



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**JULIANA DE LIMA ALVES**

**EFEITOS IMUNOMODULADORES DE DIFERENTES CEPAS DE**  
***LACTOCOCCUS LACTIS* NA HOMEOSTASE INTESTINAL**

**Belo Horizonte**  
**2017**

JULIANA DE LIMA ALVES

**EFEITOS IMUNOMODULADORES DE DIFERENTES CEPAS DE  
*LACTOCOCCUS LACTIS* NA HOMEOSTASE INTESTINAL**

**Versão Final**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Dra. Ana Cristina Gomes Santos

**Belo Horizonte  
2017**

043

Alves, Juliana de Lima.

Efeitos imunomoduladores de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* na homeostase intestinal [manuscrito] Juliana de Lima Alves. - 2017.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Co-orientadora: Dra. Ana Cristina Gomes Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Colite. 3. *Lactococcus lactis*. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Santos, Ana Cristina Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

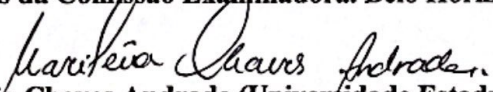
CDU: 577.1

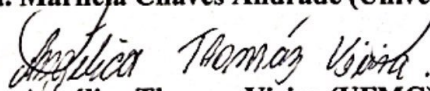


Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICBA/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

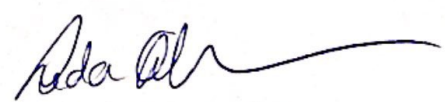


**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA DE LIMA ALVES.**  
 Aos vinte dias do mês de fevereiro de 2017 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos imunomoduladores de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* na homeostase intestinal", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Mariléia Chaves Andrade (Universidade Estadual de Montes Claros), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2017.

  
 Dra. Mariléia Chaves Andrade (Universidade Estadual de Montes Claros)

  
 Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG)

  
 Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

  
 Leda Quércia Vieira  
 orientadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho ao Senhor da minha vida, Jesus Cristo e aos meus pais, Werton e Luciara, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por cada palavra de força e fé que me renovaram a cada dia desta caminhada. Nos momentos em que ninguém poderia entender meus sentimentos, o Senhor compreendia, e vinha com Sua mão toda poderosa para me ajudar! Obrigada!

Aos meus pais, obrigada por todos os conselhos nos momentos certos que me fizeram sentir paz e estímulo para prosseguir.

A minha irmã, Geórgia, pelo apoio diário com suas doces palavras de incentivo, seu ombro amigo e seu exemplo de luta e garra que fazem a diferença na minha vida.

Ao meu namorado e companheiro, João Gabriel, pelo impulso necessário em cada momento, pela paciência nos dias de aflição, pelo amor e carinho que me tranquilizavam, e por me acompanhar nos fins de semana no ICB.

Ana Faria, tão meiga e firme ao mesmo tempo. Obrigada por me acolher, me ensinar com paciência, me ajudar a superar cada erro e vibrar comigo os meus acertos. Você é um exemplo pra mim!

Ana Cris, agradeço por todos os ensinamentos e por aceitar me co-orientar mesmo em meio a uma fase turbulenta da sua vida.

Tatiani Maioli, se hoje estou aqui foi porque você me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa experimental. Obrigada.

Ao pessoal do LIB, agradeço por todo o aprendizado, em especial Núbia e Luisa pelas sugestões e críticas construtivas, por me ajudarem em todos os experimentos e ficarem comigo no laboratório até de madrugada com toda a dedicação.

Daniela Reis, obrigada por me ensinar e pela ajuda especial em todas as citometrias de fluxo. Você não existe.

Ilda, Hermes e dona Carminha, agradeço por facilitarem a nossa vida científica deixando o biotério e o laboratório impecáveis.

Aos funcionários da pós-graduação obrigada por toda a eficiência em tornar tudo mais fácil.

À minha turma de bases obrigada pelas amizades e momentos alegres que levarei para a vida.

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o

sempre! Amém!”

Efésios 3:20,21



## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) são definidas como um grupo de desordens do trato gastrointestinal (TGI) caracterizadas por inflamação e injúria epitelial. A colite ulcerativa e a doença de Crohn são as duas formas mais frequentes de IBD, diferenciadas pela localização da lesão ao longo do TGI. Muitos modelos experimentais murinos de IBD têm sido desenvolvidos para se estudar a patogênese e a regulação da inflamação intestinal, dentre eles a colite induzida por Sulfato de sódio dextrana (DSS). O DSS é um polissacarídeo sulfatado carregado negativamente que, quando administrado por via oral, causa lesões no cólon com algumas características semelhantes à colite ulcerativa humana. Este tem sido um modelo muito utilizado para se estudar agentes com propriedades terapêuticas para essa doença. Neste contexto, microorganismos probióticos têm aparecido como uma alternativa para pacientes com IBD e sua eficiência tem sido avaliada em modelos animais e também em estudos clínicos. As *Lactococcus lactis* são bactérias produtoras de ácido lático que estão sendo estudadas na colite devido aos seus efeitos antiinflamatórios. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos imunomoduladores das cepas *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 na colite experimental induzida por DSS. A colite aguda foi induzida em camundongos C57/BL6 pela oferta de solução contendo 2% de DSS como fonte líquida exclusiva durante 7 dias. Nos grupos experimentais, uma gavagem diária de *L. lactis* foi administrada por via oral em cada animal durante 7 dias concomitantemente com a ingestão de DSS. Em grupos que receberam *L. lactis*, observamos prevenção da perda de peso, melhora do escore clínico macroscópico e do escore histológico, aumento na produção de muco, aumento na frequência de células dendríticas tolerogênicas e modulação na produção de citocinas. Não observamos diferenças entre os efeitos das três cepas de *L. lactis*. Portanto, sugerimos que o papel anti-inflamatório das *L. lactis* nesse modelo experimental não é cepa-específico. As três cepas estudadas apresentaram efeitos protetores na mucosa intestinal.

Palavras-chave: Colite. *Lactococcus lactis*

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are defined as a group of inflammatory disorders of the gastro-intestinal tract associated with local inflammation and epithelial injury. Ulcerative colitis and Crohn's disease are the two most common forms of IBD. They differ by the portion of the gastro-intestinal tract they affect. Several experimental models of IBD have been developed to study the pathogenesis and the regulation of gut inflammation. One of them is the dextran-sodium-sulfate (DSS)- induced colitis. DSS is a negatively charged sulphated polysaccharide that causes colon lesions when orally administered resembling the human ulcerative colitis. This model has been extensively used to study novel therapeutic agents for IBD. Among these agents, probiotic microorganisms are a promising tool for individuals affected with ulcerative colitis and their efficacy has been reported in experimental models as well as in clinical trials. *Lactococcus lactis* are acid lactic bacteria that have been studied in colitis models due to their anti-inflammatory effects. Therefore, the aim of this study was to investigate the immunomodulatory effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 in DSS-induced colitis. An acute colitis was induced in C57/BL6 mice by the oral administration of a 2% DSS solution as their only liquid source for 7 days. Mice from the experimental groups received 7 consecutive daily gavages of *L. lactis* during DSS administration. Treatment with *L. lactis* prevented weight loss, ameliorated clinical and histological scores, increased mucus production and the frequency of tolerogenic dendritic cells as well modulated cytokine production in DSS-treated mice. No difference in the modulatory effect was observed among groups of mice treated with different strains of *L. lactis*. Therefore, our data suggest that the immunomodulatory effect of *L. lactis* in DSS-induced colitis is not strain-specific.

Keywords: Colitis. *Lactococcus lactis*

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Tabela representativa contendo algumas das funções encontradas no sequenciamento gênico de cada cepa de <i>L. lactis</i> .....	25
Figura 1: Protocolo experimental do modelo de colite induzida por DSS.....	30
Tabela 2: Pontuações relativas ao escore histológico da colite .....	33
Tabela 3: Pontuações relativas ao escore macroscópico da colite.....	33
Tabela 4: Relação dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo, seus marcadores e seus fabricantes .....	38
Figura 2: Estratégia de <i>gating</i> para os experimentos de citometria de fluxo....	38
Figura 3: Variação de peso corporal dos camundongos tratados com DSS e/ou <i>L. lactis</i> por via oral.....	41
Figura 4: Escore inflamatório macroscópico da doença .....	42
Figura 5: Comprimento do cólon.....	43
Figura 6: Permeabilidade intestinal.....	44
Figura 7: Concentração de SIgA no intestino delgado de camundongos.....	45
Figura 8: Avaliação histológica da mucosa do cólon .....	47
Figura 9: Avaliação histológica do muco produzido no cólon .....	49
Figura 10: Frequência de células após administração exclusiva de <i>L. lactis</i> ...	51
Figura 11: Frequência de células em camundongos submetidos à colite experimental. ....	52
Figura 12: Concentração das citocinas no cólon .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

TNF- $\alpha$  – *Tumour Necrosis Factor alpha*  
ANOVA – Análise de Variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APC – Allophycocyanin  
BV421 - Brilliant Violet 421  
CD – Células Dendríticas  
cpm – contagem por minuto  
dp – Desvio padrão  
DSS – Sulfato de Sódio Dextrano  
ELISA – Ensaio Imunoenzimático Indireto  
FITC - Fluorescein isothiocyanate  
Foxp3 - forkhead box P3  
GALT – Tecido linfoide associado ao intestino  
GFP – *Green Fluorescence Protein*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico  
HE – Hematoxilina-Eosina  
IBD – Doença Inflamatória Intestinal  
IELs - Linfócitos intra-epiteliais  
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
ILFs - Folículos linfoides isolados  
kDa – Kilodaltons  
*L. lactis* – *Lactococcus lactis*  
LAB – Bactérias Ácido Láticas  
LAP - Latency-Associated Peptide  
LPLs - Linfócitos da lamina própria  
MALT – Tecido Linfóide Associado à Mucosa  
mM – milimolar  
OPD - Ortofenileno- Diamino  
PAS - *Periodic Acid-Schiff*

PE – Phycoerythrin

PercpCy 5.5 – CyChrome

PI – Permeabilidade Intestinal

SIgA- Imunoglobulina A secretória

TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor*- $\beta$

TGI – Trato Gastro Intestinal

Treg – Linfócitos T reguladores

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 A Mucosa Intestinal .....	15
1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais .....	17
1.3 As Bactérias produtoras de Acido Lático .....	20
1.4 <i>Lactococcus lactis</i> .....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 ANIMAIS.....	29
4.2 <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> .....	29
4.3 INDUÇÃO DA COLITE INDUZIDA POR DSS .....	29
4.4 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	31
4.5 OBTENÇÃO DE SANGUE PARA ANÁLISE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	31
4.6 TESTE DE PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	31
4.7 COLETA DO CONTEÚDO DO INTESTINO DELGADO.....	32
4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MUCOSA DO CÓLON .....	32
4.9 COMPRIMENTO DO COLON .....	33
4.10 ESCORE MACROSCÓPICO DA COLITE.....	33
4.11 PREPARO DE EXTRATO DE TECIDO .....	34
4.12 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE SigA.....	34
4.13 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE CITOCINAS .....	35
4.14 PREPARO DE SUSPENSÕES DE CÉLULA.....	36
4.15 CITOMETRIA DE FLUXO .....	36
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>

5.1 O tratamento com <i>L. lactis</i> preveniu a perda de peso corporal em animais doentes .....	41
5.2 O tratamento com as três cepas de <i>L. lactis</i> aliviou os sinais clínicos da doença.....	42
5.3 <i>L. lactis</i> não preveniu o encurtamento do cólon em animais doentes.....	43
5.4 As três cepas de <i>L. lactis</i> preveniram o aumento da permeabilidade intestinal em camundongos tratados com DSS.....	44
5.5 As três cepas de <i>L. lactis</i> mantiveram níveis de SIgA no lavado intestinal de camundongos com colite.....	45
5.6 Camundongos doentes tratados com <i>L. lactis</i> apresentaram menor inflamação do cólon e aumento no número de células caliciformes .....	46
5.7 Camundongos que receberam <i>L. lactis</i> durante o desenvolvimento da colite mantiveram a produção de muco .....	48
5.8 <i>L. lactis</i> interferiram na frequência de células dendríticas CD11c+ CD11b- CD103+ e nas Tregs CD4+LAP+.....	49
5.9 As três cepas de <i>L. lactis</i> modularam a produção de citocinas em camundongos doentes .....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO .....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Mucosa Intestinal

As mucosas são responsáveis, ao mesmo tempo, pela absorção de nutrientes e pela proteção contra a entrada de agentes nocivos sendo a maior área de contato com o meio ambiente (TURNER et al, 2009). A mucosa intestinal possui uma área de superfície de 32m<sup>2</sup> (HELANDER & FANDRIKS, 2014). Milhares de antígenos entram no corpo diariamente através da superfície das mucosas, principalmente através do trato gastrointestinal (MOWAT et al, 2003). O intestino delgado entra em contato com 30kg de proteínas, provenientes da dieta, por ano, e absorve cerca de 130 a 190g delas por dia (BRANDTZAEG, 1998). Além disso, o intestino está em contato constante com milhares de patógenos e contém 10 a 100 trilhões de microorganismos comensais de mais de mil espécies diferentes (FARIA et al, 2013).

Em condições fisiológicas, o sistema imune deve estar preparado para distinguir microorganismos invasivos de antígenos inofensivos. Portanto, respostas imunes são necessárias para proteger esse tecido e manter a sua homeostase. Essas respostas, produzidas tanto pela imunidade inata quanto adaptativa, são realizadas pelo MALT (do inglês *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*), local primário de exposição das células imunes com os antígenos externos (TURNER, 2009). A magnitude dessas interações é muito maior no trato gastrointestinal, onde se situa o GALT (do inglês *Gut- Associated Lymphoid Tissue*). O GALT é o maior tecido linfóide do corpo e se localiza ao longo da mucosa intestinal. O GALT é dividido estruturalmente em dois subconjuntos principais: a) GALT DIFUSO, composto por células espalhadas ao longo do epitélio e da lâmina própria (Linfócitos intra-epiteliais, IELs; Linfócitos da lamina própria, LPLs), b) GALT ORGANIZADO, composto por folículos linfóides organizados como as placas de Peyer, os folículos linfóides isolados (ILFs), os linfonodos mesentéricos e cecais (MOWAT et al, 2003).

Dentro dessas estruturas e na *lâmina própria*, estão presentes o principal grupo de células apresentadoras de antígeno, as células dendríticas



(CDs), que desempenham um papel crucial de manter o delicado balanço imune intestinal. Elas migram do intestino para os linfonodos drenantes e induzem a diferenciação de células T *naive* em linfócitos T reguladores (Treg) ou efetores. O subtipo específico de CD que estimula a produção de linfócitos Treg, possui a integrina CD103 em sua superfície celular. A produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF (*transforming growth factor*)- $\beta$  são cruciais para a produção das Treg (JOHANSSON-LINDBOM, 2010; TAKENAKA & QUINTANA, 2016). Existem alguns tipos importantes de células Treg, como as LAP+ e as Foxp3+. As células que expressam LAP (*latency-associated peptide*) foram assim classificadas por possuírem este propeptídeo associado de forma não covalente ao domínio amino terminal do TGF- $\beta$ , formando um complexo latente do TGF- $\beta$ . Essas células secretam TGF- $\beta$  quando ativadas e possuem sua atividade supressora dependente de IL-10 e TGF- $\beta$  (GANDHI et al, 2010). Outras células Treg responsáveis pela manutenção da homeostase intestinal são aquelas que expressam o fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead Box P3*), que é uma proteína que confere atividade reguladora à célula. Camundongos com mutações no gene *foxp3* (*scurfy*) desenvolvem desregulação imune e enteropatia, na qual o principal órgão afetado é o intestino (IZCUE et al, 2009).

A camada epitelial do intestino também possui células especializadas na produção de muco, chamadas células caliciformes. Essas células estão em muito maior quantidade no cólon do que em outras regiões do intestino e representam 25% do número de células epiteliais no cólon distal. A camada de muco (glicocálix), presente no intestino, funciona como uma barreira física contra antígenos agressores ao epitélio intestinal e pode ser dividida em duas regiões: a) região interna, mais densa ligada à superfície epitelial; b) região externa, mais fluida. O muco também é importante na proteção contra bactérias patogênicas, já que é composto por glicoproteínas, como a mucina, que é tóxica para muitos tipos de bactérias. Defeitos na produção de muco podem levar a maior entrada de bactérias na camada epitelial do cólon e maior susceptibilidade a algumas doenças, como a colite ulcerativa (MOWAT et al, 2014).

No muco, encontra-se presente a IgA secretória (SIgA), uma importante imunoglobulina responsável pela exclusão imune de antígenos e

microorganismos patogênicos. A interação da SIgA com antígenos pode aprisioná-los no muco e prevenir a sua ligação a receptores de superfície celular, o que ameniza respostas imunes pró-inflamatórias e contribui para a homeostase intestinal. A *lamina própria* do TGI contém o maior número de plasmócitos do corpo e a maioria dessas células produzem IgA. Calcula-se que existem cerca de  $10^{10}$  plasmócitos produtores de IgA por metro de intestino, número maior do que o total de plasmócitos presentes no baço, linfonodos e medula óssea juntos. O mecanismo de exclusão imune, realizado pela SIgA, é considerado uma das maiores e principais respostas de defesa não-inflamatórias do sistema imune intestinal (BRANDTZAEG, 1998, 2009; CRAIG & CEBRA, 1971; STOEL et al, 2005; PABST, 2012).

Esses mecanismos intestinais de controle da entrada de antígenos e da reatividade imunológica encontram-se alterados em condições patológicas tais como nas doenças inflamatórias intestinais (IBD). Sendo assim, as células imunes assim como as células epiteliais da mucosa do intestino fornecem a primeira linha de defesa das superfícies internas do corpo e possuem vários mecanismos reguladores e protetores cruciais para manutenção da sua homeostase.

## **1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais**

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) são definidas como um grupo de desordens do trato gastrointestinal (TGI) caracterizadas por inflamação e injúria epitelial. A colite ulcerativa e a doença de Crohn são as duas formas mais frequentes de IBD, diferenciadas pela localização da lesão ao longo do TGI. A doença de Crohn pode acometer qualquer região do TGI enquanto que a colite ulcerativa afeta somente o cólon. Apesar da etiologia das IBDs ser desconhecida, sabe-se que um desequilíbrio das interações entre a microbiota intestinal, o sistema imune e as células epiteliais em indivíduos predispostos geneticamente leva à ruptura da homeostase intestinal, contribuindo para sua origem. Sendo assim, existe um conjunto de fatores que influenciam o surgimento das IBDs (BASSO et al, 2014).

As IBDs têm sido associadas com o aumento da mortalidade e

morbidade em humanos (GREEF et al, 2014). Pacientes com IBD sofrem de perda de peso, que se torna acentuada pelo fato dos acometidos apresentarem redução da ingestão alimentar atribuída à dor associada ao comer e ao aumento da taxa metabólica basal. Alterações severas comumente observadas incluem desnutrição, deficiência de várias vitaminas e minerais, composição corporal alterada associada com a perda da massa mineral óssea e alta prevalência de osteopenia e osteoporose, hipoalbuminemia, anemias diversas, alterações imunes e metabólicas, dor abdominal e sangramento, afetando drasticamente a qualidade de vida (MELGAR et al, 2007).

Muitos modelos experimentais murinos de IBD têm sido desenvolvidos para se estudar a patogênese e a regulação da inflamação intestinal. Dentre eles, estão os modelos de camundongos geneticamente modificados, os modelos de colite por transferência de células e modelos de colite quimicamente induzidos. Camundongos *knockouts* ou transgênicos para determinadas citocinas (IL-10, IL-2, IL-17), receptores (receptor para IL-2, cadeia alfa do receptor de célula T) ou moléculas de MHC (HLA B27) podem apresentar alguns tipos de IBD por diversos mecanismos diferentes que ressaltam a importância do papel de cada molécula modificada ou deletada. Outro modelo importante para estudo das IBDs é a indução da colite por meio da transferência de células, desenvolvido por Powrie e colaboradores, no qual ocorre colite via desequilíbrio no número de células T reguladoras e T efectoras após a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> para camundongos imunodeficientes (POWRIE et al, 1993). Dentre os modelos de indução química, várias substâncias já foram descritas como indutoras da IBD: ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolone (oxazolona), solução intra-retal de etanol 50% (v/v), ácido acético, indometacina, carrageína (introduzida na água de beber) e sulfato de sódio dextrano (DSS) (KIESLER et al, 2015).

Apesar de nenhum desses modelos isoladamente reproduzir a complexidade da IBD humana, cada um apresenta características marcantes da doença. O modelo de colite induzida por DSS, originalmente descrito por Okayasu e colaboradores, vem sendo amplamente utilizado devido à sua facilidade na indução, rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, uniformidade e

controlabilidade (OKAYASU et al., 1990). Os camundongos que recebem a solução por via oral desenvolvem colite aguda com características semelhantes à retocolite ulcerativa humana, apresentando perda de peso, diarreia, sangramento retal, encurtamento do cólon, e alto escore histológico da doença. O DSS é um polissacarídeo sulfatado carregado negativamente, solúvel em água, com propriedades anticoagulantes. Além de agravar o sangramento retal devido a tais efeitos anticoagulantes, sua alta carga negativa é tóxica para o epitélio do cólon, resultando em erosão e ulcerações na mucosa, destruição de mucina, maior exposição a antígenos luminais e aumento da permeabilidade intestinal. A lesão extensiva causada pelo DSS é restrita ao cólon, principalmente na porção distal, onde existe maior concentração de microorganismos vivos (CHASSAING et al, 2015; MELGAR et al, 2005). Um dos motivos pelos quais o DSS pode gerar a inflamação restrita ao cólon foi explorada no trabalho de Laroui e colaboradores. Esses autores demonstraram que o DSS forma nano-lipocomplexos com ácidos graxos de cadeia média presentes no lúmen intestinal e que tais complexos podem se fundir com a membrana dos colonócitos. A chegada do DSS no citoplasma ativa vias de sinalização que resultam em inflamação intestinal e, posteriormente, em lesão na mucosa do cólon e rompimento na barreira (LAROUÏ et al, 2012). Como esta é exatamente a região mais rica em microorganismos é também a mais propensa a translocação microbiana que a grava o quadro de inflamação.

Foi sugerido que a inflamação induzida por esse sal inclui a exacerbação do infiltrado de neutrófilos, recrutamento de macrófagos e resposta de linfócitos T e B (MELGAR et al, 2005; SARTOR, 2006; OKAYASU et al, 1990). A inflamação é acompanhada da modificação na expressão das proteínas das *tight junctions* (PORITZ et al, 2007) e do aumento de algumas proteínas pró inflamatórias (MELGAR et al, 2007). Além disso, a colite induzida por DSS pode ser causada pela interferência do DSS na interação fisiológica entre linfócitos intraepiteliais, células epiteliais e proteínas de matriz extracelular, como também a um aumento na expressão dos receptores das moléculas de adesão (NI et al., 1996).

O DSS também leva a mudanças na microbiota intestinal, gerando aumento de bactérias gram negativas anaeróbicas. Okayasu e colaboradores

observaram aumento significativo na população de *Enterobacteraceae*, *Bacteroidaceae* e *Clostridium spp* em camundongos com colite ulcerativa aguda e crônica induzida por DSS (OKAYASU et al, 1990). Neste contexto, microorganismos probióticos têm aparecido como uma alternativa terapêutica para pacientes com IBD e sua eficiência tem sido avaliada em modelos animais e também em estudos clínicos (GREEF et al, 2014).

### **1.3 As Bactérias produtoras de Acido Lático**

As bactérias produtoras de ácido lático (LAB) compreendem um grupo de organismos gram-positivos, primariamente anaeróbicos, sem esporulação e que produzem ácido lático como principal produto final da fermentação do açúcar (MATTU, 2013; CAVANAGH et al, 2015)

As LAB estão entre os primeiros organismos vivos da terra e, ao longo da evolução, elas colonizaram primeiramente frutas e vegetais, e depois passaram a eleger um *habitat* rico em lactose (CARR et al, 2002)

Desde a sua descoberta, há muitos anos essas bactérias tem sido utilizadas como pioneiras na fermentação de alimentos, principalmente queijos e iogurtes, sendo assim classificadas e reconhecidas como GRAS (do inglês *Generally Regarded as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (DONOHUE e GUEIMOND, 2016; FDA, 2010).

As LAB ficaram mais conhecidas após a propagação da “Teoria da longevidade” de Metchnikoff em 1910. O pesquisador relacionou o elevado consumo diário de iogurte à maior longevidade de povos búlgaros, que viviam além dos 100 anos. Assim, a causa dessa longevidade foi atribuída às bactérias fermentadoras presentes no iogurte (GASBARRINI et al, 2016). Sua alta capacidade de fermentação permite a geração de produtos finais que, além de contribuírem com as propriedades organolépticas e preservação do alimento, constituem no maior fator responsável pelo desenvolvimento de um meio antimicrobiano na matriz alimentar (PAPADIMITRIOU, 2015).

Além de fornecer vantagens para a indústria alimentar, a mucosa intestinal também se beneficia da fermentação das LAB já que o lactato, ácido acético, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas produzidos

garantem um equilíbrio no crescimento de bactérias patogênicas e benéficas do intestino, contribuindo para a homeostase da microbiota ali presente (ISHIDA, 2004; PESSIONE, 2012). Outra característica vantajosa para o trato gastrointestinal é o fato das LAB serem acidofílicas (possuem pH ótimo de crescimento entre 3,5 e 6,5) e terem a capacidade de melhorar sua resistência ao pH ácido do estômago criando estratégias de produção de metabólitos alcalinos. É conhecido que as LAB também são capazes de acumular altas quantidades intracelulares de zinco, manganês e selênio. (PESSIONE, 2012)

Muitas LAB tem sido estudadas como probióticas — “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (WHO, 2002) — por apresentarem tais atividades anti-inflamatórias, principalmente alguns tipos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, bastante descritas por seus efeitos anti-inflamatórios (ISHIDA, 2004; SANDERS et al, 2003).

De forma adicional, alguns tipos de bactérias classificadas como LAB e que vem ganhando grande importância, são as *Lactococcus lactis*. (STILES, 1997)

#### **1.4 *Lactococcus lactis***

A *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é a bactéria mais importante dentre as LAB usadas comercialmente; tem formato de cocos e é homoláctea — o produto da sua fermentação é 100% ácido láctico. Ela é comumente isolada de plantas ou produtos lácteos (STILES, 1997).

As *L. lactis* produzem alguns tipos de bacteriocinas, sendo a principal chamada nisina, uma bacteriocina de amplo espectro que atua também em bactérias gram positivas como o *Clostridium botulinum* e seus esporos (STILES, 1997).

As *L. lactis* foram as primeiras cujo genoma foi completamente sequenciado, são bactérias de fácil manipulação genética, são gram-positivas não produzem endotoxinas, LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (BOLOTIN et al, 2001; LeBLANC et al, 2015). É estimado que um indivíduo humano ingere  $10^{18}$  células lactocócicas por ano (MILLS et al, 2010), em

grande parte devido ao seu amplo uso na fermentação industrial, fato que contribuiu para que a *L. lactis* seja reconhecida como GRAS, como citado anteriormente neste trabalho (FDA, 2010). Apesar de não serem residentes naturais do TGI, as *L. lactis* são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (CAVANAGH et al, 2015) (WEGMANN et al, 2007).

Por esses motivos, a partir do avanço da biologia molecular, essa bactéria tem sido amplamente utilizada como GM-LAB (LAB geneticamente modificadas) com o objetivo de carregar materiais de interesse, como DNA e proteínas, via trato gastrointestinal (TGI) para uma finalidade específica (LeBLANC et al, 2015). Elas podem carregar biomoléculas de alto peso molecular que interagem com as células M e células dendríticas intestinais (BERLEC et al, 2012). Steidler e colaboradores mostraram que uma *L. lactis* geneticamente construída para secretar a citocina IL-10, previne a colite em camundongos quando administrada por via oral (STEIDLER et al, 2000). Frossard e colaboradores retrataram que a mesma cepa de *L. lactis* secretora de IL-10 foi capaz de reduzir os sintomas de anafilaxia induzidos pela alergia alimentar em camundongos tratados previamente o contato com o alérgeno (FROSSARD et al, 2007). Outro trabalho demonstrou que o *L. lactis* produtor de lacticina 3147, uma bacteriocina, inibe infecção por *Clostridium difficile* em pacientes com IBD (REA et al, 2007).

Apesar desse sucesso no desenvolvimento dos GM-LAB, busca-se resgatar estudos que demonstrem os efeitos de algumas cepas de bactérias *L. lactis* selvagens, por serem ainda pouco conhecidos. Inúmeros trabalhos foram utilizados com GM-LAB, mas os efeitos dos *L. lactis* selvagens ainda são pouco conhecidos.

Neste contexto, um trabalho realizado por nosso grupo identificou atividades anti-inflamatórias da cepa selvagem *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118, quando administrada durante a fase de remissão da colite induzida por DSS em camundongos. A cepa foi capaz de melhorar os sinais clínicos da doença, manter a integridade epitelial, reduzir a produção de algumas citocinas pró- inflamatórias, além de aumentar a expressão de células T reguladoras (Treg) LAP+ nos linfonodos mesentéricos (LM) e baço, e de aumentar a população de células dendríticas CD11c+ CD11b- CD103+ no baço

dos animais tratados (LUERCE et al, 2014).

Outro estudo do nosso grupo comprovou efeitos tolerogênicos da mesma cepa *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 no modelo da doença do enxerto versus hospedeiro (do inglês *graft-versus-host disease*, GVHD). A cepa foi administrada em camundongos doadores de medula óssea desencadeando o aumento do percentual de células B reguladoras (Breg) CD19+ LAP+ e de células Treg Foxp3+ nesses animais. O tratamento mostrou-se capaz de melhorar o percentual de sobrevivência dos animais doentes após o transplante e de reduzir o escore inflamatório da doença, sendo assim considerada pelos autores uma boa adjuvante da tolerância imunológica induzida à doença. (MERCADANTE et al, 2016)

Um trabalho anterior comprovou a eficácia da cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* FC (NISHITANI et al, 2009), isolada de leite fermentado caucasiano (ISHIDA et al, 2005) em modelo de colite experimental em camundongos. Sua administração oral previamente à indução da doença por DSS melhorou os efeitos negativos da colite, como redução de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico e prevenção do encurtamento do cólon. (NISHITANI et al, 2009)

Portanto, é de suma importância o estudo de potenciais cepas probióticas para modulação de doenças inflamatórias. Nesse trabalho, optou-se por estudar os efeitos de algumas cepas de *L. lactis* que já possuem seu genoma sequenciado: *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 (OLIVEIRA et al, 2014), *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (BOLOTIN et al, 2001) e *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (WEGMANN et al, 2007), por ainda não se conhecer muito bem os efeitos dessas bactérias na mucosa intestinal.

A *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 é uma cepa isolada de cultura de queijo, não possui plasmídeo, codifica 2277 proteínas de diversas funções, porém, possui 20,1% desses genes com função ainda desconhecida (CAVANAGH et al, 2015; BOLOTIN et al, 2001). Essa cepa é pertencente ao grupo biovariante *diacetylactis*, que determina a característica de possuir enzimas responsáveis pelo catabolismo de citrato. Possui o gene *gadb*, que codifica a enzima glutamato descarboxilase responsável pela conversão de glutamato em ácido gama-aminobutírico (GABA), envolvido também na resistência ao baixo pH (CAVANAGH et al, 2015). Algumas reações do ciclo do ácido cítrico e enzimas de gliconeogênese não existem na IL1403, mas as funções necessárias para



sua respiração aeróbica são codificadas em seus genes, como a fosforilação oxidativa. São bactérias produtoras de piruvato como produto intermediário da fermentação láctica e possuem um gene que metaboliza arginina, sugerindo um complexo de regulação. Possuem também genes que codificam enzimas de degradação de aminoácidos aromáticos, sulfurados e de cadeia ramificada, além de genes de síntese de pelo menos 20 aminoácidos e de alguns cofatores como ácido fólico, riboflavina, tioredoxina e menaquinona (BOLOTIN et al, 2001).

A *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 é de origem láctea, não contém plasmídeo (CAVANAGH et al, 2015; WEGMANN et al, 2007), possui genes que codificam 2436 proteínas, e é a cepa mais utilizada como carreadora de proteínas heterólogas para o intestino. Em comparação, a *L. lactis* subsp *lactis* IL1403, anteriormente descrita, e a *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 possuem 85% de identidade em seus genes codificadores de proteínas (WEGMANN et al, 2007). Não possui genes de virulência, não possui proteinase (caseinase), mas utiliza oligopeptídeos dessas proteínas do leite (produzidas por outras bactérias) em seu metabolismo. *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 é um exemplo atípico de sua subespécie, já que recentemente descobriu-se a presença de uma via ativa de degradação de arginina em sua maquinaria, característica até então restrita às subespécies *lactis*. (WEGMANN et al, 2007)

*L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 tem maior plasticidade de crescer em várias fontes de açúcares, comparado à IL1403. Não produz enzimas para o metabolismo de citrato e, assim como a IL1403, não possui todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico. Possui enzimas de produção de tiamina fosfato a partir do piruvato, mas não a enzima que converte a tiamina fosfato em tiamina (WEGMANN et al, 2007). Subespécies *lactis* são capazes de produzir GABA (ácido gama-aminobutírico) enquanto *cremoris* não, devido a um gene inativo *gadb* causado por uma mutação. Portanto, a cepa MG1363 não é capaz de produzir GABA (CAVANAGH et al, 2015).

A MG1363 possui o gene *fbpA*, também presente no probiótico *Lactobacillus acidophilus* NCFM, que codifica proteínas ligadoras de fibronectina, uma proteína dimerica da superfície celular. A presença desse gene pode conferir a tais bactérias a aderência a superfícies celulares, como as células intestinais, importante para a função probiótica (ALTERMANN et al,

2004, WEGMANN et al, 2007).

Possui genes que participam da via de síntese/degradação:	NCDO2118	MG1363	IL1403
Produção de GABA	Sim	Não	Sim
Produção de ácido fólico	Sim	Não	Sim
Metabolização de arginina	Sim	Sim	Sim
Produção de riboflavina	Sim	Não	Sim
Produção de tioredoxina	Sim	Não	Sim
Produção de menaquinona	Sim	Não	Sim
Produção de cobalamina	Sim	Não	Sim
Produção de tiamina	Sim	Sim	Sim
Possui gene <i>fbpa</i> , que confere aderência a superfície epitelial	-	Sim	-
Biosíntese de aminoácidos essenciais	-	Sim	Sim

**Tabela 1: Funções encontradas no sequenciamento gênico de cada cepa de *L. lactis*** (BOLOTIN et al, 2001; WEGMANN et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2014).

A *L. lactis* subsp *lactis* NCDO2118 é a cepa que teve seu sequenciamento gênico descrito mais recentemente (OLIVEIRA et al, 2014). Ela não é fermentadora de produtos lácteos por ter sido isolada de ervilhas congeladas, possui 2386 genes codificadores de 25 roteínas e tem características de potencial probiótico (CAVANAGH et al, 2015; OLIVEIRA et al, 2014). Assim como IL1403, sabe-se que a NCDO2118 também é uma bactéria produtora de GABA, neurotransmissor que age modulando o sistema nervoso central, contribuindo para relaxamento do músculo esquelético e tem atividade hipotensora. Também age modulando o sistema imune, portanto, bactérias produtoras de GABA geralmente apresentam propriedades probióticas (OLIVEIRA et al, 2014).

É sugerido também que as *L. lactis* tenham um mecanismo de transferência de genes da sua maquinaria para bactérias entéricas, o que pode ser importante para indivíduos que ingerem estas cepas através do consumo

de queijos fermentados (BOLOTIN, et al 2001; WEGMANN et al, 2007). Além disso, o TGI de mamíferos apresenta um ambiente favorável para a transferência de material genético entre *Lactococcus* e outras bactérias da microbiota intestinal residente, como enterobactérias gram-negativas (CAVANAGH et al, 2015; BOLOTIN et al, 2004). Um estudo comprovou a existência de transferência do gene *ycdB*, que codifica uma proteína de função desconhecida, da *L. lactis* IL1403 para bactérias entéricas, por conjugação (BOLOTIN et al, 2004).

Sendo assim, a *L. lactis* pode apresentar efeitos anti-inflamatórios ainda desconhecidos que possam ser utilizados como ferramentas terapêuticas na modulação de respostas inflamatórias presentes em algumas doenças.

## 2. JUSTIFICATIVA

Há muitos anos nossa equipe trabalha com a bactéria *Lactococcus lactis* e tem descoberto efeitos anti-inflamatórios de algumas cepas dessa bactéria, principalmente aquelas cepas geneticamente modificadas, em alguns modelos experimentais de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, colite ulcerativa, mucosite e esclerose múltipla. Nesse contexto, visando investigar efeitos das cepas selvagens, fomos um dos primeiros grupos a descobrir funções anti-inflamatórias da *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na fase de remissão da colite induzida por DSS (LUERCE et al, 2014).

No entanto, não é conhecido se os efeitos das *L. lactis* selvagens diferem entre subespécies ou até mesmo entre cepas diferentes da mesma subespécie. Diante disso, decidimos estudar os efeitos de três diferentes cepas de *L. lactis* em modelo de colite experimental induzida por DSS.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos imunomoduladores das cepas *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 na colite experimental induzida por DSS.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos moduladores de três cepas de *Lactococcus lactis* no desenvolvimento da colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos C57BL/6;
- Verificar a ação da *L. lactis* na melhora dos sinais clínicos, morfológicos e celulares da colite, além de seus efeitos na melhora da permeabilidade intestinal;
- Avaliar a produção de IgA secretória presente no intestino delgado de camundongos com colite ulcerativa e/ou tratados com *L. lactis*;
- Comparar a frequência de linfócitos T reguladores e células dendríticas no baço, linfonodos mesentéricos e cecais entre camundongos tratados com DSS e/ou com *L. lactis*.
- Analisar a concentração de citocinas IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 em sobrenadante do extrato de cólon de camundongos doentes e/ou tratados com *L. lactis*;

## 4. MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Camundongos da linhagem C57BL/6 (MELGAR et al, 2005), com 9 a 11 semanas de idade, foram obtidos do CEBIO ou da colônia de camundongos C57BL/6 expressando *green fluorescent protein* GFP) no locus *foxp3* (*Foxp3<sup>gfp/gfp</sup>*) gentilmente cedidos pelo Dr. Howard Weiner (Harvard Medical School, Boston, EUA) mantidos em nosso biotério.

Durante os experimento, os camundongos foram mantidos em microisoladores ventilados no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG, alimentados com ração padrão para camundongos, água *ad libitum* e ciclo de luz de 12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG- CEUA # 114/2010.

### 4.2 LACTOCOCCUS LACTIS

As cepas de bactérias utilizadas foram: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 selvagens, estocadas em densitometria ótica (DO600) de aproximadamente 2,5 e glicerol na proporção de 3:1. Tais cepas foram cultivadas em meio M17 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e glicose 0,5% por 24 horas em temperatura de 30°C. Para gavagem, as doses foram estocadas em falcons de 15ml com glicerol. Os falcons foram diariamente centrifugados a 2000rpm por 10 minutos a 4°C, e os *pellets* ressuspensos em salina 1x.

### 4.3 INDUÇÃO DA COLITE INDUZIDA POR DSS

A indução da colite ulcerativa aguda foi realizada por meio da administração de solução de Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) a 2% diluído em

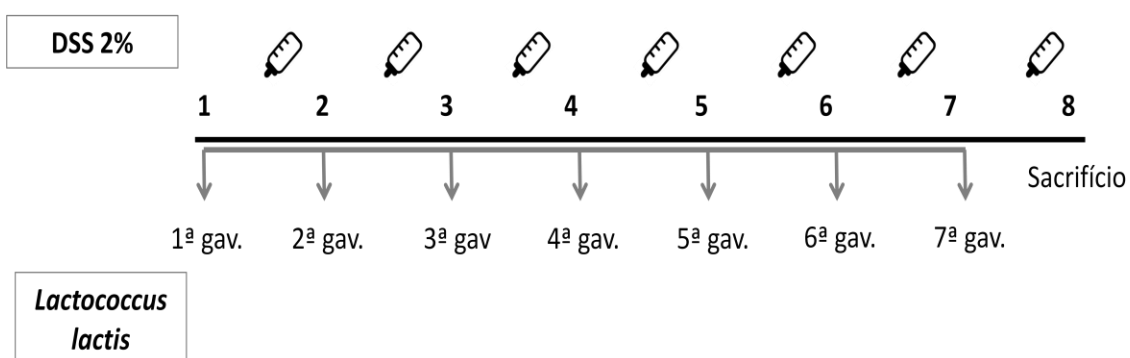
água filtrada, ofertada na mamadeira, como única fonte líquida durante sete dias (MELGAR et al, 2007; OKAYASU et al, 1990).

As garrafas contendo solução de DSS eram renovadas e o consumo dos animais foi mensurado diariamente durante o período de indução da colite. O DSS usado foi da marca MP Biomedicals, lote Q4299, com peso molecular entre 36-50 kDa.

Os camundongos receberam doses de gavagem de  $1 \times 10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de bactérias diluídas em 100ul de salina 1x, durante sete dias concomitantemente à administração de DSS.

A ANVISA (2008) determina que a quantidade diária mínima viável para consumo de probióticos deve estar na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (ANVISA, 2008). Por essa razão, visando observar efeitos anti-inflamatórios destas bactérias, optou-se por utilizar a concentração de  $10^9$  UFC/camundongo.

Ao final de sete dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados como mostrado na Figura 1.



**Figura 1: Protocolo experimental do tratamento com *L. lactis* durante o desenvolvimento do modelo de colite induzida por DSS.** Camundongos C57BL/6 receberam solução de DSS na concentração de 2% continuamente durante todo o experimento. Uma gavagem diária de  $1 \times 10^9$  UFC de *Lactococcus lactis* foi administrada a cada animal, durante 7 dias. No oitavo dia, os animais foram sacrificados.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Durante o período experimental, os camundongos foram pesados diariamente sempre no mesmo horário, em balança de precisão 0,25-2000g. Foi calculado o percentual de variação de peso, o qual também foi utilizado para obtenção do escore macroscópico da doença.

#### 4.5 OBTENÇÃO DE SANGUE PARA ANÁLISE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

Os animais foram anestesiados utilizando 100µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7 mg/Kg) e Xilazina (0,33mg/Kg). Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos de poliestireno. O sangue foi usado para mensurar a radioatividade utilizando contador-gama.

#### 4.6 TESTE DE PERMEABILIDADE INTESTINAL

A análise da permeabilidade intestinal foi realizada no sétimo dia de tratamento com DSS. Os animais receberam por gavagem 100ul de solução contendo 18,5 Megabecquerel (MBq) de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA). O  $^{99m}\text{Tc}$ - DTPA trata-se de um complexo inerte e hidrossolúvel com peso molecular aproximadamente de 500 daltons apresentando características ideais para avaliação da permeabilidade intestinal (PI) (DINIZ et al., 2005).

Quatro horas após a gavagem, o sangue foi coletado da veia axilar em tubos de poliestireno para contagem da radioatividade em aparelho contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3) e determinação da PI. Esse aparelho mede a quantidade de isótopos radioativos com emissão de raios gama (GENEROSO et al., 2015; MAIOLI et al., 2014).

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose. O padrão da dose, que corresponde a uma alíquota de igual volume de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA oferecido aos animais, foi utilizado para correção do decaimento



radioativo do  $^{99m}\text{Tc}$  e teve a radioatividade determinada no mesmo tempo dos demais tubos (ANDRADE, 2013; ANDRADE et al., 2015).

O percentual da dose foi calculado de acordo com o peso do sangue (%dose por g de sangue) a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = [(\text{cpm do sangue} \times 100) / \text{cpm da dose (Padrão) administrada}]$$

Onde: cpm= contagem por minuto

#### 4.7 COLETA DO CONTEÚDO DO INTESTINO DELGADO

No dia do sacrifício, o intestino delgado foi retirado.

Após a extração do intestino delgado, foi feita perfusão de 10 ml de solução de PBS 1x através da inserção de seringa de 10 ml e agulha de 25x08mm na extremidade proximal do intestino. O lavado foi coletado com auxílio de pipetas *Pasteur* e transferido para tubos *falcons* de 15 mL.

O conteúdo intestinal foi centrifugado a 2000 RPM durante 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado posteriormente para a dosagem de IgA secretória (SIgA).

#### 4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MUCOSA DO CÓLON

No dia do sacrifício o cólon foi retirado. A porção distal do cólon foi separada para histologia, fixada com formaldeído a 10%, e corada com HE (Hematoxilina-Eosina) ou com PAS (*Periodic Acid-Schiff*) para posterior análise histológica da mucosa.

Para a obtenção do escore histológico da doença, os seguintes parâmetros foram avaliados: destruição da arquitetura da mucosa, grau do infiltrado celular, espessamento da camada muscular. (Adaptado de MCCAFFERTY et al, 2000) A pontuação foi estabelecida conforme os valores apresentados na Tabela 2.

Para análise da produção de muco, foi calculada a área escura das imagens binarizadas. O número de células caliciformes e a produção de muco foram contabilizados utilizando o programa Image J.

<b>Escore</b>	<b>Destruição da arquitetura da mucosa</b>	<b>Grau do infiltrado celular</b>	<b>Espessura da camada muscular</b>
<b>0</b>	Normal	Nenhum	Normal
<b>1</b>	Médio	Médio	Médio
<b>2</b>	Moderado	Moderado	Moderada
<b>3</b>	Dano Excessivo	Infiltração transmural	Espessamento excessivo

**Tabela 2: Pontuações relativas ao escore histológico da colite** (Adaptado de MCCAFFERTY et al, 2000).

#### 4.9 COMPRIMENTO DO CÓLON

A medição do comprimento do cólon foi feita com o auxílio de uma régua comum de 15 cm marcando-se do ceco até a porção final do reto. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a média do grupo.

#### 4.10 ESCORE MACROSCÓPICO DA COLITE

Os parâmetros macroscópicos para avaliação da gravidade da colite induzida por DSS foram listados na Tabela 3. O índice macroscópico representa a soma de cada parâmetro ranqueado (% de perda de peso, diarreia e sangramento). O índice máximo é igual a 12 (Kang et al., 2006).

<b>Escore</b>	<b>% perda de peso</b>	<b>Diarréia</b>	<b>Sangramento</b>
0	nenhuma	nenhuma	Ausente
1	1 a 5		
2	5 a 10	moderada	Oculto
3	11 a 15		
4	>15	grave	Visível

**Tabela 3: Pontuações relativas ao escore macroscópico da colite.** (COOPER et al, 1993)

#### 4.11 PREPARO DE EXTRATOS DE TECIDOS

Amostras do cólon proximal foram pesadas e adicionados 1000ul de solução tampão contendo 0,05% de Tween-20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto benzotônio, 10 mM de EDTA e 4ul de aprotinina A para cada 100 mg de tecido. As amostras foram maceradas com um homogeneizador elétrico e centrifugadas a 15000rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

#### 4.12 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE SIgA

A avaliação da SIgA presente no conteúdo intestinal dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Sarstedt) foram incubadas overnight a 4°C com 100µl de uma solução contendo anticorpo anti Ig (Southern Biotechnology) na concentração de 1:10000 em tampão carbonato (pH=9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas cinco vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 — SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200µl de PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween. As amostras foram adicionadas e a placa foi incubada em diluição seriada de 1:100 a 1:12800 em PBS-caseína durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas por cinco vezes com solução salina-0,05%Tween. Foi adicionada solução contendo anticorpo goat anti-mouse IgA biotilado (Southern Biotechnology) na proporção de 1:10000 em PBS-0,25% caseína e a placa foi incubada por 1 h a 37°C. Após lavadas seis vezes com salina-Tween, as placas foram incubadas novamente com estreptavidina-peroxidase (Southern Biotechnology) na concentração de 1:10000 em PBS-0,25% caseína, durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com 100µl de uma solução contendo 0,2

$\mu\text{l/ml}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu\text{l/poço}$  de uma solução de ácido sulfúrico 2N ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). A absorbância ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ ) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

#### 4.13 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE CITOCINAS

As placas (Nunc) foram incubadas *overnight* a 4°C com solução (50 $\mu\text{l/poço}$ ) contendo anticorpo de captura da citocina específica desejada (Kit R&D system **IL-10**: 8,33 $\mu\text{l/ml}$ , Kit Preprotech **TNF- $\alpha$** :10 $\mu\text{l/ml}$ , Kit R&D system **TGF- $\beta$** : 8,33 $\mu\text{l/ml}$ , Kit R&D system **IL-1 $\beta$** : 8,33 $\mu\text{l/ml}$ ) ou anticorpo purificado (BD Pharmingen **IL-6**: 8 $\mu\text{l/ml}$ ). As citocinas de kit foram diluídas em PBS1x e as outras em tampão carbonato (pH=9,6). O bloqueio das citocinas de kit foi feito com uma solução de BSA 1% diluída em PBS 1x por uma hora a temperatura ambiente (200  $\mu\text{l/poço}$ ). Para bloqueio da IL-6, foi utilizada a solução de PBS-caseína. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por três vezes. O sobrenadante de extrato de tecido do cólon dos animais (50  $\mu\text{L}$ ) foi incubado novamente *overnight* a 4°C. Para ativação do TGF- $\beta$ , em 50 $\mu\text{l}$  de amostra colocou-se 10 $\mu\text{l}$  de solução de HCl 1N. Após 10 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram neutralizadas com solução NaOH 1,2N. Após ativação, as amostras foram plaqueadas e as placas incubadas *overnight* a 4°C.

No terceiro dia, as placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com solução contendo anticorpo de captura (**IL-10**: 16,66 $\mu\text{l/ml}$ , **TNF- $\alpha$** :10 $\mu\text{l/ml}$ , **TGF- $\beta$** : 16,66 $\mu\text{l/ml}$ , **IL-1 $\beta$** : 16,66 $\mu\text{l/ml}$ ) em BSA1% em PBS1x, ou biotilado (BD Pharmingen **IL-6**: 4 $\mu\text{l/ml}$ ) em PBS-caseína, por 2 horas. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com estreptavidina-peroxidase (Sigma), 50 $\mu\text{L/poço}$  na concentração de 1:15000, por 1 hora. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo

0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4 mg/mL de OPD em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A absorbância (λ= 490 nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

#### **4.14 PREPARO DE SUSPENSÕES DE CÉLULAS**

Para obtenção das células, os órgãos foram colocados diretamente em todos falcons de 15ml contendo meio RPMI 1640 completo estéril. Utilizou-se meio RPMI 1640 (GIBCO BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50mM de mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2.

Os órgãos foram macerados com o auxílio de um macerador de vidro estéril para o baço e duas lâminas de vidro de superfície áspera para os linfonodos. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As hemácias do baço foram lisadas acrescentando-se 9ml de água destilada estéril seguida de 1 ml de PBS concentrado 10X (diluição 1:10). Após a lise, a cápsula do baço foi retirada e descartada com o auxílio de uma pipeta de vidro estéril. As células do baço foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As células de baço e linfonodos foram ressuspensas em 1 ml e 500ul de meio RPMI 1640 completo, respectivamente. Alíquotas dessa suspensão foram diluídas em solução de azul de tripan a 4% em PBS1x filtrada, para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer no microscópio óptico.

#### **4.15 CITOMETRIA DE FLUXO**

Em tubos de poliestireno para leitura de Facs (Fluorescence Activated Cell Sorter), foram colocados 1x10<sup>6</sup> células obtidas da suspensão celular e 200ul de PBS-Wash para lavagem das células. Os tubos foram centrifugados a

1200rpm, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 ul de anticorpos (na diluição padronizada), para marcação de moléculas superfície, conjugados com fluorocromos que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células de camundongos (Tabela 3). As amostras foram vortexadas, encubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foram então acrescentados 200ul de PBS-wash em cada tubo para lavagem das células, que foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram homogenizadas.

Para marcação intracelular de Foxp3, as amostras foram incubadas por 30 minutos com 100ul da solução de fixação/permeabilização (eBioscience) na concentração de 1:3 (concentrado:diluyente). As amostras foram lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience) diluído 10x em água destilada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10ul de anticorpo (na diluição padronizada) conjugado com o fluorocromo APC (Allofococianina). As amostras foram incubadas por mais 30 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience).

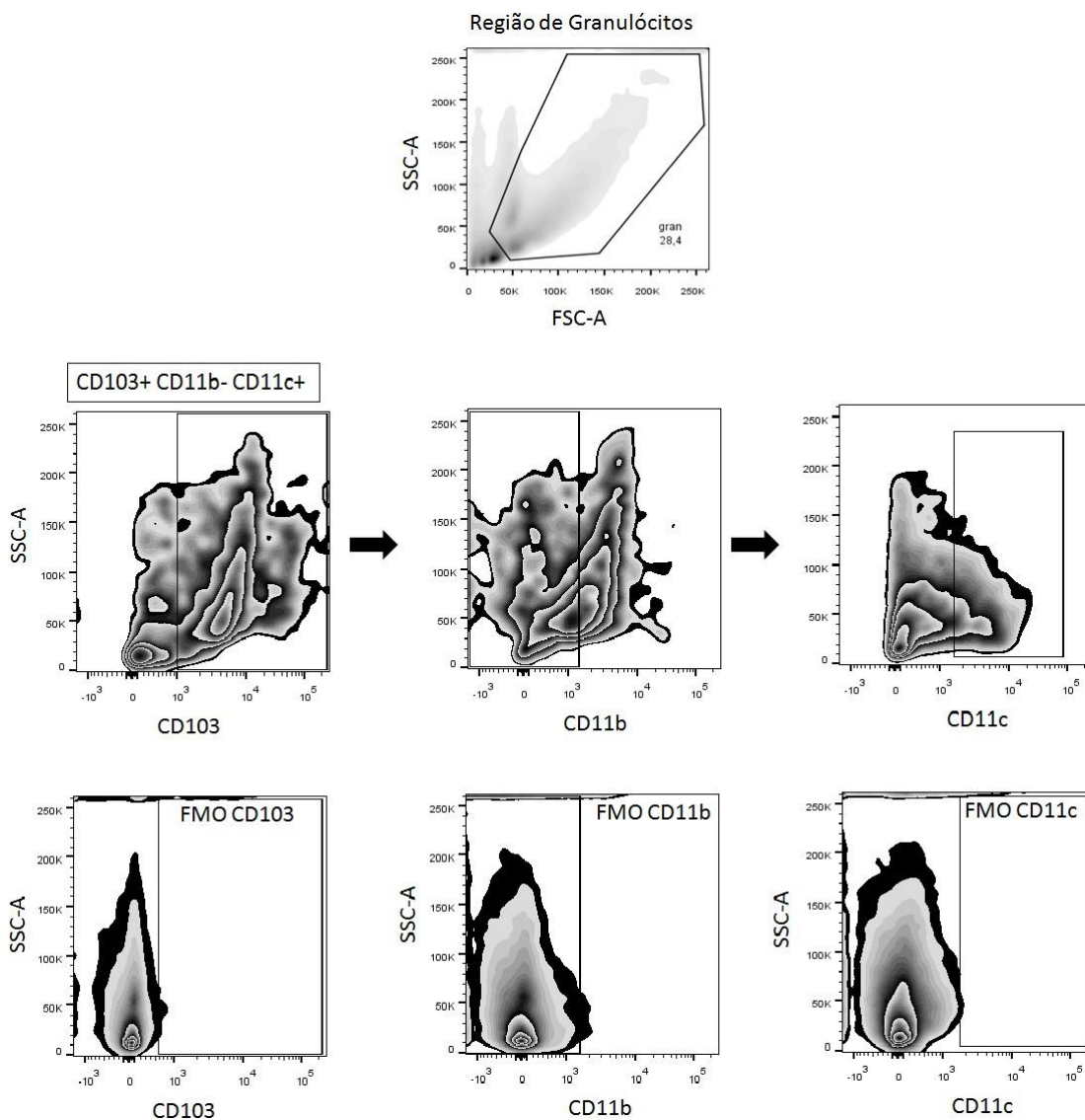
O sobrenadante foi descartado, as amostras foram vortexadas, incubadas por 30 minutos com 200ul de paraformaldeído 1% e lavadas uma vez com PBS-wash. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspendido em PBS-wash e as suspensões foram armazenadas a 4°C protegidas de luz até aquisição dos dados no equipamento BD FACScantoll.

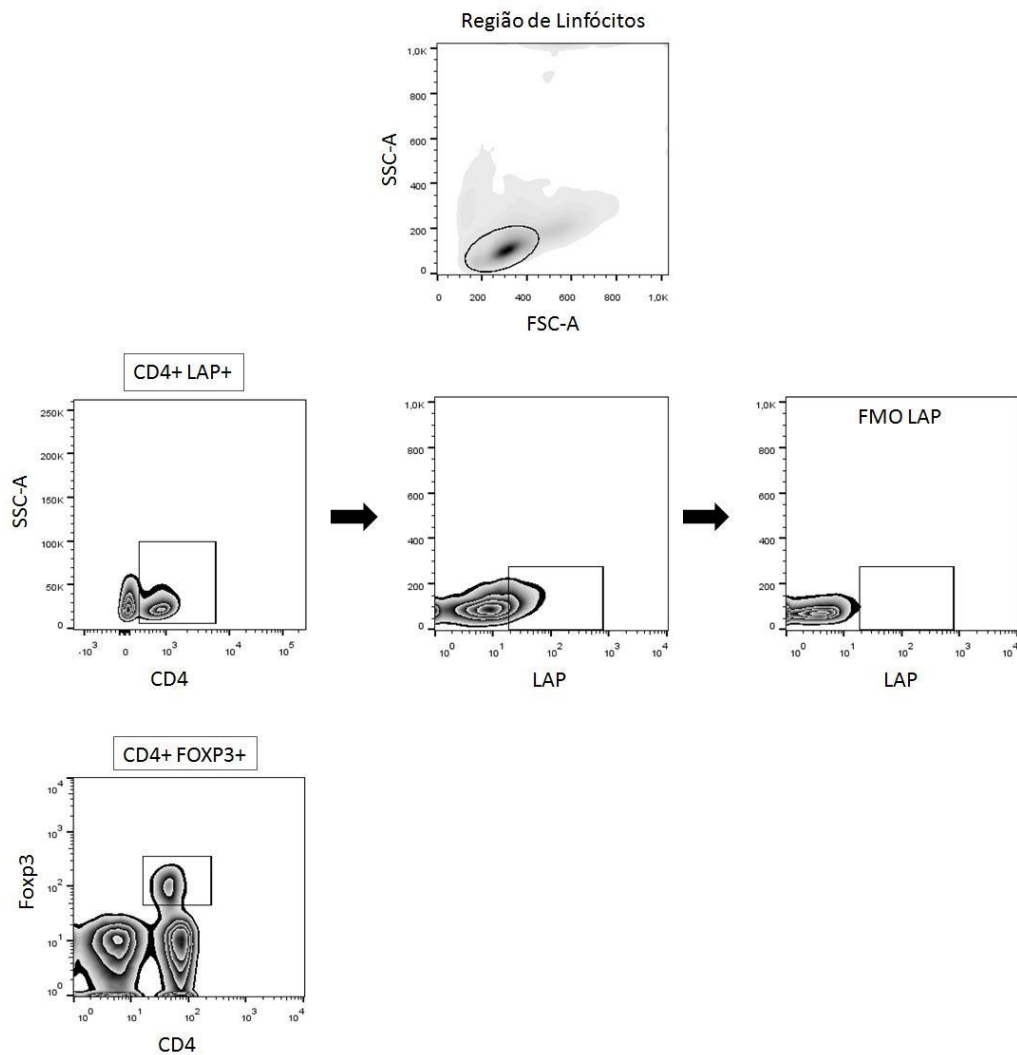
Foram feitos controles individuais (*singles*) contendo apenas um anticorpo marcado em cada tubo para a realização da compensação no aparelho.

Para melhor determinação da região (*gate*) ideal foram feitos controles do tipo fluorescência menos um (FMO- *Fluorescence minus one*) em que todos os anticorpos do *pool* estão presentes menos aquele de interesse para a marcação em questão (HERZENBERG, TUNG et al., 2006). A estratégia de *gating* e os controles FMO estão demonstrados na Figura 2. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um BD FACScantoll de 9 cores. A porcentagem de células positivas e a média de intensidade de fluorescência foram analisadas com o auxílio do programa FlowJo versão 10.0 (TreeStar).

Marcador	Fluorocromo	Fabricante
CD4	FITC (fluorescein isothiocyanate),	BD Biosciences Pharmingen ®
LAP	PE (Phycoerythrin)	BioLegend®
FOXP3	APC (Allophycocyanin)	eBioscience®
CD11b	PercpCy 5.5 (CyChrome)	BD Biosciences®
CD11c	Alexa flúor 647	BioLegend®
CD103	BV421 (Brilliant Violet)	BD Biosciences®
CD4	APC (Allophycocyanin)	eBioscience®

Tabela 4: Relação dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo, seus marcadores e seus fabricantes.





**Figura 2: Estratégia de *gating* para os experimentos de citometria de fluxo.** Células de baço e de linfonodos mesentéricos e cecais foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região de granulócitos e linfócitos foram estabelecidas com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* — FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.



#### **4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

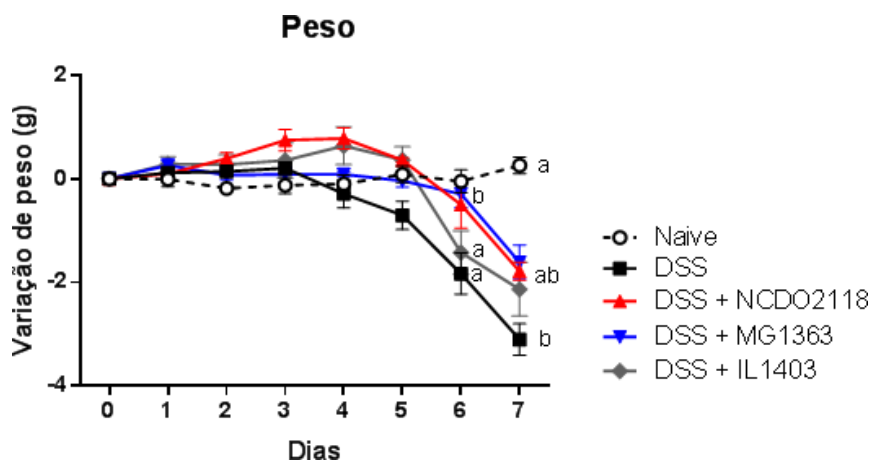
As medidas realizadas foram comparadas, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey para calcular a significância entre os grupos. O valor P considerado com diferença significativa foi  $> 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

O modelo de colite induzida por DSS tem mostrado correlações com a doença inflamatória intestinal em humanos e é considerado adequado para investigar algumas características da sua patogênese já que causa a ruptura da barreira epitelial e da homeostase intestinal. Terapias com bactérias probióticas estão sendo usadas para tratar a colite e reverter seus sintomas deletérios na mucosa intestinal, portanto resolvemos verificar o papel anti-inflamatório de três cepas de *L. lactis* na colite induzida por DSS.

### 5.1 O tratamento com *L. lactis* preveniu a perda de peso corporal em animais doentes

Um dos parâmetros clínicos alterados durante a colite ulcerativa é o peso corporal (MELGAR et al, 2007). A indução da doença levou à queda de cerca de 10-15% de peso corporal após 7 dias de ingestão exclusiva de DSS. Camundongos tratados com *L. lactis* apresentaram menor perda de peso no sétimo dia (5-10%) quando comparados ao grupo DSS (Figura 3). Porém, no sexto dia, a perda de peso do grupo DSS + IL1403 foi igual ao grupo DSS e se manteve com queda menos brusca no sétimo dia. O grupo que não sofreu a indução da colite (Naive) não perdeu peso.

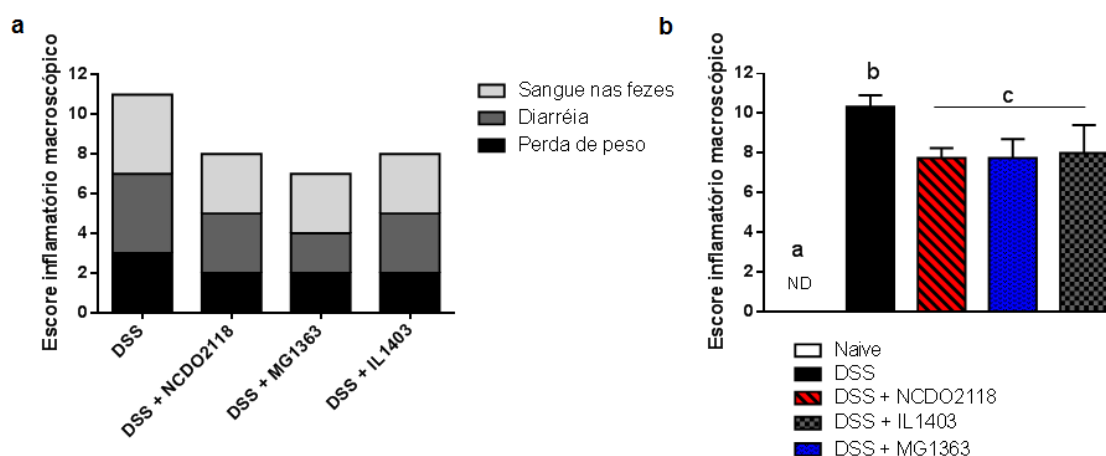


**Figura 3: Variação do peso corporal dos camundongos tratados com DSS e/ou *L. lactis* por via oral.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados

concomitantemente com as cepas *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 e *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403. O peso dos animais foi aferido diariamente. O grupo naive consistiu de animais não manipulados que não receberam nenhum tratamento, também pesados. A variação do peso diário foi obtida a partir da subtração com o peso do primeiro dia, expresso em gramas. Para análise estatística, os grupos foram comparados entre si em cada tempo experimental. n= 5. Realizou-se o teste two way ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor p <0,05. Valores representam média ± dp (desvio padrão).

## 5.2O tratamento com as três cepas de *L. lactis* aliviou os sinais clínicos da doença

O escore inflamatório macroscópico é o conjunto dos sinais mais importantes e característicos da colite ulcerativa experimental, e leva em consideração: a intensidade do sangramento presente nas fezes/reto, o grau de diarreia e o nível de perda de peso corporal (MCCAFFERTY et al, 2000). Como se esperava, o grupo naive (não manipulado) apresentou escore igual a zero. O grupo doente (DSS) apresentou o maior escore, enquanto os animais tratados com as *L. lactis* apresentaram um escore intermediário em relação aos grupos controles (Naive e DSS) (Figura 4b). O grupo naive não apresentou escore inflamatório, já que não possui a doença. Ao se comparar os parâmetros do escore, separadamente, o tratamento com as três cepas de *L. lactis* teve efeito preventivo sob os três parâmetros, por reduzir sua pontuação (Figura 4a).

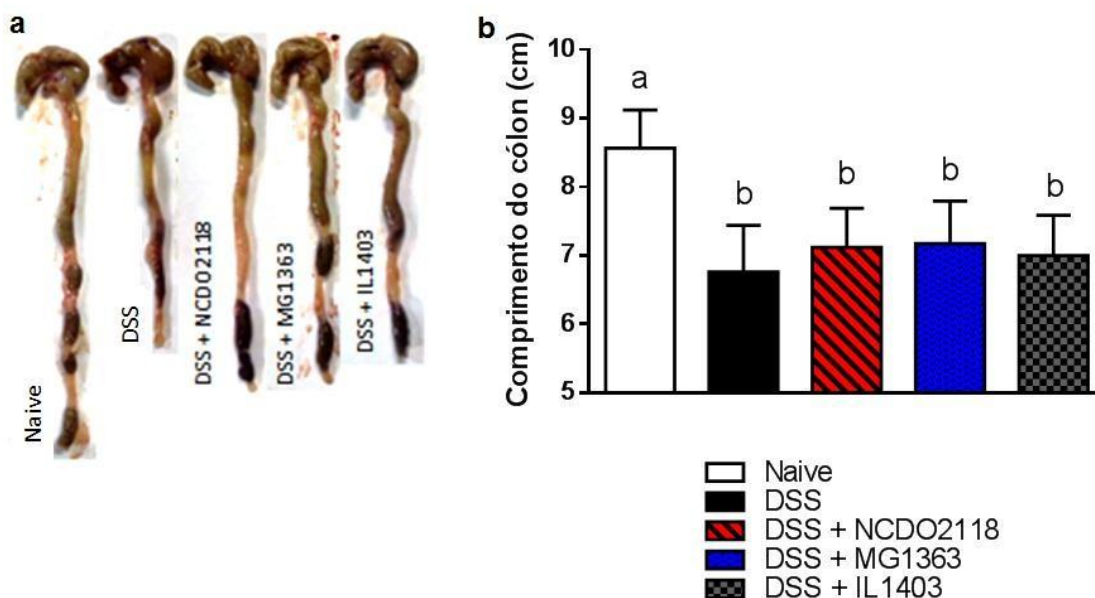


**Figura 4: Escore inflamatório macroscópico da doença.** Após 7 dias de ingestão *ad libitum* de DSS 2% acompanhada da administração oral diária de *L. lactis*, camundongos C57/BL6 foram sacrificados e submetidos à

classificação sintomatológica da doença. **a.** O gráfico em barras é dividido em cores que representam cada parâmetro do escore. O sangramento (cinza claro) e a diarreia (cinza escuro) foram avaliados após a retirada do cólon no dia do sacrifício. O percentual da perda de peso (preto) foi obtido comparando-se os valores do peso do primeiro e do último dia. Foi dado um escore de 0 a 4 para cada parâmetro analisado. **b.** O escore total foi obtido a partir da soma dos três parâmetros. O gráfico representa valores de média  $\pm$  desvio padrão (n=5). Foi realizado o teste ANOVA e as letras diferentes representam diferenças significativas (p<0.05).

### 5.3 *L. lactis* não preveniu o encurtamento do cólon em animais doentes

O encurtamento do cólon é uma característica marcante da colite (LUERCE et al, 2014). Animais tratados com *L. lactis* NCDO2118 e MG1363 apresentaram menor encurtamento do cólon se comparados com o grupo doente (DSS), porém sem diferença estatisticamente significativa. O grupo naive apresentou comprimento do cólon considerado saudável para animais adultos.

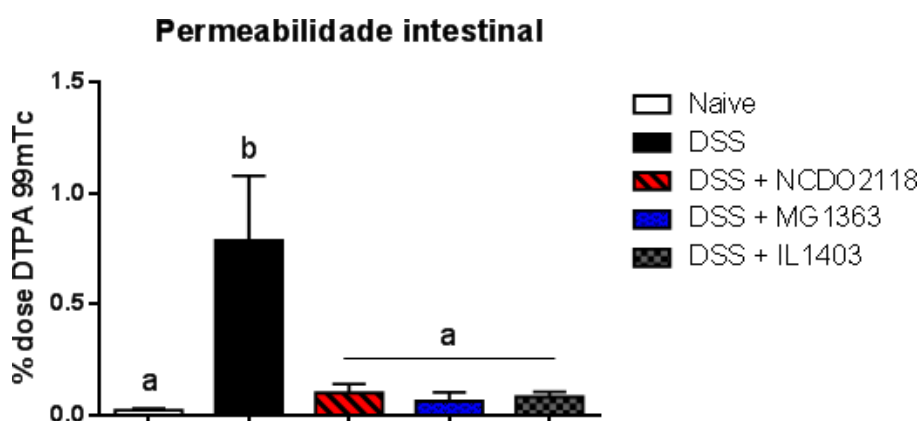


**Figura 5: Comprimento do cólon.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos a 7 dias de ingestão *ad libitum* de DSS 2% acompanhada da administração oral diária de *L. lactis*. Ao final do sétimo dia, os camundongos foram sacrificados e o cólon foi retirado para análise. **a.** Ao lado esquerdo estão as fotos representativas do cólon de um animal de cada grupo. **b.** Ao lado direito o gráfico em barras expressa as medidas do comprimento dos cólons, em centímetros (cm), contendo média  $\pm$  dp (n=10). Os valores foram obtidos a partir de medição com régua e representados em centímetros no gráfico. Realizou-se o teste ANOVA e a

diferença estatística foi apontada com valor  $p < 0,05$ .

#### 5.4 As três cepas de *L. lactis* preveniram o aumento da permeabilidade intestinal em camundongos tratados com DSS

O aumento da permeabilidade intestinal é uma das características que indica ruptura da barreira epitelial e, conseqüentemente, desequilíbrio da homeostase tecidual (DINIZ et al., 2005). Camundongos tratados com DSS possuem aumento significativo da permeabilidade do intestino, porém notou-se que as bactérias preveniram o aumento da permeabilidade, quando administradas durante o desenvolvimento da doença, como mostrado na figura 6.



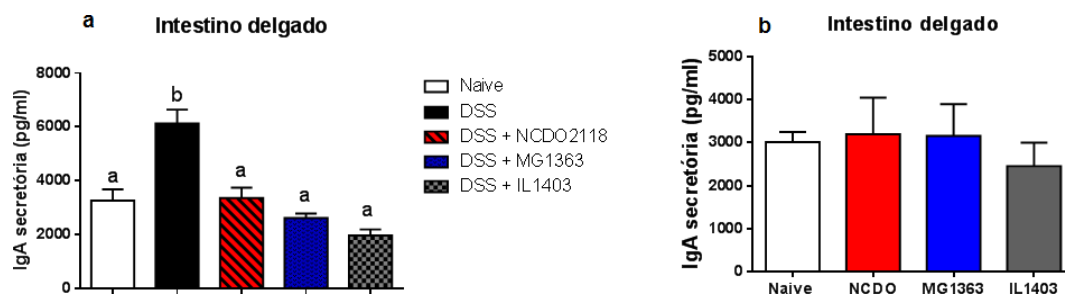
**Figura 6: Permeabilidade intestinal.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados concomitantemente com as cepas de *L. lactis*. Ao final do sétimo dia os camundongos receberam uma solução contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA por gavagem. Após 4 horas da administração de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA, os camundongos foram sacrificados e a permeabilidade intestinal foi mensurada no sangue através da quantidade de radiação apresentada em cada amostra. Os dados foram expressos em média  $\pm$  dp (n=5). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas através do teste ANOVA ( $P < 0,05$ ).

### 5.5 As três cepas de *L. lactis* mantiveram níveis de SIgA no lavado intestinal de camundongos com colite

O aumento da IgA secretória é um mecanismo fisiológico de regulação do intestino contra qualquer invasão patogênica após a lesão da mucosa, já que é uma imunoglobulina com ação imunomoduladora e protetora ao TGI (CRAIG & CEBRA, 1971).

A SIgA foi mensurada no lavado intestinal dos camundongos após 7 dias de administração oral de DSS e/ou *L. lactis*. O grupo de animais que ingeriu somente DSS apresentou alta concentração de SIgA, enquanto camundongos que receberam *L. lactis* as mantiveram em níveis normais, iguais ao grupo Naive (Figura 7a).

A administração exclusiva de *L. lactis* por gavagem, durante 7 dias, não modificou a concentração de SIgA no lavado intestinal em camundongos saudáveis (Figura 7b).



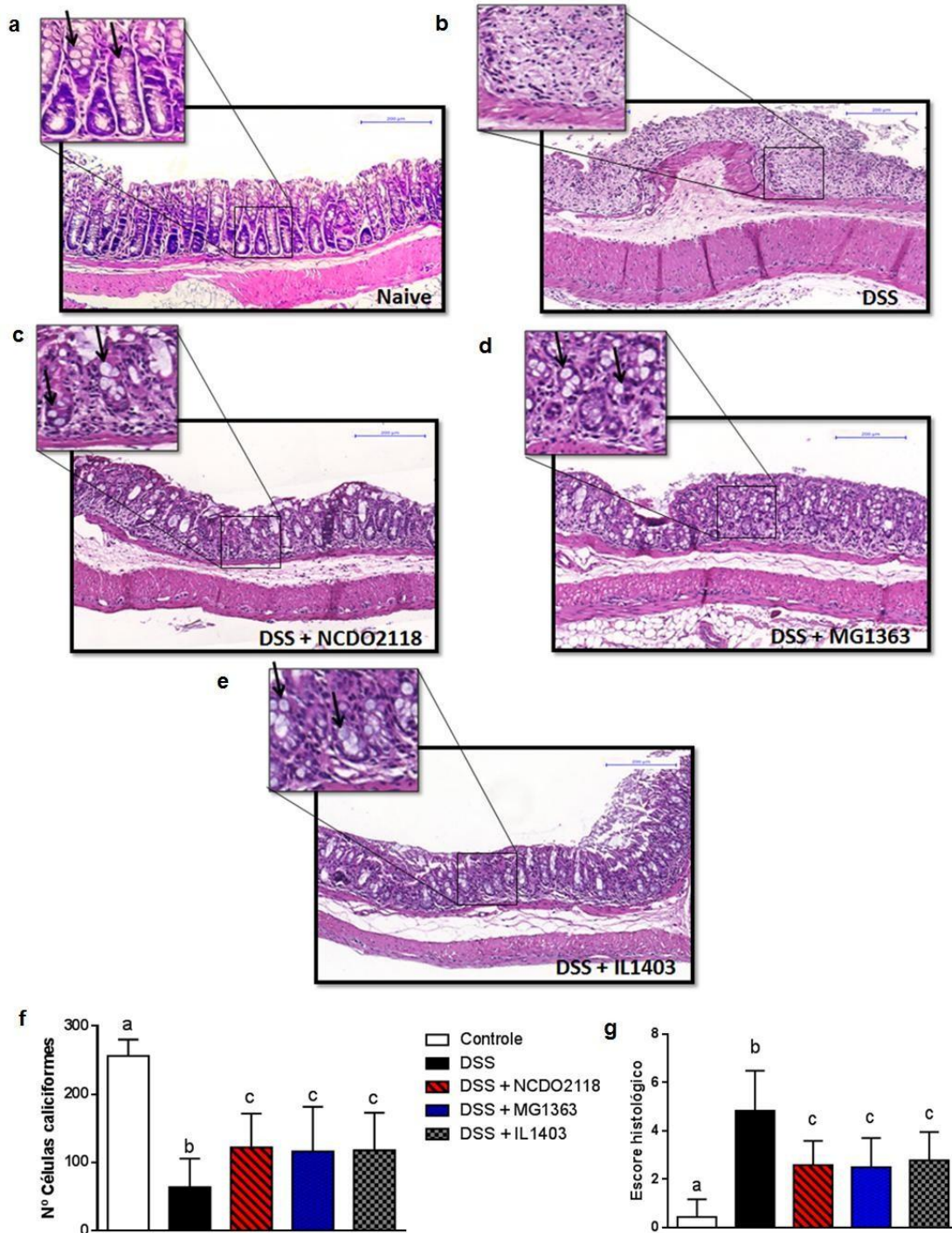
**Figura 7: Concentração de SIgA no intestino delgado de camundongos.** Gráficos em barra representam a concentração de SIgA, em pg/ml, mensurada por ELISA no lavado do intestino delgado de camundongos C57BL/6. **a.** Camundongos C57/BL6 receberam administração diária de *L. lactis* por gavagem e simultaneamente ingeriram DSS 2%, durante 7 dias. Os animais foram sacrificados, o intestino delgado foi coletado e lavado para a análise da SIgA. **b.** Os camundongos receberam administração exclusiva de *L. lactis* por gavagem durante 7 dias. Os animais foram sacrificados, o intestino delgado foi coletado e lavado para a análise da SIgA. O grupo Naive não foi manipulado durante todo o experimento. Valores representam média  $\pm$  dp (n=5). Significância estatística medida por ANOVA com diferenças apontadas pelo valor  $p < 0,05$ .

## **5.6 Camundongos doentes tratados com *L. lactis* apresentaram menor inflamação do cólon e aumento no número de células caliciformes**

A mucosa do cólon distal é a região mais acometida na colite ulcerativa. Mudanças histológicas típicas induzidas por DSS incluem aumento do infiltrado celular, erosão epitelial, ulceração, edema e depleção de células caliciformes (CHASSAING et al, 2015).

A análise das fotografias nos permitiu verificar que animais do grupo DSS tiveram bastante edema principalmente na camada muscular, quase completa perda da estrutura epitelial na mucosa, e criptas destruídas devido ao acúmulo de grande infiltrado celular tanto na submucosa quanto na mucosa. Essa análise se comprova no gráfico de escore histológico, o qual os grupos menos inflamados apresentaram menores valores. Os grupos tratados com as bactérias apresentaram escore histológico menor, quando comparados ao grupo DSS sem tratamento, o que comprovou a atividade anti-inflamatória das cepas.

Camundongos doentes tratados com as três cepas apresentaram maior integridade epitelial na mucosa, menos edema e menor infiltrado celular se comparado ao grupo DSS sem tratamento. Observou-se grande aumento no número de células caliciformes nas criptas de camundongos tratados com as três cepas de *L. lactis*.



**Figura 8: Avaliação histológica da mucosa do cólon.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados concomitantemente com as cepas de *L. lactis*. Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o cólon foi retirado. Porções de cólon distal foram coletadas para preparo das lâminas de histologia. As lâminas foram coradas com H.E. e a morfologia da mucosa foi avaliada. **a,b,c,d,e.** As fotos demonstram a região representativa do cólon de um animal de cada grupo, com aumento de 10x no microscópio óptico, obtendo-se a escala

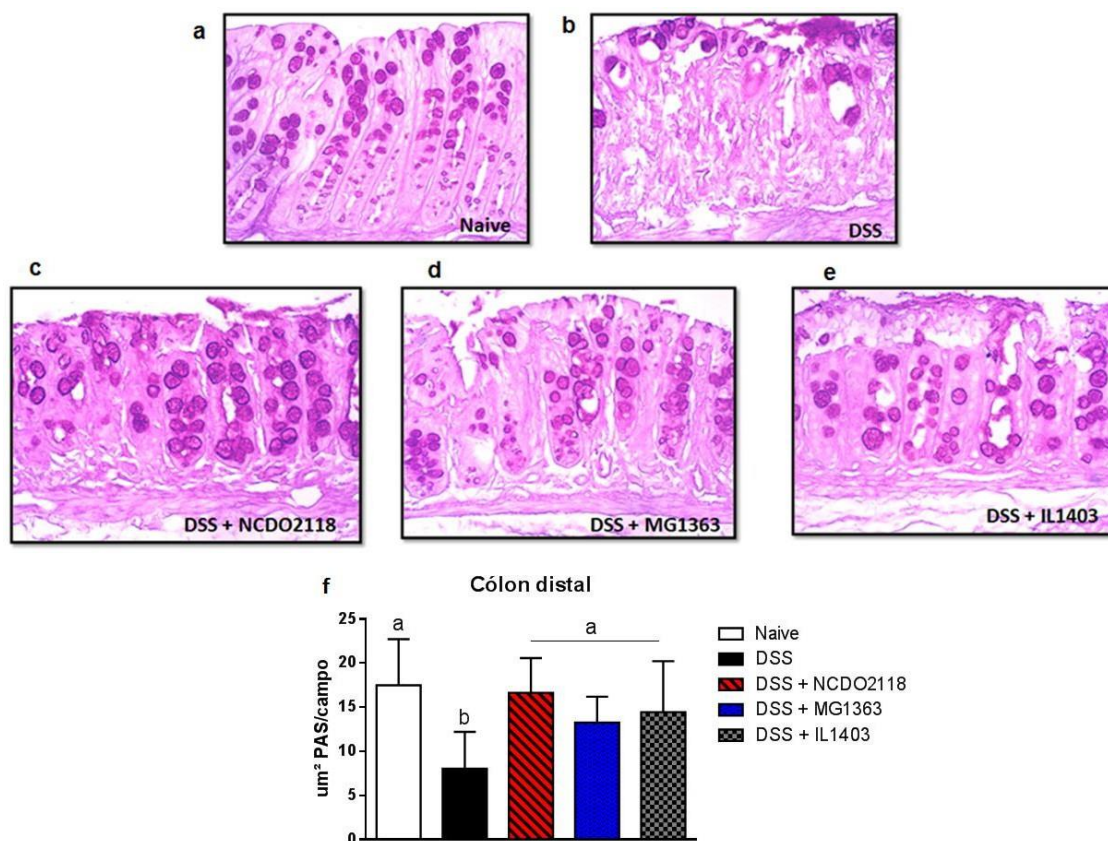


de 200µm. Os aumentos demonstram regiões de criptas íntegras e as setas apontam a presença de células caliciformes. **f.** O gráfico representa o número de células caliciformes por área. Cada foto no aumento de 10x foi considerada uma área. Para cada grupo obteve-se 15 fotos (n=15) e as células foram contadas através do programa “Image J”. **g.** O escore histológico foi obtido a partir da avaliação qualitativa global da histologia. A análise do escore leva em consideração a perda da arquitetura da mucosa, a espessura da camada muscular (edema) e o grau de infiltrado celular. Foi dado um escore de 0 a 3 para cada parâmetro analisado. O escore total foi obtido a partir da soma dos três parâmetros. Valores representam a média ± dp. A significância estatística foi medida por ANOVA e apontada por letras diferentes com Valor  $p < 0,05$ .

### **5.7 Camundongos que receberam *L. lactis* durante o desenvolvimento da colite mantiveram a produção de muco**

A administração das três cepas de *L. lactis* levou ao aumento no número de células caliciformes, sendo assim, resolvemos analisar se o mecanismo protetor gerado pelas *L. lactis* envolveu a produção de muco por essas células. A análise do muco produzido no cólon foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por P.A.S. A área foi determinada através de análise morfométrica.

Camundongos tratados com as três cepas de *L. lactis* tiveram maior presença de muco no cólon, em relação ao grupo DSS. O gráfico em barras confirmou que grupos tratados com *L. lactis* tiveram produção de muco igual ao grupo



**Figura 9: Avaliação histológica do muco produzido no cólon. a,b,c,d,e.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados concomitantemente com as cepas de *L. lactis*. Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o cólon foi retirado. Porções de cólon distal foram coletadas para preparo das lâminas de histologia. O muco produzido pelas células caliciformes foi analisado através de coloração por P.A.S. As fotos foram tiradas no aumento de 20x. **f.** O muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado e expresso como média  $\pm$  dp no gráfico em barras. Para cada grupo obteve-se 25 fotos (n=25) na escala de 100 $\mu$ m e a área onde o muco estava presente foi calculada através do programa "Image J". Realizou-se o teste ANOVA e a diferença estatística foi apontada com valor  $p < 0,05$ .

### 5.8 *L. lactis* interferiram na frequência de células dendríticas CD11c+ CD11b- CD103+ e nas Tregs CD4+LAP+

Sabe-se que células Treg são importantes para o controle de respostas inflamatórias intestinais e que células dendríticas CD103+ são cruciais para que ocorra a diferenciação de linfócitos T naive em Treg (COOMBES et al, 2007). Musaki e colaboradores (2016) demonstraram que na ausência de

células dendríticas CD103+ CD11b- ocorreu maior severidade da colite induzida por DSS (MUZAKI et al, 2016). Portanto, tendo em vista essa importante função das Tregs e CDs tolerogênicas, buscou-se analisar o efeito das três cepas de *L. lactis* na produção de algumas dessas células.

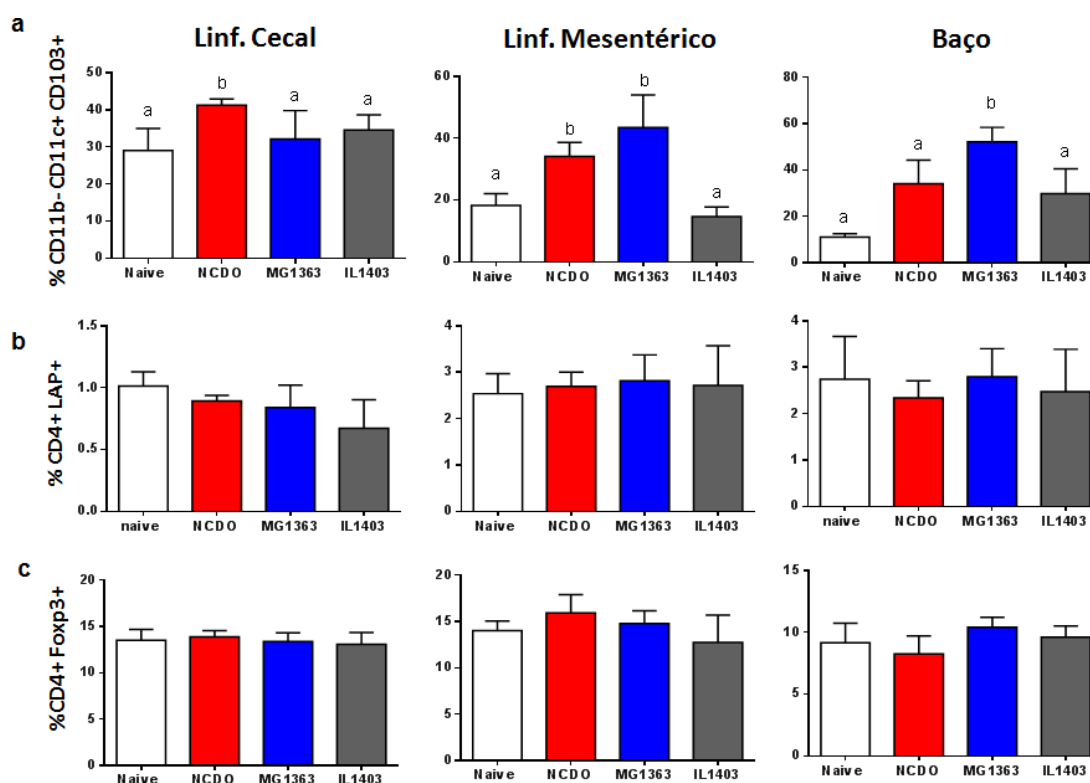
Observou-se que camundongos tratados exclusivamente com *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 apresentaram maior percentual de células dendríticas CD11c+CD11b-CD103+ no linfonodo cecal e no baço, respectivamente, ao passo que as duas bactérias aumentaram essa população de células no linfonodo mesentérico, em relação ao grupo naive (Figura 10a).

A população de células Treg CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+ não foram alteradas após o tratamento exclusivo com as três cepas em nenhum dos órgãos linfóides analisados (Figura 10b e 10c).

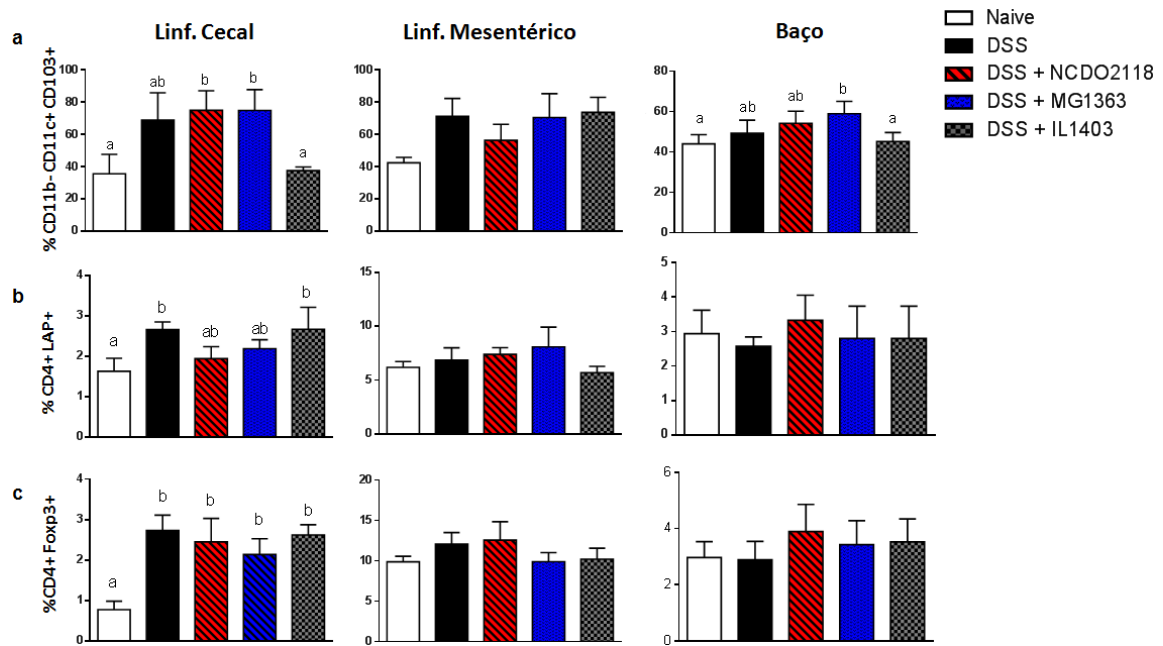
Os camundongos submetidos ao tratamento com DSS apresentaram aumento das populações de células Treg e dendríticas apenas no linfonodo cecal, se comparados com o grupo naive. Porém, em relação ao grupo DSS, os animais administrados com *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 durante a indução da colite apresentaram menor população de Treg LAP+ e maior número de células dendríticas no linfonodo cecal (Figura 11).

Entretanto, a cepa *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 não alterou o percentual de CDs e Tregs nos órgãos linfóides tanto de animais saudáveis quanto doentes.

As três cepas não foram capazes de alterar o percentual de populações CD4+Foxp3+ em relação ao grupo controle DSS.



**Figura 10: Frequência de células após administração exclusiva de *L. lactis*.** As cepas de *L. lactis* NCDO2113 ( ), MG1363 ( ) e IL1403 ( ) foram administradas durante 7 dias em camundongos C57/BL6, através de dose única diária de  $1 \times 10^9$  UFC/animal. Ao final do experimento os camundongos foram sacrificados. A frequência de células T CD4+ LAP+ (a), T CD4+ Foxp3+ (b) e dendríticas CD11c+CD11b-CD103+ (c) foram analisadas nos linfonodos cecal, mesentérico e baço. Para análise estatística, realizou-se o teste ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor  $p < 0,05$ . Valores representam média  $\pm$  dp (n=5).



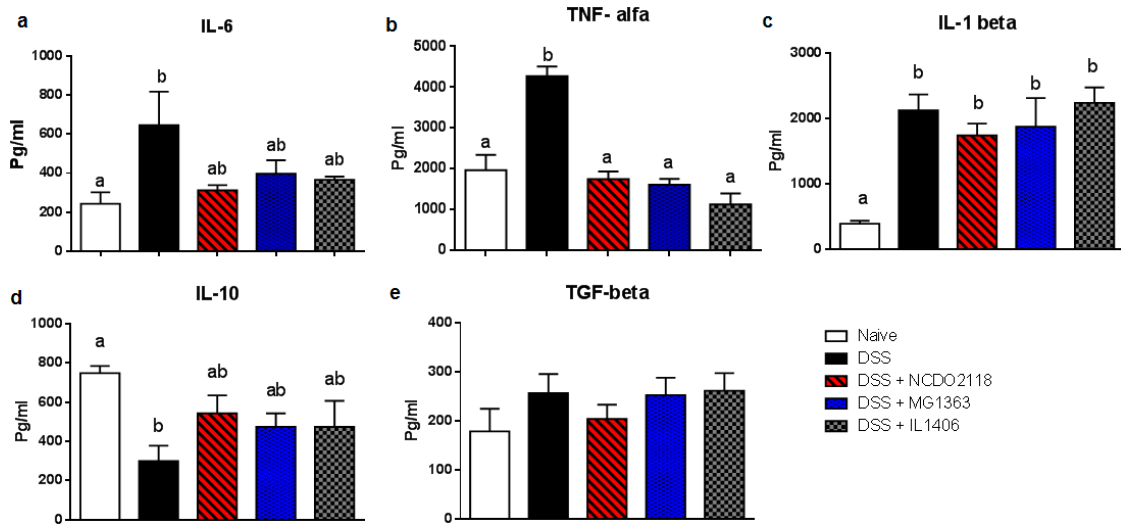
**Figura 11: Frequência de células em camundongos submetidos à colite experimental.** Durante o desenvolvimento da colite, o DSS foi administrado, em camundongos C57/BL6, simultaneamente com as cepas de *L. lactis* NCDO2118, MG1363 e IL1403, ao longo de 7 dias. Ao final do experimento os camundongos foram sacrificados. A frequência de células T CD4+ LAP+ (a), T CD4+ Foxp3+ (b) e dendríticas CD11c+CD11b-CD103+ (c) foram analisadas nos linfonodos cecal, mesentérico e baço. Para análise estatística, realizou-se o teste ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor  $p < 0,05$ . Valores representam média  $\pm$  dp (n=5).

### 5.9 As três cepas de *L. lactis* modularam a produção de citocinas em camundongos doentes

A produção de citocinas é importante para que a homeostase intestinal seja mantida. Por isso é necessário avaliar o efeito anti-inflamatório das cepas de *L. lactis* sob as citocinas produzidas na colite. Os camundongos que receberam apenas DSS tiveram produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias mensuradas (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), porém níveis reduzidos de IL-10, se comparados ao grupo naivo.

Os camundongos tratados com *L. lactis* apresentaram níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-alfa) e níveis aumentados de IL-10 no cólon. Apesar disso, as três cepas de *L. lactis* não atuaram na redução da IL-1 $\beta$ , outra citocina pró-inflamatória importante. A produção de TGF- $\beta$  não foi

alterada em nenhum dos grupos experimentais.



**Figura 12: Concentração das citocinas no cólon.** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados concomitantemente com as cepas de *L. lactis*. Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o colon proximal foi coletado para processamento. O sobrenadante do extrato de tecido do cólon proximal foi usado para análise das citocinas. Os gráficos expressos em barras representam a concentração das citocinas IL-6 (a), TNF-alfa (b), IL-1 $\beta$  (c), IL-10 (d) e TGF- $\beta$  (e), em pg/ml, no extrato de tecido do cólon. Foram usados anticorpos e reagentes de kit, exceto para IL-6. Para análise estatística, realizou-se o teste ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor p < 0,05. Os valores foram expressos em média  $\pm$  dp (n=5).

## 6 DISCUSSÃO

A colite induzida por DSS é um modelo caracterizado por alterações clínicas que envolvem a perda de peso, diarreia, sangramento retal, alterações histológicas e celulares, aumento da permeabilidade intestinal, produção de linfócitos e de citocinas inflamatórias, dentre outras. Esse modelo reproduz, assim, alguns aspectos da colite ulcerativa (OKAYASU et al, 1990).

As *L. lactis* são boas candidatas como prevenção ou tratamento da colite ulcerativa, já que existem indícios em publicações prévias de que elas possuem efeitos anti-inflamatórios na mucosa intestinal (LUERCE et al, 2014). Porém tais efeitos ainda não foram completamente elucidados nas cepas selvagens. Por esse motivo, escolhemos estudar os efeitos da *L. lactis* na colite induzida por DSS.

Um dos parâmetros clínicos relevantes na colite é a perda de peso, que ocorre a partir do 3-4 dia de administração de DSS (CHASSAING et al, 2015). Neste estudo, nós observamos que no modelo apresentado aqui, as três cepas foram capazes de prevenir a perda de peso após 7 dias de ingestão de DSS. Entretanto, animais tratados com *L. lactis* IL1403 perderam peso mais rapidamente do que aqueles tratados com outras cepas, uma vez que no dia 6 esse grupo teve redução de peso semelhante ao grupo DSS (Figura 3). É importante salientar que no grupo controle doente (DSS), os camundongos começaram a perder peso a partir do terceiro dia de administração de DSS, enquanto que animais tratados com as bactérias tiveram redução de peso a partir do quinto dia, em relação ao grupo naive. Deste modo, além de prevenir a perda de peso no sétimo dia, o tratamento com as bactérias prorrogou a queda aguda do peso durante o desenvolvimento da doença.

O tratamento com as bactérias também aumentou a sobrevivência já que houve mortalidade de alguns camundongos do grupo DSS no sexto dia, porém nos grupos que receberam as cepas juntamente com o DSS, todos sobreviveram. Além disso, observamos prostração e sinais de fraqueza em camundongos doentes, o que não foi observado em grupos que receberam as bactérias (dados não mostrados).

No presente estudo, camundongos tratados com as bactérias apresentaram sinais mais brandos da colite. Houve redução na perda de peso, menor grau de diarréia e menor sangramento retal nesses animais (Figura 4). Trabalhos anteriores publicados por nosso grupo relataram que a cepa *L. lactis* NCDO2118 melhorou os sinais clínicos da colite percebidos a partir da redução do escore inflamatório macroscópico da doença (LUERCE et al, 2014), o que corrobora os dados encontrados aqui. Portanto, notamos que as três cepas de *L. lactis* foram capazes de reduzir os três parâmetros analisados no escore inflamatório da colite e melhorar os sinais da doença.

Apesar desses efeitos antiinflamatórios, não observamos mudanças no encurtamento do cólon em grupos tratados com *L. lactis* (Figura 5). O encurtamento do cólon é uma consequência frequente causada pelo DSS (CHASSAING et al, 2015) e não foi prevenido pela administração das bactérias.

O DSS é tóxico e lesiona o epitélio tornando-o mais susceptível a penetração de antígenos externos. Sabendo disso, resolvemos analisar se as *L. lactis* modificaram a permeabilidade intestinal de camundongos tratados com DSS. A permeabilidade intestinal se encontrou elevada no grupo doente, enquanto todos os grupos tratados com *L. lactis* permaneceram inalterados com relação ao grupo naïve, o que sugere um efeito potente de proteção a barreira mucosa. Não foram observadas diferentes respostas entre as três cepas. Visto que o aumento da permeabilidade intestinal e consequente translocação bacteriana são alguns dos principais efeitos deletérios causados pelo DSS, é importante que as *L. lactis* atuem exatamente na reversão desses efeitos.

A maior exposição da mucosa do cólon aos microorganismos comensais e externos também estão relacionados com perda das proteínas das *tight junctions*, causada pelo DSS (PORITZ et al, 2007). A permeabilidade intestinal está diretamente relacionada com a perda dessas proteínas. Portanto, a melhora na permeabilidade intestinal, causada pelas *L. lactis*, pode estar relacionada ao aumento na produção de moléculas das *tight junctions*, não avaliadas aqui.

Resolvemos confirmar se a redução na permeabilidade intestinal envolveu



aumento de SIgA, já que essa imunoglobulina está envolvida com a integridade da barreira imune por limitar a penetração de bactérias comensais e patogênicas (BRANDTZAEG, 1998). Em nosso trabalho, a administração de *L. lactis* em condições fisiológicas não modificou a produção de SIgA no intestino delgado dos camundongos (Figura 7b). Porém, verificamos o aumento da SIgA em camundongos doentes, e observamos que a administração de *L. lactis* concomitante com DSS manteve os níveis de SIgA iguais ao grupo naive (Figura 7a).

Várias bactérias probióticas induzem o aumento da SIgA (O'SULLIVAN, 2001). Os mesmos efeitos não foram observados após a administração de *L. lactis*. A nossa hipótese para esse resultado é que a constante exposição a antígenos através da mucosa intestinal lesionada pelo DSS pode ter levado ao aumento da produção de SIgA no grupo doente como um mecanismo reativo protetor, acionado pelo processo inflamatório. Porém, como a administração das cepas de *L. lactis* mantiveram a barreira mucosa mais íntegra, resultado confirmado pela análise da permeabilidade intestinal, houve menor exposição às bactérias comensais, e, não houve alteração na produção da SIgA. Concluímos que a função anti-inflamatória das cepas de *L. lactis* não envolveu aumento de SIgA.

Decidimos, então, analisar a integridade da mucosa através do escore histológico da doença. Animais que receberam administração das bactérias apresentaram arquitetura da mucosa mais íntegra com menor erosão epitelial, redução do infiltrado inflamatório celular e menor edema, além de apresentarem manutenção no número de células caliciformes (Figura 8). É descrito, nesse modelo experimental de colite, a alteração desses parâmetros histológicos, já que o DSS age rompendo a barreira da mucosa, contribuindo também para o aumento da permeabilidade intestinal. Curiosamente, mesmo usando dois métodos diferentes para avaliar os escores macroscópico e histológico da doença, observamos efeito protetor semelhante das três cepas de bactérias.

Tendo notado menor depleção de células caliciformes na mucosa, resolvemos confirmar o efeito das cepas de *L. lactis* na produção de muco que constitui uma barreira protetora contra a ação do DSS (Figura 9). A coloração das lâminas histológicas com P.A.S. revelou redução na produção de muco no

cólon de animais doentes. Animais tratados com *L. lactis* apresentaram níveis de produção de muco iguais aos do grupo naive, provavelmente devido à ação dessas bactérias na proteção à agressão física causada pelo DSS.

Portanto, nossos dados sugerem que um dos mecanismos pelos quais as bactérias agem é via aumento no número de células caliciformes e da produção de muco.

Em estudo relatado por Cobo e colaboradores (2017), foi demonstrado que a expressão e liberação de MUC 2 está relacionada com o aumento na produção de peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas, por células de Paneth. Portanto, seria bastante proveitosa a investigação de tais peptídeos no lúmen dos camundongos tratados com *L. lactis*, em modelos de doenças que também afetem o intestino delgado. Sabemos também que a espécie *L. lactis* produz nisina, um peptídeo antimicrobiano, o que pode auxiliar no equilíbrio da homeostase intestinal se elas forem capazes de secreta-lo no intestino (STILES,1997).

Um estudo feito com outra bactéria potencialmente probiótica da família LAB, *Lactobacillus paracasei* LS2, administrada durante o desenvolvimento da colite por DSS, protocolo semelhante ao desenvolvido aqui, demonstra os mesmos efeitos tanto para o escore clínico, quanto para o escore histológico da doença. Isso corrobora nossos dados e sugere um possível efeito antiinflamatório do tipo mediado por probióticos promovido também pelas três cepas de *L. lactis* estudadas aqui (PARK et al, 2017).

O estudo já citado de Luerce e colaboradores (2014), demonstrou que células *caco2* estimuladas in-vitro com *L. lactis* e IL-1 $\beta$  tiveram redução na produção de IL-8. Esse achado juntamente com os resultados expostos aqui nos levam a suposição de que as *L. lactis* podem ser capazes de induzir a imunorregulação por dois mecanismos: a) via ação direta no epitélio intestinal e nas células caliciformes, levando a manutenção da integridade da camada epitelial da mucosa; b) via estimulação da expansão de células imunes, como as células dendríticas tolerogênicas ou as células T reguladoras. Sendo assim, resolvemos analisar a frequência dessas células em camundongos tratados com *L. lactis* (Figuras 10 e 11).

Musaki e colaboradores (2016) demonstraram que na ausência da

população específica de células dendríticas CD103+ CD11b-, ocorreu maior severidade da colite induzida por DSS (MUZAKI et al, 2016). Portanto, analisamos a frequência dessa população em camundongos tratados ou não com DSS e *L. lactis*. Tanto os grupos saudáveis (Figura 10) quanto os grupos doentes (Figura 11) que receberam administração das cepas *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 apresentaram maior percentual de células dendríticas tolerogênicas nos órgãos linfóides. Isso sugere que tal aumento pode ser uma ação da bactéria e não um mecanismo fisiológico imunorregulador causado pelo DSS.

É conhecido que, em camundongos normais, populações de células dendríticas do perfil CD103+ da mucosa intestinal são capazes de induzir a conversão de células T *naive* em células T reguladoras no linfonodo mesentérico, de maneira dependente de ácido retinóico e de TGF- $\beta$ . Em estudo *in vitro*, concluiu-se que células TCD4+ *naives* do baço de camundongos DO11.10, cultivadas com células dendríticas CD103+ isoladas dos linfonodos mesentéricos de camundongos são capazes de se diferenciar em células T reguladoras Foxp3+ (ANNACKER et al, 2005; COOMBES et al, 2007).

Diferentemente do esperado, não ocorreu aumento na população de células Treg CD4+Foxp3+ em animais saudáveis tratados com as três cepas de *L. lactis*. Houve aumento, no entanto, na frequência de células Treg CD4+Foxp3+ e TCD4+ LAP+ no linfonodo cecal de camundongos tratados com DSS. Portanto, nossos dados sugerem que esse aumento de Treg se deveu à administração de DSS, mas não devido ao tratamento com as bactérias.

As cepas *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 apresentaram frequência reduzida de células Treg CD4+LAP+ no linfonodo cecal, em relação ao grupo DSS, provavelmente porque, com a inflamação reduzida, ocorreu menor recrutamento ou proliferação de celular com efeito regulador.

Nota-se que o efeito anti-inflamatório da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 não ocorreu via aumento na frequência de células dendríticas ou de Tregs, já que a frequência dessas células permaneceu inalterada em todos os animais saudáveis ou doentes tratados com essa cepa.

Algumas cepas de *L. lactis* da subespécie *lactis* como a *L. lactis*

NCDO2118 e a IL1403 possuem genes que codificam enzimas da via de produção de ácido fólico, porém não se sabe se essa vitamina pode ser secretada por elas no intestino (BOLOTIN et al, 2001; OLIVEIRA ET AL, 2014). Na literatura, é descrito que células Treg Foxp3+ possuem receptor de folato 4, por necessitarem de ácido fólico como fator de sobrevivência (KUNISAWA et al, 2012). Similarmente, bactérias entéricas possuem a característica de produzir ácido fólico, portanto, não se sabe se as *L. lactis* podem agir modulando tal produção (IYER & TOMAR, 2009).

Apesar de em nosso modelo não ocorrer o aumento das células Treg, já foi demonstrado que, quando administradas em outros modelos experimentais de colite induzida por DSS, as *L. lactis* estimulam o aumento na frequência de células Treg CD4+ LAP+ no baço e linfonodo mesentérico de camundongos doentes (LUERCE et al, 2014). Outro estudo relatou que, quando administradas no modelo de doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD), as *L. lactis* NCDO2118 foram capazes de aumentar a frequência de células B reguladoras CD19+ LAP+ nos esplenócitos de camundongos doadores (MERCADANTE et al, 2016). Não foram encontrados estudos relacionando efeitos das *L. lactis* com a frequência de outras células reguladoras, como as células Tr1 ou Th3. Portanto, mais estudos são necessários para a comprovação dos efeitos dessas cepas de *L. lactis* na manutenção, proliferação e recrutamento de vários tipos de células reguladoras na mucosa intestinal.

Apesar de existirem evidências de que células Treg são importantes para conter a inflamação do cólon, nós observamos que o mecanismo pelo qual as *L. lactis* estudadas aqui regulam a inflamação não envolveu aumento na frequência de células Treg nos órgãos analisados, mas sim de células dendríticas tolerogênicas.

As *L. lactis* produzem e secretam GABA (ácido gama-aminobutírico), um neurotransmissor que também possui função de imunoregulação (JIN et al, 2013; LAROUTE et al, 2016; MAZZOLI et al, 2010). É conhecido que o sistema nervoso está intimamente ligado com o sistema imune através de suas células e mediadores. GABA tem efeitos nas células imunes, como a ativação ou supressão de secreção de citocinas, modificação na proliferação celular e

migração de células. Tais células imunes podem entrar em contato com GABA quando elas mesmas liberam esse neurotransmissor, ou quando elas entram no cérebro (JIN et al, 2013). Porém, uma nova proposta de contato com esse neurotransmissor é a sua secreção pelas *L. lactis* no intestino. Outro possível mecanismo de imunoregulação clássico é a produção de citocinas que modifiquem a resposta inflamatória. No nosso estudo, o tratamento oral com as três cepas de *L. lactis* reduziu os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentados pela ingestão de DSS no cólon dos animais. Similarmente ao encontrado, Nishitani et al, (2009) identificaram redução da citocina TNF- $\alpha$  após tratamento com as cepas de bactérias *L. lactis* subsp. *cremoris* FC.

A ingestão de *L. lactis* durante o desenvolvimento da colite não preveniu o aumento da IL-1 $\beta$  no colon. Além de ativar fatores de transcrição como NF- $\kappa$ b, que induz aumento de expressão de mediadores pro-inflamatórios, a IL1 $\beta$  está envolvida no processo de cicatrização de feridas e reepitelização intestinal. Além disso, essa citocina também pode estar envolvida na produção de peptídeos antimicrobianos e de mucina, fatores importantes na proteção da barreira epitelial (FORKEL & MJOSBERG, 2016).

A IL-10 é provavelmente uma das principais citocinas que modulam repostas imunes na mucosa intestinal. Camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem espontaneamente inflamação intestinal (KUHN et al, 1993; MACCAFFERTY et al, 2000; GOMES-SANTOS et al, 2012). No presente estudo, os níveis de IL-10 se encontraram reduzidos no cólon de animais doentes, mas a administração de DSS durante o desenvolvimento da colite impediu sua redução. Portanto, a manutenção da produção local da citocina IL-10 pode ser um dos efeitos anti-inflamatórios das três cepas estudadas.

Ao investigar possíveis grupos celulares que estariam sendo estimulados pelas *L. lactis*, contribuindo para a produção de altos níveis de IL-10 no cólon, os macrófagos com atividades anti-inflamatórias (MOSSER & EDWARDS, 2008) e as células B-1 (AZIZ et al, 2015) seriam fortes candidatos. Além dessas, outros tipos de células T reguladoras já citadas aqui podem ter influenciado nos níveis de IL-10, como as Tr1. Porém, essas células não foram analisadas no presente trabalho e são necessários mais estudos para verificar a influência das *L. lactis* na manutenção, proliferação e recrutamento de tais

células.

Não observamos alterações na produção de TGF- $\beta$  em animais doentes ou nos tratados com *L. lactis*.

Nenhum modelo experimental é capaz de reproduzir todas as características da IBD humana. Por isso, cada modelo de colite é útil para investigar um aspecto da doença. Tendo em vista que o modelo de DSS é ótimo para estudar distúrbios de permeabilidade intestinal e de produção de muco causados pela colite, é necessário investigar efeitos da *L. lactis* em outras fases da doença podendo ser usado como tratamento e/ou prevenção da colite. Além disso, é importante também investigar efeitos das *L. lactis* em outras doenças, já que outros modelos podem realçar atividades adicionais da *L. lactis* ainda não observados.

As bactérias *L. lactis* se encontram na lista de probióticos da ANVISA. Porém de acordo com os *guidelines* da FAO/WHO, elas não podem ser incluídas na definição de probióticos, já que não são capazes de colonizar o TGI. No entanto, uma recente declaração de consenso publicada em 2014 após um debate, organizado pela ISAPP (Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos), entre pesquisadores especialistas no campo de probióticos da FAO e WHO, concluiu que podem entrar no escopo de probióticos as bactérias que possuem efeitos anti-inflamatórios mesmo não sendo capazes de colonizar o intestino (HILL et al, 2014). Apesar disso, estudos adicionais são ainda necessários para que a *L. lactis* possa ser estabelecida como probiótica.

## 7 CONCLUSÃO

É importante a presença de um epitélio intacto para prevenção da inflamação intestinal já que o DSS age rompendo a barreira de mucosa. Portanto, o efeito protetor causado pelas *L. lactis* pode ser um grande avanço na prevenção/tratamento da colite por DSS. Em vários aspectos da colite, tanto macroscópicos quanto microscópicos, não foram identificadas diferenças entre os efeitos das três cepas de *L. lactis*. Portanto, sugerimos que o papel anti-inflamatório das *L. lactis* neste modelo experimental não é cepa-específica, mas as três cepas estudadas possuem efeitos protetores na mucosa intestinal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008. Disponível em: Acesso em: 2016.

ALTERMANN, E; RUSSELL, W. M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARRANGOU, R.; BUCK, B. L.; MCAULIFFE, O.; SOUTHER, N.; DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R. e KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. PNAS, v. 102, n. 11. 3906–3912, 2004.

ANNACKER, O.; COOMBES, J. L.; MALMSTROM, V.; UHLIG, H. H.; BOURNE, T.; JOHANSSON-LINDBOM, B.; AGACE, W. W.; PARKER, C. M. e POWRIE, F. Essential role for CD103 in the T cell– mediated regulation of experimental colitis. v. 202, n. 8: 1051–1061, out. 2005.

AZIZ, M.; HOLODICK, N. E.; ROTHSTEIN, T. L. & WANG, P. The Role of B-1 Cells in Inflammation. *Immunol Res.* v. 63, n. 0: 153–166, Dez. 2015.

BASSO, P.J.; FONSECA, M.T.; BONF'A, G.; ALVES, V.B.F.; SALES-CAMPOS, H.; NARDINI, V.; CARDOSO, C.R.B. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 47, n. 9: 727–737, 2014.

BERLEC, A.; RAVNIKAR, M.; STRUKELJ, B. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. *Pharmazie*, v. 67 n.11:891-8, Nov. 2012.

BOLOTIN, A., QUINQUIS, B., SOROKIN, A., EHRLICH, D.S. Recent genetic transfer between *Lactococcus lactis* and enterobacteria. *J. Bacteriol.* v. 186, 6671-6677, 2004.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; SOROKIN, A. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*, v. 11:731–753, 2001.

BRANDTZAEG, P. (1998). Development and basic mechanisms of human gut



immunity. *Nutrition Reviews*, 56(1 II). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01645.x>

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 70, 505–515, 2009.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit.Rev.Microbiol*, n. 28, 281–370. 2002.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, n. 47: 45-61. 2015.

CHASSAING B., AITKEN J. D., MALLESHAPPA, M., & VIJAY-KUMAR, M. (2015). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol*, 27(4), 1–19. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104.Dextran>

COBO, E. R.; KISSOON-SINGH, V.; MOREAU, F.; HOLANI R.; CHADEE, K. MUC2 mucin and butyrate contribute to the synthesis of the antimicrobial peptide cathelicidin in response to *E. histolytica* and DSS-induced colitis. *Infect Immun*. Jan. 2017. Manuscrito.

COOMBES, J.L.; ROBINSON, N.J.; MALOY, K.J.; UHLIG, H.H.; POWRIE, F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.*, v. 204: 184 – 194, 2005.

COOMBES, L.; SIDDIQUI, K. R. R.; ARANCIBIA- CÁRCAMO, CAROLINA V.; HALL, J.; SUN, C.-M.; BELKAID, Y.; e POWRIE, F. A functionally specialized population of mucosal CD103 + DCs induces Foxp3-regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid- dependent mechanism. *Janine*, v. 204, N. 8: 1757- 1764, Ago. 2007.

COOPER, H. S., MURTHY, S. N., SHAH, R. S., & SEDERGRAN, D. J. CLINICOPATHOLOGIC STUDY OF DEXTRAN SULFATE SODIUM EXPERIMENTAL MURINE COLITIS. LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY, 69(2), 238—249. [HTTP://EUROPEPMC.ORG/ABSTRACT/MED/8350599](http://EUROPEPMC.ORG/ABSTRACT/MED/8350599), 1993

CRAIG, S.W., CEBRA, J.J. Peyer's patches: na enriched source of precursors of IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med*, 1971. 134:188-200.

DE GREEF, E.; VANDENPLAS, Y.; HAUSER, B.; DEVREKER, T.; VEEREMAN, G. The use of probiotics in IBD and IBS. *Minerva Pediatrica*, v. 66, n. 5: 491–500, 2014.

DINIZ, S. O. F.; BARBOSA, A. J. A.; ARAÚJO, I. D.; NELSON, D. L.; MACHADO, L. A. S.; FILHO, M. B. e CARDOSO, V. N. Assessment of Bacterial Translocation in Obstructive Jaundice Using Tc-99m *Escherichia coli*. v.48, Special : pp. 45-49, *Brazilian Archives of Biology and Technology. Out.*, 2005.

DONOHUE, D.C.; GUEIMONDE, M. Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, ed. 4, 423-438. 2012.

FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002

FARIA, A. M. C.; MUCIDA, D.; MCCAFFERTY, D.-M.; TSUJI, N. M. E VERHASSELT, V. Tolerance and Inflammation at the GutMucosa. *Clinical and Developmental Immunology*, Article ID 738475, 3 pages. 2012.  
doi:10.1155/2012/738475

FDA, 2010. Generally Recognised as Safe (GRAS) Notifications. FDA.  
<http://www.fda.gov/ANimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/GenerallyRecognisedasSafeGRASNotifications/default.htm>.

FORKEL, M. e MJÖSBERG, J. Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease, v. 16, n. 10: 73, *Set*. 2016.  
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, 2007.

GANDHI, R.; FAREZ, M. F.; WANG, Y.; KOZORIZ, D.; QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. Cutting Edge: Human Latency-Associated Peptide+ T Cells: A Novel Regulatory T Cell Subset. *The journal of immunology*, v. 184: 4620-4624, 2010.

GASBARRINI, G.; BONVICINI, F.; GRAMENZI, A.; Probiotics History. *J Clin Gastroenterol*. v. 13-15: S116-S119, *set*. 2015.

GENEROSO, S. V.; RODRIGUES, N. M.; TRINDADE, L. M.; PAIVA, N. C.; CARDOSO, V. N.; CARNEIRO, C. M.; FERREIRA, A. V. M.; FARIA, A. M. C. E MAIOLI, T. U. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids in Health and Disease*, v. 14, n. 54, 2015.

GOMES-SANTOS A. C.; MOREIRA, T. G.; CASTRO-JUNIOR, A. B.; HORTA B. C.; LEMOS, L.; CRUZ, D. N.; GUIMARÃES, M. A. F.; CARA, D. C.; MCCAFFERTY D. M.; & FARIA, A. M. C. New Insights into the Immunological Changes in IL-10-Deficient Mice during the Course of Spontaneous Inflammation in the GutMucosa. *Clinical and Developmental Immunology*. v. 2012.

HELANDER, H. F. e FÄNDRIS, L. Surface area of the digestive tract – revisited. *Journal of Gastroenterology*. Early Online, 1–9. 2014

HERZENBERG, L. A., Tung, J., MOORE, W. A., HERZENBERG, L. A., & PARKS, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed - Supplementary Information. *Nature Immunology*, 7(7), 681–685.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER P. C. e SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, v. 11, 506–514, jun. 2014.

ISAO OKAYASU, SHIGERU HATAKEYAMA, MASAHIRO YAMADA, TOSHIFUMI OHKUSA, YOSHIO INAGAKI, and RINTARO NAKAYA. A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 1990. 98:694-702.

ISHIDA, T.; YOKOTA, A.; UEZAWA, Y.; TODA, T. and YAADAI, K. Identification and Characterization of Lactococcal and Acetobacter Strains Isolated from Traditional Caucasian Fermented Milk. *J Nutr Sci Vitaminol*. v. 51, n.3:187- 93, Jun. 2005.

IYER, R. & TOMAR, S. K. Folate: A Functional Food Constituent. *Journal of Food Science*. v. 74, n. 9, 2009.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation, 2009. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 27: 313–38, 2009.

JIN, Z.; MENDU, S. K.; BIRNIR, B. GABA is an effective immunomodulatory molecule. Springer. *Amino Acids*, v. 45, 87–94, 2013.

JOHANSSON-LINDBOM, B.; SVENSSON, M.; PABST, O.; PALMQVIST, C.; MARQUEZ, G.; FÖRSTER, R. e AGACE, W. W. Functional specialization of gut CD103- dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *JEM*, v. 202, n. 8: 1063–1073, 2005.

Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontario, Canada, Abril e Maio, 2002.

KANG, O.-H.; KIM, D.-K.; CHOI, Y.-A.; PARK, H.-J.; TAE, J.; KANG, C.-S.; CHOI, S.-C.; NAH, Y.-H.; LEE, H.-K. e LEE, Y.-M. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR*

*MEDICINE*, n. 18: 893-899, 2006.

KIESLER, P.; FUS, I. J.; STROBER, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.*, v. 1, n. 2: 154–170, Mar. 2015.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; & MULLER, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell*, v. 75: 263- 274, Out. 1993.

LAROUI, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C.; BAKER, M. T.; AYYADURAI S.; CHARANIA, M. A.; LAROUI, F.; YAN, Y.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain- Length Fatty Acids in the Colon. *Plos One*, v. 7, Issue 3, Mar. 2012.

LAROUI, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C.; BAKER, M. T.; AYYADURAI, S.; CHARANIA, M. A.; LAROUI, F.; YAN, Y.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nanolipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *Plos Ones*, v. 7, 2012.

LAROUTE, V.; YASARO, C.; NARIN, W.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, E.; COCAIGN-BOUSQUET, M. & LOUBIÈRE, P. GABA Production in *Lactococcus lactis* Is Enhanced by Arginine and Co-addition of Malate. *Frontiers*. v. 7, jul. 2016.

LEBLANC, A.M.; CARMEN, S.; CHATEL, J-M.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P.; LUIS G. BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; LEBLANC, J.G. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterology Research and Practice*. 2014.

LEBLANC, M. D.; CHATEL D. C. S., MIYOSHI, A.; AZEVEDO V.; LANGELLA, P., BERMUDEZ-HUMARAN, L. G., & LEBLANC, J. G. (2015). Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/146972>

LUERCE, T. D.; GOMES-SANTOS; A. C., ROCHA, C. S.; MOREIRA, T.G.; CRUZ, D.N.; LEMOS, L.; SOUSA, A.L.; PEREIRA, V.B.; AZEVEDO, M. D.; MORAES, K.; CARA, D.C.; LEBLANC, J.G.; AZEVEDO, V.; FARIA, A.M.C. and MIYOSHI, A. Antiinflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathogens*, v. 6, n. 1, article 33, 2015.

MAIOLI, T. U.; SILVA, B. M.; DIAS, M. N.; PAIVA, N. C.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS, F. S. e GENEROSO, S. V. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, v. 13, n.6, 2014.

MATTU, B.; CHAUHAN, A. Lactic Acid Bacteria and Its Use in Probiotics. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013.

MAZZOLI, R.; PESSIONE, E.; DUFOUR, M.; LAROUTE, V.; GIUFFRIDA, M. G.; GIUNTA, C.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LOUBIERE, P. Glutamate- induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during GABA production: combined transcriptomic and proteomic analysis. *Amino Acids*. n. 39: 727–737. 2010.

MCCAFFERTY, D.M.; SIHOTA E.; MUSCARA M.; WALLACE J.L.; SHARKEY K.A.; KUBES P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, n. 279:G90–G99. 2000.

MELGAR, S.; BJURSELL, M.; GERDIN, A.K.; SVENSSON, L.; MICHAËLSSON, E.; BOHLOOLY-Y, M. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, n. 292: G165–G172. 2007.

MELGAR, S.; KARLSSON, A. e MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, n. 288: G1328–G1338, 2005.

MERCADANTE, A. C. T., PEROBELLI, S. M., ALVES, A. P. G., GONÇALVES-SILVA, T., MELLO, W., GOMES-SANTOS, A. C., MIYOSHI, A., FARIA, A. M. C., & BONOMO, A. (2014). Oral Combined Therapy with Probiotics and Alloantigen Induces B Cell–Dependent Long-Lasting Specific Tolerance. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1928–1937. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301034>

MILLS, S.; O'SUILLVAN, O.; HILL, C.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics. *Int. J. Dairy Technol.* n. 63, 2010.

MOSSER, D. M.& EDWARDS. J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews, Immunology.* v. 8, Dez. 2008.

MOTTET, C.; UHLIG, H.H.; POWRIE, F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol*, n. 170:3939–43. 2003.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331–341. 2003 <https://doi.org/10.1038/nri1057>

MOWAT, A. M; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology.* v. 14. out. 2014

MUZAKI, A. R. B. M.; TETLAK, P.; SHENG, J.; LOH, S. C.; SETIAGANI, Y. A.; POIDINGER, M.; ZOLEZZI, F.; KARJALAINEN, K. e RUEDL, C. Intestinal CD103+CD11b- dendritic cells restrain colitis via IFN- $\gamma$ -induced anti- inflammatory response in epithelial cells. v.8, n.2, Mar. 2016.

NI, J.; CHEN S. F.; HOLLANDER, D. Effects of dextran sulphate sodium on

intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut.*, v. 39, n. 2:234–241, 1996.

NISHITANI, Y.; TANOUE, T.; YAMADA, K.; ISHIDA, T.; YOSHIDA, M.; AZUMA, T.; MIZUNO, M. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* n. 9:1444–1451, 2009.

O’SULLIVAN, D. J. Screening of Intestinal Microflora for Effective Probiotic Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* n.49: 1751–176. 2001.

OLIVEIRA, L. C.; SARAIVA, T. D. L.; SOARES, S. C.; RAMOS, R. T. J. et al. Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, a GABA-Producing Strain. *Genome Announcements*, v. 2, Issue 5, 2014.

OLIVEIRA, R. P.; SANTIAGO, A. F.; FICKER, S. M.; GOMES-SANTOS, A. C.; FARIA, A. M. C. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *Journal of immunologic methods*, 2015.

PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Immunology Reviews*, v. 12: 821-832, 2012.

PAPADIMITRIOU, K., POT, B., & TSAKALIDOU, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*, 2, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.001>

PARK, J.-S.; JOE, I.; RHEE, P. D.; JEONG, C.-S.; JEONG, G. A lactic acid bacterium isolated from kimchi ameliorates intestinal inflammation in DSS-induced colitis. *Journal of Microbiology*, 2017.

PASSERINI, D.; BELTRAMO, C.; CODDEVILLE, M.; QUENTIN, Y.; RITZENTHALER, P.; DAVERAN-MINGOT, M. L.; LE BOURGEOIS, P. Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS One* n. 5, 2010.

PORITZ, L. S.; GARVER, K. I.; GREEN, C.; FITZPATRICK, L.; RUGGIERO, F.; KOLTUN, W. A. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*, n.140:12–19, 2007.

POWRIE, F.; LEACH, M. W.; MAUZE, S.; CADDLE, L. B.; COFFMAN, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4<sub>+</sub> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 *scid* mice. *Int. Immunol.* n. 5: 1461, 1993.

REA, M. C.; CLAYTON, E.; O'CONNOR, P. M.; SHANAHAN, F.; KIELY, B.; ROSS, R.P.; HILL, C. Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 7: 940- 946, 2007.

RUBERTI, M.; FERNANDES, L. G. R.; SIMIONI, P. U.; GABRIEL, D. L.; YAMADA, A. T.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Phenotypical and Functional Analysis of Intraepithelial Lymphocytes from Small Intestine of Mice in Oral Tolerance. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, 16 pg, 2012.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* v.61, n.3:91-9, Mar. 2003.

STEIDLER, L.; HANS W.; SCHOTTE L., et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, n. 289:1352–5. 2000.

STILES, M. E., & HOLZAPFEL, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)

STOEL, M.; JIANG, H-Q.; DIEMEN, C. C. V.; BUN, J. C. A. M.; DAMMERS, P. M.; THURNHEER, M. C.; KROESE, F. G. M.; CEBRA, J. J. E BOS, N. A. Restricted IgA Repertoire in Both B-1 and B-2 Cell-Derived Gut Plasmablasts. *J Immunol*, v.174:1046-1054, 2005.

TEKENAKA, M. C.; QUINTANA, F. J. Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol*, 2016.  
Vitamin B9 in the Maintenance of Regulatory T Cells In Vitro and In Vivo. *Plos One*, v. 7, Issue 2, fev. 2012.

TURNER, JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*.2009. doi:10.1038/nri2653

WEGMANN, U.; O'CONNELL-MOTHERWAY, M.; ZOMER, A.; BUIST, G.; SHEARMAN, C.; CANCHAYA, C.; VENTURA, M.; GOESMANN, A.; GASSON, M. J.; KUIPERS, O. P.; SINDEREN, D. V.; KOK, J. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 8: 3256–3270. 2007.