e FAPEMIG.

O caminho da água também é cheio de pedras...e o rio não para...

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, ‘planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro” Jr 29:11

Dedico este trabalho a minha amada e querida mãe, de quem sinto imensa saudade todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelos seus planos infalíveis e maravilhosos em minha vida. Por ter me concedido saúde, força e conhecimento para que este trabalho fosse concretizado. Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Reginaldo e Tereza (*in memoriam*), por todo amor e apoio incondicional que culminou na realização de mais esta etapa da minha vida. Papai, obrigada pelo seu incentivo, por sempre torcer por mim e não poupar esforços para oferecer sempre o melhor para meu futuro! Mamãe, devo tudo o que sou a você, obrigada por ter aberto mão da sua vida para que eu pudesse viver a minha, você foi um exemplo de cuidado, carinho e sacrifício. Hoje estou aqui por vocês e por causa de vocês!

A Fabíola, irmã querida, pelos momentos agradáveis que tornaram todas as coisas mais fáceis, por ter feito do ambiente familiar um lugar seguro e confortável. Obrigada por seu interesse e cuidado constante em minha vida!

A Dra. Denise Carmona Cara, orientadora deste projeto, por todos estes anos agradáveis de convivência. Obrigada pela confiança diária em meu trabalho, por sua incrível flexibilidade e paciência! Sua orientação foi preciosa e indispensável neste trabalho. Esta caminhada não poderia ter sido concluída sem o seu apoio, sou muito grata a você pelo meu crescimento pessoal e profissional.

A Mariléia Chaves Andrade, co-orientadora deste trabalho, que em todos os momentos me ensinou com prazer e entusiasmo parte do que sei, e com incansável dedicação esteve sempre presente em meus momentos de indecisão e dúvida. Obrigada por todas as conversas científicas e pessoais, por suas correções incríveis e pela pessoa que você é!

Ao Dr. Gustavo Batista de Menezes, por todo conhecimento compartilhado e pela amizade construída durante estes anos. Tenho em você um grande exemplo de profissionalismo. Obrigada por sempre ter acreditado em mim!

A xuzinha Denise Perez, co-autora deste trabalho, por ter sido muito mais do que uma amiga, pelas horas agradáveis que passamos juntas, pela ajuda mútua, conselhos e sorrisos, pelo afeto e carinho que renovaram minhas energias. Mais do que isso, quero principalmente agradecer pelo simples fato de você existir e tornar minha vida especialmente feliz.

Aos amigos e professores do Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, a vocês o meu agradecimento e admiração por tudo o que vocês sabem e me fizeram saber. Obrigada a todos pela amizade, companhia e por fazerem do ambiente de trabalho um local tão agradável, em especial a Rafaela, Sylvinha, Albená, Priscila, Alesandra, Bárbara e Willian.

Aos amigos queridos que conquistei ao longo destes anos de ICB, Luana, Patrícia, Rodolfo, Andrei, Maria Noviello e Luana Dourado. Obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntos, pelos almoços, conversas, discussões científicas e muita diversão!

Aos professores Ana Maria Caetano e Anderson Miyoshi, por terem aberto as portas de seus laboratórios com tanta prontidão e confiança. Obrigada pela excelente colaboração e disponibilidade, nada disso seria possível sem este auxílio.

Aos alunos da Imunobiologia, por toda atenção e ajuda nas dúvidas e protocolos, especialmente a Ana Cris, Rafael Rezende, Mauro e Santiago, obrigada pela amizade e por cederem grande parte do conhecimento e tempo de vocês.

Aos alunos, professores e funcionários da UNIMONTES e Fiocruz, pela ajuda técnica e por terem me recebido com todo carinho em seus laboratórios.

Ao Alexandre Lima, o melhor amigo e companheiro que eu poderia ter! Obrigada pelas nossas conversas, por sua presença, amor e cumplicidade. Agradeço por ter me dado a mão e caminhado comigo estes anos, por sempre torcer por mim e desejar o meu melhor. Tudo se tornou mais fácil com você ao meu lado!

As irmãs de alma e coração Tati, Fabi e Ana Luíza por suas valiosas e sábias lições de esperança. Vocês são parte da minha vida, obrigada pelas palavras, pelo silêncio, pelo apoio e por serem capazes de compreender de uma forma ímpar a realização desta conquista.

A Comunidade Horizonte, minha eterna gratidão por fazerem parte de mim e por terem mudado a minha vida de forma tão intensa e única. Vocês são a minha segunda família!

A FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado, a qual foi de grande auxílio durante a jornada deste trabalho.

A todos aos quais me encontro ligada, pela ajuda e, sobretudo, por terem dado ânimo para continuar, a vocês que direta ou indiretamente fizeram parte deste processo, o meu reconhecimento e carinho eterno.

RESUMO

A ingestão de etanol (EtOH) induz aumento dos níveis de IL-4 gástrica e IgE sérica total, sinais clássicos de reação alérgica de tipo I, comprometendo a geração de tolerância oral à novas proteínas, além de outras alterações patológicas. Muitas vezes a estratégia terapêutica se baseia em intervenções medicamentosas voltadas para o controle da doença. Por uma série de fatores, o uso de terapias alternativas capazes de prevenir os efeitos do consumo de álcool sobre o sistema imune, no nível local e sistêmico, surge como candidato ao tratamento do quadro patológico. Uma alternativa inovadora, ainda em fase experimental, é a administração oral de microrganismos produtores de imunomoduladores, como *Lactococcus lactis*-Hsp65. Nesse sentido, nosso objetivo foi estudar os efeitos do pré-tratamento oral com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, como estratégia profilática para modulação das alterações inflamatórias desencadeadas pela ingestão aguda de etanol. Camundongos fêmeas C57BL/6 (n = 6/grupo) receberam por via oral *ad libitum* um pré-tratamento contendo culturas de Hsp65 LL, ou WT LL (*L. lactis* selvagem), ou apenas o meio de cultura (sem tratamento - ST) durante 4 dias consecutivos. Após 7 dias, EtOH (50%) foi administrado por via intragástrica. Após 24 horas, os animais foram sacrificados e realizadas várias análises, seguindo os objetivos. Os grupos controles receberam água pela mesma via. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, contribuiu para uma modulação da inflamação alérgica nos animais como observado pela redução dos níveis de IL-4 na mucosa gástrica e intestinal, além de uma redução significativa dos níveis séricos de IgE total dos animais tratados com EtOH. Além disso, observou-se um impacto local e sistêmico (baço), sobre o número de células apresentadoras de antígenos ativadas, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B e um aumento do número de linfócitos T com fenótipo regulador. Interessantemente, observou-se uma tendência a uma manutenção do fenômeno da tolerância oral nos animais tratados com EtOH que entraram em contato prévio com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, pela via oral. Desta forma, concluímos que o tratamento com *L. lactis* WT ou produtor de Hsp65 foi capaz de reduzir as principais alterações alérgicas geradas pela ingestão de EtOH, e que um possível mecanismo envolva o complexo contexto de ativação e geração de linfócitos T reguladores na mucosa gastrointestinal, mantendo a homeostase imunológica local e sistêmica.

Palavras chaves: Etanol, IgE, IL-4, *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65, tolerância oral

ABSTRACT

EtOH intake induces increased levels of IL-4 gastric and total serum IgE, classic signs of type I allergic reaction, affecting the formation of oral tolerance to new proteins and other pathological changes. Ordinarily, therapeutic strategy is based on pharmacological intervention to control the disease condition. For a number of factors, the use of alternative therapies capable of preventing the effects of alcohol consumption at the local and systemic level emerge as strong candidates in the treatment of the pathological condition. An innovative alternative, still experimental, is the oral administration of microorganisms that produce immunomodulators such as *Lactococcus lactis*-Hsp65. In this case, our goal was to study the effects of pretreatment with oral Hsp65-producing *L. lactis*, or not, as a prophylactic strategy for modulation of inflammatory disorders triggered by acute ingestion of ethanol. Female mice C57BL / 6 (n = 6/group) were orally *ad libitum* pre-treated with cultures containing Hsp65 LL or WT LL (wild type *L. lactis*) or medium only (no treatment - ST) for 4 consecutive days. After 7 days, EtOH (50%) was administered intragastrically. After 24 hours the animals were sacrificed and various analyzes performed, according to experiment objectives. Control groups received water the same way. The ingestion prior Hsp65-producing *L. lactis*, or not, has contributed to a variation of the allergic inflammation in animals as shown by reduced levels of IL-4 in gastric and intestinal mucosa, as well as a significant reduction in total serum IgE levels in animals treated with EtOH. Furthermore, there is a local and systemic (spleen) impact on the number of activated antigen presenting cells such as macrophages, dendritic cells and B lymphocytes and an increased number of T cells with a regulator phenotype. Interestingly, there was a tendency to maintain the phenomenon of oral tolerance in animals treated with EtOH upon coming into contact with prior Hsp65-producing *L. lactis*, or not, orally. Thus, we conclude that treatment with *L. lactis* WT or producer Hsp65 was able to reduce the major allergic changes generated by the ingestion of EtOH, and that one possible mechanism involves the complex context of activation and generation of regulatory T lymphocytes in the gastrointestinal mucosa, keeping the local and systemic immune homeostasis.

Key words: Ethanol, IgE, IL-4, Hsp65-producing *Lactococcus lactis*, oral tolerance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação dos vetores de expressão pXylT-SEC-hsp65.....	38
Figura 2- Estratégia de análise de macrófagos.....	55
Figura 3- Estratégia de análise de células dendríticas.....	56
Figura 4- Estratégia de análise de linfócitos B.....	57
Figura 5- Estratégia de análise de linfócitos T reguladores CD4 ⁺ CD45RB ^{low} CD25 ⁺ ...	59
Figura 6- Estratégia de análise de linfócitos T reguladores CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	59
Figura 7- Avaliação do peso corpóreo semanal.....	61
Figura 8- Avaliação do peso e tamanho gástrico.....	62
Figura 9- Avaliação macroscópica gástrica.....	63
Figura 10- Avaliação histopatológica gástrica.....	65
Figura 11- Avaliação morfológica do jejuno proximal.....	66
Figura 12- Avaliação histopatológica e bioquímica hepática.....	68
Figura 13- Avaliação histológica e quantitativa do muco produzido pelas células mucóides gástricas.....	70
Figura 14- Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal.....	71
Figura 15- Contagem total de mastócitos na submucosa gástrica.....	72
Figura 16- Avaliação do muco e IgAs gástrica.....	73
Figura 17- Avaliação de IgAs no intestino delgado.....	74
Figura 18- Avaliação dos níveis séricos de IgE total.....	75
Figura 19- Avaliação <i>in situ</i> da produção de citocinas gástricas.....	77
Figura 20- Avaliação <i>in situ</i> da produção de citocinas do jejuno proximal.....	78
Figura 21- Avaliação de macrófagos no baço e linfonodo mesentérico.....	80
Figura 22- Avaliação de células dendríticas no baço e linfonodo mesentérico.....	82
Figura 23- Avaliação de linfócitos B no baço e linfonodo mesentérico.....	84

Figura 24- Avaliação de linfócitos T no baço e linfonodo mesentérico.....	86
Figura 25- Avaliação dos níveis séricos de IgE anti-OVA.....	88
Figura 26: Resumo dos efeitos locais e sistêmico gerados pela administração prévia de <i>L. lactis</i> selvagem e secretor da proteína Hsp65 no modelo de ingestão aguda de EtOH	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Imuno-moduladores, antígenos e proteínas terapêuticas expressas em <i>L. lactis</i> no tratamento de desordens gastrointestinais.....	31
Tabela 2- Linhagens bacterianas.....	37
Tabela 3- Grupos experimentais – Etapas I, II e III.....	40
Tabela 4- Anticorpos utilizados.....	50
Tabela 5- Grupos experimentais – Etapa IV.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μg – Micrograma
- μL – Microlitro
- ADH – Álcool desidrogenase
- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- $\text{Al}(\text{OH})_3$ – Hidróxido de alumínio
- ALT – Alanina aminotransferase
- APC – Célula apresentadora de antígeno
- BAL – Bactéria do ácido láctico
- BSA – Albumina bovina sérica
- cAMP – Adenosina monofosfato cíclica
- CEBIO – Centro de Bioterismo
- CETEA – Comitê de ética em experimentação animal
- COX - Ciclooxigenase
- CTX – Toxina colérica
- Cy5 – *Cy-chrome*
- DAB – Diaminobenzidina
- DC – Célula dendrítica
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DSS – Dextran sulfato de sódio
- DTH – Hipersensibilidade do tipo tardio
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- EPM – Erro padrão médio
- EtOH – Etanol
- FACS – *Fluorescence activated cell sorting*
- FITC – *Fluorescein isothiocyanate* – Isotiocianato de fluoresceína
- FSC – *Forward Scatter*
- g* – *g-force* – força gravitacional
- GALT – Tecido linfóide associado ao trato gastro-intestinal
- GL – Gay Lussac
- GRAS – *Generally Recognized As Safe*
- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HCL – Ácido clorídrico
HE – Hematoxilina-eosina
Hsp – *Heat shock protein* – Proteína do choque térmico
Hsp65 LL – Linhagem recombinante secretora de Hsp65 de *L. lactis*
i.g. – Intragástrica
IBD – Doenças inflamatórias intestinas
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ - *Interferon gama*
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
JP – Jejunio proximal
Kg – Quilogramas
KIU – *Kallicrein inactivator units*
L – Litros
L. lactis – *Lactococcus lactis*
LAP – *Latent Associated Protein* – Peptídeo associado à latência
LDH – Lacto desidrogenase
LM – Linfonodo mesentérico
LPS – Lipopolisacarídeos
MALT – Tecido linfóide associado à mucosa
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1
mg – Miligramas
MHC – Moléculas de histocompatibilidade
mL - Mililitro
mM – Milimolar
MØ – Macrófago
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
NaN₃ – Azida de sódio
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
ng – Nanograma
NK – *Natural killer*
nm – Nanômetros
NSAIDs – Anti-inflamatórios não esteroidais

OD – Densidade óptica
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – Ortofenileno-diamino
OVA – Ovalbumina
PAS – *Periodic acid-Schiff*
PE – *Phycoerythrin* – Ficoeritrina
PG - Prostaglandina
pH – Potencial hidrogeniônico
PHA – Fitohemaglutinina
PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
ROS – Espécie reativa de oxigênio
s.c. – Sub-cutânea
SSC – *Side Scatter*
Stp-APC – *Streptavidin-allophycocyanin* – Streptavidina- alofococianina
TA – Temperatura ambiente
TCR – Receptores de células T
TGF- β – *Transforming growth factor beta* – Fator transformador de crescimento beta
TGI – Trato gastrointestinal
Th – Célula T helper
TLR – Receptores do tipo Toll
TNF- α – Fator-alfa de necrose tumoral
Treg – Célula T reguladora
U.A. – Unidade arbitrária
U/L – Unidade por litro
UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais
WT LL – Linhagem selvagem de *L. lactis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. <i>Mucosa gastrointestinal – homeostase e desordens</i>	20
1.2. <i>Álcool – consumo e suas consequências fisiológicas</i>	21
1.3. <i>Os efeitos inflamatórios do álcool no sistema imune</i>	23
1.4. <i>Terapias alternativas – Bactérias do ácido láctico</i>	28
1.5. <i>Aspectos fisiológicos e terapêuticos das proteínas do choque térmico (Heat Shock Protein, HSP)</i>	31
2. OBJETIVOS	34
Objetivo geral	34
Objetivos específicos	34
<i>Etapa I- Avaliações macroscópicas</i>	34
<i>Etapa II- Avaliações morfo-funcionais</i>	34
<i>Etapa III- Avaliações imunológicas</i>	35
<i>Etapa IV- Avaliação funcional</i>	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. <i>Animais experimentais</i>	36
3.2. <i>Modelo de ingestão aguda de etanol (EtOH)</i>	36
3.3. <i>Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico</i>	36
3.4. <i>Indução da expressão gênica em L. lactis</i>	38
3.5. <i>Desenho experimental das Etapas I, II e III</i>	39
3.6. <i>Metodologias usadas para análises experimentais das Etapas I, II, III</i>	40
3.6.1. Peso corpóreo	40
3.6.2. Obtenção do soro e eutanásia	40
3.6.4. Confeção de lâminas histológicas	41
3.6.5. Avaliação macroscópica	42
3.6.6. Avaliação histopatológica gástrica, intestinal e hepática	42
3.6.8. Dosagem de Alanina aminotransferase no soro	43
3.6.9. Avaliação da produção de muco	43
3.6.10. Avaliação do número de mastócitos	44
3.6.11. Coleta do muco no trato gastrointestinal	44
3.6.12. Dosagem de IgA secretória no muco	44
3.6.13. Dosagem de IgE total no soro	45
3.6.14. Preparação de extratos de tecidos	46
3.6.15. Avaliação da produção in situ de citocinas	47
3.6.16. Imunofenotipagem celular, no contexto ex-vivo, pela citometria de fluxo	48

3.7. Desenho experimental da Etapa IV.....	51
3.8. Metodologias usadas para análises experimentais da Etapa IV.....	52
3.8.1. Protocolo de indução de tolerância oral à ovalbumina (OVA)	52
3.8.2. Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no soro	52
3.9. Análise Estatística	53
Estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo.....	55
1- Identificação fenotípica de macrófagos	55
2- Identificação fenotípica de células dendríticas.....	56
3- Identificação fenotípica de linfócitos B.....	57
4- Identificação fenotípica de linfócitos T reguladores.....	58
4. RESULTADOS	60
ETAPA I – Avaliações Macroscópicas.....	60
4.1. A ingestão de EtOH não interferiu no peso corpóreo dos animais.....	60
4.2. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, não impediu a gastromegalia induzida pelo consumo agudo de EtOH	62
4.3. O consumo de EtOH não alterou os parâmetros macroscópicos da mucosa gástrica .	63
ETAPA II – Avaliações morfo-funcionais	64
4.4. A ingestão aguda de EtOH não alterou os parâmetros morfológicos da mucosa gástrica	64
4.5. A morfologia do Jejuno proximal permaneceu inalterada frente à ingestão aguda de EtOH.....	66
4.6. O consumo agudo de EtOH provocou uma degeneração hepática reversível.....	67
4.7. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 contribuiu para a redução da produção de muco na mucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.....	69
4.8. O consumo de EtOH não afetou a produção de muco pelas células caliciformes intestinais.....	71
4.9. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> selvagem contribuiu com a redução do número de mastócitos na submucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.....	72
ETAPA III – Avaliações Imunológicas	73
4.10. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, impediu o aumento na secreção de IgA no muco gástrico, observada nos animais tratados com EtOH	73
4.11. O pré-tratamento oral com <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, contribuiu para potencializar a produção de IgA secretória no muco intestinal dos animais tratados com EtOH.....	74
4.12. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, contribui para uma redução significativa dos níveis séricos de IgE total dos animais tratados com EtOH.....	75
4.13. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, contribuiu com uma modulação dos níveis de IL-4 na mucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.....	76

4.14. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, contribuiu para uma modulação dos níveis de IL-4 e IL-10 no Jejuno proximal dos animais tratados com EtOH	78
4.15. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de macrófagos ativados no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.....	79
4.16. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de células dendríticas ativadas no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.....	81
4.17. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de linfócitos B ativados no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.....	83
4.18. A ingestão prévia de <i>L. lactis</i> selvagem contribuiu para o aumento do número de linfócitos T com fenótipo regulador no baço e linfonodo mesentérico dos animais tratados com EtOH.....	85
ETAPA IV – Avaliação Funcional	87
4.19. A indução da tolerância oral está afetada em animais tratados com EtOH e há uma tendência a uma manutenção desse fenômeno quando esses animais entram em contato prévio com <i>L. lactis</i> , produtor ou não de Hsp65, pela via oral.....	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO.....	107
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
8. ANEXOS.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mucosa gastrointestinal – homeostase e desordens

O trato gastrointestinal (TGI) é continuamente exposto a uma vasta quantidade de antígenos externos, estima-se que a mucosa intestinal no ser humano possua aproximadamente 300m² (MOOG, 1981). Devido a essas características a mucosa do TGI é a maior área de contato com antígenos e aloja um grande e complexo tecido linfóide associado, denominado MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) (BRANDTZAEG, 1998). A maturação e o desenvolvimento tanto do sistema imune como do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT), são influenciados diretamente pela colonização bacteriana e pela dieta (AMARAL, 2006; HAMADA *et al.*, 2002; MACPHERSON & HARRIS, 2004; MENEZES *et al.*, 2003). O contato com estes inúmeros antígenos que entram pela via oral desencadeia uma robusta resposta imune não inflamatória. Assim, a consequência mais comum do contato do tecido linfóide associado à mucosa intestinal com antígenos naturais, como as proteínas da dieta e da microbiota, é a supressão da reatividade inflamatória sistêmica a esses antígenos, fenômeno conhecido como tolerância oral (FARIA & WEINER, 2005; SICHERER, 2002; STROBEL & MOWAT, 1998).

Os eventos imunológicos desencadeados nas superfícies mucosas têm repercussões sistêmicas, sejam eles de natureza fisiológica ou patológica. Algumas das doenças de grande prevalência no mundo são exatamente aquelas envolvendo o TGI. Entre estas, podemos citar as alergias alimentares, doenças inflamatórias crônicas intestinais – especialmente a colite ulcerativa e a doença de Crohn (ECONOMOU & PAPPAS, 2008; GUPTA *et al.*, 2011; KAPPELMAN *et al.*, 2007; MADSEN, 2005).

A mucosa gástrica e intestinal é continuamente exposta a uma grande variedade de substâncias nocivas. O termo “defesa da mucosa” é usado para descrever os diversos fatores e componentes que permitem a mucosa permanecer intacta, apesar de exposições frequentes a substâncias e agentes capazes de provocar reações inflamatórias locais e sistêmicas (WALLACE & GRANGER, 1996).

Desordens gastrointestinais podem ocorrer quando os mecanismos de defesa são quebrados por agentes infecciosos e irritantes, doenças autoimunes, fumo, estresse, uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) e ingestão de álcool (NAITO *et al.*, 2001; WU & CHO, 2004).

Uma grande variedade de estudos tem mostrado que a ingestão de álcool afeta diversos componentes do organismo, gerando importantes repercussões locais e sistêmicas. Tais alterações desencadeadas pelo consumo de etanol podem levar a uma quebra nos mecanismos reguladores e na homeostase do TGI, além de afetar de forma marcante os componentes da imunidade celular e humoral (COOK, 1998; NELSON & KOLLS, 2002; SZABO, 1999).

1.2. Álcool – consumo e suas consequências fisiológicas

O consumo de álcool é um costume extremamente antigo e tem persistido por milhares de anos. De acordo com registros arqueológicos, os primeiros indícios sobre o consumo de bebidas fermentadas pelo ser humano datam de aproximadamente 10.000 a.C. Numerosos relatos históricos revelam que o álcool era considerado uma substância divina, utilizado dentre outras formas, em rituais religiosos e espirituais, o que pode ter contribuído para a manutenção do hábito de beber ao longo do tempo (HANSON, 1995). A princípio o teor alcoólico das bebidas era relativamente baixo, uma vez que dependiam exclusivamente do processo de fermentação. Com o advento do processo de destilação na Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas. Nesta época bebidas destiladas passaram a ser consideradas um remédio para a cura de todas as doenças. Um grande número na oferta desse tipo de bebida foi registrado a partir da Revolução Industrial, o que contribuiu para um maior consumo dessa substância. Como consequência, um número crescente de pessoas passaram a apresentar problemas decorrentes do uso excessivo de álcool (HANSON, 1995). Atualmente, bebidas alcoólicas são amplamente consumidas no mundo inteiro, segundo o relatório de 2011 da Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo *per capita* mundial de bebidas alcoólicas em 2005 foi equivalente a 6,13 litros de álcool puro, consumido por indivíduos entre 15 anos ou mais. No Brasil esta média foi equivalente a 7,5 – 9,99 litros *per capita*. Existem variações quanto aos tipos de bebidas alcoólicas consumidas conforme as diferenças geográficas, aproximadamente 38% do consumo total mundial de álcool é ingerido sob a forma de cerveja, principalmente na região das Américas, incluindo o Brasil (WHO, 2011).

O uso nocivo do álcool caracteriza-se pelo seu consumo excessivo, o que pode gerar prejuízos à saúde e consequências sociais adversas. Os danos causados pelo álcool são considerados graves problemas de saúde mundial, sendo um fator causal de mais de 60 tipos de doenças e injúrias, e resulta em aproximadamente 2,5 milhões de mortes todos os anos.

Seu consumo tem atingido de forma crescente gerações mais jovens em países desenvolvidos. Mundialmente, 320.000 jovens, com idade entre 15-29 anos morrem todos os anos a partir de problemas relacionados com o álcool, representando 9% das mortes nesta faixa etária (WHO, 2011).

Em 2004, quase 4% de todas as mortes no mundo foram atribuídas ao álcool, onde 6,2% foram homens e 1,1% mulheres. Tais valores são maiores do que as taxas de óbitos causadas por AIDS, violência ou tuberculose. A diferença significativa de incidência de mortes entre os sexos é um indicador da variação no consumo entre homens e mulheres, tanto em relação ao volume de álcool ingerido quanto em ocasiões de consumo agudo exagerado (*heavy drinking*) (WHO, 2011).

Mortes, doenças e injúrias causadas pelo consumo de álcool têm impactos socioeconômicos marcantes, como os altos custos médicos arcados pelo governo, além da carga financeira e psicológica exigida da família (WHO, 2011). As maiores doenças e injúrias desencadeadas pelo álcool são: (1) distúrbios neuropsiquiátricos; (2) doenças gastrointestinais; (3) disfunções hepáticas; (4) câncer; (5) injúrias intencionais, como suicídio e violência; (6) injúrias não intencionais, como quedas, envenenamento e acidentes de trânsito; (7) doenças cardiovasculares; (8) Síndrome alcoólica fetal; (9) diabetes mellitus e (10) distúrbios imunológicos e hematopoiéticos (STANDRIDGE *et al.*, 2004; WHO, 2011).

A relação entre ingestão de álcool e seus efeitos positivos e negativos em algumas patologias são bastante discutidos na literatura, e variam de acordo com a dose e intensidade do consumo. Segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (2002) uma dose padrão de bebida alcoólica contém 14 gramas de álcool puro, em doenças cardiovasculares, o consumo leve (menos de 2 doses/dia) a moderado (3 – 4 doses/dia) pode proporcionar um efeito benéfico, com menores riscos de desenvolvimento de doenças coronarianas, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio. Por outro lado, indivíduos que consomem grandes quantidades de álcool de forma crônica estão propensos a desenvolverem hipertensão, cardiomiopatias e arritmias (STANDRIDGE *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos indicam que o consumo moderado de etanol pode proteger contra o desenvolvimento de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (BENGTSSON *et al.*, 2002), além de reduzir significativamente artrite reumatóide em modelo experimental de doença (JONSSON *et al.*, 2007).

A associação entre o risco de desenvolver alguma doença relacionada à exposição ao álcool é multifatorial e depende de variações individuais associadas ao estilo de vida e estado

geral de saúde. Além destes fatores, a dose e o tempo de exposição ao álcool podem modificar seus efeitos no organismo (DIAZ *et al.*, 2002; ROMEO *et al.*, 2007).

1.3. Os efeitos inflamatórios do álcool no sistema imune

Estudos das duas últimas décadas têm mostrado que o consumo de álcool resulta em alterações de componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo (NELSON & KOLLS, 2002). Os efeitos da ingestão aguda ou crônica de álcool variam de forma considerável e dependem da concentração e dose utilizadas. Diversos outros fatores, como estado nutricional, idade e etnia influenciam nestes achados, o que dificulta o estabelecimento dos efeitos gerados pelo álcool de uma forma geral (BODE & BODE, 2003).

Dados de pesquisas revelam que as duas formas de consumo, agudo e crônico, podem interferir na atividade imunológica, levando à perda de linfócitos do timo, baço e linfonodos em modelos experimentais, o que acaba por gerar a atrofia desses órgãos (EWALD, 1989; JERRELLS *et al.*, 1994; PRUETT *et al.*, 1994). Os tipos de células perdidas incluem as células B, células NK, e no timo, as células T em desenvolvimento, conhecidas como tímócitos, resultando na diminuição das respostas imune celular e humoral (COOK, 1998; SZABO, 1999).

Alguns trabalhos têm mostrado que o consumo agudo de etanol aumenta o risco de complicações em pacientes que sofreram traumas ou queimaduras (FAUNCE *et al.*, 1997; GERMANN *et al.*, 1997; MESSINGHAM *et al.*, 2002), enquanto a exposição crônica leva ao aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas e virais, além reduzir a capacidade de eliminar patógenos (COOK, 1998; NELSON & KOLLS, 2002). Tais alterações têm sido fortemente associadas aos efeitos do etanol no funcionamento das células apresentadoras de antígenos ou APCs, que têm seus aspectos fenotípicos e funcionais modificados pela exposição ao álcool, e que podem variar de acordo com a forma de administração (aguda ou crônica). As APCs são componentes especializados do sistema imune inato, que possuem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T, levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de uma resposta imune específica efetiva (DELVES & ROITT, 2000; SAALMULLER, 2006).

O consumo agudo de álcool tem sido associado a efeitos imunossupressores devido ao comprometimento na produção de mediadores inflamatórios. Diversos estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm mostrado que a exposição aguda ao álcool (2h a 24h) afeta o balanço na

produção de citocinas e quimiocinas em macrófagos humanos e/ou murinos, em resposta a uma variedade de compostos microbianos. Tais alterações podem ser verificadas por meio da redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NELSON *et al.*, 1989; SZABO *et al.*, 1995; VERMA *et al.*, 1993), e na produção de quimiocinas, como IL-8 e MCP-1, em resposta a desafios imunes subsequentes (SZABO *et al.*, 1999).

Essas alterações sugerem que a existência de vias comuns na regulação destes produtos podem estar afetadas pela ingestão de álcool. De fato, a ativação do fator nuclear regulatório κ B (NF- κ B), um elemento comum na região promotora destes genes inflamatórios, é inibido pela ingestão aguda de álcool (MANDREKAR *et al.*, 2006; SZABO *et al.*, 1999). Somado a isso, crescentes evidências têm sugerido que alterações na resposta inflamatória pelo uso agudo de etanol envolvem mudanças nos sinais intracelulares mediados por receptores do tipo toll ou TLRs.

TLRs são uma família de receptores que reconhecem diversas estruturas microbianas (ADEREM & ULEVITCH, 2000). Estes receptores são expressos por células do sistema imune inato e são cruciais na iniciação de respostas inflamatórias (TAKEDA *et al.*, 2003). Os eventos de sinais intracelulares mediados por TLRs envolvem a fosforilação de proteínas kinases que regulam diversos programas celulares, essas proteínas conhecidas com MAPKs, incluem as famílias p38, ERK e JNK, além de NF- κ B (KAWAI & AKIRA, 2006; RAMAN *et al.*, 2007). De fato, um trabalho interessante realizado por Goral e Kovacs (2005) mostra que a exposição aguda ao etanol *in vivo* foi capaz de inibir a ativação de vias de sinais intracelulares como p38 e ERK1/2 desencadeada por agonistas de TLR4, TLR2 e TLR9, suprimindo desta forma a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 em macrófagos. Além de regular vias pró-inflamatórias, a exposição aguda ao etanol aumenta a secreção de IL-10 em culturas de monócitos humanos do sangue periférico (MANDREKAR *et al.*, 1996). Estas observações sugerem que o consumo agudo e moderado de álcool possui um efeito duplo, exibindo efeitos anti-inflamatórios, tanto por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias, quanto por meio do aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias em monócitos (GORAL *et al.*, 2008).

Além do impacto sobre a produção de citocinas e quimiocinas e nos sinais intracelulares, o consumo de álcool afeta as populações de linfócitos T. O tratamento agudo com etanol resultou em um aumento na taxa de apoptose de timócitos (EWALD & SHAO, 1993), além disso, foi verificado um número reduzido de linfócitos e diminuição na proliferação celular, sugerindo que linfócitos expostos ao etanol têm capacidade reduzida de

se proliferarem e se diferenciarem em resposta a um desafio antigênico (ROSELLE *et al.*, 1995).

Monócitos e células dendríticas (DCs) intercedem em respostas imunes inatas e adaptativas e são essenciais na ativação de linfócitos T de uma maneira antígeno-dependente (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2001). Um estudo feito com sangue periférico de voluntários saudáveis mostrou uma redução significativa na proliferação de linfócitos T na presença de monócitos e DCs obtidos em diferentes horas após consumo de álcool, quando estimulados com diferentes antígenos. Estes dados sugerem que o consumo agudo de álcool inibe a função acessória celular tanto em monócitos quanto células dendríticas (SZABO *et al.*, 2004). Corroborando estes dados, experimentos *in vitro* demonstraram que moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 estavam reduzidas em DCs quando cultivadas na presença de álcool, contribuindo para uma redução na ativação de linfócitos T (Mandrekar *et al.*, 2004). Outros trabalhos realizados mostram que além de inibir as funções acessórias das APCs, o álcool afeta a capacidade fagocítica destas células. A adição aguda de etanol *in vitro* foi capaz de inibir em monócitos a atividade microbiana e a expressão de receptores Fc γ do tipo II, envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas (MORLAND & MORLAND, 1989; ZUIABLE *et al.*, 1992).

Por outro lado, o consumo crônico (semanas ou anos) de álcool tem mostrado um efeito pró-inflamatório nas APCs tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A maioria dos estudos que relata os efeitos da ingestão de etanol de forma crônica está relacionada à pacientes com doença hepática alcoólica, ou em modelos experimentais que mimetizam tais condições.

Diversos estudos têm demonstrado que a ingestão crônica de álcool está diretamente relacionada a alterações no balanço de citocinas e quimiocinas, levando a um perfil pró-inflamatório. Concentrações elevadas de IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, bem como a redução nos níveis de IL-10, IL-2 e IFN- γ têm sido frequentemente associadas à pacientes com doença hepática alcoólica e/ou em culturas de monócitos tratados cronicamente (AZIZ-SEIBLE *et al.*, 2011; COOK, 1998; Le MOINE *et al.*, 1995; ROMEO *et al.*, 2007; SCHAFER *et al.*, 1995). Fortes evidências têm sugerido que a ativação da cascata pró-inflamatória desencadeada pelo uso crônico de álcool está associada ao aumento da atividade de p38 e ERK 1/2 (CAO *et al.*, 2002; KISHORE *et al.*, 2001, 2002), e na ativação de NF- κ B (SZABO *et al.*, 2007). Esta inflamação é provavelmente iniciada por espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas por células de Kupffer ativadas (macrófagos residentes do fígado) e endotoxinas circulantes, como LPS.

Diversas evidências têm sustentado a hipótese de que o LPS presente em níveis aumentados na corrente sanguínea de alcoolistas e animais tratados cronicamente com álcool, participa da ativação das células de Kupffer (HINES & WHEELER, 2004; THURMAN, 1998). Bactérias presentes no lúmen intestinal são fontes potenciais de LPS (WHEELER *et al.*, 2001). Em condições normais, o LPS não penetra no epitélio intestinal, entretanto, o consumo excessivo de álcool rompe a barreira epitelial, permitindo o aumento da translocação bacteriana do lúmen para a corrente sanguínea (RAO *et al.*, 2004). Uma vez na circulação, os produtos bacterianos, como o LPS, afetam múltiplos sistemas do organismo, incluindo o fígado (FUKUI *et al.*, 1991). Células de Kupffer ativadas por LPS produzem TNF- α , IL-6, IL-1, bem como quimiocinas. Juntas, estas moléculas aumentam a permeabilidade vascular dos sinusóides hepáticos e aumentam o recrutamento de neutrófilos e células linfóides mononucleares para o fígado (HINES & WHEELER, 2004; NAGY, 2003). Corroborando esta hipótese, análises realizadas em pacientes admitidos em unidades intensivas de tratamento, demonstraram uma forte correlação entre alcoolismo e incidência de choque séptico (O'BRIEN JR. *et al.*, 2007).

Além disso, o consumo crônico de etanol pode afetar outras células do sistema imune inato. Trabalhos têm demonstrado prejuízos na geração de precursores de DCs mielóides *in vitro* frente à ingestão crônica de álcool e redução seletiva destas mesmas populações no sangue periférico de pacientes alcoolistas (LASO *et al.*, 2007). Somado a isso, uma deficiência na função fagocítica foi demonstrada em monócitos de pacientes com cirrose alcoólica (SILVAIN *et al.*, 1995), o que sugere que alterações na fagocitose realizada por macrófagos e uma redução na geração de DCs após o consumo crônico de álcool, pode comprometer a atividade microbicida realizada por estas células.

Alterações no sistema imune adquirido estão comumente presentes em pacientes e/ou modelos murinos com doença hepática alcoólica. Apesar da produção anormal de imunoglobulinas circulantes, há uma redução no número de linfócitos T e B. Distúrbios na secreção de IgA, IgG e IgM são normalmente constatadas por meio do aumento em seus níveis, além disso pode ocorrer depósito de IgA em diversos tecidos, gerando outras patologias associadas (COOK, 1998; PARONETTO, 1993).

Desta forma, fica claro que as alterações desencadeadas pelo álcool, seja de forma aguda ou crônica, exercem um considerável impacto fenotípico e funcional nas células do sistema imune, e dependem dentre outros fatores, do tempo e quantidade de consumo, além do teor alcoólico da bebida.

Em trabalho recente do nosso grupo utilizando o modelo de administração intragástrica aguda de etanol (ANDRADE *et al.*, 2006), foi identificado um impacto diferencial do álcool sobre aspectos imunofenotípicos, síntese de citocinas, e capacidade fagocítica de subpopulações de células apresentadoras de antígenos (ANDRADE *et al.*, 2006, 2009). Os efeitos do álcool, nesse modelo, favoreceram o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo alérgica. Em síntese, os efeitos do etanol sobre as populações de macrófagos e células dendríticas parecem ser moduladores da atividade celular, enquanto sobre os linfócitos B, o efeito seria estimulador, destacado por um aumento da capacidade endocítica e da expressão de moléculas co-estimuladoras. Em função desse provável desvio da hierarquia das APCs após a administração oral de etanol, os linfócitos T apresentam-se mais ativados devido a um aumento na expressão de receptores de citocinas mitogênicas, como a IL-2 e IL-4, diminuição da expressão da selectina CD62-L, além da diminuição da expressão da forma latente do TGF-beta expresso na membrana celular (LAP, *Latency Associated Peptide*) (ANDRADE *et al.*, 2009). Além disso, foram observadas alterações locais e sistêmicas como níveis aumentados de IL-4 no estômago e IgE total sérica, aumento na síntese de IL-4 e ausência de IL-10 por esplenócitos. Somado a isto, a ingestão de etanol preveniu a tolerância oral induzida por ovalbumina (OVA) (ANDRADE *et al.*, 2006), um fenômeno fisiológico e T - dependente que ocorre na superfície da mucosa intestinal e que mantém a regulação da reatividade imunológica inflamatória a antígenos da dieta e da microbiota autócrina (FARIA & WEINER, 2006). Esses resultados em conjunto, sugerem que alterações imunológicas induzidas pelo álcool interferem com mecanismos imuno-reguladores em toda a mucosa intestinal, possivelmente, com impactos sistêmicos, levando a um perfil alergênico com consequente perda da susceptibilidade à indução de tolerância oral a uma nova proteína.

Atualmente, os tratamentos para danos gerados pelo álcool se restringem a intervenções psicoterapêuticas e psicofarmacológicas. Uma vez que o consumo de álcool é capaz de provocar uma variedade de doenças associadas, desde distúrbios imunológicos a câncer, muitas vezes o tratamento destes pacientes se baseia em intervenções medicamentosas direcionadas ao quadro patológico presente e no uso específico de medicamentos voltados para o controle da dependência de álcool. Algumas drogas aversivas são amplamente utilizadas, entretanto oferecem inúmeros efeitos adversos, como náuseas, vômitos, dor abdominal, cefaléia, confusão mental, sonolência, alteração de libido e efeitos dermatológicos (HECKMANN & SILVEIRA, 2009; WHO, 2011). Desta forma, terapias alternativas seguras, capazes de prevenir os efeitos do consumo de álcool no nível local e sistêmico, surgem como fortes candidatas no tratamento de alterações decorrentes do consumo.

Nesse contexto, a ingestão de álcool em modelo experimental representa uma estratégia relevante para estudos de eventos que envolvam alterações das vias imunológicas, possibilitando, portanto, o conhecimento de estratégias alternativas de imuno-modulação capazes de atenuar ou reverter os efeitos gerados pelo consumo de etanol, com importantes implicações clínicas.

1.4. Terapias alternativas – Bactérias do ácido láctico

Algumas bactérias do ácido láctico (BAL) são bastante conhecidas por suas aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de várias desordens sendo, portanto denominadas de probióticos. Várias espécies como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri*, são conhecidas por suas propriedades probióticas (AMDEKAR *et al.*, 2010; OUWEHAND *et al.*, 2002; STILES & HOLZAPFEL, 1997). Além dos benefícios naturais, o uso destas BAL como vetores vivos para entrega de antígenos e proteínas terapêuticas na superfície de mucosas, surge como uma aplicação bastante promissora (PONTES *et al.*, 2011). Desta forma, diversos sistemas eficientes de expressão foram desenvolvidos para a produção controlada e direcionada dos antígenos desejados, com a finalidade de serem liberados na mucosa gastrointestinal (Le LOIR *et al.*, 2001; PONTES *et al.*, 2011; WELLS *et al.*, 1993).

Uma alternativa inovadora de tratamento de doenças que acometem o trato gastrointestinal, ainda em fase experimental, é a administração oral de microrganismos produtores de imunomoduladores. Neste caso, microrganismos que fossem bons produtores de proteínas heterólogas, capazes de resistir às intempéries do trato gastrointestinal, transientes, e pouco imunogênicos, seriam candidatos ideais neste estudo. Baseado nestes requisitos, as BAL poderiam, perfeitamente, desempenhar tal função.

As BAL constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, microaerófilos, não formadores de esporos e não móveis, capazes de converter açúcares (hexoses) em ácido láctico (MAKAROVA & KOONIN, 2007). Estas bactérias são amplamente utilizadas na fabricação de diversos alimentos como iogurtes, queijos, pão, vinho e manteiga. Por serem utilizadas há séculos na indústria alimentícia para produção e preservação de produtos fermentados elas são consideradas como organismos seguros (“GRAS” - Generally Recognized As Safe). Segundo Pontes e colaboradore (2011), o uso de microrganismos vivos

como veículo celular para produção e apresentação de antígenos, além da entrega de DNA, tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento de novas vacinas. Vantagens adicionais como o baixo custo e fácil manipulação destas bactérias tornam ainda mais atrativas sua utilização.

Lactococcus lactis (*L. lactis*) é a espécie melhor caracterizada dentre as BAL, além de sua importância econômica, possui seu genoma completamente sequenciado. Diversas ferramentas genéticas e de expressão já foram desenvolvidas para esta espécie, desta forma, *L. lactis* é considerado como um organismo modelo dentro do grupo (BOLOTIN *et al.*, 2001; DUWAT *et al.*, 2000; PLATTEEUW *et al.*, 1994). *L. lactis* tem se destacado como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, quando comparado ao uso de modelos clássicos como a *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, uma vez que *L. lactis* não produz endotoxinas, LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (BOLOTIN *et al.*, 2001; Le LOIR *et al.*, 2005; NOUAILLE *et al.*, 2003).

Neste contexto, vários grupos de pesquisa voltaram-se para o uso potencial destas bactérias como “usinas celulares” para a produção de moléculas de interesse médico e biotecnológico, como DNA, citocinas, enzimas, peptídeos, alérgenos e antígenos (NOUAILLE *et al.*, 2003; WELLS & MERCENIER, 2008). Inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Le LOIR *et al.*, 2005; NOUAILLE *et al.*, 2003).

A obtenção de respostas imunes supressoras antígeno-específica é um importante objetivo no desenvolvimento de tratamentos para doenças autoimunes, inflamatórias e gastrointestinais. A tolerância oral é um poderoso meio para induzir tolerância a um antígeno específico, porém a implementação desta estratégia em seres humanos tem sido dificultada, pois a dose e o protocolo de administração oral dos antígenos utilizados em modelos animais precisam ser adaptados para humanos (FARIA & WEINER, 2006). Em 1998, De Faria e colaboradores mostraram que a ingestão contínua do antígeno se mostrou mais eficiente na indução da tolerância oral em animais idosos, ao invés da administração intragástrica (i.g.) da mesma dose do antígeno. Desta forma, a entrega ativa, lenta e gradual de proteínas heterólogas na mucosa intestinal por *L. lactis* geneticamente modificado, fornece uma nova ferramenta terapêutica para a indução da tolerância a esta mesma proteína. A capacidade tolerogênica e imunomodulatória destas bactérias recombinantes foi testada em diversos modelos de distúrbios gastrointestinais como doenças inflamatórias intestinais (IBD) e alergias alimentares (Tabela 1). Um estudo realizado por Huibregtse e colaboradores (2007) demonstrou que a entrega de OVA por *L. lactis* geneticamente modificado, induziu a

supressão de respostas locais e sistêmicas de células T específicas para OVA em camundongos. Esta proteção não foi restrita apenas ao modelo de alergia a OVA, uma vez que a administração de *L. lactis* expressando β -lactoglobulina também foi capaz de prevenir parcialmente a sensibilização em camundongos (ADEL-PATIENT *et al.*, 2005). Em um modelo experimental de colite ulcerativa, a administração de *L. lactis* secretando IL-10 resultou em uma redução de 50% da doença em camundongos selvagens, além disso, foi capaz de prevenir o estabelecimento dessa patologia em animais deficientes para IL-10 (STEIDLER *et al.*, 2000).

Baseado nessas evidências, com o intuito de desenvolver uma estratégia para induzir mecanismos tolerogênicos e prevenir a reatividade exacerbada do sistema imune associada à ingestão aguda de etanol, foi utilizada a bactéria *L. lactis* geneticamente modificada para produzir e secretar a proteína de choque térmico 65 (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*.

Tabela 1: Imuno-moduladores, antígenos e proteínas terapêuticas expressas em *L. lactis* no tratamento de desordens gastrointestinais

Imuno-moduladores, antígenos ou proteínas terapêuticas	Localização celular em <i>L. lactis</i>	Modelo experimental <i>in vivo</i>	Rota de administração	Uso proposto	Referências
IL-10 murina (mIL-10)	Secretada	-Camundongo IL-10 ^{-/-} -Camundongo tratado com DSS*	Oral	IBD (colite)	STEIDLER <i>et al.</i> , 2000
IL-10 humana (hIL-10)	Secretada	-Porcos -Ensaio clínico em humanos	Oral	IBD (Doença de Cronh's)	BRAAT <i>et al.</i> , 2006; STEIDLER <i>et al.</i> , 2003
Nanocorpos anti-TNF	Secretada	-Camundongo IL-10 ^{-/-} -Camundongo tratado com DSS	Oral	IBD (colite)	VANDENBROUCKE <i>et al.</i> , 2010
Fatores trefoil murinos (mTFF)	Secretada	-Camundongo IL-10 ^{-/-} -Camundongo tratado com DSS	Oral	IBD (colite)	VANDENBROUCKE <i>et al.</i> , 2004
mIL-10	Secretada	Modelo experimental de camundongo tratado com β-lactoglobulina/CTX**	Oral	Alergia alimentar	FROSSARD; STEIDLER; EIGENMANN, 2007
β-lactoglobulina bovina	Secretada, intracelular	Camundongo BALB/c	Oral	Alergia alimentar	ADEL-PATIENT <i>et al.</i> , 2005
mIL-2	Secretada	Camundongo BALB/c	Intranasal	Alergia alimentar	CORTES-PEREZ <i>et al.</i> , 2007

*DSS: *Dextran sodium sulphate*; **CTX: *Cholera toxin*. Adaptado de Bahey-El-Din *et al.*, 2010)

1.5. Aspectos fisiológicos e terapêuticos das proteínas do choque térmico (*Heat Shock Protein*, HSP)

Ritossa (1962) observou que o aumento da temperatura alterava a expressão de genes na glândula salivar de larvas de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente, os produtos destes genes foram identificados e denominados proteínas do choque térmico ou heat shock protein (HSP) (TISSIERES *et al.*, 1974).

As HSPs estão presentes tanto em células procarióticas quanto eucarióticas e podem ser categorizadas em diversas famílias, Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 e pequenas HSPs, nomeadas de acordo com suas massas moleculares (Van EDEN *et al.*, 2005). Exposições a diversos fatores como temperaturas elevadas, isquemia e reperfusão, infecções virais, estresse oxidativo, exposição à ultravioleta e produtos químicos, inflamação e lesão celular, provocam o aumento na expressão de HSPs. Desta forma, as HSPs também são conhecidas como proteínas de estresse (ELLIS, 1990; LINDQUIST & CRAIG, 1988; SANTORO, 2000; WELCH, 1993).

Em condições fisiológicas, algumas destas proteínas funcionam como moléculas chaperonas ou proteases, envolvidas na homeostase e biogênese de proteínas dentro das células (POCKLEY, 2001). Estas funções incluem dobramento de proteínas recém formadas, degradação de proteínas instáveis, transporte de peptídeos, prevenção da agregação protéica e modulação endógena da apoptose (BEERE, 2004; BUKAU & HORWICH, 1998; Van EDEN, 2000; THOMPSON & REUSE, 2002).

Devido ao alto grau de conservação evolucionária, as HSPs são conhecidas como imunogênicas (Van EDEN *et al.*, 2003). Hsp10, Hsp40, Hsp60 e Hsp70 de mamíferos possuem grande homologia com algumas bactérias (POCKLEY *et al.*, 1999) desta forma, reações imunes cruzadas podem ocorrer entre estes organismos filogeneticamente distantes (Van EDEN, *et al.*, 2005).

A capacidade destas proteínas de induzirem respostas pró-inflamatórias, somado a similaridade filogenética entre HSPs eucarióticas e procarióticas, leva a suposição de que estas proteínas fornecem uma ligação entre infecção e doenças autoimunes (POCKLEY, 2001). Por outro lado, fortes evidências têm demonstrado um fenótipo regulador nestas respostas de reatividade cruzada a HSPs microbianas, resultando no controle de diversas patologias (Van EDEN, *et al.*, 2005; POCKLEY, 2001).

A Hsp60 humana possui em torno de 55% de sua sequência genômica idêntica à Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (JONES *et al.*, 1990; WINFIELD, 1989). A primeira evidência do papel das HSPs como antígenos nas respostas inflamatórias, foi obtida em 1988. Neste trabalho, van Eden e colaboradores mostraram que células T isoladas de ratos com artrite induzida por adjuvante – micobactéria morta – respondiam a Hsp60 de micobactéria. Foi demonstrado ainda que a pré-imunização com Hsp60 de micobactéria protegia contra a artrite, provando a primeira evidência que HSPs estão envolvidas na regulação de doenças inflamatórias (Van EDEN *et al.*, 1988 citado por Van EDEN *et al.*, 2005).

Desde então, diversos trabalhos têm mostrado que células T reativas a HSP possuem um fenótipo imunoregulador, sugerindo que HSPs, em particular, Hsp60 e Hsp70, constituem um grupo de autoantígenos com o potencial de desencadear vias imunoreguladoras (Van EDEN *et al.*, 2005). Evidências em modelos animais têm mostrado que imunizações com HSPs foram capazes de inibir ou atenuar desordens como aterosclerose (MARON *et al.*, 2002; XIONG *et al.*, 2009), diabetes (BRUGMAN *et al.*, 2004), lúpus (MARENGO *et al.*, 2008), colite (SANTOS, 2011) e artrite (HAQUE *et al.*, 1996; WIETEN *et al.*, 2009). A partir destas observações, sugere-se que o efeito protetor das HSPs parece ser independente da relação antigênica de HSP com o antígeno indutor da doença (Van EDEN *et al.*, 2005). O potencial efeito de proteção das HSPs, em modelos animais, tem sido reproduzido em ensaios clínicos com pacientes utilizando peptídeos derivados destas proteínas (PRAKKEN *et al.*, 2004; RAZ *et al.*, 2001). Desta forma, embora Hsp60 e Hsp70 sejam marcadores na identificação de uma variedade de doenças, a expressão destas proteínas parece estar mais associada com a *down-regulation* da inflamação, do que com a indução ou propagação da mesma (Van EDEN *et al.*, 2005).

HSPs de bactérias e mamíferos têm sido descritas por ativar diretamente APCs (SRIVASTAVA, 2002), incluindo macrófagos e células dendríticas (DCs), provavelmente por meio de sua ligação a receptores na superfície celular como CD14, CD40, CD91, CD36, TLR2 e TLR4 (BINDER *et al.*, 2004; DELNESTE, 2004). Estudos têm demonstrado que HSP60 modula a expressão de fatores transcricionais envolvidos na diferenciação Th1 versus Th2, favorecendo um perfil Th2. Este resultado promove a redução da secreção de citocinas inflamatórias com TNF- α e IFN- γ e aumenta a secreção de citocinas reguladoras como IL-10 por células T ativadas por Hsp60 (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2005). Desta forma, uma vez demonstrado o aumento da expressão de Hsp60 em condições de estresse ou inflamação e os efeitos modulatórios promovidos por linfócitos T reguladores, torna-se relevante avaliar se a administração oral prévia de Hsp65 produzida e liberada por *L. lactis* seria capaz de prevenir ou atenuar as alterações inflamatórias geradas pela ingestão aguda de etanol.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar os efeitos do pré-tratamento oral com *L. lactis*, produtor ou não da proteína Hsp65, como estratégia profilática para modulação das alterações inflamatórias desencadeadas pela ingestão aguda de etanol em camundongos C57BL/6.

Objetivos específicos

Para melhor delineamento experimental, os objetivos específicos foram separados em 4 etapas bem distintas, como descrito a seguir:

Etapa I- Avaliações macroscópicas

Avaliar as alterações gerais desencadeadas pela administração de EtOH, bem como o efeito modulador da administração prévia de *L. lactis*, por meio das seguintes análises:

- Peso corpóreo;
- Peso e tamanho gástrico;
- Macroscopia da mucosa gástrica.

Etapa II- Avaliações morfo-funcionais

Avaliar as alterações morfo-funcionais locais (trato gastrointestinal), desencadeadas pela administração de EtOH, e os efeitos moduladores da ingestão prévia de *L. lactis*, por meio da análise dos seguintes parâmetros:

- Histologia da mucosa gástrica e intestinal (jejuno proximal - JP), por meio da coloração com HE;
- Morfologia do fígado por meio da técnica de HE;

- Avaliação quantitativa de degeneração hepática;
- Atividade enzimática da Alanina aminotransferase (ALT) no soro;
- Avaliação da produção de muco gástrico e intestinal (JP) pela coloração com PAS;
- Contagem de mastócitos na submucosa gástrica pela coloração com Azul de Toluidina.

Etapa III- Avaliações imunológicas

Avaliar as alterações imunológicas locais e sistêmicas desencadeadas pela administração de EtOH, e o impacto imuno-modulador do pré-tratamento oral com *L. lactis*, sobre os seguintes parâmetros:

- Quantificação de IgA secretória (IgAs) no muco gástrico e intestinal por meio da técnica de ELISA;
- Avaliação dos níveis de IgE total no soro por meio de ELISA;
- Avaliação do perfil de citocinas produzidas *in situ* como IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- γ em extratos de estômago e IL-4 e IL-10 em extratos do jejuno proximal, por meio de ELISA;
- Investigação imunofenotípica de células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e linfócitos T com perfil regulador, no linfonodo mesentérico e baço, utilizando a técnica de citometria de fluxo;

Etapa IV- Avaliação funcional

Avaliar o impacto da ingestão de EtOH na susceptibilidade à indução de tolerância oral à ovalbumina, e o efeito da ingestão prévia de *L. lactis* sobre esse fenômeno pela:

- Dosagem dos níveis de IgE anti-OVA no soro por meio da técnica de ELISA.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos, fêmeas (entre 8-10 semanas) da linhagem C57BL/6 selvagens, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), livre acesso a ração (Labina) e água, exceto em período experimental previamente estabelecido. Após condicionamento adequado e vermifugação num período de 7 dias (Ivermectina 1% - Biomectina - BIOFARM, Brasil) deu-se início aos experimentos. Todos os procedimentos utilizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo – número 114/2010).

3.2. Modelo de ingestão aguda de etanol (EtOH)

Segundo descrito por Andrade e colaboradores (2006), animais C57BL/6 receberam por meio de uma sonda metálica de ponta arredondada, acoplada a uma seringa de 1mL, uma única administração intragástrica (i.g.) de 0,2 mL de EtOH/animal, diluído 50% em água durante 4 dias consecutivos. Os grupos controles receberam somente água pela mesma via. Os animais foram deixados de jejum por no mínimo 12h antes da gavagem.

3.3. Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 2. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco) suplementado com 0,5% de glicose ou 1% de xilose (GM17 ou XM17, respectivamente). No meio de cultivo contendo *L. lactis* recombinante foi adicionado 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (SIGMA). As bactérias foram incubadas em estufa a 30°C, sem agitação, para crescimento (primeiro dia) e indução da expressão gênica (segundo dia). Para fins de estocagem, após período de crescimento (primeiro dia), as linhagens de *L. lactis* foram coletadas e diluídas (4:1) em uma

solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em ultrafreezer -80°C. Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar com material estéril. Análises por Western Blotting realizadas por Azevedo (2009) estimaram que *L. lactis* pSEC:hsp65 produz 7mg/L de Hsp65. A representação dos vetores de expressão de *L. lactis* recombinante está ilustrada na Figura 1.

Tabela 2: Linhagens bacterianas

Espécie	Linhagem	Fonte
<i>L. lactis</i> NCDO2118 ^a	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LGCM
<i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 ^b	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXylT:SEC:hsp65/Cm ^r contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) de <i>L. lactis</i> fusionada à ORF hsp65 de <i>M. leprae</i> sob o controle do promotor PxyIT	ROCHA, 2007

^a: Linhagem selvagem de *L. lactis* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) – UFMG.

^b: Linhagem recombinante de *L. lactis* portadora do plasmídeo pXylT:SEC:hsp65 desenvolvida por Azevedo (2009).

Cm^r: Resistência ao antibiótico cloranfenicol.

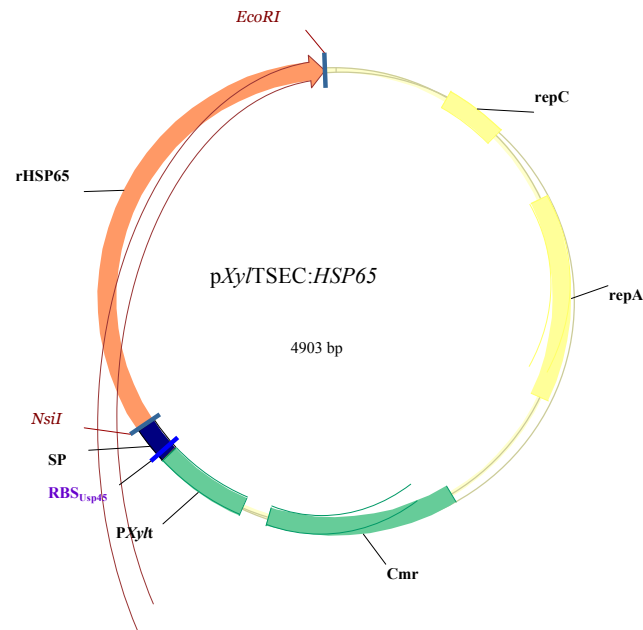


Figura 1: Representação dos vetores de expressão pXylT:SEC:hsp65.

PxylT: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. NsiI e EcoRI: Sítio para as enzimas de restrição NsiI e EcoRI. rhsp65: ORF hsp65 de *Mycobacterium leprae*. repA e repC: origens de replicação. Cmr: Gene que confere resistência ao cloranfenicol.

3.4. Indução da expressão gênica em *L. lactis*

- Primeiro dia

Colônias isoladas de *L. lactis* pSEC:hsp65, e *L. lactis* selvagem foram individualmente inoculadas em 5 mL de meio GM17, onde apenas os meios de cultivo destinados às linhagens recombinantes foram suplementados com cloranfenicol na concentração de 10 µg/mL. Em seguida, os inóculos permaneceram em uma estufa a 30°C por 18 horas (*overnight*), sem agitação (MIYOSHI *et al.*, 2004).

- Segundo dia

As culturas crescidas *overnight* foram diluídas (1:10.000) em 50 mL de XM17. Posteriormente, os inóculos foram incubados na estufa a 30°C, sem agitação, por mais 18 horas.

- Terceiro dia

Após as culturas terem alcançado uma densidade óptica (OD_{600nm}) 2.0, o que corresponde a 1×10^9 bactérias/mL, as culturas crescidas *overnight* foram acondicionadas em mamadeiras de vidro estéreis e ofertadas aos camundongos. As mamadeiras foram trocadas diariamente durante 4 dias consecutivos.

3.5. Desenho experimental das Etapas I, II e III

Camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente separados em 6 grupos, contendo 6 animais/gaiola (Tabela 3). Esses receberam por via oral, *ad libitum*, um pré-tratamento contendo *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* produtor de Hsp65 secretória (Hsp65 LL) em meio nutritivo ou somente o meio de cultura (sem tratamento – ST). As mamadeiras foram administradas durante 4 dias consecutivos e trocadas diariamente, após este período o conteúdo foi substituído por água até o final do experimento. Sete dias após o último dia de tratamento oral, foi realizada a administração intragástrica (i.g.) de etanol (EtOH) 50%/animal durante quatro dias consecutivos. Os camundongos controles receberam somente água pela mesma via. Vinte e quatro horas após a última administração i.g. (EtOH ou água), como protocolo descrito no item 3.2, foram realizadas as intervenções experimentais. Durante a necropsia foram retirados: sangue, estômago, intestino delgado, fígado, baço e linfonodo mesentérico (LM) para análises que serão descritas nos itens a seguir.

Escala temporal(dias): Etapas I, II e III

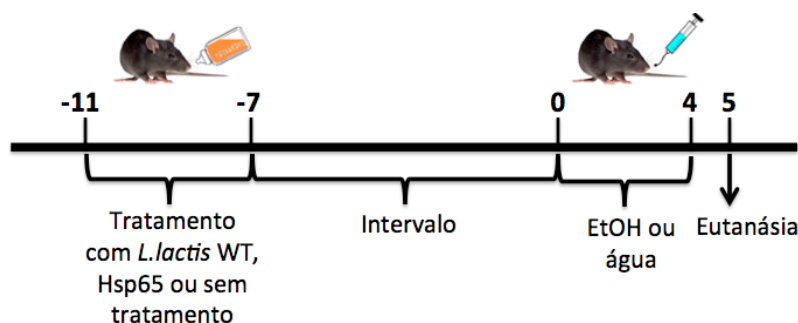


Tabela 3: Grupos experimentais – Etapas I, II e III

Grupos	Tratamentos (4 dias)	Administração de EtOH 50% (4 dias)
1	Sem tratamento	+
2	NCDO2118 ^a	+
3	pSEC:hsp65 ^b	+
4	Sem tratamento	-
5	NCDO2118 ^a	-
6	pSEC:hsp65 ^b	-

^a: Linhagem de *L. lactis* selvagem (WT LL)

^b: Linhagem recombinante de *L. lactis* (Hsp65 LL)

n=6 animais/grupo

3.6. Metodologias usadas para análises experimentais das Etapas I, II, III

3.6.1. Peso corpóreo

O peso corpóreo individual foi avaliado semanalmente e expresso em gramas (g) como valores médios de cada grupo.

3.6.2. Obtenção do soro e eutanásia

Com o auxílio de pipetas *Pasteur* descartáveis, uma média de 700 µL de sangue/animal foi obtida por meio dos vasos axilares dos camundongos, previamente anestesiados com xilazina (20 mg/Kg) e ketamina (100 mg/Kg) diluídos em salina fisiológica. Após coagulação, o sangue foi centrifugado (252g) por 10 minutos, o soro obtido armazenado em *ependorfs* individuais e congelado (-20°C) para análises posteriores de imunoglobulinas (Igs) e alanina aminotransferase (ALT). Em seguida os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical, sendo retirados os órgãos de interesse.

3.6.3. *Peso e tamanho gástrico*

Após eutanásia, os estômagos dos animais foram extraídos com auxílio de pinça e tesoura, lavados com 5 mL de salina fisiológica, para retirada do conteúdo gástrico, e levemente pressionados em papel toalha para retirar o excesso de líquido. Em seguida foram pesados em balança analítica de precisão, e seu tamanho mensurado com uma régua milimetrada. Os resultados foram expressos em mg e cm, respectivamente.

3.6.4. *Confecção de lâminas histológicas*

Após eutanásia dos animais, estômago, intestino delgado e o lobo maior do fígado foram retirados cuidadosamente com auxílio de pinça e tesoura para avaliação histológica. Os conteúdos estomacais e intestinais foram lavados com 5 mL e 10 mL de salina fisiológica, respectivamente. O material obtido foi armazenado em tubos de poliestireno 15 mL (Falcon® - Becton Dickinson), para dosagem de IgA secretória (IgAs), e congelado a -20°C. O estômago foi aberto ao longo de sua curvatura menor, estendido e preso entre dois papéis filtro, a fim de evitar que o órgão se dobrasse durante o processo de fixação.

Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo Ferraris e colaboradores (1992). A técnica consiste em dividir o intestino em quatro partes de 20%, 30%, 30% e 20%, começando pela parte proximal - próxima ao estômago, em direção a parte distal – junção íleo-cecal, sendo estas porções denominadas respectivamente como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. A região intestinal selecionada para estudo foi o jejuno proximal (JP), o qual após ter sido isolado das demais partes, foi aberto com o auxílio de tesoura cirúrgica e enrolado em toda sua extensão na forma de um "rocambolé".

Posteriormente os órgãos selecionados foram imersos em formalina de Carson em tampão millong pH 7,2 por 48h, após este período as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcoois (70° a 100° GL), clarificados com xilol e incluídos em blocos parafina. A partir desses blocos, cortes teciduais de 4 µm foram obtidos com auxílio de um micrótomo e corados de acordo com o interesse. As técnicas de coloração utilizadas foram Hematoxilina-Eosina (HE), *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Azul de Toluidina, que serão apropriadamente descritas em seções posteriores.

3.6.5. Avaliação macroscópica

Após lavagem e abertura estomacal, o órgão foi cuidadosamente examinado a fresco com o intuito de averiguar possíveis alterações macroscópicas como hiperemia, hemorragia e focos necróticos. Logo após, o material foi fixado em solução formalina de Carson em tampão millong pH 7,2 para avaliação morfológica.

3.6.6. Avaliação histopatológica gástrica, intestinal e hepática

Para avaliação histopatológica foi utilizado o método de HE. A hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais abundantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, se tornam azulados. A eosina, ao contrário, é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa, que por sua vez são bastante abundantes no citoplasma. A técnica consiste em desparafinar (xilol), hidratar (álcoois 100° a 70° GL) e banhar os cortes na solução de hematoxilina por 45 segundos, após lavar por 10 minutos em água corrente, os cortes dos tecidos foram mergulhados na eosina por 1'30'' minuto e posteriormente desidratados (álcoois 70° a 100° GL), diafanizados (xilol) e as lâminas montadas. Foram realizadas análises qualitativas pela visualização da integridade da mucosa, presença de infiltrado inflamatório e edema no parênquima hepático e nas submucosas gástrica e intestinal (JP).

3.6.7. Avaliação quantitativa de degeneração hepática

A partir de cortes histológicos hepáticos corados com HE, foram realizadas análises quantitativas do grau de degeneração dos hepatócitos, representados pela presença de vacúolos citoplasmáticos. Imagens de três campos/animal (100X) foram capturadas a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software de morfometria ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Os resultados foram obtidos a partir da média de cada grupo e expressos em porcentagem de degeneração/área.

3.6.8. Dosagem de Alanina aminotransferase no soro

Para quantificação bioquímica de lesão hepática foi utilizado um teste para dosagem de alanina aminotransferase (ALT). Para determinar a atividade de ALT foi utilizado o Kit Transaminase ALT cinético (Bioclin), composto por dois reagentes, substrato e coenzima. O preparo do reagente de trabalho foi feito por meio da mistura de 9 partes do substrato com 1 parte da coenzima. Para realização do teste, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) termostalizadas a 37° C, foram incubadas com 20 µL dos soros obtidos por centrifugação do sangue dos camundongos testados. Em seguida 200 µL/poço do reagente de trabalho termostalizado a 37° C foi adicionado às amostras. Após um minuto, foi feita a leitura inicial (340 nm) e leituras subsequentes foram realizadas após 1, 2 e 3 minutos, totalizando 4 leituras. Resumidamente, o teste consiste em duas reações, onde primeiramente o ALT catalisa a transferência do grupamento amina da alanina para o alfa-cetoglutarato, levando à formação de piruvato e glutamato. O piruvato em presença de lacto desidrogenase (LDH) reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD⁺. A velocidade de diminuição da concentração de NADH é proporcional à atividade da ALT no soro analisado. Por fim, a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minutos}$) das 4 leituras foi calculada e o resultado obtido por meio da fórmula $\Delta A/\text{minutos} \times 1746$. Os resultados foram expressos em unidade/litro (U/L).

3.6.9. Avaliação da produção de muco

Para avaliação da presença de muco gástrico e intestinal foi utilizada a técnica de PAS. Esse método é utilizado para a demonstração de glicogênio, mucina neutra, membranas basais e mucossubstâncias secretadas pelo epitélio, e baseia-se no princípio de que o ácido periódico oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o ácido sulfuroso Fucsina - presente no reativo de *Schiff*. Para execução do método, os cortes foram desparafinados, hidratados e banhados na solução de ácido periódico por 5 minutos, posteriormente banhados em água destilada e mergulhados no reativo de *Schiff* até atingir uma tonalidade rosa pálida. Neste ponto, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados, diafanizados, e as lâminas montadas. Foram realizadas análises quantitativas (estômago) e qualitativas (JP). Para as análises quantitativas, imagens de três campos/animal (100X) foram capturadas a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas

com a utilização do software de morfometria ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Os resultados foram obtidos a partir da média da cada grupo e expressos em porcentagem de muco/área.

3.6.10. Avaliação do número de mastócitos

Os mastócitos presentes na submucosa gástrica foram visualizados pelo método de coloração Azul de Toluidina. Estas células contêm em seu citoplasma numerosos e pequenos grânulos que armazenam grande quantidade de proteoheparina e histamina. A heparina, altamente sulfatada, é revelada pelo Azul de Toluidina produzindo o fenômeno da metacromasia. Para execução do método, os cortes foram desparafinados, hidratados e banhados em solução de Azul de Toluidina 0,5% por alguns segundos. Posteriormente os cortes foram desidratados, diafanizados e as lâminas montadas. A contagem foi realizada em toda extensão gástrica (200X), o resultado foi expresso como número de mastócitos totais.

3.6.11. Coleta do muco no trato gastrointestinal

Para a coleta do muco, foi utilizada a técnica descrita por Elson e colaboradores (1984), com algumas modificações. Os órgãos: estômago e intestino delgado foram retirados e lavados com auxílio de uma seringa com 5 mL e 10 mL de salina fisiológica gelada, respectivamente. Os conteúdos dos lavados foram transferidos para tubos de poliestireno de 15 mL (Falcon[®] - Becton Dickinson), agitados em vórtex e centrifugados a 268g por 30 minutos (4°C). Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para a medida de IgA secretória (IgAs).

3.6.12. Dosagem de IgA secretória no muco

A dosagem de anticorpos IgA foi realizada pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a 4°C *overnight* com 100 µL/poço de anticorpos de cabra anti-Ig total de camundongo na diluição de 1:2000 (*Goat anti-mouse Ig total UNLB*; Southern

Biotechnology, Birmingham, Alabama) em tampão carbonato pH 9,6. Após este período as placas foram lavadas 2 vezes com 200 µL/poço de salina acrescida de 0,05% de *Tween* 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA – salina-*Tween*). Todas as etapas de lavagens a seguir foram realizadas com o mesmo volume desta solução (salina-*Tween*). Posteriormente as placas foram incubadas com 200 µL/poço de solução contendo PBS-caseína 0,25% (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA) para bloqueio e incubados à temperatura ambiente (TA). Após 2 lavagens foram adicionados 100 µL/poço das amostras de muco, na diluição 1:10 do lavado intestinal, e total (sem diluição) do lavado estomacal. Como anticorpo padrão, foi utilizado IgA de camundongo purificado (*Mouse IgA UNLB*, Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluído em 200 µL de PBS-caseína no primeiro poço, diluições seriadas foram realizadas nos poços subsequentes, que receberam previamente 100 µL de PBS-caseína/poço. O conteúdo da última diluição foi desprezado, permanecendo um volume final de 100 µL/poço (1 µg/mL – 0,0078 µg/mL). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas 5 vezes com salina-*Tween*. Em seguida, as placas foram incubadas com 100 µL/poço de uma solução de anticorpos de cabra anti-IgA de camundongo conjugados a biotina (*Goat anti-mouse IgA-biot*; Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluídos em PBS-caseína (1:10000) por 1 hora a 37°C. Após 5 lavagens as amostras foram incubadas com 100 µL/poço de uma solução contendo Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluída em PBS/caseína na concentração de 1:5000 por 1 hora a 37° C. Após 5 lavagens deu-se início a etapa de revelação pela adição de 100 µL/poço de uma solução de tampão citrato (pH 5,0) contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (1:5000) e ortofenileno-diamino (OPD) (0,4 mg/mL). A reação foi interrompida pela adição de 20 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e as placas então lidas em Leitor automático (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria), usando o filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos em µg/mL.

3.6.13. Dosagem de IgE total no soro

A dosagem de anticorpos IgE total foi realizada pelo teste de ELISA. Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a 4°C *overnight*, contendo 50 µL/poço de anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (*Rat anti-mouse IgE*, Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) em tampão carbonato pH 9,6. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e incubadas

por 1 hora com uma solução de PBS-caseína (200 µL/poço) para bloqueio à TA. Após este período as placas foram lavadas 2 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e foram adicionados 50 µL/poço do soro total das amostras dos animais a serem testados, e seguiu-se a incubação das placas por 2 horas à TA. Como padrão foi utilizado IgE de camundongo purificado (*Mouse IgE UNLB*, Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama), diluído em 100 µL de PBS-caseína no primeiro poço, diluições seriadas foram realizadas nos poços subsequentes, previamente ambientalizados com 50 µL/poço de PBS-caseína. O conteúdo da última diluição foi desprezado, permanecendo um volume final de 50 µL/poço (40 µg/mL – 0,312 µg/mL). Após 5 lavagens com salina-*Tween* (200 µL/poço) as placas foram incubadas com 50 µL/poço com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo conjugado a Biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama), diluído 1:500 em PBS-caseína por 1 hora à TA. Posteriormente as placas foram lavadas 5 vezes (200 µL/poço) e as amostras incubadas por 1 hora com 50 µL/poço de Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluídas em PBS-caseína na concentração de 1:5000 por 45 minutos à TA. As placas foram lavadas 5 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e incubadas, ao abrigo da luz, com 100 µL/poço de tampão citrato (pH 5,0), contendo H₂O₂ (1:5000) e OPD (0,4 mg/mL). Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) e lida com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos em µg/mL.

3.6.14. Preparação de extratos de tecidos

Amostras do estômago e jejuno proximal dos animais, após serem lavadas, respectivamente, com 5 mL e 10 mL de PBS gelado, foram acrescidas de 1 mL de tampão de extração contendo inibidores de proteases (0,05% de *Tween*-20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto benzotônio, 10 mM de EDTA e 20 KIU de aprotinina A), para cada 100mg de tecido. Em seguida, o material foi triturado com um homogeneizador (Omni International TH) até se obter uma solução homogênea e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5590g durante 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos no gelo para posterior medida de citocinas.

3.6.15. Avaliação da produção *in situ* de citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada por ELISA, que, resumidamente, segue a metodologia descrita a seguir: microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4°C, com 50 µL/poço de anticorpos monoclonais anti-IL-2, anti-IFN-γ, anti-IL-4 e anti-IL-10 murinos, (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), diluídos em Buffer Carbonato pH 8,3 (Na₂CO₃, NaHCO₃ – 0.1M) para IFN-γ ou Tampão Fosfato pH 6 (NaH₂PO₄ - 0.1M, NaHPO₄) para demais citocinas. Posteriormente as placas foram lavadas 2 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e incubadas por 1 hora com 200µl/poço de PBS-caseína, para bloqueio à TA. Após este período, as placas foram lavadas 2 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço), e em seguida 50 µL das amostras do sobrenadante dos extratos de tecidos foram adicionadas e as placas incubadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, após 6 lavagens foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados com biotina diluídos em PBS-caseína específicos para IL-2, IFN-γ, IL-4 e IL-10 de camundongos (50 µL/poço) (Pharmingen, Becton Dickinson, Mountain View, California) e seguiu-se à incubação por 2 horas, à TA. As placas foram então lavadas 6 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e incubadas com Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluída em PBS-caseína na concentração de 1:5000 por 1 hora à TA (50 µL/poço). Em seguida foi realizada a etapa de revelação, onde foram adicionados 100µl/poço de uma solução de tampão citrato (pH 5,0) contendo H₂O₂ e OPD. A reação foi interrompida pela adição de 20µl/poço de H₂SO₄ 2mN. As placas foram lidas em Leitor automático (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria), usando o filtro de 492 nm. Foram utilizadas curvas padrões obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. As concentrações utilizadas para cada citocina foram: IL-2 (20 ng/mL – 0,156 ng/mL), IFN-γ (20 ng/mL – 0,156 ng/mL), IL-4 (1 ng/mL – 0,007 ng/mL), IL-10 (5 ng/mL – 0,039 ng/mL). Os resultados foram expressos ng/mL.

3.6.16. Imunofenotipagem celular, no contexto ex-vivo, pela citometria de fluxo

3.6.16.1. Suspensão celular do baço e linfonodo mesentérico

A análise fenotípica das células de interesse foi realizada por citometria de fluxo de acordo com o seguinte método: imediatamente após eutanásia dos animais, com auxílio de pinça e tesoura, o baço e linfonodo mesentérico (LM) foram retirados e mergulhados em 2 mL de meio de cultura completo (RPMI incompleto, 10% soro fetal bovino, 1% aminoácidos não essenciais, 1% piruvato de sódio, 0,09% 2-mercaptoetanol, 0,1% gentamicina) a fim de se manter a viabilidade celular. Em seguida, o baço de cada animal foi triturado com macerador de tecidos de vidro e o LM triturado por pressão entre as pontas foscas de duas lâminas histológicas. Posteriormente os macerados foram coletados e transferidos para tubos de poliestireno de 15 mL (Falcon® - Becton Dickinson). *Debris* presentes nas suspensões celulares foram retirados com auxílio de uma pipeta *Pasteur* descartável. A suspensão de células esplênicas foi centrifugada a 97g, por 10 minutos (4°C), o sobrenadante desprezado, o *pellet* agitado e as hemácias lisadas com 9 mL de água destilada seguida da adição imediata de 1 mL de PBS 10X. Os homogeneizados celulares de ambos os órgãos foram então centrifugados a 97g, por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi desprezado e os leucócitos do baço ressuspendidos em 1 mL de meio de cultura completo, e do LM em 500 µL do mesmo meio. As células foram mantidas em gelo para contagem da viabilidade celular.

3.6.16.2. Contagem da viabilidade celular

O corante eritrocina foi utilizado para identificação de células não-viáveis e consequentemente identificação de células viáveis não coradas. Para contagem das células, 50 µL da suspensão celular (1:100 – baço e 1:50 – LM) foram adicionadas em volume igual de eritrocina, sendo uma diluição final de 1:200 – baço e 1:100 – LM. Após homogeneizar com auxílio de uma pipeta, alíquotas de 10 µL de cada solução foram transferidas para câmara de *Neubauer*. As células viáveis dos quatro quadrantes externos da câmara foram contadas em microscópio óptico (400X). O número de células foi calculado pela fórmula:

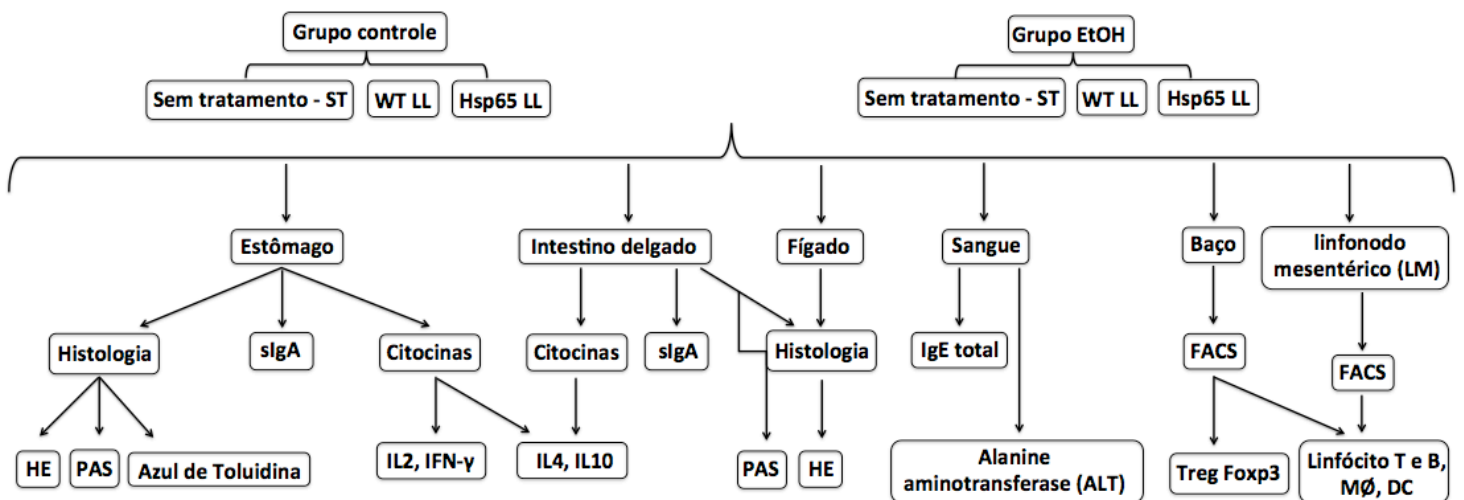
$n^{\circ} \text{ céls/mL ou } /500 \mu\text{L} = (n^{\circ} \text{ céls viáveis} \times \text{diluições utilizadas} \times 10^4) \times \text{volume inicial da ressuspenção celular} / n^{\circ} \text{ quadrantes contados na câmara de } \textit{Neubauer}$.

3.6.16.3. Imunofenotipagem celular

Após a determinação da viabilidade celular, foram retiradas diferentes alíquotas da suspensão celular de cada tubo, de modo que em cada poço das placas de poliestireno (96 poços, fundo em U - Nunc, Roskilde, Denmark), recebesse aproximadamente 500 mil células. Em seguida foram adicionados 20 µL/poço de uma solução de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina), Cy5 (Cy-chrome) ou STP-APC (Streptavidina-aloficocianina), diluídos em tampão PBS 5% SFB (0,15M, pH 7,2). Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela 4. As placas foram incubadas, ao abrigo da luz por 30 minutos a 4°C, posteriormente lavadas com PBS-BSA-NaN₃ e centrifugadas a 113g por 7 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o procedimento de lavagem. As células marcadas com anticorpo biotina foram submetidas a uma nova incubação com streptavidina por 30 minutos (4°C) e lavadas conforme descrito. Logo após, as células marcadas foram ressuspensas, (exceto para marcação com Foxp3), em 200 µL de solução fixadora (paraformaldeído 1% em PBS) e mantidas a 4°C ao abrigo da luz para análises posteriores. Para marcação de Foxp3, após procedimento de lavagem e centrifugação, as amostras foram ressuspensas com 200 µL/poço em tampão de fixação (*Mouse Foxp3 Fixation Concentrate* – BD Pharmingen), por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. As placas foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As amostras foram então lavadas com tampão de permeabilização (*Mouse Foxp3 permeabilization concentrate* – BD Pharmingen) e submetidas a nova centrifugação. Após o sobrenadante ser desprezado as amostras foram incubadas com tampão de permeabilização por 30 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. As placas foram centrifugadas, o conteúdo desprezado, e nova lavagem foi realizada com PBS-BSA-NaN₃. Após centrifugar e desprezar o sobrenadante, foi adicionado ao *pellet* 10 µL/poço de solução do anti-Foxp3. Após 20 minutos de incubação à TA, as placas foram lavadas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células marcadas foram então fixadas com 200 µL/poço de paraformaldeído 1X diluído em PBS. A leitura, 50.000 eventos para as amostras de baço e 30.000 para LM, foi realizada no citômetro de fluxo do tipo FACScalibur (Becton-Dickinson). Na análise dos dados foi feita a correção dos valores percentuais obtido para valores absolutos, para minimizar possíveis erros, uma vez que diferentes alíquotas das suspensões celulares foram retiradas de cada tubo para plaqueamento.

Tabela 4: Anticorpos utilizados

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	Célula-alvo
Anti-CD4	FITC	1:300	Linfócito T
Anti-CD45RB	PE	1:100	Linfócito T
Anti-CD25	Biotina (StpAPC)	1:50	Linfócito T
Anti-Foxp3	PE	1:50	Linfócito T
Anti-CD19	Cy5	1:400	Linfócito B
Anti-MHC II	Biotina (StpAPC)	1:200	Célula dendríticas/Macrófago/Linfócito B
Anti-CD80	PE	1:100	Célula dendríticas/Macrófago/Linfócito B
Anti-CD86	PE	1:50	Macrófago
Anti-CD14	FITC	1:10	Macrófago
Anti-CD11c	FITC	1:100	Célula dendríticas
Streptavidina (Stp)	APC	1:100	-

Resumo das análises experimentais das Etapas I,II e III:

3.7. Desenho experimental da Etapa IV

Camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente separados em 12 grupos, contendo 6 animais/gaiola (Tabela 5). Esses receberam, por via oral *ad libitum*, um pré-tratamento contendo *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* produtor de Hsp65 secretória (Hsp65 LL) em meio nutritivo, ou somente o meio de cultura (sem tratamento – ST). As mamadeiras foram administradas durante 4 dias consecutivos e trocadas diariamente. Sete dias após o último dia de tratamento oral foi realizada a administração i.g. de etanol (EtOH) 50%/animal durante quatro dias consecutivos. Os camundongos controles receberam somente água pela mesma via. Vinte e quatro horas após a última administração i.g. (EtOH ou água) foi iniciado o protocolo de indução da tolerância oral a OVA, com duração de 28 dias. Após este período os animais foram sacrificados e realizada a sangria para análises sorológicas.

Tabela 5: Grupos experimentais – Etapa IV

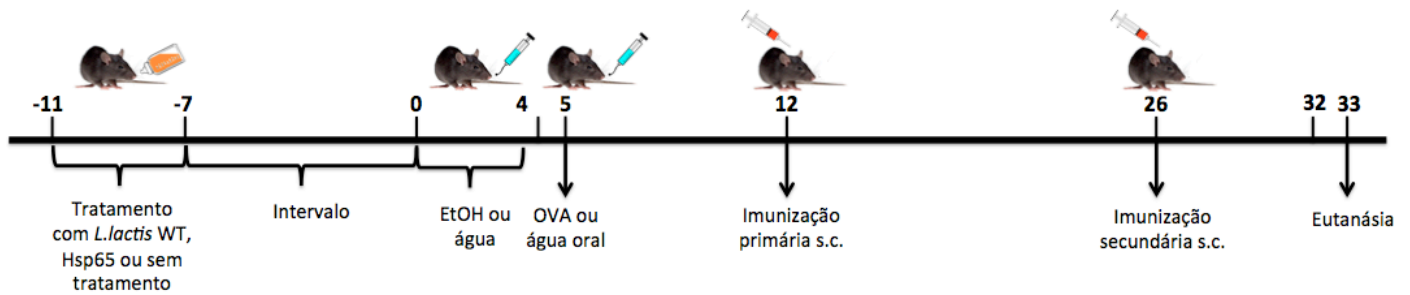
Grupos	Tratamentos (4dias)	Administração de EtOH 50% (4 dias)	OVA oral	Imunização primária	Imunização secundária
1	Sem tratamento	+	+	+	+
2	Sem tratamento	+	-	+	+
3	NCDO2118 ^a	+	+	+	+
4	NCDO2118 ^a	+	-	+	+
5	pSEC: <i>hsp65</i> ^b	+	+	+	+
6	pSEC: <i>hsp65</i> ^b	+	-	+	+
7	Sem tratamento	-	+	+	+
8	Sem tratamento	-	-	+	+
9	NCDO2118 ^a	-	+	+	+
10	NCDO2118 ^a	-	-	+	+
11	pSEC: <i>hsp65</i> ^b	-	+	+	+
12	pSEC: <i>hsp65</i> ^b	-	-	+	+

^a: Linhagem de *L. lactis* selvagem (WT LL)

^b: Linhagem recombinante de *L. lactis* (Hsp65 LL)

n=6 animais/grupo

Escala temporal (dias): Etapa IV



3.8. Metodologias usadas para análises experimentais da Etapa IV

3.8.1. Protocolo de indução de tolerância oral à ovalbumina (OVA)

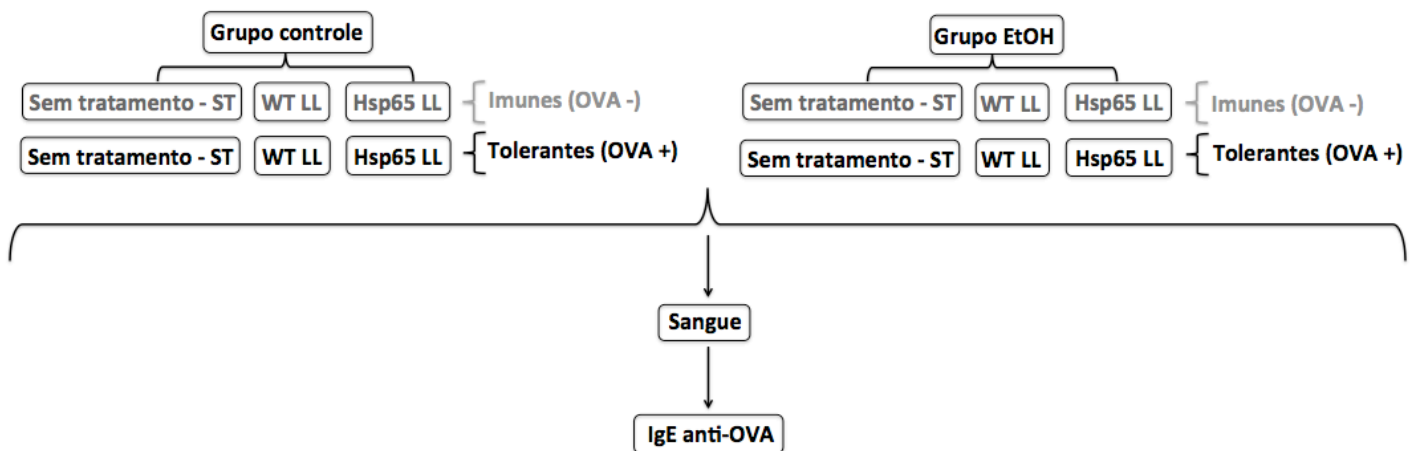
A tolerância oral a OVA foi induzida pela administração i.g. de 0,2 mL de uma solução de OVA na concentração de 20mg/animal diluída em salina fisiológica. Os grupos imunes receberam água no mesmo tempo e pela mesma via. Sete dias após o tratamento oral, todos os grupos foram sensibilizados com uma injeção subcutânea (s.c.) de 0,2 mL de solução salina fisiológica contendo 10 mg de OVA adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio – $\text{Al}(\text{OH})_3$. Após quatorze dias, os animais receberam 0,2 mL de solução salina contendo 10 mg de OVA por via subcutânea. O sacrifício dos animais, para análise de anticorpos específicos no soro, ocorreu sete dias após o último desafio.

3.8.2. Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no soro

A dosagem de anticorpos IgE anti-OVA foi realizada por ELISA. Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a 4°C *overnight*, com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:500 (*Rat anti-mouse IgE*, Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) em tampão carbonato pH 9,6, 50 µL/poço. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e incubadas por 1 hora com 200 µL/poço de PBS-caseína, para bloqueio à TA. Após este período as placas foram lavadas 3 vezes com salina-*Tween* (200 µL/poço) e adicionados 50 µL /poço das amostras de soro (total). As placas foram incubadas por 2 horas à TA e lavadas 5 vezes com

salina-*Tween* (200 μL /poço). Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora à TA com 1 μL de OVA-Biotinilada em 50 μL de PBS-Caseína/poço. Após 4 lavagens com salina-*Tween* (200 μL /poço), as placas foram incubadas (50 μL /poço) com uma solução de Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) diluída em PBS-caseína, na concentração de 1:5000 por 45 minutos à TA. As placas foram lavadas 4 vezes com salina-*Tween* (200 μL /poço) e incubadas ao abrigo da luz com 100 μL /poço de tampão citrato (pH 5,0) contendo H_2O_2 (1:5000) e OPD (0,4 mg/mL). Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 20 μL /poço de H_2SO_4 2N. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) e lida com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.) sendo o padrão positivo considerado como 1000 unidades e as demais amostras comparadas a este valor.

Resumo das análises experimentais da Etapa IV:



3.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM). As diferenças entre as médias em grupos diferentes foram verificadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. As análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foram feitas utilizando-se TESTE T DE STUDENT. Todas as análises foram realizadas por meio do software GraphPad PRISM. O nível de significância foi considerado quando $p < 0.05$. Nas etapas de I a III foi utilizado um asterisco (*) quando houve

diferença significativa entre os grupos EtOH e seus respectivos controles; dois asteriscos (**), quando a diferença foi constatada entre o grupo EtOH sem tratamento e seus respectivos grupos tratados (WTLL ou Hsp65 LL) e três asteriscos (***) quando a diferença foi constatada entre o grupo controle sem tratamento e seus respectivos grupos tratados (WTLL ou Hsp65 LL). Na etapa IV foi utilizado (#) quando houve diferença significativa entre os grupos tolerantes e seus respectivos grupos imunes, e (§) quando a diferença foi constatada entre o grupo tolerante EtOH sem tratamento e seus respectivos grupos tratados (WTLL ou Hsp65 LL).

Estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo

1- Identificação fenotípica de macrófagos

Para a população de **macrófagos**, que identificamos fenotipicamente pela expressão da molécula CD14, fizemos a seleção da população positiva pelo fenótipo, uma vez que essas células, em camundongos, encontram-se com uma distribuição ampla e não conseguiríamos selecionar a população em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC-*Forward Scatter*) versus granulosidade (SSC-*Side Scatter*). Como demonstrado na Figura 2, construímos um histograma de fluorescência 1 (FL1) baseado na expressão de CD14-FITC. Fizemos um *gate* (R1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 para selecionar as células positivas para a molécula CD14 (Figura 2A).

Para análise da ativação celular, verificamos a expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) e de MHCII da seguinte maneira: selecionando a população contemplada no *gate* R1, fizemos histogramas de fluorescência específica para análise da expressão dessas moléculas dentro da população CD14⁺, como exemplificado pelas Figuras 2B (MHCII-APC) e 2C (CD80-PE). Definimos a região de interesse de análise a partir da positividade de expressão de cada molécula, delimitado pela faixa M1. Com a análise estatística obtivemos o percentual de células em cada faixa de seleção, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*). Nos resultados, os valores percentuais foram corrigidos para número de células com base em cálculos específicos.

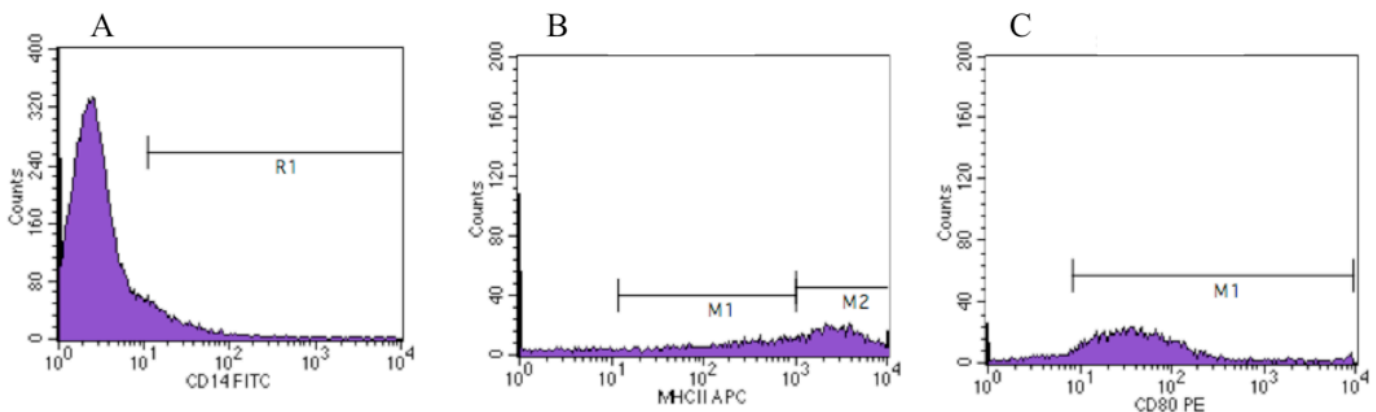


Figura 2: Estratégia de análise de macrófagos. Os histogramas obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de macrófagos pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) expressão de CD14-FITC com *gate* (R1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 , em (B) expressão MHCII com seleção (M1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 e em (C) expressão de CD80 com seleção (M1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 .

2- Identificação fenotípica de células dendríticas

Para a população de **células dendríticas**, que identificamos fenotipicamente pela expressão da molécula CD11c, fizemos a seleção da população positiva pelo fenótipo, uma vez que essas células, em camundongos, encontram-se com uma distribuição ampla e não conseguiríamos selecionar a população em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC-*Forward Scatter*) versus granulosidade (SSC-*Side Scatter*). Como demonstrado na Figura 3, construímos um histograma de fluorescência 1 (FL1) baseado na expressão de CD11c-FITC. Fizemos um *gate* (R1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 para selecionar as células positivas para a molécula CD11c (Figura 3A).

Para análise da ativação celular, verificamos a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80) e de MHCII da seguinte maneira: selecionando a população contemplada no *gate* R1, fizemos histogramas de fluorescência específica para análise da expressão dessas moléculas dentro da população CD11c⁺, como exemplificado pelas Figuras 3B (CD80-PE) e 3C (MHC-APC). Definimos a região de interesse de análise a partir da positividade de expressão de cada molécula, delimitado pela faixa M1. Com a análise estatística obtivemos o percentual de células em cada faixa de seleção, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*). Nos resultados, os valores percentuais foram corrigidos para número de células com base em cálculos específicos.

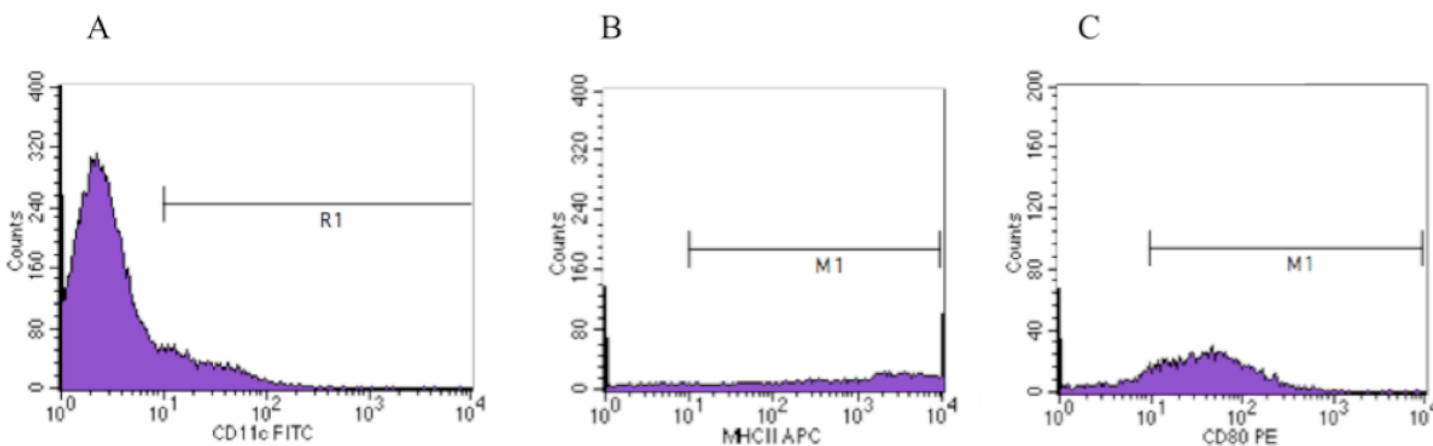


Figura 3: Estratégia de análise de células dendríticas. Os histogramas obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células dendríticas pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) expressão de CD11c-FITC com *gate* (R1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 , em (B) expressão CD80 com seleção (M1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 e em (C) expressão de MHCII com seleção (M1) na faixa de fluorescência acima de 10^1 .

3- Identificação fenotípica de linfócitos B

De acordo com suas características morfológicas, linfócitos podem ser diferenciados de outras populações celulares por localizarem em uma determinada faixa de tamanho (FSC=200-400). Sabemos que linfócitos ativados - linfoblastos - aumentam de tamanho, desta forma, para garantir que estávamos contemplando também essas células, ampliamos a nossa faixa de seleção da população de interesse, selecionando, em gráficos de distribuição pontual (*dot plots*) de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) a população entre 200-1000 de FSC (*gate* R1), como demonstrado na Figura 4A.

Para análise da ativação celular em linfócitos B (CD19⁺), verificamos a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80) e de MHCII da seguinte maneira: realizamos uma estratégia de análise convencional onde foi construído um gráfico (Figura 4B) de distribuição pontual dos marcadores CD19 (FL3) *versus* CD80 (FL2) por exemplo, selecionado dentro da população delimitada no *gate* R1. Construímos o *gate* R2 delimitando a população duplo positiva (CD19⁺CD80⁺) e analisamos a expressão de MHCII dentro desta população, construindo histogramas de fluorescência específica, como exemplificado pelas Figuras 4C (MHCII-APC). Definimos a região de interesse de análise a partir da positividade de expressão da molécula, delimitado pela faixa M1. Com a análise estatística obtivemos o percentual de células em cada faixa de seleção, pelos valores da média de deslocamento da população no eixo X (*X mean*). Nos resultados, os valores percentuais foram corrigidos para número de células com base em cálculos específicos.

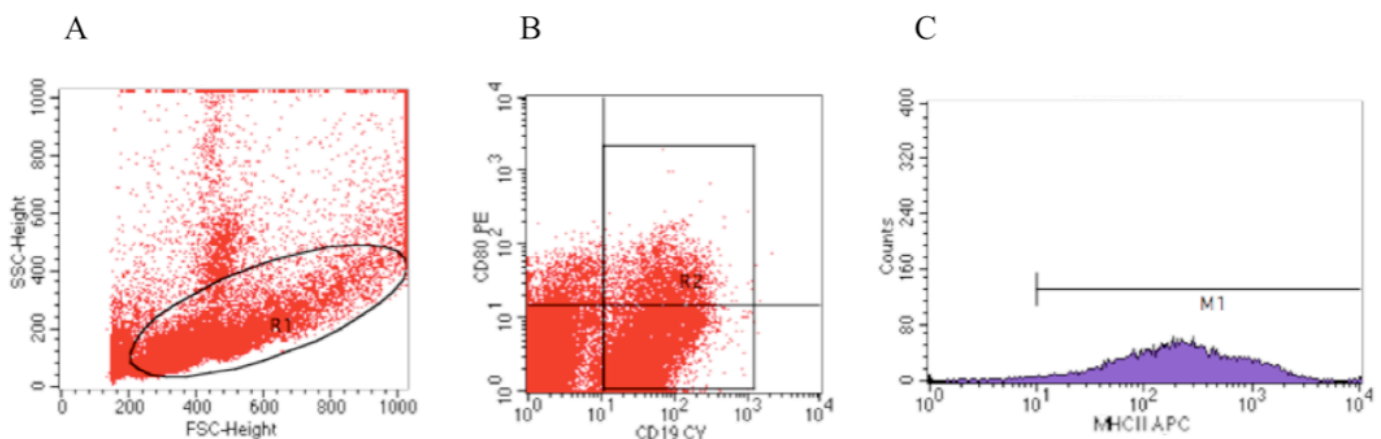


Figura 4: Estratégia de análise de linfócitos B. Os *Dot plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de células linfócitos B pela Citometria de Fluxo no programa CellQuest representam, em (A) tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) com *gate* (R1) para seleção da população de interesse e em (B), expressão CD19 x CD80 com *gate* (R2). Em (C) histograma para análise de MHCII na população resultante da combinação dos *gates* R1 e R2.

4- Identificação fenotípica de linfócitos T reguladores

De acordo com suas características morfométricas, linfócitos podem ser diferenciados de outras populações celulares por estarem localizados em uma determinada faixa de tamanho (FSC=200-400). Sabemos que linfócitos ativados – linfoblastos - aumentam de tamanho, desta forma, para garantir que estávamos contemplando também essas células, ampliamos a nossa faixa de seleção da população de interesse, selecionando, em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) a população entre 200-800 de FSC (*gate* R1), como demonstrado na Figura 5A.

Para uma caracterização imunofenotípica dos linfócitos T com perfil regulador, analisamos a expressão de várias moléculas de superfície em linfócitos T CD4⁺.

Para análise dos linfócitos T reguladores estimulados na periferia, utilizamos a marcação com CD25 e CD45RB, realizando a seguinte estratégia de análise: construímos um gráfico (Figura 5B), selecionado dentro da população delimitada no *gate* R1, de distribuição pontual (*dot plot*) dos marcadores CD4 (FL1) *versus* uma fluorescência não utilizada, como FL3. Nesse gráfico, fizemos um novo *gate* (R2) para selecionar a população positiva para a expressão da molécula CD4. Em seguida, combinando os *gates* R1e R2, fizemos um histograma (Figura 5C) de fluorescência 2 (FL2) para análise da expressão de CD45RB-PE, dentro da população de linfócitos CD4⁺. Fizemos um *gate* R3 na população com baixa expressão da molécula CD45RB^{low} (faixa entre 10¹ e 10²). Combinando os *gates* R1, R2 e R3 construímos um gráfico de distribuição pontual (*dot plot*) da molécula CD25 em Y (FL4) *versus* CD4 em X (FL1), como demonstrado na Figura 5D. Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ duplo-positivos CD45RB^{low}CD25⁺ no quadrante (UR-Upper Right).

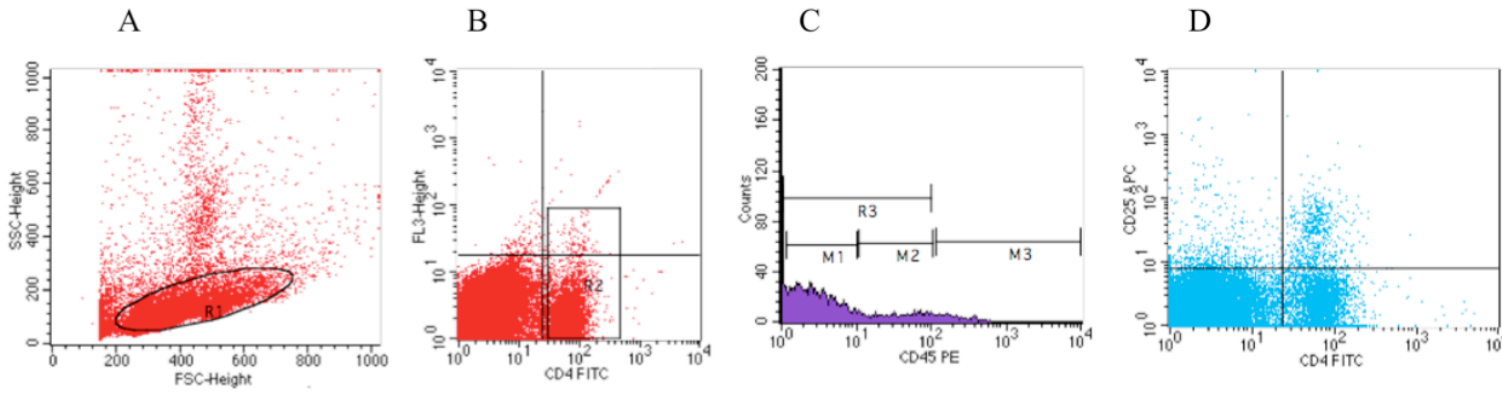


Figura 5: Estratégia de análise de linfócitos T reguladores $CD4^+CD45RB^{low}CD25^+$. Os *Dot plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de linfócitos T pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) com *gate* (R1) para seleção da população de interesse e, em (B) expressão CD4 x FL3 com *gate* (R2) para seleção da população $CD4^+$. Em (C), histograma para análise da expressão da molécula CD45RB com *gate* R3 para selecionar células expressando CD45 em baixa fluorescência ($CD45RB^{low}$) e em (D) *dot plot* resultante da combinação dos *gates* R1, R2 e R3 para análise da expressão de CD25 dentro da população de linfócitos T $CD4^+CD45RB^{low}$.

Para análise dos linfócitos T reguladores naturais, utilizamos a marcação com $Foxp3^+$, realizando a seguinte estratégia de análise: em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), selecionamos a população entre 200-800 de FSC (*gate* R1), como demonstrado na Figura 6A. Em seguida, construímos um novo gráfico de distribuição pontual (Figura 6B), selecionado dentro da população delimitada no *gate* R1, de fluorescência 1 em FL1 (CD4-FITC) *versus* fluorescência 2 em FL2 (Foxp3-PE). Com a análise estatística obtivemos a porcentagem de linfócitos T $CD4^+Foxp3^+$ no quadrante (UR).

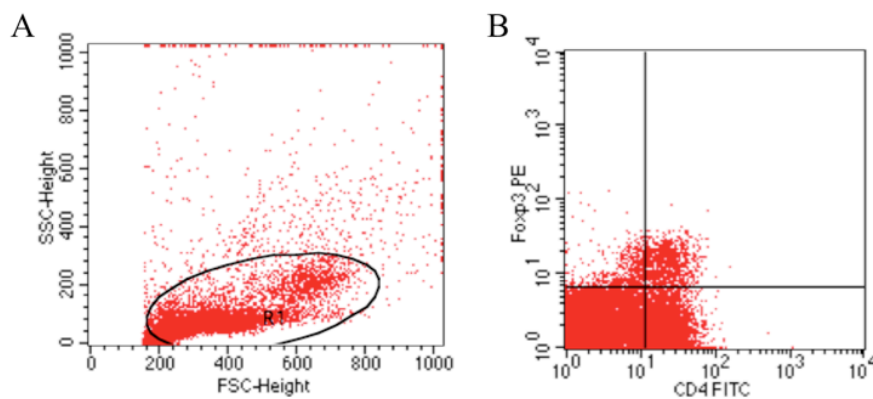


Figura 6: Estratégia de análise de linfócitos T reguladores $CD4^+Foxp3^+$. Os *Dot plots* obtidos após aquisição e análise dos dados de imunofenotipagem de linfócitos T pela Citometria de Fluxo no programa *CellQuest* representam, em (A) tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) com *gate* (R1) para seleção da população de interesse e, em (B) expressão CD4 x Foxp3 analisada dentro da população selecionada no *gate* R1.

4. RESULTADOS

Para fins de uma melhor compreensão dos resultados, estes serão apresentados em 4 blocos distintos seguindo a divisão proposta nos objetivos específicos. Esta, por sua vez, baseou-se na caracterização do efeito profilático da administração de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, sobre as alterações macroscópicas, morfológicas, imunológicas e funcionais ocasionadas pela ingestão aguda de EtOH.

As barras brancas representam os grupos que receberam água i.g. (Controle) e as barras escuras representam os grupos que receberam etanol i.g. (EtOH). Os grupos tratados com *L. lactis* selvagem serão denominados WT LL, os grupos tratados com *L. lactis* secretor de Hsp65 serão denominados Hsp65 LL, e por fim os grupos que receberam apenas o meio de cultura serão considerados sem tratamento e, portanto denominados ST.

ETAPA I – Avaliações Macroscópicas

4.1. A ingestão de EtOH não interferiu no peso corpóreo dos animais.

Sabe-se que o consumo abusivo de álcool pode levar o indivíduo a uma perda de peso corpóreo devido a desordens de motilidade, má digestão e má absorção. A fim de se avaliar a interferência da ingestão de EtOH no peso corpóreo, os animais foram pesados semanalmente do início ao fim do experimento. O consumo agudo de EtOH na dose administrada não afetou o peso corpóreo. Os resultados foram expressos em gramas (Figura 7).

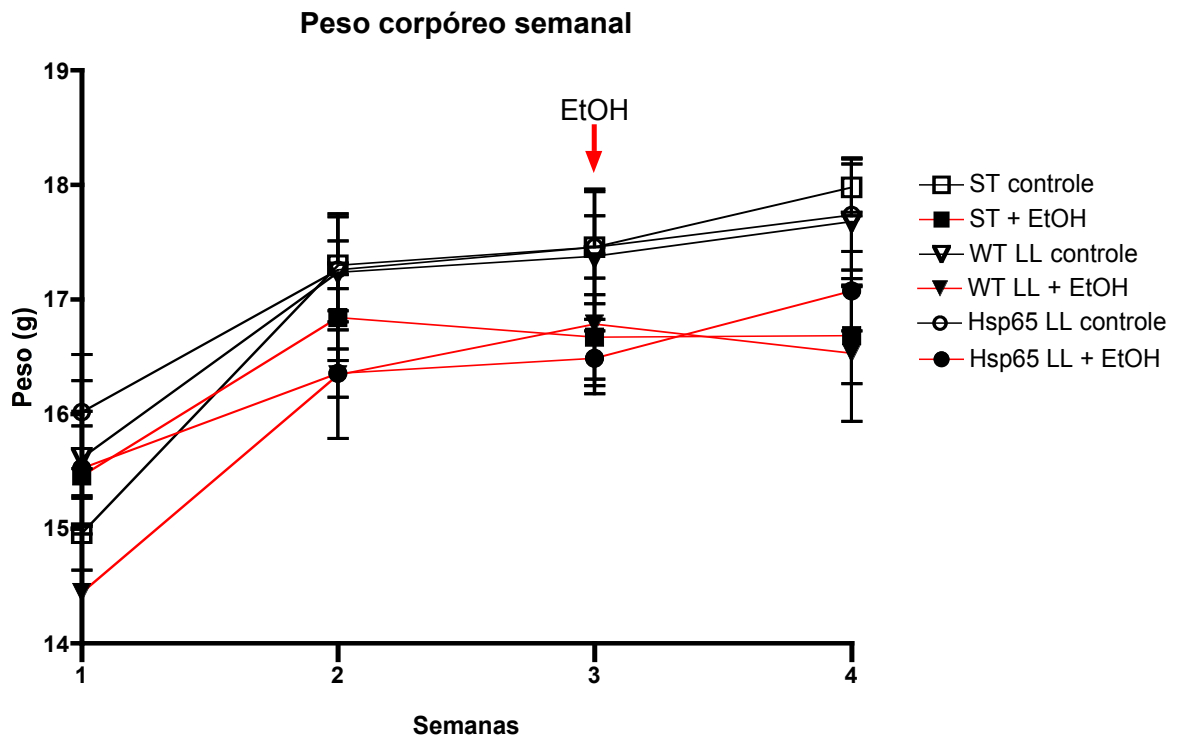


Figura 7: Avaliação do peso corpóreo semanal. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento - ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. Os símbolos representam as médias (+/-SEM) dos valores de cada grupo.

4.2. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, não impediu a gastromegalia induzida pelo consumo agudo de EtOH.

O estômago é um importante órgão do sistema digestivo e alterações patológicas podem resultar em alterações funcionais. De fato, foi observado gastromegalia nos animais que ingeriram EtOH, provavelmente devido ao acúmulo de gases. Essa gastromegalia pode ser comprovada pelo aumento do peso (Figura 8A) e tamanho gástrico (Figura 8B). O tratamento com *L. lactis*, secretor de HSP (Hsp65 LL) ou não (WT LL) não interferiu nesses parâmetros.

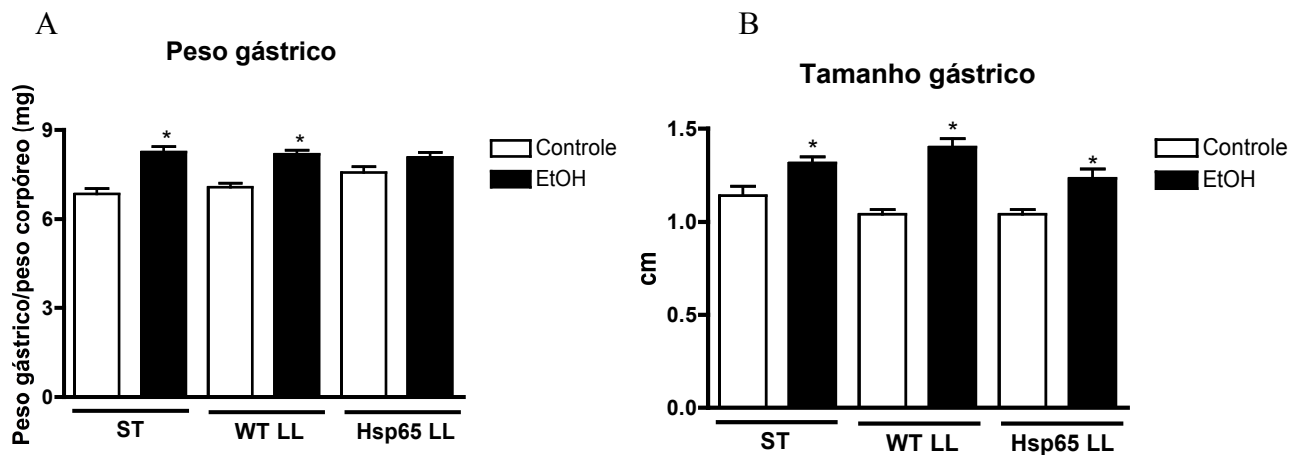


Figura 8: Avaliação do peso e tamanho gástrico. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento - ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As barras representam as médias (+/-SEM) dos valores de cada grupo. Os resultados foram calculados pela fórmula (peso gástrico/peso corpóreo) (A) ou expressos em cm (B). N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle. ANOVA-Test, T test.

4.3. O consumo de EtOH não alterou os parâmetros macroscópicos da mucosa gástrica.

A ingestão de EtOH pode afetar diretamente a mucosa gástrica, o que ocasionalmente leva a um quadro de lesões macroscopicamente visíveis. Tais análises foram realizadas nos órgãos a fresco. Após lavagem do conteúdo gástrico, foi feita uma abertura ao longo da curvatura maior do estômago, em seguida este foi estendido delicadamente sobre um papel filtro e imagens foram capturadas. Foi constatado que animais que ingeriram EtOH em todos os grupos testados apresentaram aparência semelhante aos animais controle, uma vez que a mucosa de ambos os grupos apresentava-se íntegra, sem pontos de erosão ou eritema (Figura 9)

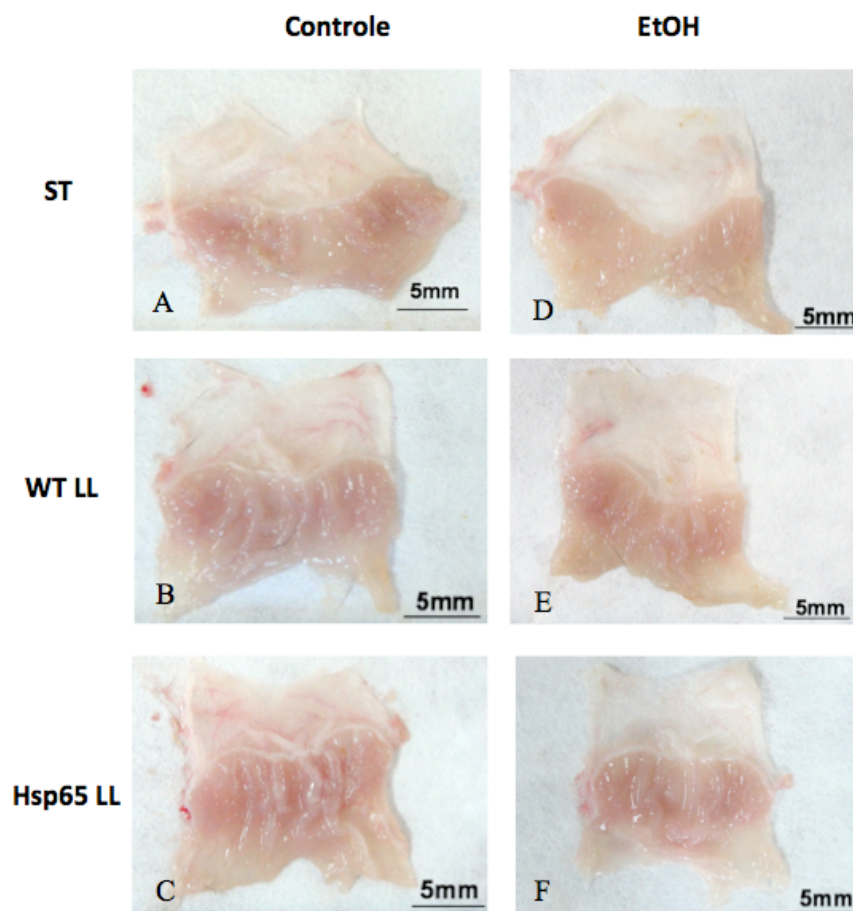


Figura 9: Avaliação macroscópica gástrica. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água pela mesma via (grupo controle) durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. Para verificar a presença de hiperemia os órgãos foram avaliados macroscopicamente a fresco. A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente.

ETAPA II – Avaliações morfo-funcionais

4.4. A ingestão aguda de EtOH não alterou os parâmetros morfológicos da mucosa gástrica.

A ingestão de substâncias potencialmente danosas como o álcool, embora possa não revelar diretamente danos macroscópicos, pode levar a prejuízos microscópicos na mucosa gástrica. Tais lesões podem resultar em alterações morfo-funcionais identificadas pela presença de pontos erosivos e atrofia da mucosa, presença de infiltrado inflamatório e edema da submucosa. Para análise dessas características cortes de 4 μm do estômago foram obtidos e corados com HE. As análises foram realizadas em aumentos de 100X e 40X, representada em tamanho reduzido no canto esquerdo das imagens. A administração de EtOH no tempo e na dose testada não alterou a morfologia da mucosa gástrica (Figura 10).

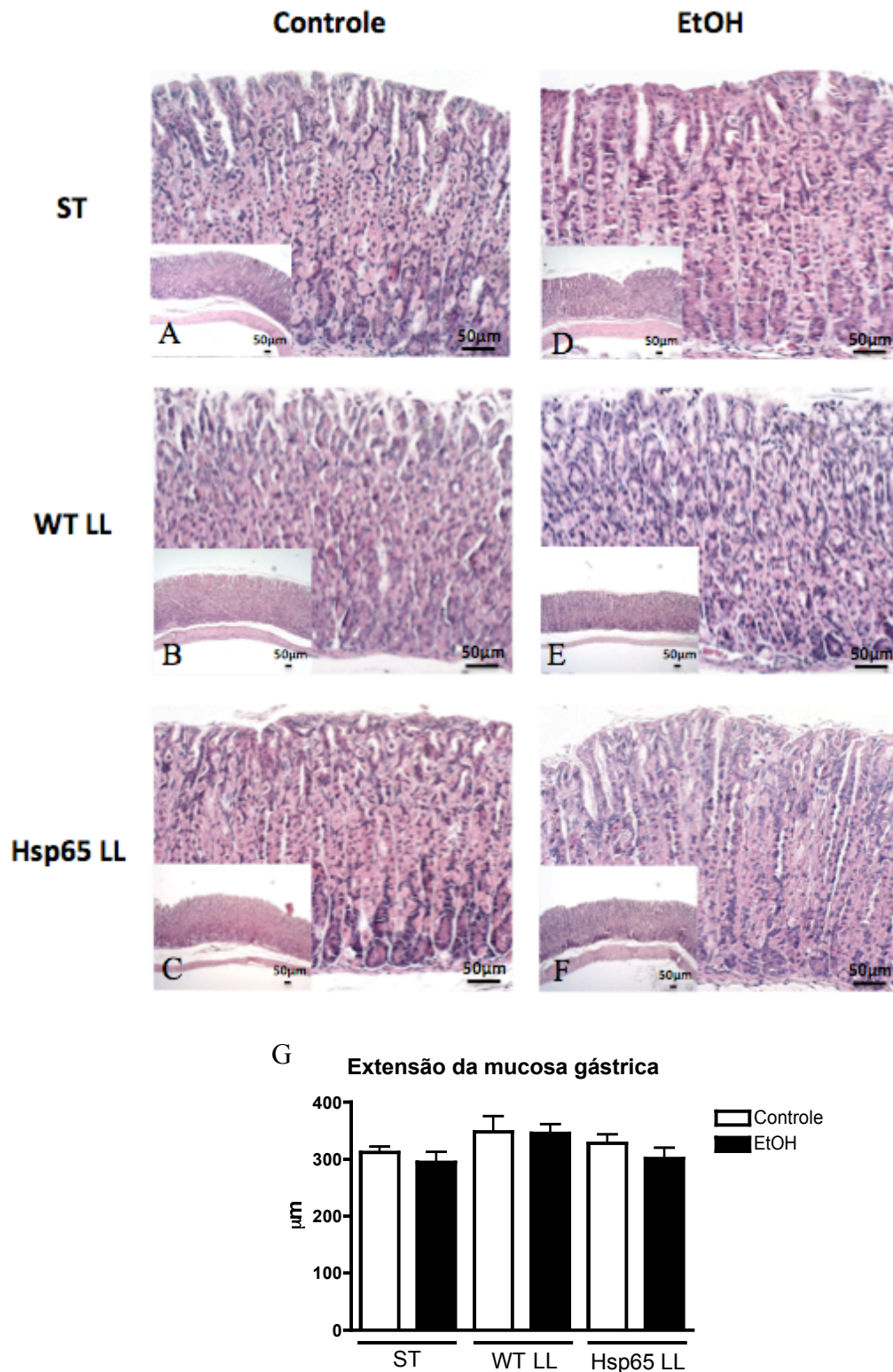


Figura 10: Avaliação histopatológica gástrica. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. Para análise histopatológica os órgãos foram avaliados em aumento de 100X (HE). A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. G) Extensão da mucosa gástrica avaliada por meio de 3 medições/animal. As barras representam as médias (+/-SEM) dos valores de cada grupo N= 6 grupo. ANOVA-Test, T test.

4.5. A morfologia do Jejuno proximal permaneceu inalterada frente à ingestão aguda de EtOH.

O consumo de EtOH seja de forma crônica ou aguda pode resultar em perda de epitélio nas bordas das vilosidades, erosões hemorrágicas e infiltrado inflamatório atípico na mucosa intestinal. Para análise dessas características cortes de 4 μm do jejuno proximal (JP) foram obtidos e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As análises realizadas em aumentos de 100X revelaram que a administração de EtOH não alterou a histologia do JP, uma vez que a integridade da superfície epitelial e dos tecidos adjacentes estavam mantidas (Figura 11).

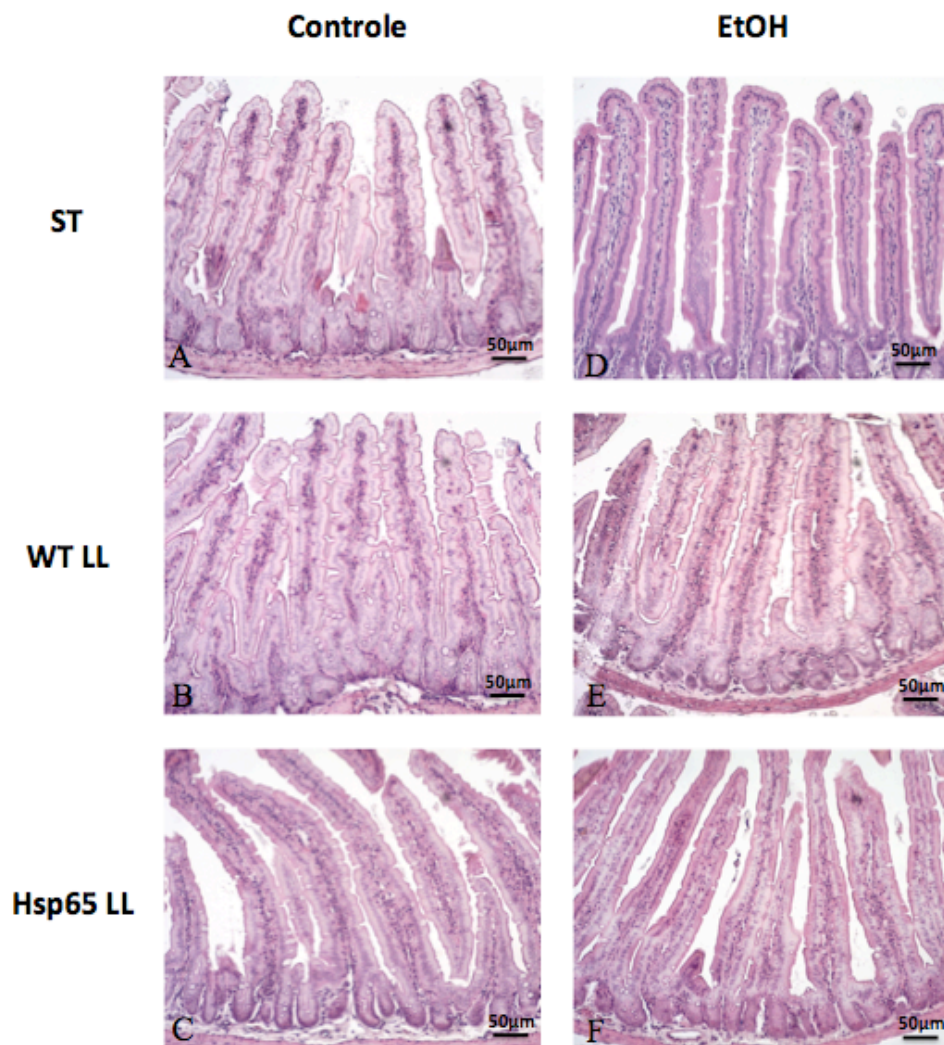


Figura 11: Avaliação morfológica do jejuno proximal. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. Análises morfológicas do jejuno proximal foram realizadas em aumento de 100X (HE). A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente.

4.6. O consumo agudo de EtOH provocou uma degeneração hepática reversível.

O consumo de álcool em excesso, por longos períodos de tempo, pode causar um considerável dano ao fígado com resultados potencialmente fatais. Para investigar os efeitos da ingestão aguda de EtOH no parênquima hepático, cortes de 4 μm de amostras do fígado foram obtidos e corados com HE. As análises foram realizadas em aumento de 100X. A ingestão de EtOH, mesmo que por um pequeno período de tempo, foi capaz de provocar extensas áreas de degeneração hidrópica, representada pela presença de vacúolos citoplasmáticos, mantendo-se a integridade do núcleo (Figuras 12D, E e F). De forma interessante, a ingestão prévia de *L. lactis* secretor de Hsp65 foi capaz de reduzir o grau de degeneração, representado por uma menor presença de áreas vacuolizadas no interior dos hepatócitos (Figura 12G). Foi realizada a análise de alanina aminotransferase (ALT), enzima presente no interior do hepatócito. Quando ocorre a lesão celular, a ALT atinge a corrente sanguínea e seus níveis séricos podem ser mensurados. Como controle positivo de ALT foi utilizado soro de animal que recebeu uma sobredose de paracetamol, droga conhecida por provocar uma lesão hepática aguda considerável. Foi constatado que a ingestão de EtOH em todos os grupos testados não provocou danos celulares irreversíveis, pois os níveis de ALT encontravam-se dentro do limite esperado quando comparados ao controle positivo (Figura 12H).

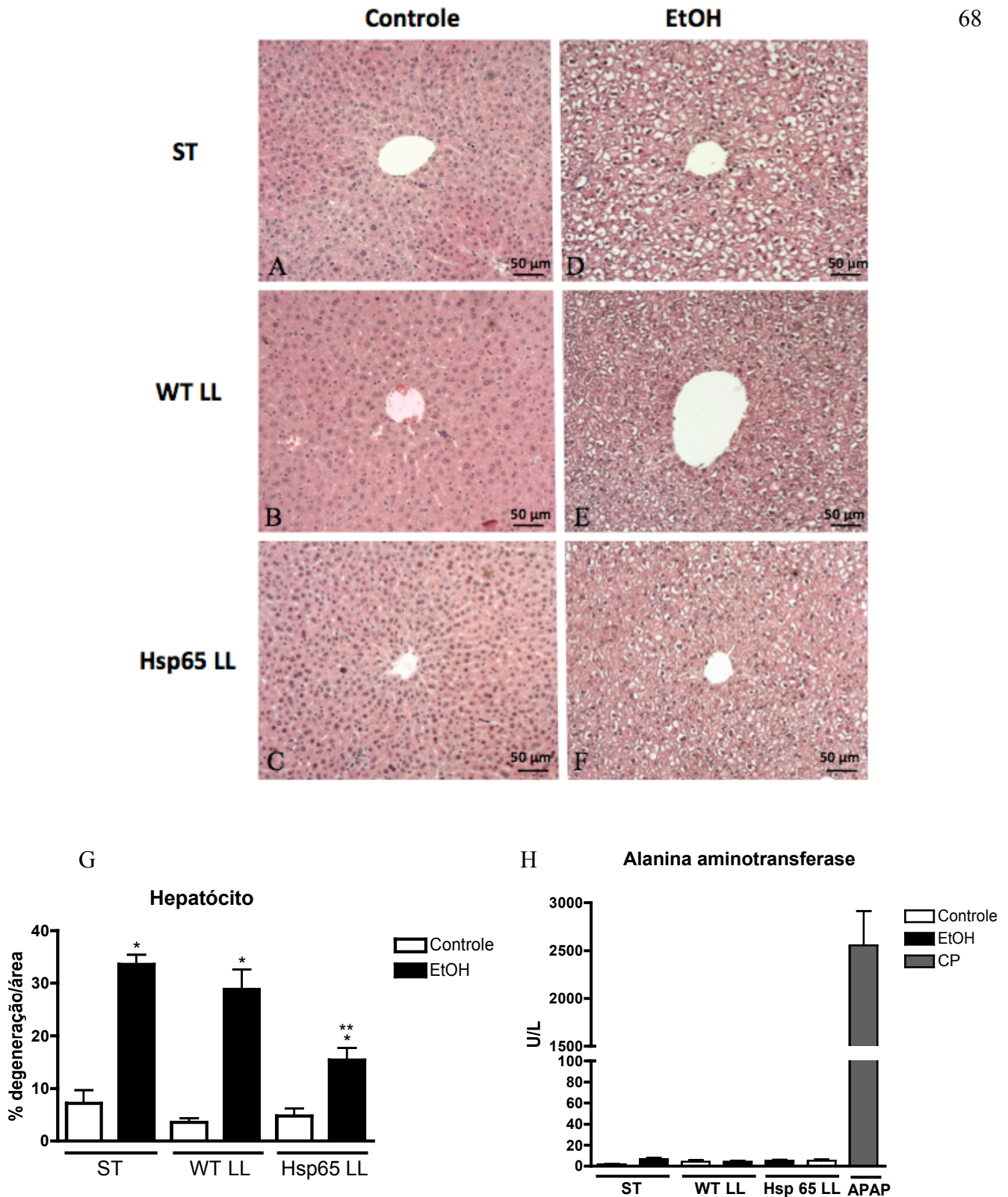


Figura 12: Avaliação histopatológica e bioquímica hepática. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. A avaliação histopatológica foi realizada em aumento de 100X (HE). A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. G) Porcentagem de degeneração hepática. H) Níveis de alanina aminotransferase sérica. Como controle positivo (CP) foi utilizado soro de animal com lesão hepática aguda induzida por paracetamol (APAP). As barras representam as médias (+/-SEM) por grupo. N= 6 grupo. ANOVA-Test, T test.

4.7. A ingestão prévia de *L. lactis* produtor de Hsp65 contribuiu para a redução da produção de muco na mucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.

O muco é um importante componente do trato gastrointestinal, pois atua como uma barreira física contra agentes tóxicos e nocivos. O aumento ou a redução de sua secreção pode estar relacionado a estímulos ou processos patológicos. A coloração de PAS (*Periodic Acid Schiff*), referência para mucinas neutras, foi realizada em lâminas com cortes de 4 µm para quantificar o muco produzido por células mucóides, presentes no epitélio gástrico (Figura 13A-F). Foi verificado que a ingestão de EtOH em animais sem pré-tratamento com a bactéria resultou em um aumento de 62% no muco produzido quando comparado a seu respectivo controle. De forma interessante esse aumento não foi verificado em animais do grupo EtOH tratados com ambas as linhagens bacterianas, quando comparados a seus respectivos controles. Mas nota-se que há uma tendência à redução do efeito do álcool sobre a produção de muco na mucosa gástrica quando os animais são pré-tratados com as linhagens bacterianas, principalmente os que recebem *L. lactis* produtor de Hsp 65 (Figura 13G).

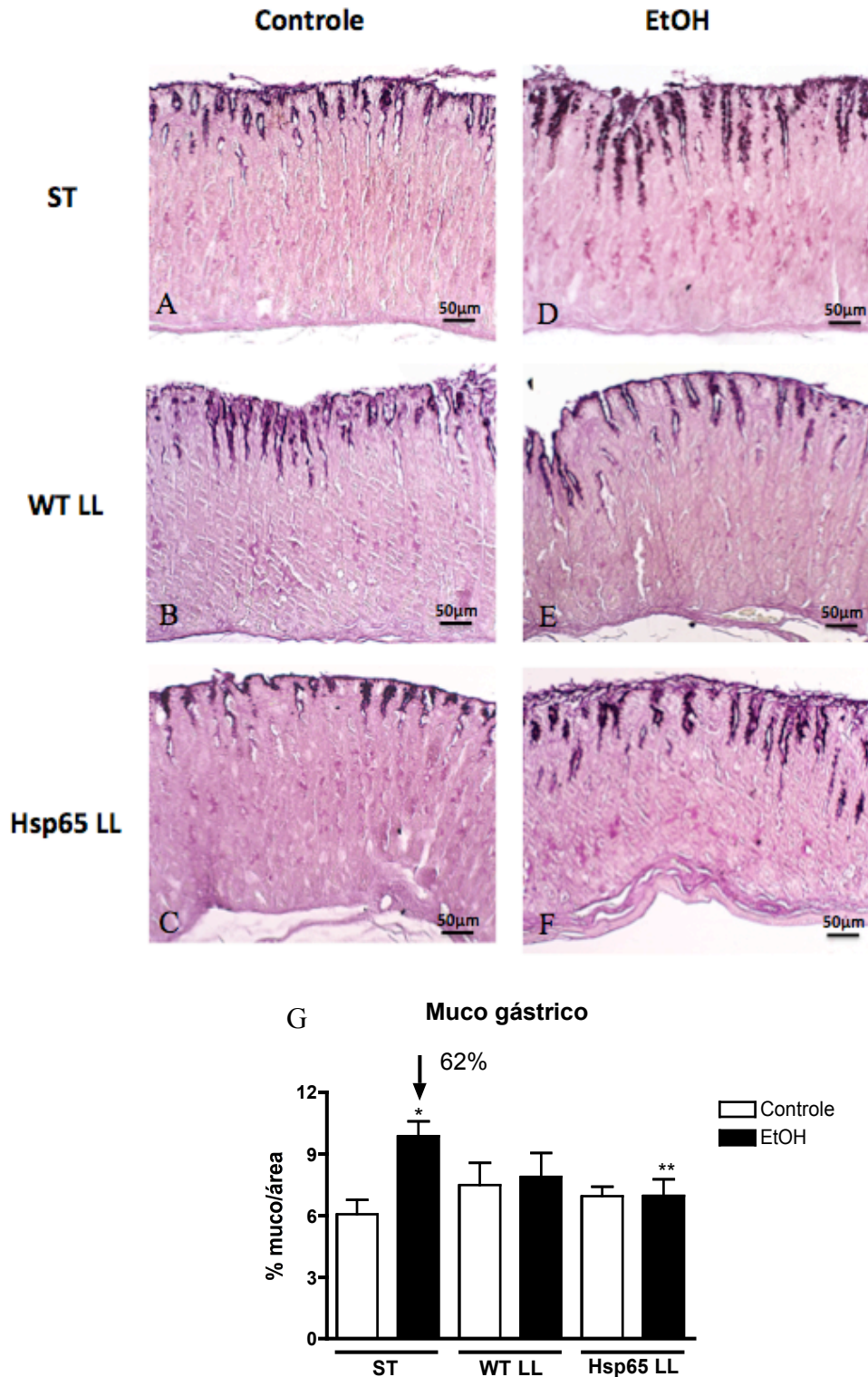


Figura 13: Avaliação histológica e quantitativa do muco produzido pelas células mucoides gástricas. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. A quantificação de muco gástrico foi realizada em aumento de 100X por meio técnica de PAS. A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. G) Foram analisados 3 campos aleatórios da porção do corpo gástrico/animal. As barras representam as médias (+/-SEM) dos valores de cada grupo. N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.8. O consumo de EtOH não afetou a produção de muco pelas células caliciformes intestinais.

A coloração de PAS, referência para mucinas neutras, foi realizada em lâminas com cortes de 4 μm para quantificar o muco produzido pelas células caliciformes presentes no epitélio intestinal. As análises realizadas em aumento de 100X revelaram que não houve interferência do consumo de EtOH na secreção de muco por estas células (Figura 14).

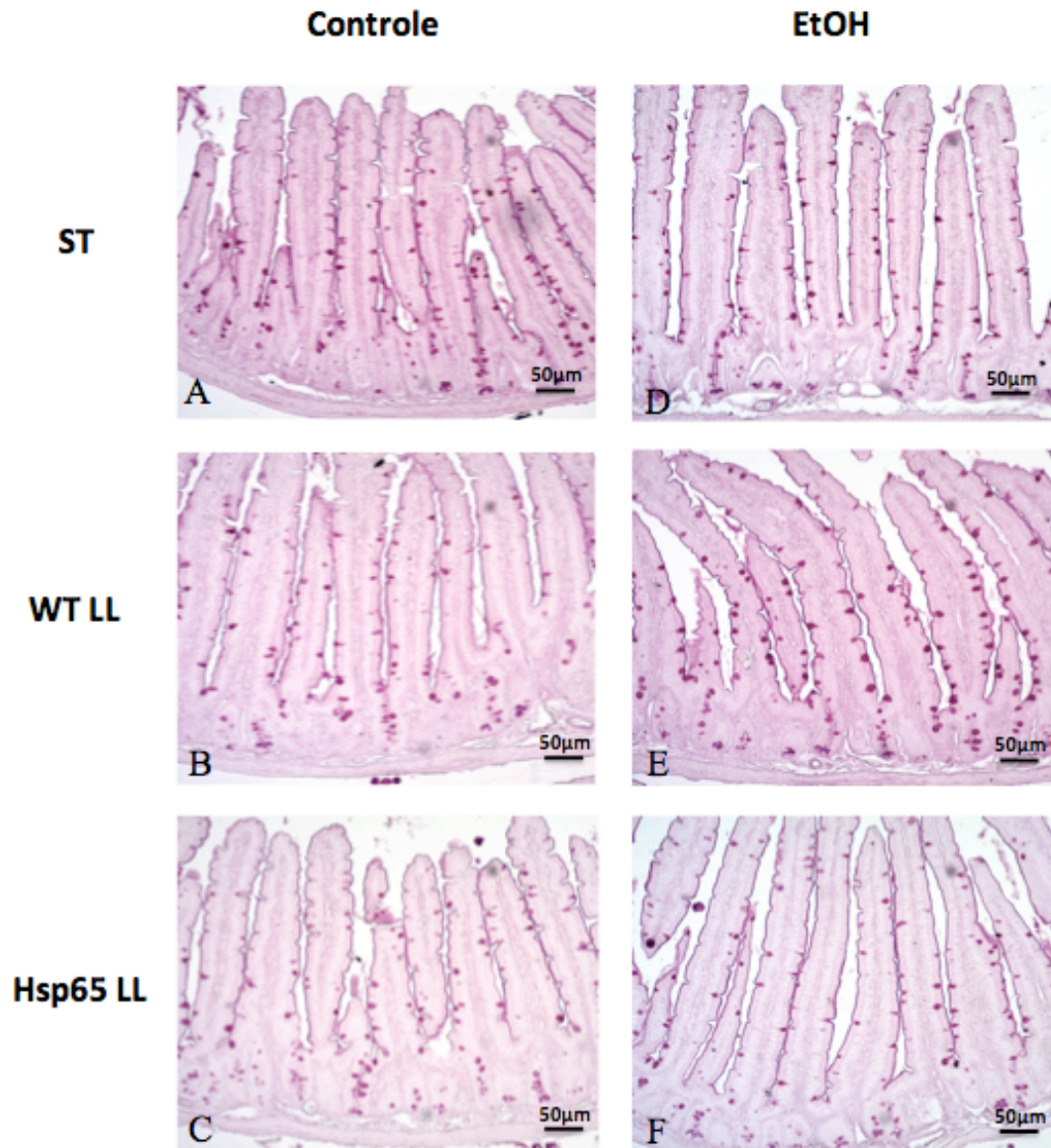


Figura 14: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. A análise qualitativa de muco intestinal foi realizada em aumento de 100X por meio técnica de PAS. A, B e C) Grupo controle sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente. D, E e F) Grupo EtOH sem tratamento, tratado com WT LL ou Hsp65 LL, respectivamente.

4.9. A ingestão prévia de *L. lactis* selvagem contribuiu com a redução do número de mastócitos na submucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.

Os mastócitos, presentes em mucosas, epitélios e tecidos subendoteliais, são células conhecidas por liberar mediadores químicos após desgranulação como histaminas e outros agentes vasodilatadores. A coloração por Azul de toluidina, conhecida por evidenciar a propriedade de metacromasia apresentada por essas células, foi realizada em cortes de 4 μm de amostras do estômago. Os mastócitos presentes na submucosa gástrica foram contados em sua totalidade em aumento de 200X. Como observado na Figura 15, o tratamento com EtOH não resultou em alterações em níveis quantitativos no número de mastócitos da submucosa gástrica, uma vez que não houve diferença em relação ao grupo controle. Porém, o tratamento prévio de animais que ingeriram EtOH com *L. lactis* selvagem (WT) revelou uma redução no número destas células quando comparados a seu respectivo controle.

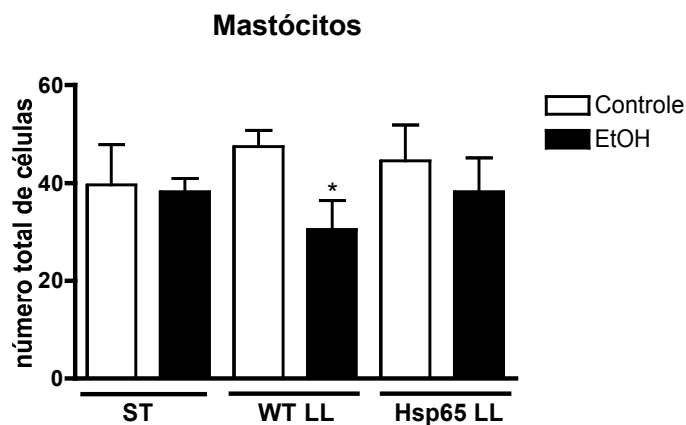


Figura 15: Contagem total de mastócitos na submucosa gástrica. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As células de interesse foram visualizados por meio da técnica Azul de toluidina em aumento de 200X. As barras representam as médias (+/-SEM) por grupo da contagem total de mastócitos presentes na submucosa gástrica. * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. N= 6 grupo. ANOVA-Test, T test.

ETAPA III – Avaliações Imunológicas

4.10. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, impediu o aumento na secreção de IgA no muco gástrico, observada nos animais tratados com EtOH.

A IgA secretória (IgAs) funciona como uma primeira linha de defesa na proteção do epitélio gastrointestinal contra toxinas e patógenos. Plasmócitos presentes na lâmina própria secretam IgA e esta é transportada via células epiteliais em direção ao muco no lúmen do trato gastrointestinal. A dosagem desta imunoglobulina foi realizada no muco coletado do conteúdo gástrico e mensurada pelo teste de ELISA. Foi demonstrado que os animais tratados com EtOH apresentaram uma maior produção e secreção de IgA no lúmen gástrico quando comparados com os respectivos controles (Figura 16). Interessantemente o pré-tratamento dos animais com as linhagens bacterianas não impediu nesse aumento. Entretanto, fica claro que parece haver uma tendência (apesar de não ser estatisticamente significativo) a uma redução na produção de IgA nos animais do grupo EtOH que foram pré-tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65.

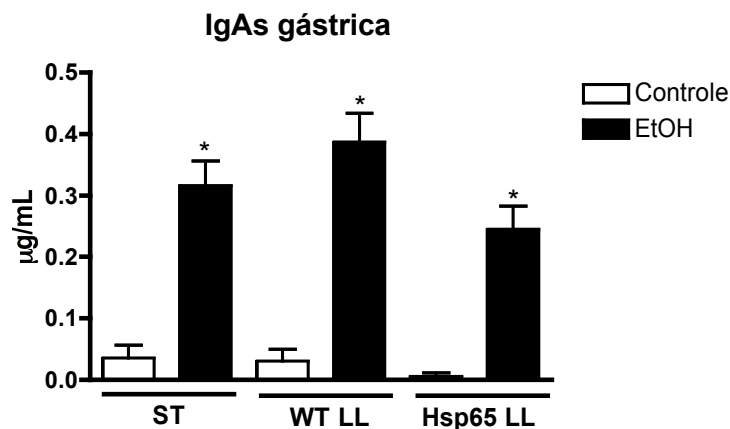


Figura 16: Avaliação do muco e IgAs gástrica. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As barras representam as médias (+/-SEM) dos níveis de IgAs do muco gástrico quantificados por meio da técnica de ELISA. Os resultados foram comparados a uma curva padrão obtida a partir da diluição de concentrações conhecidas da imunoglobulina. N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle. ANOVA-Test, T test.

4.11. O pré-tratamento oral com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, contribuiu para potencializar a produção de IgA secretória no muco intestinal dos animais tratados com EtOH.

A dosagem IgAs foi realizada no muco coletado do conteúdo intestinal e mensurada por ELISA. Foi demonstrado que o consumo de EtOH em animais sem tratamento resultou em um aumento na secreção desta imunoglobulina (Figura 17). De forma interessante, este aumento também foi verificado em animais controles que consumiram apenas os meios de cultura contendo ambas as linhagens bacterianas, quando comparados ao controle sem tratamento. Em destaque, o grupo EtOH pré-tratado com *L. lactis* WT revelou ainda uma capacidade aumentada da produção de IgAs quando comparado ao grupo EtOH sem tratamento.

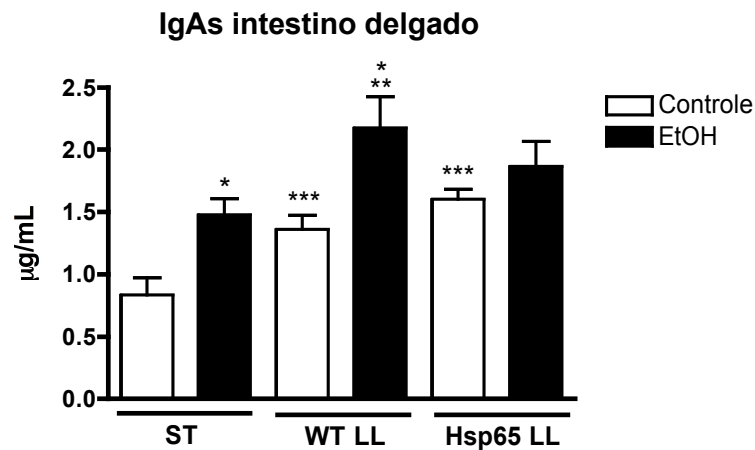


Figura 17: Avaliação de IgAs no intestino delgado. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. A dosagem de sIgA foi realizada por meio da coleta do muco pela lavagem do órgão com salina e quantificada por meio da técnica de ELISA. Os resultados foram comparados a uma curva padrão obtida a partir da diluição de concentrações conhecidas desta imunoglobulina. As barras representam as médias (+/-SEM) dos valores de cada grupo. N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento; ***p<0,05 em relação ao grupo controle sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.12. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, contribui para uma redução significativa dos níveis séricos de IgE total dos animais tratados com EtOH.

A IgE é uma importante imunoglobulina envolvida principalmente em processos alérgicos. Nosso grupo relatou previamente que o consumo de EtOH neste modelo foi relacionado ao aumento nos níveis séricos de IgE total (ANDRADE *et al.*, 2006). Soro dos animais obtidos após centrifugação sanguínea foram submetidos ao teste de ELISA para análise de IgE total. De forma similar ao trabalho descrito, foram encontrados altos níveis circulantes desta imunoglobulina nos animais tratados com EtOH (Figura 18). Surpreendentemente, ambas as linhagens bacterianas administradas previamente a ingestão de EtOH, foram capazes de reduzir de forma significativa os parâmetros encontrados, sendo que o pré-tratamento com *L. lactis* selvagem (WT) levou a uma redução de 65% dos níveis de IgE total séricos, e *L. lactis* Hsp65, 89% dos níveis dessa imunoglobulina, chegando a alcançar valores próximos ao do grupo controle (sem nenhum tratamento).

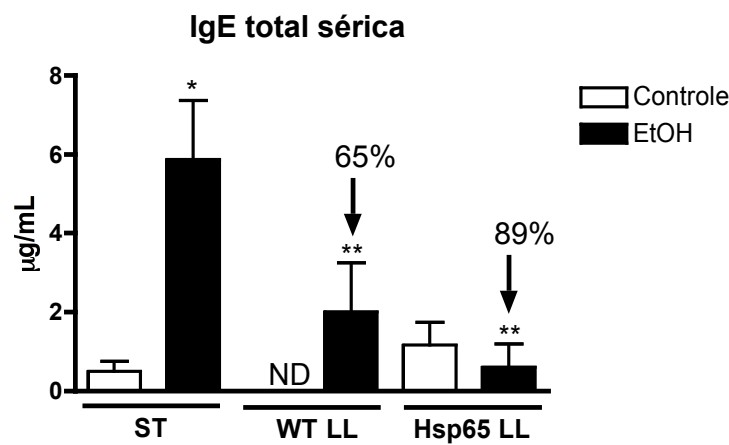


Figura 18: Avaliação dos níveis séricos de IgE total. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As barras representam as médias (+/-SEM) dos níveis séricos de IgE total quantificados por meio da técnica de ELISA. Os resultados foram comparados a uma curva padrão obtida a partir da diluição de concentrações conhecidas desta imunoglobulina. N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.13. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, contribuiu com uma modulação dos níveis de IL-4 na mucosa gástrica dos animais tratados com EtOH.

Citocinas são mediadores em diversos eventos imunológicos e fortes indicativos de atividade celular. Uma vez verificado um aumento no perfil sérico de IgE total, e associado ao fato de que este aumento pode estar relacionado ao perfil de citocinas tanto locais quanto sistêmicas, foi realizada a análise *in situ* dos níveis dessas importantes mediadoras da atividade imunológica. Para análise deste perfil, foi obtido após centrifugação, o sobrenadante dos extratos de tecidos de amostras do estômago. A concentração local de citocinas foi mensurada por ELISA. A Figura 19 mostra que o consumo de EtOH modificou o padrão de secreção de IL-4 e IL-10. A produção de IL-4 encontrava-se elevada em animais EtOH sem tratamento em relação a seu respectivo controle e de forma interessante, estes níveis foram reduzidos a níveis basais em animais do grupo EtOH tratados previamente com ambas as linhagens bacterianas (Figura 19A). Os níveis de IL-10 foram reduzidos em todos os grupos que receberam EtOH, de forma que os tratamentos empregados não interferiram nesses parâmetros (Figura 19B). Os níveis de IL-2 e IFN- γ não foram afetados pela ingestão de EtOH (Figura 19C e D respectivamente).

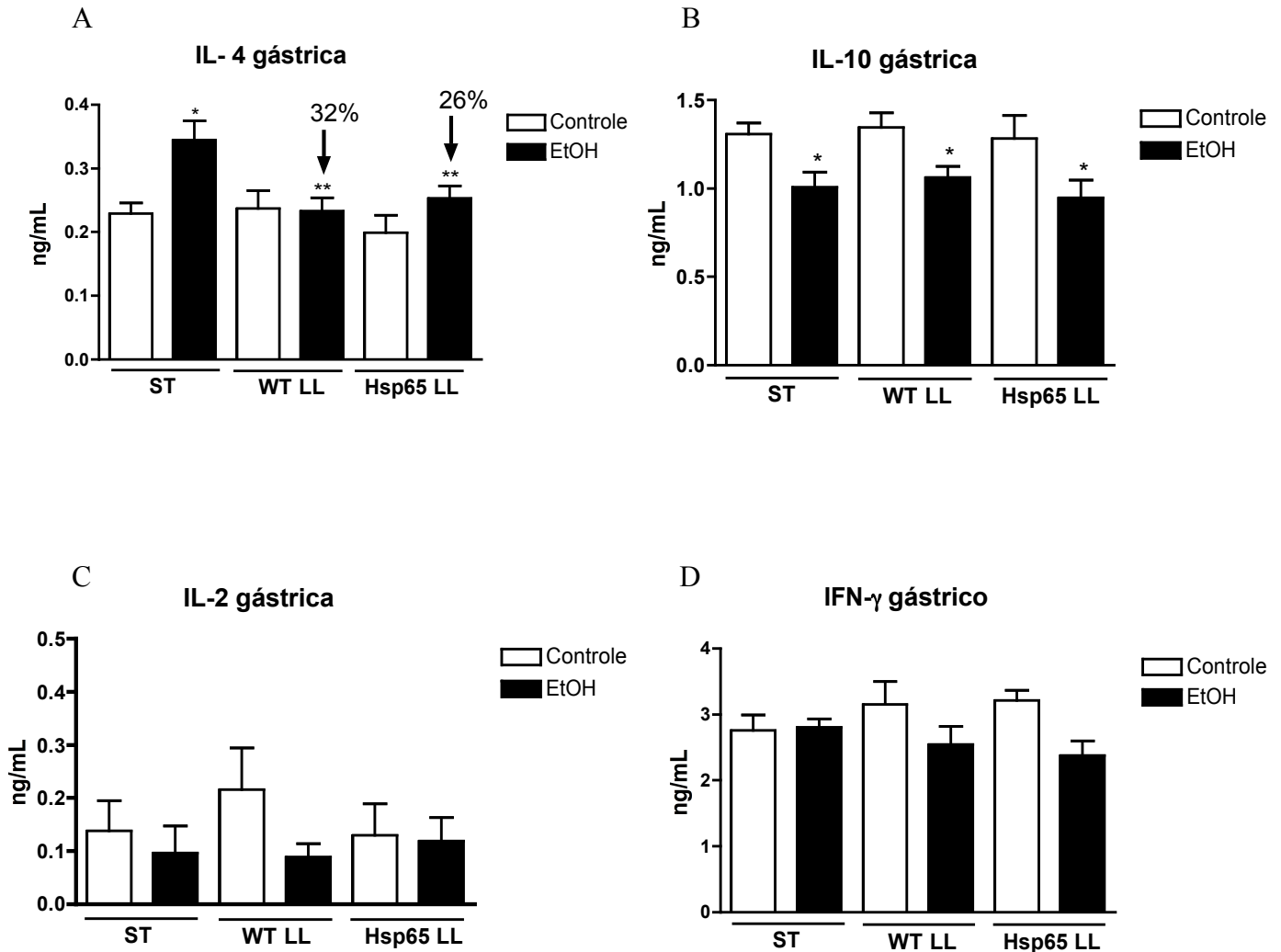


Figura 19: Avaliação *in situ* da produção de citocinas gástricas. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As barras representam as médias (+/-SEM) dos níveis de citocinas gástricas quantificadas por ELISA. IL-4 (A), IL-10 (B), IL-2 (C) e IFN- γ (D). Foram utilizadas curvas padrões obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. N= 6 grupo. * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.14. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, contribuiu para uma modulação dos níveis de IL-4 e IL-10 no Jejuno proximal dos animais tratados com EtOH.

Para análises dos perfis de citocinas *in situ* foram obtidos após centrifugação, os sobrenadantes dos extratos de tecidos de amostras do JP. A concentração local de citocinas foi mensurada por ELISA. Os dados revelaram um aumento significativo na produção de IL-4 (Figura 20A) e IL-10 (Figura 20B) mediante exposição ao EtOH, quando comparados a seus respectivos controles. Ambos os tratamentos bacterianos empregados previamente a ingestão de EtOH restauraram a níveis basais estas citocinas.

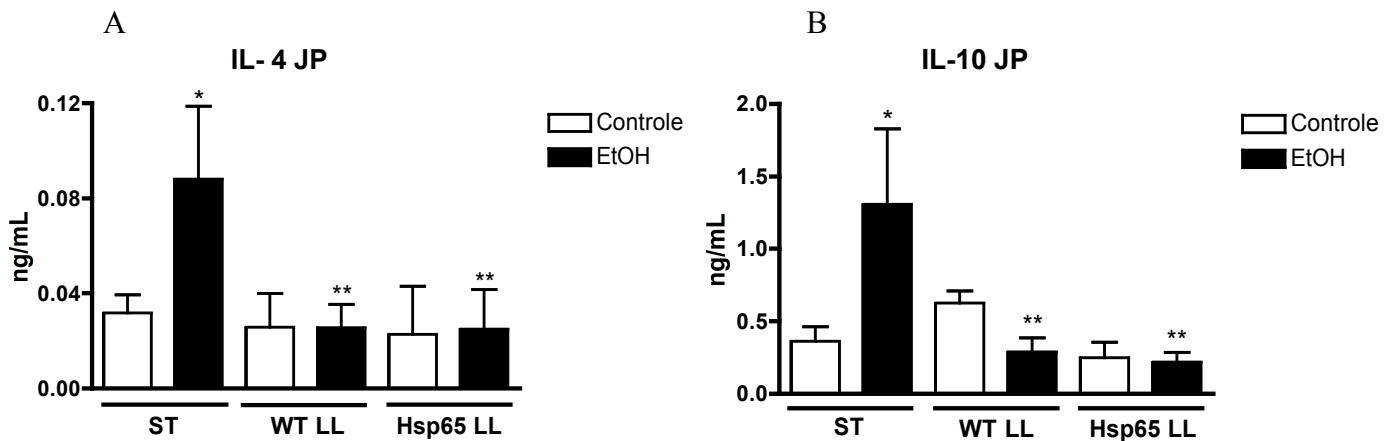


Figura 20: Avaliação *in situ* da produção de citocinas do jejuno proximal. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As barras representam as médias (+/-SEM) dos níveis de citocinas intestinais quantificadas por ELISA. IL-4 (A) e IL-10 (B). Foram utilizadas curvas padrões obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. N= 6 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.15. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de macrófagos ativados no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.

Os macrófagos, como importantes células apresentadoras de antígenos, apresentam em sua superfície receptores e moléculas capazes de estimular e ativar linfócitos T, além de outros ligantes que reconhecem diversos antígenos. Desta forma, a identificação fenotípica de macrófagos ativados, em linfonodo mesentérico (LM) e baço, foi feita pela marcação com anticorpos anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86 e anti-MHC II. O número de células expressando os marcadores citados foi avaliado pela citometria de fluxo.

Os resultados do LM e baço mostraram que o número de macrófagos (CD14⁺) ativados, identificados pela expressão de CD80, CD86 e MHCII, não foi alterado após a ingestão de EtOH nos animais sem tratamento (que não entraram em contato com a bactéria), quando comparado a seus respectivos controles (Figura 21). Entretanto, a ingestão prévia de bactérias foi suficiente para provocar significativas modificações no número de macrófagos ativados nesses órgãos após o consumo de EtOH pelos animais. Observou-se uma redução nos níveis de macrófago expressando MHCII (CD14⁺MHCII⁺) no LM nos grupos que receberam *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65 (Figura 21B). Já no baço as alterações foram ainda mais marcantes uma vez que houve um significativo aumento de macrófagos expressando CD80 (CD14⁺CD80⁺) nos animais previamente tratados pela via oral *L. lactis* WT (Figura 21A) e uma redução no número de macrófagos expressando MHCII (CD14⁺MHCII⁺) após a ingestão de *L. lactis* produtor de Hsp65, nos animais tratados com EtOH quando comparados a seu respectivo controle (Figura 21B). O número de macrófagos expressando o CD86 (CD14⁺CD86⁺) mostrou-se aumentado no baço de animais do grupo EtOH que foram tratados previamente com *L. lactis* WT e reduzida no grupo pré-tratado com *L. lactis* Hsp65, quando comparados a seus respectivos controles. No LM não houve diferença em nenhum dos grupos analisados (Figura 21C).

Linfonodo mesentérico

Baço

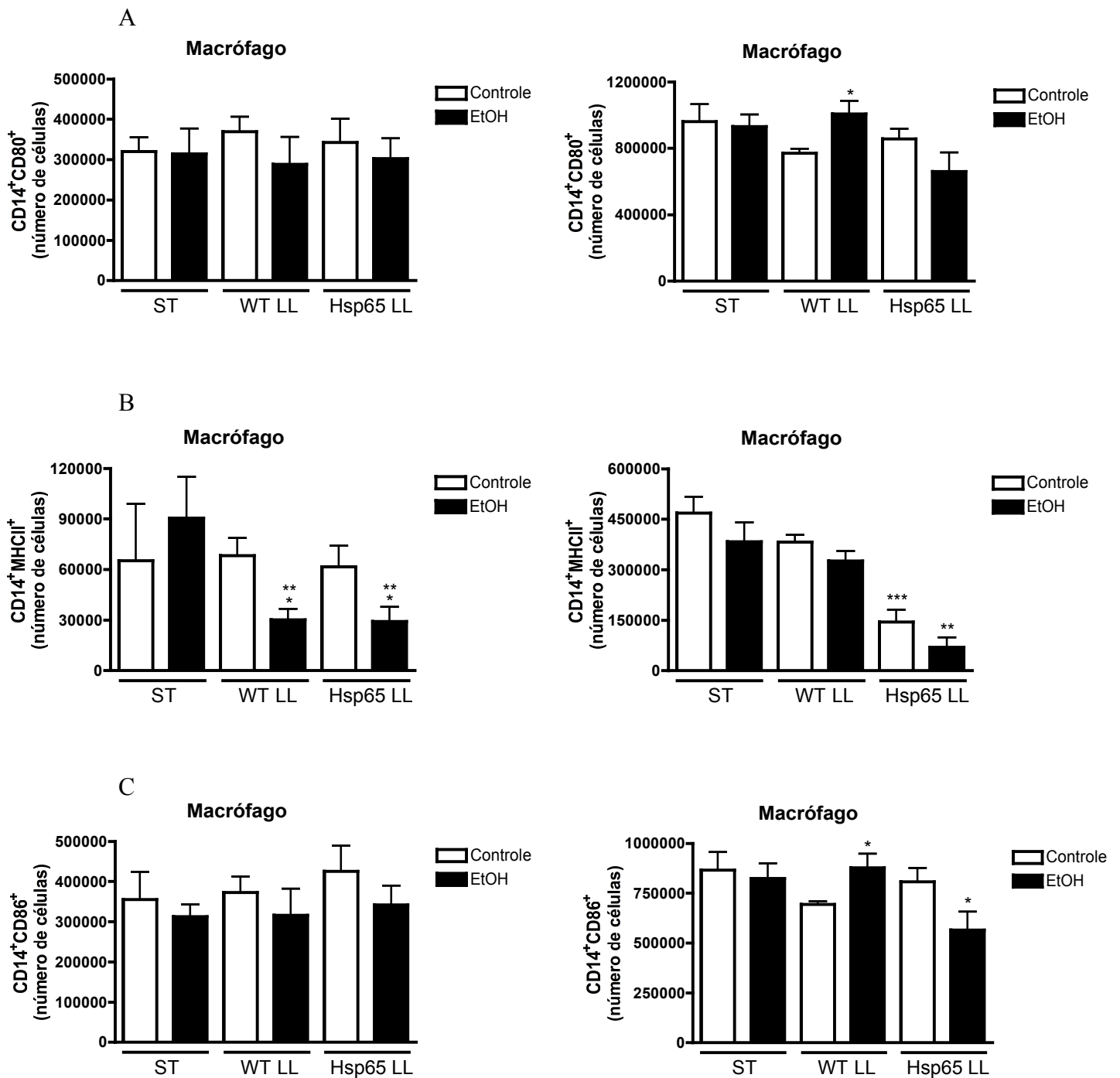


Figura 21: Avaliação de macrófagos no baço e linfonodo mesentérico. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As células extraídas do baço e LM foram analisadas por citometria de fluxo. O número de células CD14⁺CD80⁺ (A), CD14⁺MHCII⁺ (B) e CD14⁺CD86⁺ (C) está demonstrado nos gráficos. As barras representam as médias (+/-SEM) do valor absoluto de células. N= 4 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento; ***p<0,05 em relação ao grupo controle sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.16. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de células dendríticas ativadas no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.

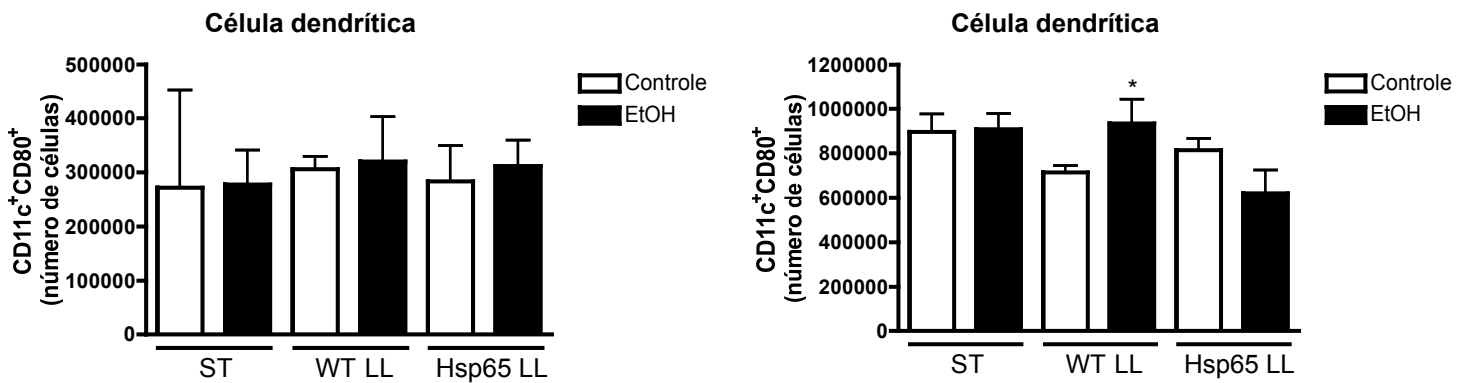
As células dendríticas são as mais eficientes células apresentadoras de antígeno (APC). A molécula CD11c é considerada um forte marcador para estas APCs. Além disso receptores como MHC II e moléculas co-estimuladoras como CD80 também estão presentes em sua membrana. Para identificação fenotípica de células dendríticas ativadas foi realizada a marcação, em células do LM e baço, com anticorpos anti-CD11c, anti-CD80 e anti-MHC II, e o número de células expressando os marcadores citados foi avaliado pela citometria de fluxo.

Observou-se que, tanto no LM quanto no baço, o número de células dendríticas não foi alterado após a ingestão de EtOH nos grupos sem tratamento (que não entraram em contato com a bactéria), quando comparados a seus respectivos controles (Figura 22). Entretanto, novamente observou-se que a ingestão prévia de bactérias nos animais tratados com EtOH leva a alterações significativas em relação ao número de células dendríticas ativadas nos órgãos avaliados. No LM, fica claro que o ingestão oral prévia de *L. lactis* selvagem (WT) foi suficiente para elevar o número de células dendríticas ativadas expressando MHCII (CD11c⁺MHCII⁺) nos animais tratados com EtOH em relação a seu respectivo controle (Figura 22B). Nenhuma alteração foi observada em relação às células dendríticas expressando CD80 nesse órgão. Novamente o baço destacou-se por um número mais representativo de alterações uma vez que foi observado um aumento no número de células dendríticas expressando a molécula CD80 nos animais que receberam EtOH e foram previamente tratados com *L. lactis* selvagem (WT) em comparação com o grupo controle (Figura 22A). E, em relação à expressão de MHCII no baço, observou-se um aumento na frequência de células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺ nos animais tratados com EtOH que ingeriram previamente *L. lactis* selvagem e uma redução no número dessas células no grupo pré-tratado com Hsp65, ambos comparados com seus respectivos controles (Figura 22B).

Linfonodo mesentérico

Baço

A



B

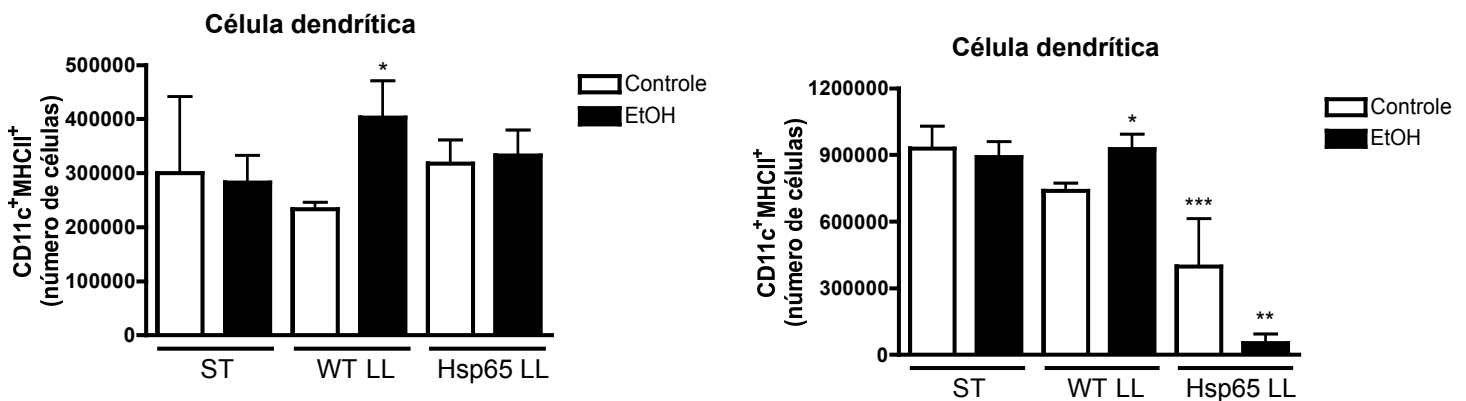


Figura 22: Avaliação de células dendríticas no baço e linfonodo mesentérico. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As células extraídas do baço e LM foram analisadas por citometria de fluxo. O número de células CD11c⁺CD80⁺ (A) e CD11c⁺MHCII⁺ (B) está demonstrado nos gráficos. As barras representam as médias (+/-SEM) do valor absoluto de células. N= 4 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento; ***p<0,05 em relação ao grupo controle sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.17. A ingestão prévia de *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, teve um impacto sobre o número de linfócitos B ativados no linfonodo mesentérico e baço dos animais tratados com EtOH.

Os linfócitos B são mediadores centrais na resposta humoral. O ligante CD19 é considerado um forte marcador para estas células, além disso, os linfócitos B também apresentam em sua membrana receptores MHC II e moléculas co-estimuladoras como o CD80. Para identificação fenotípica de linfócitos B ativados, células isoladas do LM e baço foram marcadas com anticorpos anti-CD19, anti-CD80 e anti-MHC II, e o número de células expressando os marcadores citados foi avaliado por citometria de fluxo.

Análises realizadas tanto no LM quanto no baço mostraram que a ingestão de EtOH, nos grupos sem pré-tratamento (que não entraram em contato com a bactéria) não interferiu no número das populações analisadas, quando comparados a seus respectivos controles (Figura 23). Por sua vez, como demonstrado na Figura 23A, o pré-tratamento oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 levou a uma redução do número de linfócitos B ativados analisado pela co-expressão de CD80 e MHCII (CD19⁺ CD80⁺MHCII⁺).

No baço, observou-se um aumento no número de linfócitos B ativados co-expressando as moléculas CD80 e MHCII (CD19⁺CD80⁺MHCII⁺) em animais do grupo EtOH que receberam previamente *L. lactis* selvagem quando comparados a seu respectivo controle. Interessantemente, um resultado contrário foi observado nos animais que receberam previamente *L. lactis* Hsp65, uma vez que houve uma significativa redução no número de linfócitos B ativados nesse grupo (Figura 23B).

Linfonodo mesentérico

Baço

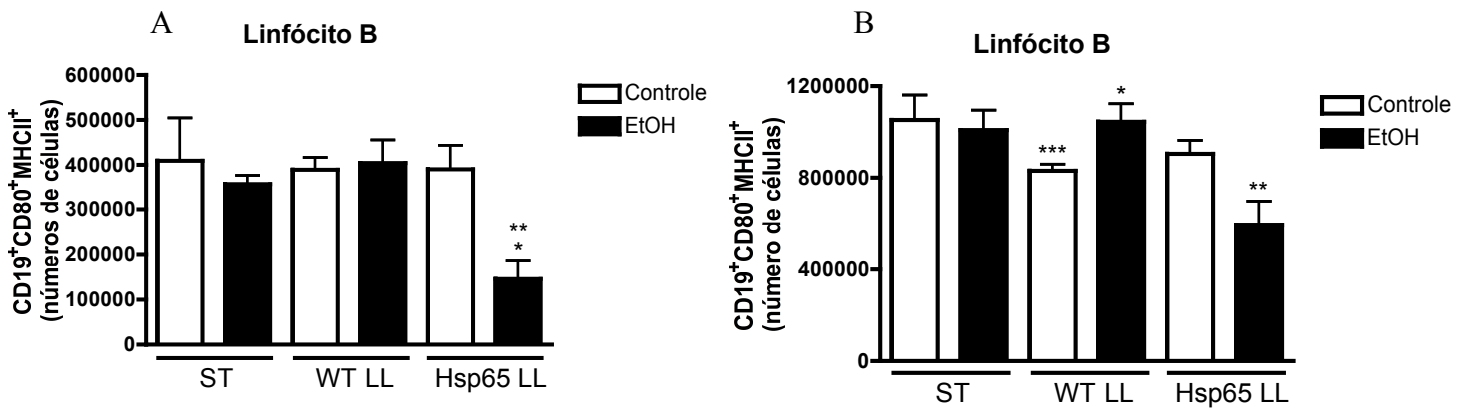


Figura 23: Avaliação de linfócitos B no baço e linfonodo mesentérico. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As células extraídas do baço e LM analisadas por citometria de fluxo. O número de células CD19⁺CD80⁺MHCII⁺ no LM (A) e baço (B) foi obtido a partir do *gate* de linfócitos totais. As barras representam as médias (+/-SEM) do valor absoluto de células. N= 4 grupo. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; **p<0,05 em relação ao grupo EtOH sem tratamento; ***p<0,05 em relação ao grupo controle sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

4.18. A ingestão prévia de *L. lactis* selvagem contribuiu para o aumento do número de linfócitos T com fenótipo regulador no baço e linfonodo mesentérico dos animais tratados com EtOH.

Células T CD4⁺CD25⁺ referem-se a linfócitos T reguladores. Estas células expressam CD45RB, um indicativo de maturidade celular. Além disso, a presença do regulador transcricional Foxp3 é um fator essencial para o desenvolvimento e função de células Treg CD25⁺. Para identificação fenotípica de linfócitos T com perfil regulador, células isoladas do baço e linfonodo mesentérico dos grupos testados foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD45RB e apenas no baço a marcação para anti-Foxp3 foi utilizada. O número de células expressando os marcadores citados foi avaliado por citometria de fluxo.

Interessantemente, observou-se que tanto no LM quanto no baço a ingestão prévia de *L. lactis* selvagem (WT) repercutiu em um aumento no número de linfócitos T com fenótipo regulador (CD4⁺CD25⁺CD45RB⁺) nos animais tratados com EtOH (Figura 24A), a diferença foi significativa no baço em relação a seu respectivo controle, e LM em relação a seu respectivo controle e ao grupo EtOH ST (Figura 24A). No baço, o número de Linfócitos T reguladores naturais (CD4⁺Foxp3⁺) não apresentou diferenças entre os grupos testados (Figura 24B), mas os resultados apresentam uma tendência à redução nos grupos previamente tratados com ambas as bactérias.

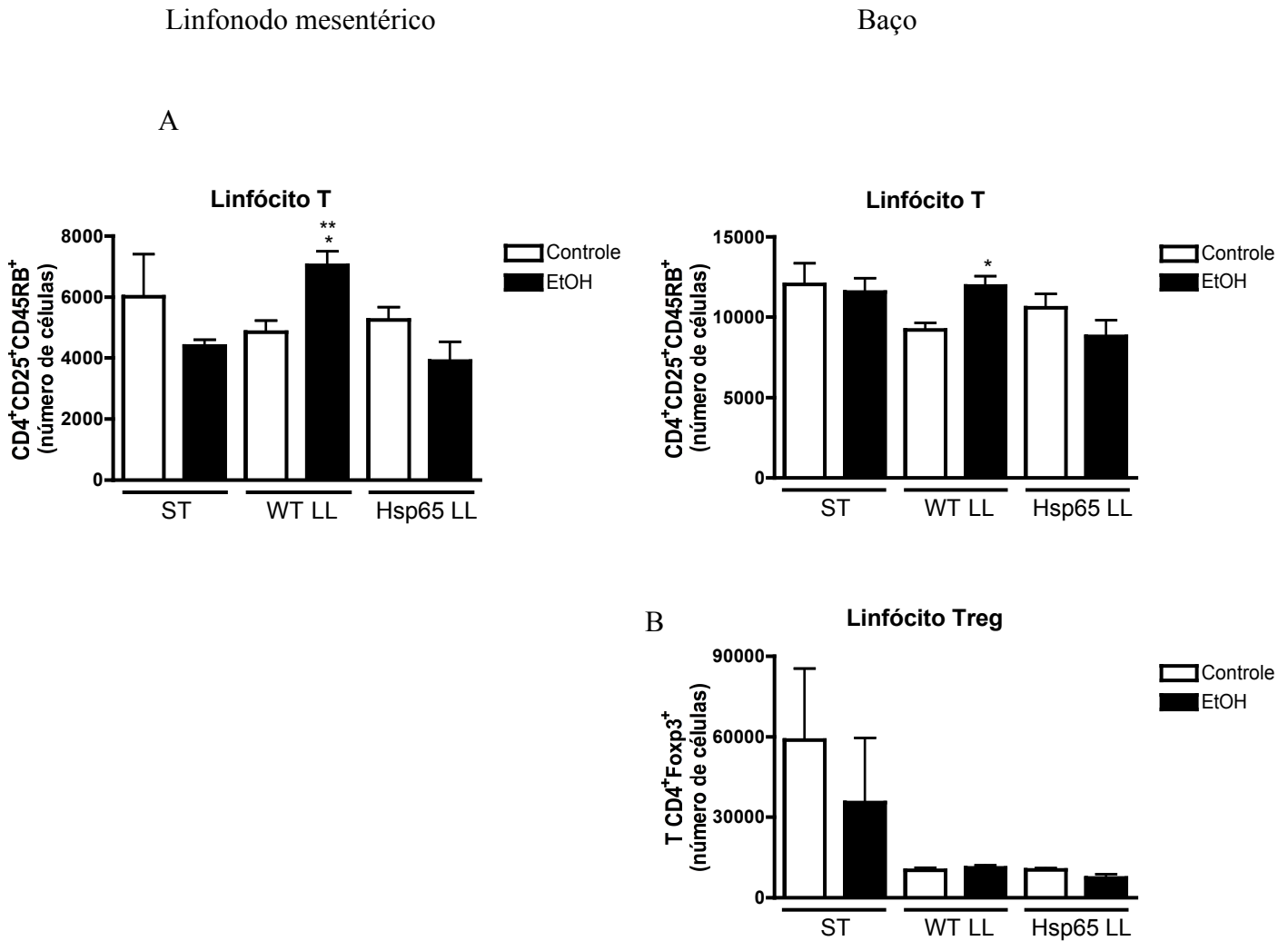


Figura 24: Avaliação de linfócitos T no baço e linfonodo mesentérico. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água (grupo controle) pela mesma via, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) foi realizada a eutanásia dos animais. As células extraídas do baço e LM foram analisadas por citometria de fluxo. O número de linfócitos T $CD4^+CD25^+CD45RB^{low+}$ (A) e $CD4^+Foxp3^+$ (B) foi obtida a partir da análise no *gate* de linfócitos totais. As barras representam as médias (+/-SEM) do valor absoluto de células. N= 4 grupo. * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

ETAPA IV – Avaliação Funcional

4.19. A indução da tolerância oral está afetada em animais tratados com EtOH e há uma tendência a uma manutenção desse fenômeno quando esses animais entram em contato prévio com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, pela via oral.

A tolerância oral refere-se a uma supressão ativa da reatividade imunológica ao antígeno que tenha sido contactado primeiramente pela via oral. Pode ser mensurada pela produção de anticorpos específicos ou por uma atividade celular. Em nosso estudo avaliamos a tolerância oral pela resposta humoral para uma proteína da clara do ovo (OVA) que não faz parte da dieta normal dos animais. Para analisar diferenças na susceptibilidade a indução da tolerância oral, animais controle e EtOH, tratados ou não com *L. lactis* WT e *L. lactis* Hsp65 receberam 24 horas após a última administração de água ou EtOH, uma única gavagem de uma solução contendo 20mg de OVA ou água. Após 7 dias receberam por via s.c. 0,2 mL de solução salina contendo 10 mg de OVA adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio – Al(OH)₃. Quatorze dias após, os animais receberam a mesma dose de OVA em salina. Após uma semana os soros foram coletados e a produção de anticorpos específicos IgE anti-OVA mensurados por ELISA. Como controle negativo (CN) foi utilizado soro de animal que recebeu durante todo o protocolo apenas salina, seja por gavagem ou s.c. Apesar de não estatisticamente significativo, análises nos níveis de IgE anti-OVA mostraram uma forte supressão nos níveis de IgE anti-OVA nos animais controles (ST) que receberam OVA por via oral, em relação aos animais imunizados, que contactaram o antígeno apenas via s.c. Como já demonstrado por nosso grupo de pesquisa, houve uma inversão nos níveis esperados de IgE-anti OVA entre o grupo imune e o tolerante em animais do grupo EtOH ST, resultando em uma perda da capacidade de indução de tolerância oral nesses animais, analisada pela resposta humoral. Interessantemente, o tratamento prévio desses animais com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, resultou em uma redução dos níveis de IgE anti-OVA no grupo tolerizado nos animais tratados com EtOH, parecendo resgatar os elementos necessários para que o fenômeno ocorra (Figura 25).

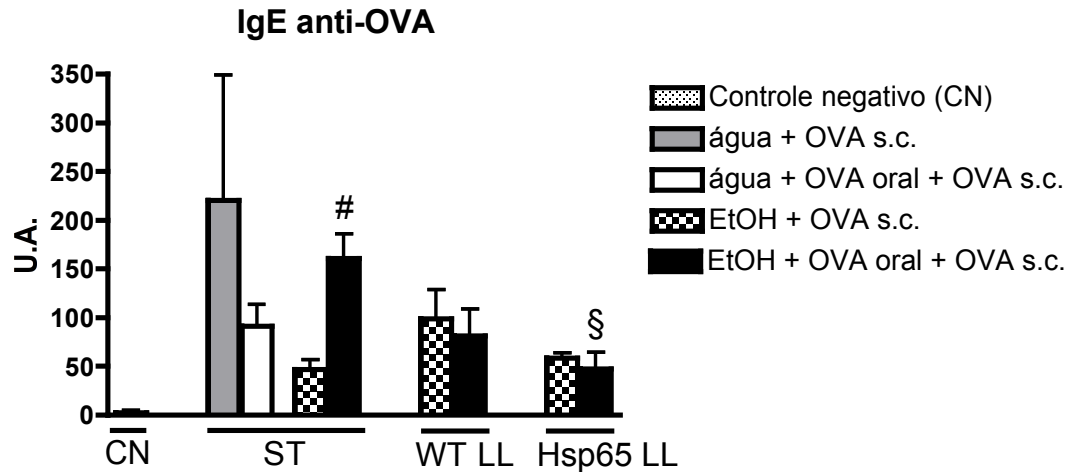


Figura 25: Avaliação dos níveis séricos de IgE anti-OVA. Camundongos C57BL/6 fêmeas receberam um pré-tratamento, por via oral, com *L. lactis* selvagem (WT LL), *L. lactis* secretor de Hsp65 (Hsp65 LL) ou apenas o meio de cultura – M17 difco (sem tratamento – ST) durante quatro dias consecutivos. Uma semana após, foi realizada a administração intragástrica de 0,2 mL de EtOH 50%/animal (grupo EtOH) ou água pela mesma via (grupo controle) durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração (EtOH ou água) deu-se início a indução da tolerância oral à ovalbumina (OVA) pela administração intragástrica de 0,2 mL de uma solução de OVA na concentração de 20mg/animal diluída em salina. Os grupos imunes receberam água, ao invés de OVA, pela mesma via. Sete dias após o tratamento oral, todos os grupos foram sensibilizados com uma injeção subcutânea (s.c.) de 0,2 mL de solução salina contendo 10 mg de OVA adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio – Al(OH)₃. Quatorze dias após, os animais receberam a mesma dose de OVA em salina. Após uma semana foi realizada a eutanásia dos animais. Como controle negativo (CN) foi utilizado soro de animal que recebeu apenas água por via oral e salina por via s.c. As barras representam as médias (+/-SEM) dos níveis séricos de IgE anti-OVA quantificados por ELISA. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.) sendo o padrão positivo considerado como 1000 unidades e as demais amostras comparadas a este valor N= 6 grupo. # p<0,05 em relação a seu respectivo grupo imune; § p<0.05 em relação ao grupo tolerante EtOH sem tratamento. ANOVA-Test, T test.

5. DISCUSSÃO

A mucosa gástrica é continuamente exposta a uma grande variedade de substâncias nocivas e agentes irritantes, capazes de ativar diversas linhas de defesa que conferem proteção. Danos da mucosa gástrica podem ocorrer quando os mecanismos de defesa são destruídos por diversos fatores. Estresse físico ou fisiológico e uso de drogas são frequentemente associados com lesões agudas da mucosa gástrica. Danos similares são observados na mucosa gástrica de ratos submetidos ao estresse após contenção por imersão em água, (Takagi *et al.*, 1964) ou após ingestão de substâncias lesivas, como drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs) ou por agentes necrozantes, como HCl e etanol (MERSEREAU *et al.*, 1988; OATES & HAKKINEN, 1988).

O álcool é uma substância amplamente consumida mundialmente e responsável pela causa de uma grande variedade de condições patológicas e mortes todos os anos (WHO, 2011). Dentre as injúrias geradas pela ingestão de álcool podemos destacar aquelas que acometem o trato gastrointestinal. Diversos trabalhos na literatura apontam para um efeito danoso e lesivo na mucosa gástrica frente à ingestão dessa substância (JONES *et al.*, 2010; LAM *et al.*, 2007; YONETCI *et al.*, 2003; ZHI *et al.*, 2007).

No modelo experimental de ingestão aguda de etanol 50%, durante 4 dias consecutivos, desenvolvido por nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 2006) e empregado neste trabalho, verificamos diversas alterações locais e sistêmicas. Poucos estudos na literatura têm mostrado as implicações do álcool sobre a imuno-modulação, e recentemente nosso grupo demonstrou a perda da susceptibilidade à indução de tolerância oral induzida pela ingestão de etanol (ANDRADE *et al.*, 2006). Muitos estudos ainda precisam ser realizados a fim de elucidar a respeito desse mecanismo, mas neste mesmo trabalho nosso grupo demonstrou que o álcool induz uma inflamação do tipo alérgica nos animais e isso pode comprometer a homeostase imunológica e fenômenos decorrentes desse equilíbrio, como a tolerância oral (ANDRADE *et al.*, 2006). Nesse sentido, a busca de estratégias alternativas capazes de reduzir ou atenuar tais efeitos se torna de extrema relevância.

Nosso estudo se baseou em um possível impacto imuno-modulador alcançado por meio da ingestão prévia de *L. lactis* selvagem (WT LL) ou *L. lactis* produtor da proteína Hsp65 (Hsp65 LL), como estratégia protetora da mucosa gastrointestinal dos animais que receberiam álcool *a posteriori*. Várias foram as estratégias metodológicas usadas para a análise da inflamação causada pelo álcool.

Nossos resultados mostram que o protocolo de administração de álcool utilizado não interfere no peso corpóreo dos animais, entretanto verificamos um aumento no peso e tamanho gástrico nos animais tratados com EtOH, confirmando os dados de Andrade e colaboradores (2006). Este aumento pode, em parte, ser explicado pelo acúmulo de gases presentes no estômago dos animais, verificado no momento da necropsia. Já foi demonstrado que bebidas com concentração alcoólica acima de 15% parecem inibir a motilidade gástrica, atrasando assim o esvaziamento do estômago. Como resultado do aumento do tempo no trânsito gástrico, a degradação bacteriana do alimento se inicia, gerando gases e distensão (BODE & BODE, 1997).

O álcool, considerado um agente necrozante, é capaz de lesar diretamente a mucosa gástrica, contudo a macroscopia e microscopia gástrica dos grupos administrados com EtOH encontrava-se normal. A análise a fresco do estômago dos animais tratados com EtOH apresentava-se íntegra, sem pontos de erosão ou eritema, além disso, a microscopia revelou ausência de atrofia da mucosa, infiltrado inflamatório ou edema da submucosa. Em contraste com nossos dados, diversos trabalhos na literatura mostraram que após a ingestão de EtOH a mucosa gástrica dos animais apresentava marcantes lesões. Observamos que nestes modelos experimentais os animais eram sacrificados entre 30 minutos a 3 horas após a administração de EtOH, desta forma, sugerimos que a diferença no tempo entre a ingestão de álcool e a eutanásia dos animais possa ser um fator importante que permita uma melhor visualização das lesões gástricas (JONES *et al.*, 2010; LAM *et al.*, 2007; YONETCI *et al.*, 2003; ZHI *et al.*, 2007). De fato, um trabalho realizado por Saika e colaboradores (2000) mostrou que 15 minutos após administração de etanol absoluto em ratos, coágulos sanguíneos e hemorragias lineares estavam presentes na superfície da mucosa. A severidade das lesões apresentava-se elevada após 1 hora e permanecia por até 6 horas. Porém 24 horas após, a mucosa gástrica aparentava-se quase que totalmente normal. Ainda neste trabalho, a análise microscópica revelou descamação das células luminiais ou das fossas gástricas, e profundas lesões necróticas, contudo, 24h após tais lesões havia praticamente desaparecido. Em nosso modelo os animais foram sacrificados 24 horas após a última administração de EtOH, o que justifica a ausência de lesões naquele dado momento, e não exclui a possibilidade da ocorrência de danos à mucosa em horas ou dias anteriores a eutanásia. A ausência de lesões pode ser explicada devido ao alto poder reconstitutivo da mucosa gástrica, há mais de 20 anos a capacidade regenerativa desta mucosa tem sido reconhecida como sendo um processo extremamente rápido e eficiente (LACY & ITO, 1984).

Existem diversas evidências que explicam o processo de cura da mucosa após lesão. A migração e/ou proliferação do epitélio gástrico participa no processo de reparo, diversos tipos de fatores endógenos desencadeiam, medeiam, ou regulam a regeneração e proliferação da mucosa em resposta aos danos agudos gástricos. Um dos agentes endógenos importantes que auxiliam neste processo são as prostaglandinas (PGs). Prostaglandinas endógenas estão envolvidas na citoproteção, bem como na cura de danos da mucosa gástrica (LACY & ITO, 1982; SCHMIDT *et al.*, 1986; TARNAWSKI *et al.*, 1983). Cyclooxygenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2) catalisam uma peça chave na síntese de PGs, enquanto cada isoforma é regulada de maneiras diferentes. COX-1 é constitutivamente expressa em diversos tecidos, incluindo o estômago, enquanto COX-2 é normalmente indetectável e rapidamente induzida por agentes pró-inflamatórios ou mitogênicos (EBERHART & DUBOIS, 1995). Há alguns anos atrás se acreditava que PGs derivadas de COX-1 mediarão funções protetoras na mucosa gastrointestinal, enquanto que PGs derivadas da ação de COX-2 desencadeariam propriedades inflamatórias (MORTEAU, 2000). Entretanto, vários estudos têm mostrado propriedades anti-inflamatórias associadas à ação de COX-2. Saika e colaboradores (2000) mostraram que após a ingestão de álcool, a expressão de COX-2 mRNA apresentou picos entre 60 a 90 minutos, o que sugere a participação de COX-2 na restituição da mucosa gástrica. A liberação de PGs pela mucosa constitui um fator crucial para manutenção da integridade e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrozantes. As PGs inibem a secreção de ácido, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, aceleram a restituição epitelial e cura da mucosa, estimulam a secreção de bicarbonato, fosfolípidios e muco (ATAY *et al.*, 2000; BRZOZOWSKI *et al.*, 2005; KOBAYASHI & ARAKAWA, 1995; LAINE *et al.*, 2008; LICHTENBERGER *et al.*, 1983; SZABO, 1991).

Visto que a primeira linha de defesa pré-epitelial – entre o lúmen e o epitélio gástrico – é constituída pela barreira de muco, analisamos a interferência da ingestão de álcool sobre este parâmetro. Constatamos que em nosso modelo a ingestão de álcool aumenta a secreção de muco gástrico. Este resultado é condizente com a literatura, uma vez que foi demonstrado por Mutoh e colaboradores (1995) um aumento na liberação de muco gástrico como resultado do efeito à exposição ao álcool. Uma vez que a secreção de muco é estimulada por hormônios, PGs e agentes colinérgicos (ALLEN & FLEMSTROM, 2005), acreditamos que o aumento nos níveis de muco encontrado nestes animais seja uma resposta ao estímulo agressivo desencadeado pelo álcool, proporcionando um reforço na proteção física da mucosa. De forma interessante, quando esses animais foram pré-tratados com *L. latiss*

selvagem (WT) ou produtor de Hsp65, os níveis de muco estavam semelhantes aos seus controles, mostrando uma proteção da mucosa aos efeitos do álcool sobre este parâmetro.

Esse resultado nos fez supor que *L. lactis*, de alguma maneira possa estar atuando como um probiótico. Durante anos diversas foram as definições para “probióticos”, e em 1998, Guarner e Schaafsma propuseram que “probiótico é todo microrganismo vivo, capaz de conferir efeitos benéficos ao hospedeiro quando consumido em quantidade adequada”. Esta mesma definição de probióticos foi incorporada posteriormente pela OMS em 2002. Dentro do grupo das bactérias do ácido láctico, ao longo de muitos anos e até mesmo nos dias atuais, diversos trabalhos não incluíam *L. lactis* como sendo um microrganismo com potencial probiótico (CLARKE *et al.*, 2012; OUWEHAND *et al.*, 2002; SAVILAHTI *et al.*, 2008). Embora há mais de dez anos *L. lactis* tenha sido reconhecido por Holzapfel (2001) como uma bactéria probiótica, pouco se sabia a respeito de suas propriedades benéficas. Recentemente, alguns estudos têm começado a reconhecer os efeitos positivos de *L. lactis* (KIMOTO-NIRA *et al.*, 2009; OHLAND & MACNAUGHTON, 2010). Bactérias probióticas têm sido amplamente utilizadas em estudos de tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais (KABEERDOSS *et al.*, 2011). Alguns destes microrganismos têm a capacidade de induzir a expressão *in vitro* de genes de mucinas em culturas de células epiteliais intestinais, quanto *in vivo*, pelo aumento nos níveis de mucinas no intestino de ratos (CABALLERO-FRANCO *et al.*, 2007; MATTAR *et al.*, 2002). Além disso, o uso de probióticos pode aumentar a camada de muco secretada na mucosa gástrica de ratos (LAM *et al.*, 2007). Os resultados de nosso trabalho sugerem que *L. lactis* não apresenta esta característica, uma vez que os níveis na secreção de muco gástrico em animais controles tratados com ambas as linhagens bacterianas, são semelhantes aos animais controles sem tratamento. Podemos inferir que *L. lactis* esteja atuando de uma forma diferente de outros probióticos, contribuindo para a homeostase na mucosa gástrica e impedindo os efeitos do álcool sobre a produção de muco.

Em se tratando da mucosa intestinal, um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que não havia um efeito inflamatório (em termos quantitativos) do álcool quando avaliada a contagem de células da lâmina própria e dos linfócitos intra-epiteliais dos animais tratados com EtOH (ANDRADE, 2003). Em nosso trabalho confirmamos os resultados do nosso grupo, uma vez que a análise histopatológica e a produção de muco no jejuno proximal estavam dentro dos parâmetros normais.

Diversos artigos na literatura mostram que a ingestão de etanol, principalmente em altas doses e de forma crônica, desencadeia doenças hepáticas alcoólicas. Desta forma, analisamos a histopatologia hepática dos animais mediante a exposição ao álcool.

Encontramos sinais de degeneração hidrópica no fígado dos animais tratados com EtOH, todavia não foi detectado a presença de alanina aminotransferase sérica. A ALT é uma enzima de origem citoplasmática, cuja maior atividade está localizada no fígado. Seus níveis séricos encontram-se elevados em qualquer condição que cause comprometimento hepatocelular agudo, tais como cirrose ativa, hepatite alcoólica, viral ou induzida por drogas (LOTT, 2008). A ingestão de álcool de forma aguda ou crônica pode levar a lesão hepática com aumento sérico de ALT (LEE *et al.*, 2011; LIAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012), porém este aumento, principalmente no consumo agudo, depende da dose e do protocolo utilizado. De forma interessante, o fígado dos animais que ingeriram Hsp65 LL antes do tratamento com EtOH, apresentam uma redução no quadro degenerativo, sugerindo algum efeito protetor induzido/estimulado pela bactéria durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal, com repercussões sistêmicas. As interações de múltiplos mecanismos fisiológicos influenciam na progressão de doenças do fígado induzida por álcool. Alguns produtos gerados no fígado e trato gastrointestinal durante o metabolismo do álcool, como o acetaldeído é considerado mais tóxico do que o próprio etanol. Adicionalmente, um grupo de produtos metabólicos, conhecidos como radicais livres, pode danificar as células do fígado e promover inflamação (CABALLERIA, 2003). Além disso, uma íntima correlação entre endotoxemia e severidade de injúria hepática induzida pelo álcool é confirmado por diversos estudos clínicos e experimentais. Existem trabalhos na literatura mostrando que a ingestão de probióticos, como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*, é capaz de reduzir danos gástricos e principalmente hepáticos causados pela ingestão aguda (5 dias) de álcool. Este efeito foi relacionado à capacidade destas bactérias em reduzirem a concentração de álcool na corrente sanguínea via aumento da atividade do álcool desidrogenase (ADH), conseqüentemente, acelerando o metabolismo do etanol tanto no estômago quanto no fígado (QING & WANG, 2008). Caballeria (2003) demonstrou que o efeito benéfico de BAL na injúria hepática induzida pelo álcool está associado à manutenção da barreira intestinal e prevenção da endotoxemia. Neste trabalho, o autor revelou que os níveis séricos de endotoxinas estavam 19 vezes maiores nos animais que consumiram apenas álcool, quando comparados àqueles que ingeriram previamente os probióticos. Desta forma, podemos sugerir que em nosso trabalho, embora *L. lactis* selvagem esteja incluída no grupo de BAL, esta espécie não é capaz de atenuar os danos hepáticos gerados pelo álcool. Entretanto, a secreção de Hsp65 por *L. latiss* em momentos prévios a ingestão de álcool, foi capaz de preservar a integridade dos hepatócitos.

A geração de radicais livres é um importante passo nos danos hepáticos provocados pelo etanol e a presença destes compostos tem sido detectada no fígado de ratos após ingestão de álcool. A administração aguda ou crônica de etanol pode levar a injúrias pela produção de espécies reativas de oxigênio que iniciam o processo de lipoperoxidação e/ou depleção de componentes endógenos de antioxidantes glutatiônicos (PAWA & ALI, 2004; SUN *et al.*, 2001). Uma vez que a ingestão de álcool pode resultar em danos celulares induzidos pelo estresse oxidativo, é possível que haja maior disponibilização de HSPs no fígado após o consumo. Assim, o contato intestinal prévio com a Hsp pode ter contribuído para a indução de tolerância, resultando em uma resposta hepática menos exacerbada, ou melhor, imunomodulada.

Koivisto e colaboradores (1999) indicam que o acetaldeído em baixas concentrações é um potente degranulador de mastócitos *in vitro*. Desta forma resolvemos investigar se o consumo de álcool seria capaz de alterar a população destas células no estômago. Mastócitos possuem uma relação íntima com epitélios e recebem sinais provenientes de outras células imunes, nervos e do próprio tecido associado. A ativação destas células resulta na degranulação e liberação de diversos mediadores como histaminas, eicosanóides, citocinas e quimiocinas (METCALFE *et al.*, 1997). Os mastócitos são classicamente ativados em alergias e possuem um papel fundamental no aumento da permeabilidade vascular, bem como na *up-regulation* de moléculas de adesão necessárias para o recrutamento de leucócitos (CARA *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2009). A histamina liberada de mastócitos degranulados são mediadores reconhecidos por sua capacidade de permitir o extravasamento vascular. Alguns dos mecanismos de injúria induzida pelo etanol são o aumento do extravasamento de albumina marcada de capilares da mucosa gástrica e vênulas pós-capilares, redução no fluxo devido a congestão de hemácias e eventuais áreas de estase na mucosa, culminando no desenvolvimento de lesões necróticas (KALIA *et al.*, 1997).

Diante do exposto e pelo fato do álcool induzir um processo alérgico onde mastócitos são importantes mediadores, investigamos a população dessas células na submucosa gástrica mediante o consumo de álcool. A contagem de mastócitos presentes na submucosa gástrica de animais EtOH não difere dos animais controle, o que sugere que o álcool não penetra na submucosa, ou então que os mastócitos presentes na submucosa não são afetados pelo mesmo. Estes resultados corroboram com a literatura, onde foi demonstrado que o número de mastócitos na mucosa gástrica superficial estava reduzido mediante a exposição tópica de álcool 60%, enquanto que na submucosa não houve alteração na contagem de mastócitos. A redução no número destas células na mucosa é resultado de sua degranulação, o que leva ao

desenvolvimento de lesões necróticas gástricas. Entretanto, quando os animais expostos ao álcool receberam previamente por via oral um estabilizador de mastócitos, conhecido como cetotifeno, a contagem na mucosa permaneceu inalterada e não houve formação de lesões (KALIA *et al.*, 2000). Estes resultados mostram que o álcool é um potente degranulador de mastócitos, e esta ação pode influenciar no desenvolvimento de lesões gástricas, entretanto sua ação pode estar limitada aos mastócitos presentes apenas na mucosa e não na submucosa. Com base nestes resultados, podemos sugerir que em nosso modelo não excluimos a possibilidade de alterações na contagem de mastócitos na mucosa gástrica e da presença de lesões em momentos anteriores ao sacrifício. É provável que a mucosa tenha se regenerado e reforçado os mecanismos de proteção, além disso, a contagem de mastócitos em nosso trabalho foi realizada na submucosa, o que possivelmente nos levou a um resultado inconclusivo sobre os efeitos reais do álcool na população destas células no local afetado mais provável – a mucosa gástrica. De forma interessante, animais previamente tratados com *L. lactis* WT apresentam um número reduzido destas células na submucosa quando comparados a seu respectivo controle. Alguns trabalhos na literatura têm mostrado que diversos probióticos possuem efeitos inibitórios ou atenuam a ativação e degranulação de mastócitos em modelos experimentais de alergias e doenças auto-imunes (MEIJERINK *et al.*, 2012; SCHIFFER *et al.*, 2011). Uma atividade estabilizadora em mastócitos induzida pelo uso de probióticos também foi verificada em um modelo de lesão gástrica induzida por aspirina (SENOL *et al.*, 2011a). Desta forma, os mecanismos pelos quais a contagem de mastócitos nestes animais estava reduzida permanecem inconclusivos.

Sabe-se que além de afetar a morfologia e função de diversos componentes gastrointestinais, o álcool é capaz de modificar uma grande variedade de respostas imunes. A IgA secretória (IgAs) é uma imunoglobulina característica e predominante do sistema imune de mucosas, possui um papel importante na proteção de uma vasta área ocupada pela superfície de mucosas, como trato respiratório, genitourinário e gastrointestinal. Juntas, estas superfícies representam uma enorme área de potencial exposição a patógenos ingeridos e inalados (WOOF & KERR, 2006). Desta forma, a IgAs se destaca no sentido de prevenir infecções por organismos patogênicos e contra a absorção aberrante de proteínas alergênicas. Diversos estímulos podem desencadear a secreção de IgA no trato gastrointestinal, é geralmente aceito que após estímulo antigênico nas placas de *Peyer*, os precursores de IgA, guiados por moléculas de adesão e quimiocinas migram para a lâmina própria intestinal onde terminam sua diferenciação em plasmócitos (BRANDTZAEG & JOHANSEN, 2005).

O efeito do etanol no sistema imune é bem estabelecido, entretanto pouco se sabe de sua influência na imunidade de mucosas. No presente estudo, avaliamos a presença de IgAs no muco gástrico e intestinal. Encontramos um aumento bastante significativo na secreção desta imunoglobulina no muco gástrico de todos os grupos que receberam EtOH, mostrando que o álcool por si só possui um efeito estimulatório na produção de IgAs. A ingestão prévia de ambas as linhagens bacterianas não contribuiu para a diminuição na produção dessa imunoglobulina nos animais tratados com EtOH. A análise do muco intestinal mostrou que o consumo de EtOH é capaz de aumentar a secreção desta imunoglobulina quando comparado a seu respectivo grupo controle. Recentemente Budec e colaboradores (2007) mostraram que uma única gavagem de EtOH foi capaz de aumentar os níveis de IgAs no intestino de ratas. Os autores sugerem que este efeito pode ser em parte mediado pela produção de óxido nítrico endógeno. Outro trabalho realizado em voluntários saudáveis mostrou que uma única dose de etanol, porém em grande quantidade, provocou um aumento duas vezes maior de IgAs na saliva, quando comparado às amostras colhidas antes do consumo de EtOH (WASZKIEWICZ *et al.*, 2008). Estes dados podem ser extrapolados para os resultados obtidos em nosso trabalho, uma vez que a literatura sugere que o álcool administrado de forma aguda possui um efeito estimulador na secreção de IgA em mucosas. Ainda em relação à análise do muco intestinal, interessante, foi verificado um aumento na secreção de IgA em animais controles que consumiram ambas as linhagens microbianas quando comparados aos animais sem tratamento, mostrando que a ingestão de *L. lactis*, selvagem ou secretor de Hsp65, é capaz de estimular a produção de IgAs. Estudos em crianças saudáveis e prematuras revelaram um aumento na secreção de IgA fecal em resposta a intervenções probióticas (FUKUSHIMA *et al.*, 1998; MOHAN *et al.*, 2008). Estudos experimentais têm mostrado que a ingestão de yogurt contendo *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium lactis* foi capaz de aumentar a secreção de IgA nas fezes de camundongo e humanos respectivamente (JAIN *et al.*, 2009; KABEERDOSS *et al.*, 2011). Sugere-se que este aumento ocorre no nível de placas de Peyer, uma vez que a administração de *Lactobacillus paracasei* estimulou uma imunomodulação nas placas de Peyer e induziu altos níveis de células produtoras de IgA na lâmina própria (TSAI *et al.*, 2010).

Desta forma, propomos que *L. lactis* atua na secreção de IgAs apenas no intestino, no nível de placas de Peyer, e não possui efeito neste parâmetro na mucosa gástrica. Outro dado importante foi que o pré-tratamento oral com *L. lactis* selvagem talvez tenha potencializado o efeito estimulador do álcool na produção de IgAs no muco intestinal. Esse aumento na produção de uma importante imunoglobulina que tem papel de exclusão imune na mucosa

possa ter efeitos benéficos, no sentido de protegê-la contra a entrada de bactérias entéricas, através do epitélio e manter a integridade das junções epiteliais.

Após as análises histomorfológicas descritas acima, e, usando a dosagem de IgA como um marcador do impacto do álcool sobre o sistema imune local, passamos então a verificar os efeitos locais e sistêmicos do pré-tratamento oral com as bactérias sobre a inflamação alérgica desencadeada pelo etanol.

Atopia pode ser definida como uma predisposição genética ao desenvolvimento de anticorpos IgE contra antígenos ambientais comuns (PEPYS, 1986). A IgE é a principal imunoglobulina envolvida em doenças alérgicas, e, além do fator genético, a produção aumentada dessa imunoglobulina pode estar relacionada a diversos outros elementos, como infecções parasitárias, neoplasmas e algumas exposições ambientais.

A síntese de IgE e os mecanismos que envolvem a sensibilização alérgica têm recebido uma atenção considerável nos últimos anos. A alta prevalência e o aumento da incidência de doenças alérgicas têm sido registrados principalmente nos países desenvolvidos (MATRICARDI, 2001; MATRICARDI *et al.*, 2000), os quais possuem um estilo de vida ocidentalizado e urbanizado (LINNEBERG, 2008). Uma vez que o consumo de álcool está relacionado a um hábito de estilo de vida comum em muitos países, esse pode ser um potente fator de risco ou desencadeador de doenças alérgicas. Experimentalmente já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a ingestão de álcool possibilita o desenvolvimento de um perfil inflamatório do tipo alérgico, representado pelo aumento tanto de IgE sérica total quanto IL-4 gástrica e em culturas de células do baço (ANDRADE *et al.*, 2006).

Em concordância com a literatura, nossos resultados revelam que a ingestão de álcool em animais sem tratamento é capaz de aumentar os níveis séricos de IgE total, quando comparados a seu respectivo grupo controle. Em 1970, Heiner e Rose descreveram pela primeira vez o aumento nos níveis séricos de IgE em pacientes com cirrose alcoólica. Desde então, muitos estudos têm associado o consumo de álcool ao aumento sérico desta imunoglobulina. Esta evidência tem sido sustentada por diversos estudos os quais têm demonstrado que muitos alcoólatras não atópicos apresentam um aumento na concentração de IgE total sérica quando comparados a controles saudáveis (DOMINGUEZ-SANTALLA *et al.*, 2001; Van EPPS *et al.*, 1976; GONZALEZ-QUINTELA *et al.*, 1995, 1999; HALLGREN & LUNDIN, 1983; SMITH JR. *et al.*, 1980; VIDAL *et al.*, 1994). Entretanto, esse aumento tende a reduzir após abstinência (GONZALEZ-QUINTELA *et al.*, 1995; HALLGREN & LUNDIN, 1983; SMITH JR. *et al.*, 1980). Estas evidências são corroboradas por estudos experimentais realizados em roedores, os quais demonstram elevação nos níveis de IgE sérica

seguida da administração experimental de álcool (ANDRADE *et al.*, 2006; STARKENBURG *et al.*, 2001). De forma interessante, o contato de bactérias (de ambas as linhagens) na mucosa gastrointestinal previamente à ingestão de EtOH contribui para uma redução drástica nos níveis séricos de IgE. É possível que esse achado seja em consequência da indução de uma atividade imuno-reguladora local com repercussão sistêmica, sugerindo mais uma vez propriedades probióticas do *L. lactis*. Frossard e colaboradores (2007) mostraram que a administração de *L. lactis* selvagem, ou geneticamente modificado para secretar IL-10, em um modelo experimental de anafilaxia alérgica induzida por β -lactoglobulina, foi capaz de reduzir os níveis séricos de IgE e IgG1 anti- β -lactoglobulina. Em outro trabalho utilizando-se camundongos sensibilizados para OVA, a administração prévia de *L. lactis* reduziu os níveis de IgE total, e este efeito foi perdido quando utilizou-se a bactéria morta pelo calor (YOSHIDA *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais a ingestão de álcool pode induzir o aumento de IgE ainda não estão completamente compreendidos. Provavelmente o efeito de bebidas alcoólicas no aumento de IgE é feita pelo próprio etanol, e não por outras substâncias presentes nestas bebidas (LINNEBERG *et al.*, 2003). O etanol é oxidado a acetaldeído por meio da enzima álcool desidrogenase (ADH), desta forma tem sido proposto que o acetaldeído pode ser a substância responsável pela reação de hipersensibilidade induzida pelo álcool e possivelmente induz a polarização para Th2 na resposta imune (CRABB *et al.*, 2004; LINNEBERG *et al.*, 2008).

A associação entre ingestão de álcool e altos níveis de IgE é algo biologicamente plausível. O consumo de álcool induz mudanças no balanço de citocinas, com polarização para produção de citocinas do tipo Th2, a qual está correlacionada com níveis elevados de IgE em alcoolistas (GONZALEZ-QUINTELA *et al.*, 2004; HEINZ & WALTENBAUGH, 2007; SZABO *et al.*, 1999) e em modelos animais (HEINZ & WALTENBAUGH, 2007). Tem sido relatado que alcoólatras admitidos em um hospital com síndrome de abstinência alcoólica possuíam aumento nos níveis de alguns tipos de citocinas Th2 comparados com controles saudáveis (GONZALEZ-QUINTELA *et al.*, 1999).

Citocinas são proteínas multifuncionais que possuem um papel crítico na comunicação e ativação celular. Estas proteínas impactam uma variedade de tecidos de uma forma complexa, participando em processos que regulam inflamação, morte celular, proliferação e migração celular (CREWS *et al.*, 2006). O consumo de etanol é conhecido por alterar os níveis de citocinas em uma variedade de tecidos, incluindo pulmão, fígado, cérebro, intestino, estômago e plasma (ANDRADE *et al.*, 2006; CREWS *et al.*, 2006). Citocinas produzidas por

linfócitos Th1 e Th2 controlam a síntese de IgE. Citocinas do tipo Th2, particularmente IL-4 e IL-13, são necessárias para a troca de isotipo para IgE nos linfócitos B. Por sua vez, citocinas Th1, particularmente IFN- γ , inibem a síntese de IgE (BACHARIER & GEHA, 2000; RYAN, 1997). Desordens envolvendo aumento nos níveis séricos de IgE são portanto indicativos de um domínio de citocinas Th2 (LUCEY *et al.*, 1996).

Com o intuito de analisar a dinâmica de produção destas proteínas em nosso modelo, analisamos o perfil de citocinas em extratos de tecidos gástricos e intestinais. Nosso grupo de pesquisa identificou que a ingestão oral de EtOH resulta em aumento de IL-4 no estômago (ANDRADE *et al.*, 2006). Em concordância com esses dados, encontramos um aumento bastante significativo de IL-4 em extratos de tecidos gástrico e intestinal (JP) em animais que ingeriram EtOH, quando comparados a seus respectivos controles. Interessantemente, ambas as linhagens bacterianas previamente administradas são capazes de prevenir o aumento nestes níveis em ambos os órgãos. Alguns trabalhos na literatura mostram que o consumo prévio de probióticos, dentre eles, *L. lactis*, em modelos experimentais de alergias, foram capazes de reduzir drasticamente os níveis de IL-4 em culturas celulares de baço e linfonodo mesentérico, possivelmente por meio da regulação no balanço entre células Th1 e Th2 (HUANG *et al.*, 2010; KIM, *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2011). Outro estudo, utilizando uma única dose oral de álcool 98% em ratos, demonstrou um aumento de IL-4 no estômago, e, interessantemente, a ingestão prévia de um mix de probióticos (composto por cepas de três linhagens diferentes), reduziu os níveis dessa citocina (SENOL *et al.*, 2011b). Nossos resultados sugerem que a administração prévia de *L. lactis* possa ter um impacto local, contribuindo de alguma maneira para a imuno-modulação da produção IL-4, minimizando os efeitos alérgicos do álcool.

A imuno-modulação na mucosa está associada a diversos mecanismos efetores da atividade do sistema imune. Nesse sentido, passamos a analisar possíveis mecanismos (efetores e celulares) imuno-moduladores na mucosa associados à ingestão prévia das bactérias. A IL-10 é uma potente citocina imuno-reguladora produzida por macrófagos, células dendríticas e linfócitos Th2. Promove respostas imunes humorais e inibe respostas imunes celulares via *down-regulation* de citocinas Th1, proliferação de células T antígeno-específica, e níveis de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α e IL-12. Além disso, a IL-10 inibe a ativação e geração de citocinas por mastócitos e eosinófilos, inibe a função de APCs, incluindo a maturação de células dendríticas, a expressão de MHC II, moléculas co-estimuladoras e ativação de células Th2 (HAWRYLOWICZ & O'GARRA, 2005; SZABO *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram que o consumo de álcool é capaz de reduzir os níveis

de IL-10 gástrica em todos os grupos, independente dos tratamentos prévios administrados. Entretanto, a análise desta citocina no jejuno proximal mostrou que a ingestão de EtOH resulta em um aumento na concentração de IL-10, e de forma interessante, a administração prévia de ambas as linhagens bacterianas contribui para uma redução dessa citocina a níveis basais. Novamente observamos uma capacidade de *L. lactis* em manter a homeostase mediante a ingestão de álcool. Alguns estudos relatam que o tratamento agudo de álcool foi capaz de induzir a produção e aumento nos níveis de IL-10 induzido por LPS em monócitos humanos (KIM *et al.*, 2003; SZABO *et al.*, 1996). Outro estudo realizado por Norkina e colaboradores (2007) mostrou que monócitos de amostras sanguíneas obtidas de voluntários saudáveis 24h após um consumo agudo de álcool, apresentavam aumento nos níveis de IL-10. Este aumento foi relacionado à ativação de Src kinase, levando a ativação de vias como Src-STAT3 e Src-MAPK (p-38 e JNK)-STAT3, desencadeado pela ingestão aguda de etanol. Embora a literatura revele uma clara interferência do álcool na produção de IL-10 por monócitos sanguíneos, nossos resultados nos mostram que o álcool pode atuar de formas diferentes na secreção de IL-10 nos compartimentos gastrointestinais. Uma vez que o intestino é o local de maior absorção e possui mecanismos imuno-reguladores melhores desenvolvidos que o estômago, o aumento de IL-10 no JP pode ser um reflexo de mecanismos compensatórios ao aumento de IL-4 e IgE mediante a exposição ao álcool. A prevenção deste aumento após a ingestão oral de *L. lactis* revela uma forte atuação destes microrganismos na imuno-regulação da mucosa intestinal.

IFN- γ é um dos mais potentes ativadores de monócitos, e em conjunto com IL-12 formam um indutor-chave no desenvolvimento de respostas imunes do tipo Th1 (BRADLEY *et al.*, 1996; WENNER *et al.*, 1996). IFN- γ estimula a produção de IL-12 por monócitos e auxiliam na redução dos níveis de citocinas Th2, incluindo IL-10 (CHOMARAT *et al.*, 1993; TRINCHIERI & GEROSA, 1996; TRINCHIERI, 1993). Nossos resultados mostram que a ingestão de álcool não afeta os níveis de IFN- γ gástrico em nenhum dos grupos, sugerindo que a ingestão de EtOH neste modelo não possui efeito na produção local de citocinas Th1.

IL-2 é uma citocina e fator de crescimento crítico para células T, além de possuir um papel fundamental tanto na ativação imune quanto na homeostase (BACHMANN & OXENIUS, 2007). Esta citocina exerce uma ampla variedade de efeitos no sistema imune, incluindo a expansão e ativação de células T e promoção de sua função efetora. Desta forma achamos interessante investigar o efeito da ingestão de etanol nos níveis de IL-2. Nossos dados mostram que a ingestão de álcool não afeta a secreção de IL-2 na mucosa gástrica. Entretanto, Ghare e colaboradores (2011) mostraram que o etanol foi capaz de reduzir a

produção de IL-2 dependente de estimulação via TCR em células T CD4⁺. Esta supressão foi resultado da inibição do fator transcricional NFAT, essencial para a expressão do gene relacionado a IL-2. Estes achados foram confirmados tanto em células Jurkat (linhagem de linfócitos T imortalizados) quanto em linfócitos humanos TCD4⁺ de doadores saudáveis. Entretanto estas células quando tratadas apenas com etanol, sem estímulo de TCR, não mostraram alterações nos níveis de IL-2, corroborando com os dados encontrados em nosso trabalho. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o etanol por si só não possui efeito sobre a cascata de sinalização responsável pela produção de IL-2, sugerindo que os metabólitos produzidos após metabolismo do álcool podem ser responsáveis pela inibição da transdução de sinais dependente de TCR, resultando na redução da ativação de NFAT e produção de IL-2 (GHARE *et al.*, 2011).

Na tentativa de buscar uma compreensão para os fenômenos observados, como destacamos anteriormente, investigamos mecanismos efetores e celulares que pudessem nos dar um direcionamento do provável impacto imuno-modulador sobre a inflamação alérgica causada pelo álcool quando os animais entravam em contato prévio com o *L. lactis*. Um dos principais mecanismos reguladores na mucosa intestinal é a geração, na periferia, de linfócitos T com atividade supressora (WEINE *et al.*, 2011). Para tanto, sabemos da importância crucial do contexto ativador desses linfócitos, com a participação de células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs, componentes especializados do sistema imune inato, possuem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T, levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de uma resposta imune específica. Dentre as populações de APCs profissionais, destacam-se as DCs, os macrófagos e os linfócitos B (DELVES & ROITT, 2000; SAALMULLER, 2006).

As APCs iniciam respostas adaptativas via interação TCR-MHC-peptídeo (BLANDER, 2007; WATTS, 2002). O reconhecimento antigênico por linfócitos T específicos e a subsequente ativação celular requerem, além da apresentação do peptídeo pelas APCs, um segundo sinal, denominado co-estimulação. A interação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, na superfície das células apresentadoras, e a molécula CD28 na superfície da célula T é o principal estímulo para a ativação dos linfócitos T, que podem participar tanto de atividades imunogênicas ou tolerogênicas (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 2002; TSENG *et al.*, 2001). Nesse sentido, analisamos o perfil de ativação das principais APCs (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) em um órgão linfóide

local (linfonodo mesentérico - LM) e no baço, uma vez que a regulação gerada na mucosa tem repercussões sistêmicas.

Vale ressaltar que, apesar de trabalhos do nosso grupo de pesquisa terem demonstrado alterações significativas no percentual de APCs estudadas e no perfil de ativação das mesmas após a ingestão aguda de etanol (ANDRADE *et al.*, 2009), nossos dados não evidenciam tal impacto. Isso pode ser explicado pelo fato de que no trabalho de Andrade e colaboradores (2009) foi avaliado o percentual de células e intensidade média de expressão de moléculas de ativação pela emissão de fluorescência. É preciso destacar que no nosso trabalho utilizamos um protocolo de imunofenotipagem modificado, de modo que os resultados foram expressos como número absoluto de células, e não valores percentuais. De qualquer forma, nossos dados foram extremamente interessantes, como destacaremos a seguir.

De um modo geral, observamos as principais alterações nos grupos tratados com EtOH que receberam previamente as bactérias, quando os comparamos com seus respectivos controles (que não receberam EtOH). Em síntese, parece que o contato das bactérias com a mucosa intestinal provoca alterações diferenciais no perfil de ativação das APCs locais, e mais interessante, com repercussão para as APCs do baço. Essas mudanças parecem representar um componente a mais para ajudar na manutenção dos mecanismos imunoreguladores, e que, na ausência de agressão não são evidenciados. Essas alterações estarão em destaque quando a manutenção desta imuno-regulação estiver sob “ameaça”, ou seja, quando a mucosa entrar em contato com agentes agressores, como o álcool.

Interessantemente, no LM observamos um impacto seletivo, com um aumento no número de células dendríticas ativadas e redução do número de macrófagos ativados, sem qualquer alteração nos linfócitos B, nos animais tratados com EtOH que previamente entraram em contato oral com *L. lactis* selvagem. Entretanto, quando *L. lactis* produtor de Hsp65 foi administrado previamente ao álcool, observamos uma diminuição no número de macrófagos e linfócitos B ativados, sem impacto sobre as células dendríticas.

Resultados ainda mais interessantes foram observados na análise do baço. Como destaque citamos o aumento na ativação de todas as APCs avaliadas (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B), com provável repercussão no potencial de apresentação de antígenos, nos animais tratados com EtOH que previamente entraram em contato oral com *L. lactis* selvagem. O contrário foi observado quando *L. lactis* produtor de Hsp65 foi administrado previamente ao álcool. Observamos uma diminuição no número de APCs ativadas quando comparado com o grupo controle, que não recebeu EtOH. Esses resultados

são extremamente interessantes e é claro, necessitam de estudos adicionais para sua elucidação.

Alguns trabalhos na literatura sugerem que a presença de Hsp60 no meio extracelular é responsável por afetar a expressão de moléculas de superfície em APCs, com possíveis repercussões em suas funções. Flohe e colaboradores (2003) demonstraram que culturas de células dendríticas derivadas da medula óssea, quando cultivadas com Hsp60 humana, mostravam sinais de maturação representados pela *up-regulation* de MHCII e moléculas co-estimuladoras como CD86, CD40 e CD54 de uma maneira dose dependente. De forma semelhante, Cohen-Sfady e colaboradores (2005) mostraram que culturas de linfócitos B esplênicos purificados, na presença de Hsp60 humana, apresentavam uma *up regulation* na expressão de MHCII, CD86, CD40 e CD69, entretanto, sem diferença em CD80. Assim podemos sugerir que a ingestão oral prévia de Hsp60/65 seja capaz de gerar uma *down-regulation* em moléculas de superfícies associadas à maturação celular de APCs, quando estas são expostas subsequentemente a esta mesma proteína, liberada devido à lesão celular gerada pelo álcool. Desta forma acreditamos que em nosso trabalho essa provável *down-regulation* na ativação de APCs após o tratamento oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 possa ser um reflexo da tolerância para a Hsp65.

Outra análise importante que complementou os estudos das APCs foi a investigação de linfócitos T com fenótipo de células reguladoras, avaliados pela expressão de moléculas que caracterizam a produção desses linfócitos na periferia, como CD45RB^{low}CD25⁺, e moléculas que identificam as chamadas células T reguladoras naturais, geradas no timo (CD25⁺Foxp3) (ANNACKER *et al.*, 2001; BOTTOMLY *et al.*, 1989; WEINER *et al.*, 2011). De forma complementar aos dados das APCs, observamos que o tratamento prévio com *L. lactis* nos animais tratados com EtOH, repercute em um aumento no número de linfócitos T com fenótipo regulador gerados na periferia, tanto no LM quanto no baço, quando comparado com o grupo que não recebeu EtOH. Um dos principais mecanismos explicativos para a indução da tolerância oral é a supressão via células reguladoras. Estas células são geradas após apresentação do antígeno pelas APCs na mucosa. Após este contato as células T antígeno-específicas são induzidas a secretarem citocinas anti-inflamatórias com TGF- β e IL-10, e posteriormente migram para órgãos linfóides onde inibem respostas inflamatórias (FARIA & WEINER, 1999, 2005; WEINER *et al.*, 2011). Alguns trabalhos na literatura têm mostrado que a geração de células com fenótipo regulador pode também ser desencadeada pela ingestão de bactérias probióticas. A administração prévia de probióticos - *Lactobacillus rhamnosus* e/ou *B. longum* – em modelos experimentais de alergia alimentar e asma induzidos

por OVA, foi capaz de aumentar a frequência de células Treg $CD4^+CD25^{high}$ no baço e LM de animais alérgicos, e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço de animais asmáticos, em relação a seus controles positivos, o que resultou na supressão da resposta alérgica nestes modelos experimentais (JANG *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2012). Desta forma, podemos reforçar que um dos mecanismos pelos quais *L. lactis* esteja atuando na redução dos parâmetros alérgicos desencadeados pelo álcool, seja por meio da geração de células T com fenótipo regulador na periferia.

Sabemos que esses resultados apontam para um caminho sobre o provável mecanismo de ação de *L. lactis* na manutenção ou mesmo no reforço da imuno-modulação local e sistêmica, mas muito ainda precisa ser feito para comprovar nossa hipótese. Outros estudos, mais associados à investigação funcional de APCs e Linfócitos T estão sendo elaborados para responder essas questões.

Como objetivo final, avaliamos o efeito da administração prévia de bactérias sobre um importante fenômeno imunológico, que ocorre no intestino, conhecido como tolerância oral e sabidamente envolvido na manutenção da homeostase imunológica local e sistêmica. Nosso grupo de pesquisa mostrou uma refratariedade à indução da tolerância oral a OVA em animais que consumiram etanol previamente (ANDRADE *et al.*, 2006). Da mesma forma, nossos resultados indicam que a administração de álcool é acompanhada de importantes alterações no microambiente das mucosas de modo que, não foi possível estabelecer uma ativação de mecanismos reguladores nos animais sem tratamento que ingeriram álcool. Verificamos uma inversão nos níveis de IgE anti-OVA entre os grupos EtOH sem tratamento imunizados e tolerizados, de modo que houve um aumento nos níveis de IgE anti-OVA no soro dos animais tratados com álcool e tolerizados, sugerindo que estes animais, além de apresentarem um defeito na indução da tolerância oral, foram sensibilizados pelo contato oral com a OVA, após um reforço por via sub-cutânea.

Andrade e colaboradores (2003) sugerem que eventos relacionados com a atividade de macrófagos podem estar envolvidos na refratariedade a indução da tolerância oral em animais que consumiram álcool. Essa hipótese surgiu a partir da observação da permanência, demonstrada pela análise histológica, do antígeno não degradado na pata de animais que consumiram etanol e desafiados para a indução de reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH). Macrófagos e outras células estão envolvidos em uma variedade de eventos importantes, dentre eles destaca-se o processamento e apresentação de antígenos, que representa uma importante conexão entre o sistema imune inato e adaptativo (KLIMP *et al.*, 2002). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa identificaram uma drástica redução no

tempo total de fagocitose realizada por macrófagos peritoneais coletados de animais que receberam álcool. Uma vez que estas células são importantes APCs, foi sugerido que o processamento de antígenos esteja também comprometido pelo álcool, e com ele, várias atividades importantes na indução da tolerância oral. Recentemente (ANDRADE *et al.*, 2009) nosso grupo de pesquisa deu uma nova contribuição para o mecanismo envolvido na refratariedade à indução de tolerância oral nos animais tratados com etanol ao demonstrar um aumento do potencial de apresentação de antígenos por linfócitos B. Alguns artigos na literatura demonstram que quando linfócito B apresenta para linfócito T há um aumento na produção de IL-4 e por sua vez todo mecanismo alérgico é iniciado (DENG *et al.*, 2002; LINDELL *et al.*, 2008). Interessantemente, o tratamento prévio desses animais com *L. lactis*, produtor ou não de Hsp65, resultou em uma redução dos níveis de IgE anti-OVA no grupo tolerizado nos animais tratados com EtOH, parecendo resgatar os elementos necessários para que o fenômeno ocorra. Frossard e colaboradores (2007) mostraram que a administração de *L. lactis* selvagem, ou geneticamente modificado para secretar IL-10, em um modelo experimental de anafilaxia alérgica induzida por β -lactoglobulina, foi capaz de reduzir os níveis séricos de IgE e IgG1 anti- β -lactoglobulina. Somado a isso, recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que a mesma linhagem de *L. lactis* selvagem e secretor de Hsp65 utilizado neste trabalho, foi capaz de reduzir os níveis de IgE-anti OVA em um modelo experimental de alergia a OVA (PEREZ, 2012). Desta forma podemos sugerir que *L. lactis* esteja atuando em mecanismos que envolvem apresentação de antígenos às células T, com possíveis repercussões na secreção de imunoglobulinas e interleucinas, principalmente aquelas relacionadas a alergias, como IL-4 e IgE.

No presente estudo demonstramos que *L. lactis* selvagem ou secretor de Hsp65 são microrganismos com propriedades probióticas, capazes de reverter os sinais alérgicos clássicos, locais e sistêmicos, desencadeados pelo consumo agudo de álcool, como o aumento *in situ* de IL-4 gástrica e intestinal, e IgE total sérica. Além disso, ambas as linhagens restauraram, a níveis basais, a secreção de muco gástrico e IL-10 intestinal aumentada pelo consumo de álcool, evidenciando o papel destas BAL na imuno-modulação local. Adicionalmente, ambas as linhagens elevaram a secreção de IgAs no intestino de animais controle, característica apresentada por alguns microrganismos probióticos. No fígado, de forma interessante, apenas *L. lactis* secretor de Hsp65 atenuou a degeneração hidrópica hepática desencadeada pela ingestão de EtOH, sugerindo que a tolerância oral a Hsp65 possa ter repercutido de uma forma sistêmica marcante, promovendo um efeito protetor neste órgão. A análise fenotípica de APCs no LM e baço dos animais EtOH tratados previamente com as

bactérias, mostrou uma possível tolerância oral a Hsp65, representada pela *down-regulation* na ativação celular desta população. Contrariamente, *L. lactis* selvagem foi capaz de aumentar a população tanto de APCs ativadas quanto de células T reguladoras. Embora ambas as linhagens empregadas neste trabalho tenham mostrado atuações opostas na ativação de APCs, fica evidente o papel benéfico destas bactérias nos parâmetros analisados em nosso estudo. Finalmente mostramos uma refratariedade à indução da tolerância oral à OVA em animais que consumiram álcool, e de forma interessante, ambas as linhagens bacterianas parecem resgatar os elementos necessários para que este fenômeno ocorra (Figura 26).

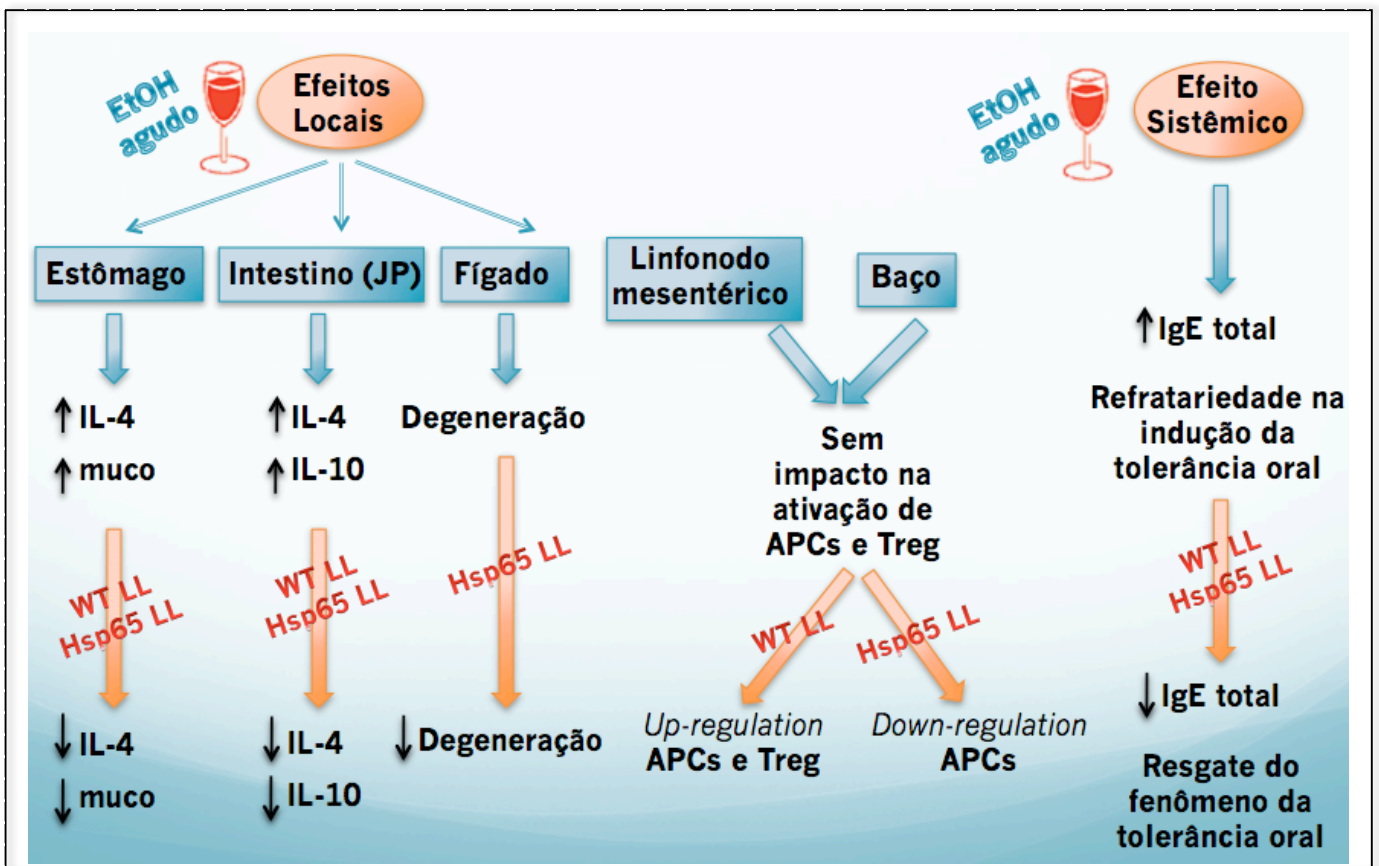


Figura 26: Resumo dos efeitos locais e sistêmicos gerados pela administração prévia de *L. lactis* selvagem e secretor da proteína Hsp65 no modelo de ingestão aguda de EtOH.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Nas condições experimentais utilizadas neste estudo, conclui-se que os tratamentos com *L. lactis* selvagem e secretores de Hsp65 em animais que ingeriram álcool:
 - Revertem sinais clássicos de reação alérgica do tipo I, por meio da redução dos níveis de IL-4 na mucosa gástrica e intestinal, além dos níveis séricos de IgE total;
 - Restauram a homeostase do muco gástrico secretado e da produção de IL-10 intestinal;
 - Impactam diferencialmente o número de APCs ativadas, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, no linfonodo mesentérico e baço; além disso, *L. lactis* selvagem apresenta uma capacidade em aumentar células T com fenótipo regulador nesses órgãos;
 - Parecem resgatar o fenômeno da tolerância oral quebrada pelo consumo de álcool.

- ✓ *L. lactis* secretor de Hsp65 ingerido previamente ao consumo de etanol parece ser eficiente na redução de danos hepáticos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria do ácido láctico *L. lactis* selvagem surge como nova possibilidade terapêutica na prevenção de alterações imunológicas, com perfil alergênico, desencadeado pela ingestão aguda de álcool. Este microrganismo emerge como um potente probiótico, capaz de resgatar a homeostase do organismo e aumentar defesas inatas como a secreção de IgA intestinal. A entrega de Hsp65 na mucosa gastrointestinal por *L. lactis* surge como uma promissora ferramenta na prevenção de doenças hepáticas, entretanto novos estudos precisam ser realizados a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nesta proteção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEL-PATIENT, K.; AH-LEUNG, S.; CREMINON, C. *et al.* Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. **Clin Exp Allergy**, v. 35, n. 4, p. 539-546, 2005.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, n. 1, p. C1-19, 2005.
- AMARAL, J. F. DO. **O papel das proteínas da dieta na manutenção do sistema imune após o desmame e na infecção experimental por *Leishmania major***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- AMDEKAR, S.; DWIVEDI, D.; ROY, P.; KUSHWAH, S.; SINGH, V. Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 299-306, 2010.
- ANDRADE, M C; ALBERNAZ, M. J.; ARAUJO, M. S. *et al.* Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 3, p. 226-237, 2009.
- ANDRADE, M C; MENEZES, J. S.; CASSALI, G. D. *et al.* Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 2, p. 312-322, 2006.
- ANDRADE, MARILÉIA CHAVES. **Tolerância e inflamação: um estudo da imunoregulação em modelos experimentais de gastrite e colite induzidos por álcool**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- ANNACKER, O.; PIMENTA-ARAÚJO, R.; BURLIN-DEFRANOUX, O. *et al.* CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. **J Immunol**, v. 166, n. 5, p. 3008-3018, 2001.
- ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 61, n. 3-4, p. 105-124, 2000.
- AZEVEDO, M. S. P. DE. **Avaliação da imunogenicidade de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- AZIZ-SEIBLE, R. S.; LEE, S. M.; KHARBANDA, K. K.; MCVICKER, B. L.; CASEY, C. A. Ethanol feeding potentiates the pro-inflammatory response of Kupffer cells to cellular fibronectin. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 4, p. 717-725, 2011.

- BACHARIER, L. B.; GEHA, R. S. Molecular mechanisms of IgE regulation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 105, n. 2 Pt 2, p. S547-58, 2000.
- BACHMANN, M. F.; OXENIUS, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. **EMBO Rep**, v. 8, n. 12, p. 1142-1148, 2007.
- BAHEY-EL-DIN, M.; GAHAN, C. G.; GRIFFIN, B. T. Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. **Curr Gene Ther**, v. 10, n. 1, p. 34-45, 2010.
- BEERE, H. M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 13, p. 2641-2651, 2004.
- BENGTSSON, A. A.; RYLANDER, L.; HAGMAR, L.; NIVED, O.; STURFELT, G. Risk factors for developing systemic lupus erythematosus: a case-control study in southern Sweden. **Rheumatology (Oxford)**, v. 41, n. 5, p. 563-571, 2002.
- BINDER, R. J.; VATNER, R.; SRIVASTAVA, P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p. 442-451, 2004.
- BLANDER, J. M. Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation. **Trends Immunol**, v. 28, n. 1, p. 19-25, 2007.
- BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Alcohol Health Res World**, v. 21, n. 1, p. 76-83, 1997.
- BODE, C.; BODE, J. C. Effect of alcohol consumption on the gut. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, n. 4, p. 575-592, 2003.
- BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S. *et al.* The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Res**, v. 11, n. 5, p. 731-753, 2001.
- BOTTOMLY, K.; LUQMAN, M.; GREENBAUM, L. *et al.* A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. **Eur J Immunol**, v. 19, n. 4, p. 617-623, 1989.
- BRAAT, H.; ROTTIERS, P.; HOMMES, D. W. *et al.* A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 6, p. 754-759, 2006.
- BRADLEY, L. M.; DALTON, D. K.; CROFT, M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. **J Immunol**, v. 157, n. 4, p. 1350-1358, 1996.
- BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutr Rev**, v. 56, n. 1 Pt 2, p. S5-18, 1998.
- BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F. E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunol Rev**, v. 206, p. 32-63, 2005.

BRUGMAN, S.; KLATTER, F. A.; VISSER, J. *et al.* Neonatal oral administration of DiaPep277, combined with hydrolysed casein diet, protects against Type 1 diabetes in BB-DP rats. An experimental study. **Diabetologia**, v. 47, n. 7, p. 1331-1333, 2004.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J Physiol Pharmacol**, v. 56 Suppl 5, p. 33-55, 2005.

BUDEC, M.; KOKO, V.; TODOROVIC, V. *et al.* Possible mechanism of acute effect of ethanol on intestinal IgA expression in rat. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 6, p. 858-863, 2007.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, 1998.

CABALLERIA, J. Current concepts in alcohol metabolism. **Ann Hepatol**, v. 2, n. 2, p. 60-68, 2003.

CABALLERO-FRANCO, C.; KELLER, K.; SIMONE, C. DE; CHADEE, K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 1, p. G315-22, 2007.

CAO, Q.; MAK, K. M.; LIEBER, C. S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF- α generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles of MAPKs and NF- κ B. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, n. 4, p. 849-853, 2002.

CARA, D. C.; EBBERT, K. V.; MCCAFFERTY, D. M. Mast cell-independent mechanisms of immediate hypersensitivity: a role for platelets. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4964-4971, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Alcohol and Public Health. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2012.

CHOMARAT, P.; RISSOAN, M. C.; BANCHEREAU, J.; MIOSSEC, P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. **J Exp Med**, v. 177, n. 2, p. 523-527, 1993.

CLARKE, G.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G.; QUIGLEY, E. M. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome--focus on lactic acid bacteria. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 35, n. 4, p. 403-413, 2012.

COHEN-SFADY, M.; NUSSBAUM, G.; PEVSNER-FISCHER, M. *et al.* Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. **J Immunol**, v. 175, n. 6, p. 3594-3602, 2005.

COOK, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 9, p. 1927-1942, 1998.

CORTES-PEREZ, N. G.; AH-LEUNG, S.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G. *et al.* Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 3, p. 226-233, 2007.

CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proc Nutr Soc**, v. 63, n. 1, p. 49-63, 2004.

CREWS, F. T.; BECHARA, R.; BROWN, L. A. *et al.* Cytokines and alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, n. 4, p. 720-730, 2006.

DELNESTE, Y. Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 4, p. 633-635, 2004.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DENG, J.; DEKRUYFF, R. H.; FREEMAN, G. J.; UMETSU, D. T.; LEVY, S. Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. **International immunology**, v. 14, n. 5, p. 513-23, maio 2002.

DIAZ, L. E.; MONTERO, A.; GONZALEZ-GROSS, M. *et al.* Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **Eur J Clin Nutr**, v. 56 Suppl 3, p. S50-3, 2002.

DOMINGUEZ-SANTALLA, M. J.; VIDAL, C.; VINUELA, J.; PEREZ, L. F.; GONZALEZ-QUINTELA, A. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 8, p. 1198-1205, 2001.

DUWAT, P.; CESSSELIN, B.; SOURICE, S.; GRUSS, A. Lactococcus lactis, a bacterial model for stress responses and survival. **Int J Food Microbiol**, v. 55, n. 1-3, p. 83-86, 2000.

EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 285-301, 1995.

ECONOMOU, M.; PAPPAS, G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. 5, p. 709-20, maio 2008.

EDEN, I. VAN. Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. **Drug Discov Today**, v. 5, n. 3, p. 115-120, 2000.

EDEN, W. VAN; KOETS, A.; KOOTEN, P. VAN; PRAKKEN, B.; ZEE, R. VAN DER. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. **Vaccine**, v. 21, n. 9-10, p. 897-901, 2003.

EDEN, W. VAN; THOLE, J. E.; ZEE, R. VAN DER; *et al.* Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. **Nature**, v. 331, n. 6152, p. 171-173, 1988.

EDEN, W. VAN; ZEE, R. VAN DER; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 4, p. 318-330, 2005.

- ELLIS, R. J. The molecular chaperone concept. **Semin Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 1990.
- ELSON, C. O.; EALDING, W.; LEFKOWITZ, J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. **J Immunol Methods**, v. 67, n. 1, p. 101-108, 1984.
- EPPS, E. VAN; HUSBY, G.; WILLIAMS JR., R. C.; STRICKLAND, R. G. Liver disease--a prominent cause of serum IgE elevation. **Clin Exp Immunol**, v. 23, n. 3, p. 444-450, 1976.
- EWALD, S. J. T lymphocyte populations in fetal alcohol syndrome. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 13, n. 4, p. 485-489, 1989.
- EWALD, S. J.; SHAO, H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 17, n. 2, p. 359-365, 1993.
- FARIA, A. M. DE; FICKER, S. M.; SPEZIALI, E. *et al.* Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mech Ageing Dev**, v. 102, n. 1, p. 67-80, 1998.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv Immunol**, v. 73, p. 153-264, 1999.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 206, p. 232-259, 2005.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clin Dev Immunol**, v. 13, n. 2-4, p. 143-157, 2006.
- FAUNCE, D. E.; GREGORY, M. S.; KOVACS, E. J. Effects of acute ethanol exposure on cellular immune responses in a murine model of thermal injury. **J Leukoc Biol**, v. 62, n. 6, p. 733-740, 1997.
- FERRARIS, R. P.; VILLENAS, S. A.; DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. **Am J Physiol**, v. 262, n. 6 Pt 1, p. G1047-59, 1992.
- FLOHE, S. B.; BRUGGEMANN, J.; LENDEMANS, S. *et al.* Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. **J Immunol**, v. 170, n. 5, p. 2340-2348, 2003.
- FROSSARD, C. P.; STEIDLER, L.; EIGENMANN, P. A. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 4, p. 952-959, 2007.
- FUKUI, H.; BRAUNER, B.; BODE, J. C.; BODE, C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. **J Hepatol**, v. 12, n. 2, p. 162-169, 1991.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, H.; TERADA, A.; MITSUOKA, T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **Int J Food Microbiol**, v. 42, n. 1-2, p. 39-44, 1998.

GERMANN, G.; BARTHOLD, U.; LEFERING, R.; RAFF, T.; HARTMANN, B. The impact of risk factors and pre-existing conditions on the mortality of burn patients and the precision of predictive admission-scoring systems. **Burns**, v. 23, n. 3, p. 195-203, 1997.

GHARE, S.; PATIL, M.; HOTE, P. *et al.* Ethanol inhibits lipid raft-mediated TCR signaling and IL-2 expression: potential mechanism of alcohol-induced immune suppression. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 8, p. 1435-1444, 2011.

GONZALEZ-QUINTELA, A.; VIDAL, C.; GUDE, F. *et al.* Increased serum IgE in alcohol abusers. **Clin Exp Allergy**, v. 25, n. 8, p. 756-764, 1995.

GONZALEZ-QUINTELA, A.; VIDAL, C.; GUDE, F. Alcohol, IgE and allergy. **Addict Biol**, v. 9, n. 3-4, p. 195-204, 2004.

GONZALEZ-QUINTELA, A.; VIDAL, C.; LOJO, S. *et al.* Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 83, n. 1, p. 61-67, 1999.

GORAL, J.; KARAVITIS, J.; KOVACS, E. J. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. **Alcohol**, v. 42, n. 4, p. 237-247, 2008.

GORAL, J.; KOVACS, E. J. In vivo ethanol exposure down-regulates TLR2-, TLR4-, and TLR9-mediated macrophage inflammatory response by limiting p38 and ERK1/2 activation. **J Immunol**, v. 174, n. 1, p. 456-463, 2005.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **Int J Food Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 237-238, 1998.

GUO, Y.; LI, Z.; LIN, H.; SAMEE, H.; KHALID, J. Studies on the specific degranulation of mast cell sensitized by several allergens in vitro. **Cell Mol Immunol**, v. 6, n. 2, p. 149-153, 2009.

GUPTA, R. S.; SPRINGSTON, E. E.; WARRIER, M. R. *et al.* The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. **Pediatrics**, v. 128, n. 1, p. e9-17, 20 jul 2011.

HALLGREN, R.; LUNDIN, L. Increased total serum IgE in alcoholics. **Acta Med Scand**, v. 213, n. 2, p. 99-103, 1983.

HAMADA, H.; HIROI, T.; NISHIYAMA, Y. *et al.* Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 57-64, 2002.

HANSON, D. J. **Preventing alcohol abuse: alcohol, culture and control**. Westport: [s.n.], 1995. p. 140

HAQUE, M. A.; YOSHINO, S.; INADA, S. *et al.* Suppression of adjuvant arthritis in rats by induction of oral tolerance to mycobacterial 65-kDa heat shock protein. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 11, p. 2650-2656, 1996.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 4, p. 271-283, 2005.

HEINER, D. C.; ROSE, B. Elevated levels of gamma-E (IgE) in conditions other than classical allergy. **J Allergy**, v. 45, n. 1, p. 30-42, 1970.

HEINZ, R.; WALTENBAUGH, C. Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 10, p. 1759-1771, 2007.

HINES, I. N.; WHEELER, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 2, p. G310-4, 2004.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2 Suppl, p. 365S-373S, 2001.

HUANG, J.; ZHONG, Y.; CAI, W. *et al.* The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 60, n. 2, p. 132-141, 2010.

HUIBREGTSE, I. L.; SNOECK, V.; CREUS, A. DE; *et al.* Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 517-528, 2007.

JAIN, S.; YADAV, H.; SINHA, P. R. Probiotic dahi containing *Lactobacillus casei* protects against *Salmonella enteritidis* infection and modulates immune response in mice. **J Med Food**, v. 12, n. 3, p. 576-583, 2009.

JANG, S. O.; KIM, H. J.; KIM, Y. J. *et al.* Asthma Prevention by *Lactobacillus Rhamnosus* in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 4, n. 3, p. 150-156, 2012.

JERRELLS, T. R.; SLUKVIN, I.; SIBLEY, D.; FUSELER, J. Increased susceptibility of experimental animals to infectious organisms as a consequence of ethanol consumption. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 2, p. 425-430, 1994.

JONES, D. B.; HUNTER, N. R.; DUFF, G. W. Heat-shock protein 65 as a beta cell antigen of insulin-dependent diabetes. **Lancet**, v. 336, n. 8715, p. 583-585, 1990.

JONES, M. K.; PADILLA, O. R.; ZHU, E. Survivin is a key factor in the differential susceptibility of gastric endothelial and epithelial cells to alcohol-induced injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 61, n. 3, p. 253-264, 2010.

JONSSON, I. M.; VERDRENGH, M.; BRISSELT, M. *et al.* Ethanol prevents development of destructive arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 1, p. 258-263, 2007.

KABEERDOSS, J.; DEVI, R. S.; MARY, R. R. *et al.* Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12(R) on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. **Nutr J**, v. 10, p. 138, 2011.

KALIA, N.; BARDHAN, K. D.; REED, M. W.; JACOB, S.; BROWN, N. J. Mast cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric mucosal injury: mechanisms of protection. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 2, p. 133-141, 2000.

KALIA, N.; BROWN, N. J.; JACOB, S.; REED, M. W.; BARDHAN, K. D. Studies on gastric mucosal microcirculation. 1. The nature of regional variations induced by ethanol injury. **Gut**, v. 40, n. 1, p. 31-35, 1997.

KAPPELMAN, M. D.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; KLEINMAN, K. *et al.* The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 5, n. 12, p. 1424-9, dez 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 5, p. 816-825, 2006.

KIM, D. J.; KIM, W.; YOON, S. J. *et al.* Effects of alcohol hangover on cytokine production in healthy subjects. **Alcohol**, v. 31, n. 3, p. 167-170, 2003.

KIM, J. Y.; CHOI, Y. O.; JI, G. E. Effect of oral probiotics (Bifidobacterium lactis AD011 and Lactobacillus acidophilus AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 8, p. 1393-1400, 2008.

KIMOTO-NIRA, H.; MIZUMACHI, K.; OKAMOTO, T.; SASAKI, K.; KURISAKI, J. Influence of long-term consumption of a Lactococcus lactis strain on the intestinal immunity and intestinal flora of the senescence-accelerated mouse. **Br J Nutr**, v. 102, n. 2, p. 181-185, 2009.

KISHORE, R.; HILL, J. R.; MCMULLEN, M. R.; FRENKEL, J.; NAGY, L. E. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, n. 1, p. G6-15, 2002.

KISHORE, R.; MCMULLEN, M. R.; NAGY, L. E. Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 276, n. 45, p. 41930-41937, 2001.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. DE; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **J Clin Gastroenterol**, v. 21 Suppl 1, p. S12-7, 1995.

KOIVISTO, T.; KAIHOVAARA, P.; SALASPURO, M. Acetaldehyde induces histamine release from purified rat peritoneal mast cells. **Life Sci**, v. 64, n. 3, p. 183-190, 1999.

LACY, E. R.; ITO, S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. **Gastroenterology**, v. 83, n. 3, p. 619-625, 1982.

LACY, E. R.; ITO, S. Rapid epithelial restitution of the rat gastric mucosa after ethanol injury. **Lab Invest**, v. 51, n. 5, p. 573-583, 1984.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LAM, E. K.; TAI, E. K.; KOO, M. W. *et al.* Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Life Sci**, v. 80, n. 23, p. 2128-2136, 2007.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 263-266, 2001.

LASO, F. J.; VAQUERO, J. M.; ALMEIDA, J.; MARCOS, M.; ORFAO, A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 5, p. 846-854, 2007.

LEE, S. J.; KANG, M. H.; MIN, H. Folic acid supplementation reduces oxidative stress and hepatic toxicity in rats treated chronically with ethanol. **Nutr Res Pract**, v. 5, n. 6, p. 520-526, 2011.

LIAN, L. H.; WU, Y. L.; SONG, S. Z. *et al.* *Gentiana manshurica* Kitagawa reverses acute alcohol-induced liver steatosis through blocking sterol regulatory element-binding protein-1 maturation. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 24, p. 13013-13019, 2010.

LICHTENBERGER, L. M.; GRAZIANI, L. A.; DIAL, E. J.; BUTLER, B. D.; HILLS, B. A. Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. **Science**, v. 219, n. 4590, p. 1327-1329, 1983.

LINDELL, D. M.; BERLIN, A. A.; SCHALLER, M. A.; LUKACS, N. W. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PloS one**, v. 3, n. 9, p. e3129, jan 2008.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet**, v. 22, p. 631-677, 1988.

LINNEBERG, A. Are we getting enough allergens? **Int Arch Allergy Immunol**, v. 147, n. 2, p. 93-100, 2008.

LINNEBERG, A.; BERG, N. D.; GONZALEZ-QUINTELA, A.; VIDAL, C.; ELBERLING, J. Prevalence of self-reported hypersensitivity symptoms following intake of alcoholic drinks. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 1, p. 145-151, 2008.

LINNEBERG, A.; PETERSEN, J.; NIELSEN, N. H. *et al.* The relationship of alcohol consumption to total immunoglobulin E and the development of immunoglobulin E sensitization: the Copenhagen Allergy Study. **Clin Exp Allergy**, v. 33, n. 2, p. 192-198, 2003.

LOIR, Y. LE; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *et al.* Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 2, 2005.

LOIR, Y. LE; NOUAILLE, S.; COMMISSAIRE, J. *et al.* Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 9, p. 4119-4127, 2001.

LOTT, R. **Transaminase. Cispre**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2008

LUCEY, D. R.; CLERICI, M.; SHEARER, G. M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 532-562, 1996.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MADSEN, C. Prevalence of food allergy: an overview. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 4, p. 413-7, nov 2005.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **J Bacteriol**, v. 189, n. 4, p. 1199-1208, 2007.

MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; DOLGANIUC, A.; KODYS, K.; SZABO, G. Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. **J Immunol**, v. 173, n. 5, p. 3398-3407, 2004.

MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; GIROUARD, L.; SZABO, G. Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 567-577, 1996.

MANDREKAR, P.; CATALANO, D.; WHITE, B.; SZABO, G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, n. 1, p. 135-139, 2006.

MARENCO, E. B.; MORAES, L. V. DE; FARIA, M. *et al.* Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3025, 2008.

MARON, R.; SUKHOVA, G.; FARIA, A. M. *et al.* Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1708-1715, 2002.

MATRICARDI, P. M. Prevalence of atopy and asthma in eastern versus western Europe: why the difference? **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 87, n. 6 Suppl 3, p. 24-27, 2001.

MATRICARDI, P. M.; ROSMINI, F.; RIONDINO, S. *et al.* Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. **BMJ**, v. 320, n. 7232, p. 412-417, 2000.

MATTAR, A. F.; TEITELBAUM, D. H.; DRONGOWSKI, R. A. *et al.* Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. **Pediatr Surg Int**, v. 18, n. 7, p. 586-590, 2002.

- MEIJERINK, M.; WELLS, J. M.; TAVERNE, N. *et al.* Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization model. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 2012.
- MENEZES, J. S.; MUCIDA, D. S.; CARA, D. C. *et al.* Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**, v. 15, n. 3, p. 447-455, 2003.
- MERSEREAU, W. A.; LEHOTAY, D. C.; HINCHEY, E. J. Relative roles of acid and mucosal compression in ulcerogenesis in indomethacin-insulin-treated rat. **Dig Dis Sci**, v. 33, n. 11, p. 1454-1458, 1988.
- MESSINGHAM, K. A.; FAUNCE, D. E.; KOVACS, E. J. Alcohol, injury, and cellular immunity. **Alcohol**, v. 28, n. 3, p. 137-149, 2002.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol Rev**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.
- MIYOSHI, A.; JAMET, E.; COMMISSAIRE, J. *et al.* A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 239, n. 2, p. 205-212, 2004.
- MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J. *et al.* Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. **Pediatr Res**, v. 64, n. 4, p. 418-422, 2008.
- MOINE, O. LE; MARCHANT, A.; GROOTE, D. DE; *et al.* Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. **Hepatology**, v. 22, n. 5, p. 1436-1439, 1995.
- MOOG, F. The lining of the small intestine. **Scientific American**, v. 245, n. 5, p. 154-8, 160, 162 et passiom, nov 1981.
- MORLAND, H.; MORLAND, B. Different effects of ethanol on particle phagocytosis via different receptors in human monocytes. **APMIS**, v. 97, n. 9, p. 853-857, 1989.
- MORTEAU, O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 48, n. 6, p. 473-480, 2000.
- MUTOH, H.; OTA, S.; HIRAISHI, H. *et al.* Adaptive cytoprotection in cultured rat gastric mucus-producing cells. Role of mucus and prostaglandin synthesis. **Dig Dis Sci**, v. 40, n. 4, p. 872-878, 1995.
- NAGY, L. E. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 8, p. 882-890, 2003.
- NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; YAGI, N. *et al.* Effects of polaprezinc on lipid peroxidation, neutrophil accumulation, and TNF-alpha expression in rats with aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**, v. 46, n. 4, p. 845-851, 2001.

- NELSON, S.; BAGBY, G. J.; BAINTON, B. G.; SUMMER, W. R. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. **J Infect Dis**, v. 160, n. 3, p. 422-429, 1989.
- NELSON, S.; KOLLS, J. K. Alcohol, host defence and society. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 205-209, 2002.
- NORKINA, O.; DOLGANIUC, A.; SHAPIRO, T. *et al.* Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinases to promote IL-10 production in human monocytes. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 3, p. 752-762, 2007.
- NOUAILLE, S.; RIBEIRO, L. A.; MIYOSHI, A. *et al.* Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 102-111, 2003.
- OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, n. 1, p. 10-21, 1988.
- OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 6, p. G807-19, 2010.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1-4, p. 279-289, 2002.
- O'BRIEN JR., J. M.; LU, B.; ALI, N. A. *et al.* Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients. **Crit Care Med**, v. 35, n. 2, p. 345-350, 2007.
- PARONETTO, F. Immunologic reactions in alcoholic liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 13, n. 2, p. 183-195, 1993.
- PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. **Biochim Biophys Acta**, v. 1688, n. 3, p. 210-222, 2004.
- PEPYS, J. Natural history of "atopy." **J Allergy Clin Immunol**, v. 78, n. 5 Pt 2, p. 959-961, 1986.
- PEREZ, D. A. **Avaliação do uso de *Lactococcus lactis* produtores ou não da proteína de choque térmico 65 como estratégia imunomodulatória em camundongos com alergia alimentar experimental à ovalbumina**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- PLATTEEUW, C.; SIMONS, G.; VOS, W. M. DE. Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, n. 2, p. 587-593, 1994.
- POCKLEY, A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? **Expert Rev Mol Med**, v. 3, n. 23, p. 1-21, 2001.

POCKLEY, A. G.; BULMER, J.; HANKS, B. M.; WRIGHT, B. H. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. **Cell Stress Chaperones**, v. 4, n. 1, p. 29-35, 1999.

PONTES, D. S.; AZEVEDO, M. S. DE; CHATEL, J. M. *et al.* Lactococcus lactis as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein Expr Purif**, v. 79, n. 2, p. 165-175, 2011.

PRAKKEN, B. J.; SAMODAL, R.; LE, T. D. *et al.* Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 12, p. 4228-4233, 2004.

PRUETT, S. B.; HAN, Y. C.; WU, W. J. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol: involvement of neuroendocrine pathways. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 2, p. 431-437, 1994.

QING, L.; WANG, T. Lactic acid bacteria prevent alcohol-induced steatohepatitis in rats by acting on the pathways of alcohol metabolism. **Clin Exp Med**, v. 8, n. 4, p. 187-191, 2008.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100-12, 14 maio 2007.

RAO, R. K.; SETH, A.; SHETH, P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, n. 6, p. G881-4, 2004.

RAZ, I.; ELIAS, D.; AVRON, A. *et al.* Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. **Lancet**, v. 358, n. 9295, p. 1749-1753, 2001.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962.

ROCHA, C. S. **Construção de linhagens recombinantes de Lactococcus lactis produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de Mycobacterium leprae: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações científicas**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

ROMEO, J.; WARNBERG, J.; DIAZ, L. E.; GONZALEZ-GROSS, M.; MARCOS, A. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. **J Physiol Biochem**, v. 63, n. 2, p. 153-159, 2007.

ROSELLE, G. A.; MENDENHALL, C. L.; CHEDID, A.; MORITZ, T. E.; GARTSIDE, P. Alcohol modulation of immune function: clinical and experimental data. Veterans Affairs Cooperative Study Groups 119 and 275. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 19, n. 3, p. 551-554, 1995.

RYAN, J. J. Interleukin-4 and its receptor: essential mediators of the allergic response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 99, n. 1 Pt 1, p. 1-5, 1997.

SAALMULLER, A. New understanding of immunological mechanisms. **Vet Microbiol**, v. 117, n. 1, p. 32-38, 2006.

SAIKA, M.; UEYAMA, T.; SENBA, E. Expression of immediate early genes, HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion. **Dig Dis Sci**, v. 45, n. 12, p. 2455-2462, 2000.

SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 55-63, 2000.

SANTOS, A. C. G. **Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças inflamatórias intestinais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SAVILAHTI, E.; KUITUNEN, M.; VAARALA, O. Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 8, n. 3, p. 243-248, 2008.

SCHAFER, C.; SCHIPS, I.; LANDIG, J.; BODE, J. C.; BODE, C. Tumor-necrosis-factor and interleukin-6 response of peripheral blood monocytes to low concentrations of lipopolysaccharide in patients with alcoholic liver disease. **Z Gastroenterol**, v. 33, n. 9, p. 503-508, 1995.

SCHIFFER, C.; LALANNE, A. I.; CASSARD, L. *et al.* A strain of *Lactobacillus casei* inhibits the effector phase of immune inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2646-2655, 2011.

SCHMIDT, K. L.; BELLARD, R. L.; SMITH, G. S.; HENAGAN, J. M.; MILLER, T. A. Influence of prostaglandin on repair of rat stomach damaged by absolute ethanol. **J Surg Res**, v. 41, n. 4, p. 367-377, 1986.

SENOL, A.; ISLER, M.; KARAHAN, A. G.; KILIC, G. B.; KULEASAN, H.; GOREN, I. *et al.* Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. **Turk J Gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 18-26, 2011a.

SENOL, A.; ISLER, M.; KARAHAN, A. G.; KILIC, G. B.; KULEASAN, H.; KAYA, S. *et al.* Preventive effect of probiotics and alpha-tocopherol on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **J Med Food**, v. 14, n. 1-2, p. 173-179, 2011b.

SICHERER, S. H. Food allergy. **Lancet**, v. 360, n. 9334, p. 701-710, 2002.

SILVAIN, C.; PATRY, C.; LAUNAY, P.; LEHUEN, A.; MONTEIRO, R. C. Altered expression of monocyte IgA Fc receptors is associated with defective endocytosis in patients with alcoholic cirrhosis. Potential role for IFN-gamma. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1606-1618, 1995.

HECKMANN, W.; SILVEIRA, C. M. **Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos**. In: **Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual**. (J. C. A. & A. G. de Andrade, Ed.) Barueri, 2009.

SMITH JR., W. I.; THIEL, D. H. VAN; WHITESIDE, T. *et al.* Altered immunity in male patients with alcoholic liver disease: evidence for defective immune regulation. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 4, n. 2, p. 199-206, 1980.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 185-194, 2002.

STANDRIDGE, J. B.; ZYLSTRA, R. G.; ADAMS, S. M. Alcohol consumption: an overview of benefits and risks. **South Med J**, v. 97, n. 7, p. 664-672, 2004.

STARKENBURG, S.; MUNROE, M. E.; WALTENBAUGH, C. Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 8, p. 1221-1230, 2001.

STEIDLER, L.; HANS, W.; SCHOTTE, L.; NEIRYNCK, S.; OBERMEIER, F.; FALK, W.; FIERS, W.; REMAUT, E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, v. 289, n. 5483, p. 1352-1355, 2000.

STEIDLER, L.; NEIRYNCK, S.; HUYGHEBAERT, N. *et al.* Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 7, p. 785-789, 2003.

STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 1, p. 351-358, 2002.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int J Food Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunol Today**, v. 19, n. 4, p. 173-181, 1998.

SUN, A. Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; NEVE, E. *et al.* Ethanol and oxidative stress. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 5 Suppl ISBRA, p. 237S-243S, 2001.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 6, p. 830-841, 1999.

SZABO, G.; CATALANO, D.; WHITE, B.; MANDREKAR, P. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 5, p. 824-828, 2004.

SZABO, G.; CHAVAN, S.; MANDREKAR, P.; CATALANO, D. Acute alcohol consumption attenuates interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1) induction in response to ex vivo stimulation. **J Clin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 67-76, 1999.

SZABO, G.; MANDREKAR, P.; CATALANO, D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. **J Leukoc Biol**, v. 58, n. 3, p. 342-350, 1995.

- SZABO, G.; MANDREKAR, P.; GIROUARD, L.; CATALANO, D. Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 5, p. 900-907, 1996.
- SZABO, G.; MANDREKAR, P.; OAK, S.; MAYERLE, J. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, n. 2-3, p. 115-123, 2007.
- SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J Clin Gastroenterol**, v. 13 Suppl 2, p. S21-34, 1991.
- TAKAGI, K.; KASUYA, Y.; WATANABE, K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 12, p. 465-472, 1964.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-376, 2003.
- TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; STACHURA, J.; KRAUSE, W. J. Arachidonic acid protection of gastric mucosa against alcohol injury: sequential analysis of morphologic and functional changes. **J Lab Clin Med**, v. 102, n. 3, p. 340-351, 1983.
- THOMPSON, L. J.; REUSE, H. DE. Genomics of Helicobacter pylori. **Helicobacter**, v. 7 Suppl 1, p. 1-7, 2002.
- THURMAN, R. G. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 1, p. G605-11, 1998.
- TISSIERES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. **J Mol Biol**, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. **Immunol Today**, v. 14, n. 7, p. 335-338, 1993.
- TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **J Leukoc Biol**, v. 59, n. 4, p. 505-511, 1996.
- TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; LIAO, J. W.; PAN, T. M. Effect of the administration of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 7, p. 791-798, 2010.
- TSENG, S. Y.; OTSUJI, M.; GORSKI, K. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. **J Exp Med**, v. 193, n. 7, p. 839-846, 2001.
- VANDENBROUCKE, K.; HAARD, H. DE; BEIRNAERT, E. *et al.* Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 1, p. 49-56, 2010.

VANDENBROUCKE, K.; HANS, W.; HUYSSE, J. VAN; *et al.* Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 502-513, 2004.

VERMA, B. K.; FOGARASI, M.; SZABO, G. Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. **J Clin Immunol**, v. 13, n. 1, p. 8-22, 1993.

VIDAL, C.; QUINTELA, A. G.; MILLAN, I.; GUDE, F.; CUERVAS-MONS, V. Serum IgE levels in liver cirrhosis. Contrasting results in alcoholic and non-alcoholic patients. **Clin Exp Allergy**, v. 24, n. 6, p. 540-548, 1994.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996.

WANG, Z.; WU, X.; ZHANG, Y. *et al.* Discrepant roles of CpG ODN on acute alcohol-induced liver injury in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 12, n. 3, p. 526-533, 2012.

WASZKIEWICZ, N.; SZAJDA, S. D.; JANKOWSKA, A. *et al.* The effect of acute ethanol intoxication on salivary proteins of innate and adaptive immunity. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 4, p. 652-656, 2008.

WATTS, C. Phagocytosis: how the phagosome became the phag-ER-some. **Curr Biol**, v. 12, n. 19, p. R666-8, 2002.

WEINER, H. L.; CUNHA, A. P. DA; QUINTANA, F.; WU, H. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 241, n. 1, p. 241-259, 2011.

WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Sci Am**, v. 268, n. 5, p. 56-64, 1993.

WELLS, J. M.; MERCENIER, A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 5, p. 349-362, 2008.

WELLS, J. M.; WILSON, P. W.; NORTON, P. M.; GASSON, M. J.; PAGE, R. W. LE. *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. **Mol Microbiol**, v. 8, n. 6, p. 1155-1162, 1993.

WENNER, C. A.; GULER, M. L.; MACATONIA, S. E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. **J Immunol**, v. 156, n. 4, p. 1442-1447, 1996.

WHEELER, M. D.; KONO, H.; YIN, M. *et al.* The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 12, p. 1544-1549, 2001.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London Ontario, 2002.

WHO, World Health Organization. **Global status report on alcohol and health**. Geneva, 2011.

- WIETEN, L.; BERLO, S. E.; TEN BRINK, C. B. *et al.* IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4186, 2009.
- WINFIELD, J. B. Stress proteins, arthritis, and autoimmunity. **Arthritis Rheum**, v. 32, n. 12, p. 1497-1504, 1989.
- WOOF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **J Pathol**, v. 208, n. 2, p. 270-282, 2006.
- WU, W. K.; CHO, C. H. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. **J Pharmacol Sci**, v. 94, n. 4, p. 348-358, 2004.
- XIONG, Q.; LI, J.; JIN, L.; LIU, J.; LI, T. Nasal immunization with heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis and reduces serum lipids in cholesterol-fed wild-type rabbits probably through different mechanisms. **Immunol Lett**, v. 125, n. 1, p. 40-45, 2009.
- YONETCI, N.; KOSEKLI, M. A.; OZUTEMIZ, A. O. *et al.* Effects of pentoxifylline on alcohol-induced gastric injury and acid secretion in rats. **Dig Dis Sci**, v. 48, n. 7, p. 1392-1396, 2003.
- YOSHIDA, A.; AOKI, R.; KIMOTO-NIRA, H. *et al.* Oral administration of live *Lactococcus lactis* C59 suppresses IgE antibody production in ovalbumin-sensitized mice via the regulation of interleukin-4 production. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 61, n. 3, p. 315-322, 2011.
- ZANIN-ZHOROV, A.; BRUCK, R.; TAL, G. *et al.* Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3227-3236, 2005.
- ZHI, Q.; WANG, S.; CHAI, M. *et al.* Transgenic mini-tomato and protection against alcohol-induced gastric injury. **J Genet Genomics**, v. 34, n. 8, p. 756-763, 2007.
- ZHONG, Y.; HUANG, J.; TANG, W.; CHEN, B.; CAI, W. Effects of probiotics, probiotic DNA and the CpG oligodeoxynucleotides on ovalbumin-sensitized Brown-Norway rats via TLR9/NF-kappaB pathway. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 2012.
- ZUIABLE, A.; WIENER, E.; WICKRAMASINGHE, S. N. In vitro effects of ethanol on the phagocytic and microbial killing activities of normal human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Clin Lab Haematol**, v. 14, n. 2, p. 137-147, 1992.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I

Fixação de tecidos

Formalina de Carson em Tampão Millong ph 7.2 – 7.4

Formol 40%.....	10ml
Fosfato de Sódio monobásico.....	1,86g
Hidróxido de Sódio.....	0,42g
Água destilada.....	90ml

Dissolver os reagentes em água. Em seguida, adicionar formol 40%. Por último, medir o pH

Tempo de fixação: 24-72 horas

Após este tempo transferir o tecido para álcool 70%

9.2. ANEXO II

Técnicas de colorações histológicas

HE (Hematoxilina-Eosina)

1- Desparafinar em Xilol I e II	10 a 20 minutos (cada)
2- Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
3- Lavar em água corrente	5 minutos
4- Corar pela Hematoxilina (VETEC)	1 minuto e 30 segundos
5- Lavar em água corrente branda	30 minutos
6- Corar pela Eosina (VETEC)	30 segundos
7- Lavar rapidamente em água corrente	1 mergulho
8- Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico (70%, 80% e 90%)	2 mergulhos
9- Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico absoluto I e II	3 minutos (cada)
10- Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	

AZUL DE TOLUIDINA

1- Desparafinar em Xilol I e II	10 a 20 minutos (cada)
2- Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
3- Lavar em água destilada	3 minutos
4- Azul de Toluidina 0,5%	5 segundos
5- Água destilada	1 mergulho
6- Diferenciar em álcool 95%	Até os cortes ficarem azuis claros
7- Desidratar em álcool etílico absoluto I e II	2 mergulhos (cada)
8- Diafanizar em Xilol I e II	5 minutos (cada)
9- Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	

P.A.S. (Periodic Acid Schiff)

1- Desparafinar em Xilol I e II	10 a 20 minutos (cada)
2- Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
3- Lavar em água corrente	5 minutos
4- Lavar em água destilada	1 mergulho
5- Ácido periódico 0,5%	5 minutos
6- Lavar em água destilada	2 mergulhos
7- Reativo de Schiff	10 minutos ou mais (até os cortes ficarem rosa pálido)
8- Lavar em água corrente	1 mergulho
9- Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico (70%, 80% e 90%)	2 mergulhos (cada)
10- Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico absoluto I e II	3 minutos
11- Diafanizar em Xilol I e II	5 minutos (cada)
12- Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	