



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças
inflamatórias intestinais**

Doutoranda: Ana Cristina Gomes Santos

Orientadora: Prof. Ana Maria Caetano de Faria -UFMG

Co-orientador: Prof. Anderson Miyoshi - UFMG

Colaboradoras: Prof. Denise Carmona Cara –UFMG

Prof. Donna-Marie McCafferty – University of Calgary

Belo Horizonte, setembro de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças
inflamatórias intestinais**

*Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.*

Ana Cristina Gomes Santos

Orientadora: Profa. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientador: Prof. Anderson Miyoshi

Colaboradoras: Profa. Denise Carmona Cara

Profa. Donna-Marie McCafferty

Belo Horizonte, setembro de 2011

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunobiologia (Lib) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-PRONEX) e Instituto de Investigação em Imunologia (iii).

Motivo

*Eu canto porque o instante existe
e a minha vida está completa.*

*Não sou alegre nem sou triste:
sou poeta.*

Irmão das coisas fugidias,

não sinto gozo nem tormento.

Atravesso noites e dias no vento.

Se desmorono ou se edifico,

se permaneço ou me desfaço,

não sei, não sei.

Não sei se fico ou passo.

Sei que canto. E a canção é tudo.

Tem sangue eterno a asa ritmada.

E um dia sei que estarei mudo:

mais nada.

Cecília Meireles

Aos meus pais Márcio e Beth, aos meus irmãos Juliana e Gustavo e ao meu grande amor Rodrigo.

Dedico....

Agradecimentos

À família mais maravilhosa que uma pessoa podia ter: ao meu pai, exemplo de vida e de perseverança, à minha mãe que partiu cedo mas está presente sempre, todos os dias, em meu coração. Aos meus adoráveis irmãos Juliana e Gustavo pela amizade e cumplicidade. Vocês me divertem muito! Amo vocês!

Ao Rodrigo por ser meu companheiro, meu amado e confidente. Agradeço por todo apoio desde minha formatura na Biologia. Você me ensinou a lutar e a esquecer os problemas, os obstáculos. Faz a minha vida mais leve. Não podia deixar de agradecer pelos fins de semana, me esperando nos bancos do ICB, até no dia de nosso, por acaso, noivado.

Agradeço a minha Tia Tereza e primas Fernanda e Manuela. Obrigada pelo amor diário, pelos conselhos e carinho. Mela, obrigada pela estadia e dias inesquecíveis no Canadá (extensivos ao meu tio Francisco).

À minha sogrinha e também mãe Bete. Pelo incentivo no estudo da doença de Crohn e tantas conversas sobre um futuro mais promissor de tratamento para os pacientes com a doença. Você me fez enxergar além dos muros da Universidade.

À Prof. Ana agradeço a confiança e o tempo dispendido em discutir e refletir sobre a ciência, a imunologia e a vida. Você não só me recebeu em seu laboratório de braços abertos como trouxe o entusiasmo ao ensino e a pesquisa cotidianamente para nossas vidas. Não posso deixar de agradecer também a amizade, o sorriso adorável e o carinho. Meu muito obrigada!

Ao Prof. Anderson Miyoshi agradeço o apoio e prontidão imediata em nos ajudar. Obrigada pela gentileza em nos receber e pelas ótimas discussões científicas.

À doce Prof. Denise Carmona, que me deu a mão desde o mestrado, me levou para o Canadá, me ensinou a trabalhar com colite e foi sempre uma mãe. Denise, não tenho como agradecer...obrigada!

Agradeço à Prof. Donna-Marie por me receber em seu laboratório com a maior alegria e pelo aprendizado fundamental proporcionado. Ao Ron e Maithan pela prontidão em ajudar.

Ao prof. Nelson Vaz por nos fazer pensar sempre a Imunologia e a Biologia do viver. Seus cutucões foram sempre muito motivadores! Obrigada!

Tive a sorte de trabalhar na presença de amigos-irmãos. Sem vocês, o doutorado não seria possível! Não foram poucos os dias que me ajudaram, apoiaram, aconselharam e compartilharam comigo. Vivemos dias de ansiedade e tensão com os experimentos, de alegrias e entusiasmo a cada resultado, de discussões à respeito da ciência e de nossas vidas. Agradeço ao Archimedes, meu professor particular de Imunologia, pelos longos dias de experimentos e conversas, pelas discussões que também me fizeram crescer, mas principalmente, pelo enorme carinho comigo. Você me acompanhou passo-a-passo e ficou aqui, até o fim! Obrigada mesmo! Ao Bernardo, pelos planos mirabolantes e idéias sensacionais. Foi impressionante como nos demos certo, mesmo tendo personalidades tão diferentes. Acho que aprendi com você a fazer as coisas com mais perfeccionismo e paciência. Obrigada, meu amigo! Ao meu anjo da guarda chamado Thais agradeço a amizade instantânea e afinidades compartilhadas. Friend, você nem pode imaginar o quanto aprendi com você. Agradeço por me ajudar sempre, sem nem que eu precise pedir. Você me entende como ninguém. Queridos amigos, obrigada pelos anos inesquecíveis de amizade e confiança. Sei que estaremos uns com os outros, sempre! Nem que seja por Skype, né?

À Juliana Lauar, Jubs, que não se importou em não estar dividindo mais o espaço físico de um laboratório comigo e preferiu inserir-se definitivamente em minha vida. Madrinha

querida, adoro sua risada, seu jeito de menina. É muito bom ter tantos planos e ideais de vida em comum com você. Aproveito para agradecer também ao Eric –Zezé pela ajuda sempre que necessária.

Aos queridos alunos de iniciação científica Luisa Lemos, Luiza Hudson, Mauro e Débora. Vocês me ajudaram prontamente, sempre tão dispostos e presentes! Esse trabalho tem a mãozinha de vocês!

Aos companheiros de LIB, Rafael Pires e Rafael Rezende, nossa equipe de HSP! Obrigada pelas discussões e auxílios.

Aos técnicos Ana Cecília, Santiago e Ildinha. Sem vocês, as coisas ficam muito, muito, mas muito mais difíceis. Aninha, agradeço a amizade de tantos anos. Santiago obrigada por fazer nosso lab mais organizado e divertido. Ildinha, agradeço todos os seus cuidados, com os animais e conosco, sem contar o ombro amigo.

Aos colegas do LGCM, em especial a Kátia, Clarissa e Tessália, por auxiliarem nos experimentos e discussões sobre as bactérias lácticas.

Ao Prof. Sérgio Costa, por nos proporcionar trabalhar com os animais nocautes de Toll e também pelas discussões sobre imunidade inata. Ao aluno Leonardo Almeida que nos ajudou com os experimentos.

Aos laboratórios chefiados pelos professores Sergio Costa, Leda, Jacqueline, Denise e Maria Helena pelo empréstimo de reagentes e uso de equipamentos.

Aos professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Para manter a homeostase intestinal, o sistema imune lida tanto com os antígenos patogênicos como também mantém um estado de tolerância a microbiota e aos antígenos alimentares com os quais entra em contato todos os dias. No entanto, a perturbação desse equilíbrio fino pode causar doença inflamatória intestinal (DII) em hospedeiros geneticamente susceptíveis. IL-10 é uma citocina reguladora que desempenha um papel importante na homeostase da mucosa do intestino e isso é ilustrado pelo fato de que camundongos IL-10^{-/-} desenvolvem colite espontânea. Nesse estudo, analisamos as alterações imunológicas que acompanham o desenvolvimento de colite em camundongos IL-10^{-/-} com diferentes idades. Defeitos em elementos reguladores na mucosa do intestino tais como a menor frequência de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram detectados a partir de 6 semanas de idade. Em paralelo, houve um aumento na frequência de células T ativadas no cólon. A progressão da colite culmina com a redução da frequência de linfócitos intraepiteliais TCR $\gamma\delta$ ⁺ e de células T reguladoras CD4⁺LAP⁺ no intestino delgado e grosso. A produção de IL-17 foi maior no cólon de camundongos com 6 semanas de idade, mas camundongos IL-10^{-/-} com 16 semanas apresentaram níveis maiores de IFN- γ no cólon. Os níveis de TGF- β estavam aumentados no jejuno proximal de camundongos com colite. As frequências de células B1 estavam elevadas no peritônio, nas placas de Peyer e na *lamina propria* do intestino. Houveram alterações nos níveis de imunoglobulinas séricas e na produção de IgA secretória que estavam aumentadas. Apesar de todas essas alterações, camundongos IL-10^{-/-} com 16 semanas de idade se tornam tolerantes após a ingestão contínua de antígeno. Posteriormente, testamos duas intervenções terapêuticas nas DIIs. A primeira delas consistiu em substituir as proteínas da dieta por aminoácidos livres ou por peptídeos de cadeia curta. A dieta contendo aminoácidos livres agravou a inflamação intestinal no modelo de colite, com redução de IgA secretória. Da mesma forma, a dieta com hidrolizados proteicos não foi capaz de melhorar a colite aguda. Na segunda intervenção, utilizamos *Lactococcus lactis* geneticamente modificados para secretar Hsp65 na mucosa intestinal. A administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 inibiu significamente a

indução da colite por DSS; abolindo a perda de peso, a diarreia e o sangramento retal. O efeito não pôde ser explicado por alterações na secreção de IgA ou na permeabilidade intestinal. No entanto, a proteção da mucosa foi acompanhada por níveis diminuídos de TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-5 e aumento de IL-10 na mucosa do cólon. Além disso, os camundongos tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 tiveram frequência aumentada de células Treguladoras (T regs) no baço. A razão entre células T efectoras/Tregs foi semelhante àquela encontrada em camundongos controle. Houveram maiores frequências de células dendríticas expressando CD80, CD86, CD40, CD103, TLR2 e TLR4 no baço de camundongos que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65. A capacidade do sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65 em induzir a expressão de TLR2 e TLR4 foi confirmada *in vitro*. Além disso, a administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 não foi capaz de melhorar a colite em camundongos TLR2^{-/-}. Em camundongos IL-10^{-/-}, *L. lactis* produtor de Hsp65 reduziu os sinais da inflamação. A frequência de células Tregs CD4⁺LAP⁺ e os níveis de TGF- β no colon aumentaram após o tratamento. Nosso estudo fornece uma análise detalhada das mudanças que precedem a colite em camundongos IL-10^{-/-} e também sugere que *L. lactis* produtor de Hsp65 pode ser usado como tratamento alternativo para DII.

Palavras chave: IL-10, colite, tolerância oral, dieta, *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65

ABSTRACT

To maintain intestinal homeostasis, the immune system must faithfully respond to antigens from pathogenic microbes while maintaining a state of tolerance to commensal microorganisms and food antigens that confront it every day. However, disruption of this thin balance can cause inflammatory bowel disease (IBD) in genetic susceptible hosts. IL-10 is a regulatory cytokine that plays a major role in the homeostasis of the gut mucosa and this is illustrated by the fact that IL-10-deficient mice develop spontaneous colitis. In this study, IL-10^{-/-} mice were analyzed for immunological changes accompanying the development of colitis at different ages. Defects in regulatory elements at the gut mucosa such as lower frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells could be detected since 6 weeks of age. In parallel, there was an increased frequency of activated T cells in the colon. Colitis progression culminates with the reduction in the frequency of TCRγδ⁺ intraepithelial lymphocytes (IEL) and CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells in the small and large intestines. Production of IL-17 was higher in the colon at 6 weeks of age but at 16 weeks of age levels of IFN-γ increased in the colon. TGF-β was increased in the proximal jejunum of mice with colitis. Frequencies of B1 cells were elevated in peritoneum, Peyer's patches and gut *lamina propria*. There were alterations in serum immunoglobulin levels and secretory IgA production was increased. Despite all these alterations, 16-week-old IL-10-deficient mice could be rendered tolerant by a continuous feeding protocol of antigen administration. We next tested two therapeutic alternatives for the treatment of IBD. The first one consisted of a diet where proteins were replaced by free aminoacids or short chain peptides. The diet containing free aminoacids aggravated gut inflammation in DSS induced colitis model with reduction in secretory IgA. Likewise, the diet with protein hydrolyzates was not able to ameliorate the acute colitis. As a second therapeutic alternative, we used a strain of *Lactococcus lactis* genetically engineered to deliver Hsp65 in the gut mucosa. Oral administration of Hsp65-producing *L. lactis* prevented DSS-induced colitis; abolishing weight loss, diarrhea and fecal bleeding. The effect

could not be explained by alterations in secretory IgA or in intestinal permeability. However, mucosal protection was accompanied by diminished levels of TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-5 and by enhanced IL-10 in colonic mucosa. In addition, mice treated with Hsp65-producing *L. lactis* had increased frequency Treg cells in the spleen. Moreover, the ratio between effector T cells and Tregs was similar to the one found in control health mice. There was enhanced frequency of dendritic cells expressing CD80, CD86, CD40, CD103, TLR2 e TLR4 in the spleen of mice that received Hsp65-producing *L. lactis*. Ability of Hsp supernatant in enhancing expression of TLR2 and TLR4 was confirmed *in vitro*. Moreover, Hsp65-producing *L. lactis* did not improve the ulcerative colitis in TLR2^{-/-}. In IL-10^{-/-} mice, Hsp65-producing *L. lactis* was able to reduce the signs of inflammation. Likewise, frequency of CD4⁺LAP⁺ Tregs and colonic levels of TGF- β increased after treatment with Hsp65-producing *L. lactis*. Our study provides detailed analysis of changes that precede colitis in genetically susceptible mice and it also suggests that Hsp-65 producing *L. lactis* could be one alternative treatment to IBD.

Key words: IL-10, colitis, oral tolerance, diet, Hsp65 producing *Lactococcus lactis*

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
1. Introdução	2
2. Revisão da Literatura.....	9
2.1. Mucosa intestinal	9
2.2. Tolerância imunológica	13
2.3. Tolerância Oral.....	15
2.4. Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs)	17
2.5. Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais	19
2.6. Dieta isenta de antígenos proteicos	22
2.7. Bactérias lácticas na indução de tolerância oral	25
2.8. Proteínas de Choque Térmico e Inflamação	27
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Material e Métodos	34
4.1. Animais experimentais	34
4.2. Desenho experimental	34
4.3. Análise macroscópica	38
4.4. Análise histológica	39
4.5. Dieta experimental com aminoácidos livres.....	40
4.6. Dieta experimental com di-tripeptídeos	42
4.7. Dosagens bioquímicas de albumina e proteínas totais e hemoglobina	43
4.8. <i>Lactococcus lactis</i> : linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico	44
4.9. Indução da expressão gênica em <i>L. lactis</i>	45
4.10. Preparação das suspensões de células	46

4.11. Análise da produção de IL-12p70 por macrófagos obtidos do peritônio	46
4.12. Separação de linfócitos intraepiteliais e de leucócitos da <i>lamina própria</i>	46
4.13. Preparação de extratos de tecidos	47
4.14. Medida da produção de citocinas por ELISA	47
4.15. Determinação de IgM, IgA, IgG séricas e de IgA secretória	48
4.16. Citometria de fluxo	49
4.17. Análise da citometria de fluxo.....	50
4.18. Indução de tolerância oral	51
4.19. Teste de permeabilidade intestinal	51
4.20. Ensaio repórter luciferase.....	52
4.21. Análise estatística	53
5. Resultados- Parte I	55
5.1. Caracterização da colite durante o curso da inflamação intestinal em camundongos IL-10-/-	55
5.2. Morfologia do intestino delgado e perfil dos linfócitos intraepiteliais em camundongos deficientes para IL-10	55
5.3. Camundongos deficientes em IL-10 possuem frequência reduzida de linfócitos T reguladores no intestino	59
5.4. Alterações na secreção de citocinas no intestino delgado e grosso de camundongos IL-10-/-	61
5.5. A frequência de linfócitos B1 aumenta no peritônio e <i>lamina propria</i> de camundongos IL-10-/- com colite	63
5.6. Os níveis de imunoglobulinas séricas se alteram durante o curso da doença em camundongos IL-10-/-.....	63
5.7. Camundongos deficientes em IL-10 com inflamação estabelecida na mucosa podem se tornar tolerantes somente por ingestão voluntária	65
5. Resultados - Parte II	67
5.8. Perfil de células apresentadoras de antígeno em animais alimentados com dieta isenta de proteínas inteiras desde o desmame	67
5.9. Dieta de aminoácidos livres agrava a colite experimental em camundongos	69
5.10. Dieta de aminoácidos livres reduz hemoglobina sérica de camundongos com colite.....	71
5.11. Dieta de aminoácidos livres reduz IgA secretória em camundongos com colite.....	71
5.12. Dieta contendo di-tripeptídeos reduz a perda de peso mas não a inflamação intestinal.....	72

5. Resultados - parte III	74
5.13. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 melhora inflamação aguda induzida por DSS	74
5.14. Efeito de <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 na permeabilidade intestinal e IgA secretória de camundongos com colite	76
5.15. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 altera a secreção de citocinas no cólon de camundongos com colite.....	77
5.16. <i>L. Lactis</i> produtor de Hsp65 aumenta células T reguladoras com 3 dias da indução da colite.....	79
5.17. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 apresenta maior razão de células T reguladora/T efetora.....	81
5.18. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 reduz a expressão de CD44 ⁺ em linfócitos T nos linfonodos de camundongos com colite.....	82
5.19. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 aumenta a frequência de células dendríticas positivas para CD80, CD86, CD40 e CD103 no baço de camundongos após indução de colite	84
5.20. Sobrenadante de <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 ativa TLR2 e TLR4 <i>in vitro</i>	87
5.21. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 aumenta a expressão de TLR2 e de TLR4 <i>in vivo</i>	88
5.22. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 não melhora colite induzida por DSS em camundongos TLR2-/-	90
5.23. <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65 melhora índice macroscópico da colite espontânea em camundongo deficientes em IL-10	92
5.24. Perfil de citocinas e células T em camundongos deficientes em IL-10 tratados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65	94
6. Discussão	97
7. Conclusões.....	123
8. Referências Bibliográficas	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Balanço entre células T efetoras x células T reguladoras.	7
Figura 2: Ambiente imunológico intestinal.....	13
Figura 3: Representação do vetores de expressão pXylT:SEC:hsp65.....	45
Figura 4: Estratégia de análise de citometria de fluxo.....	51
Figura 5: Histopatologia das alterações intestinais em camundongos deficientes em IL-10.	57
Figura 6: Índice inflamatório e perfil de linfócitos intraepiteliais.....	58
Figura 7: Perfil de linfócitos T na <i>lamina propria</i> do intestino delgado e grosso de camundongos IL-10 ^{-/-} durante o curso da inflamação intestinal.	60
Figura 8: Perfil de citocinas na mucosa intestinal durante o curso da inflamação intestinal espontânea.....	62
Figura 9: Células B e isotipo de imunoglobulinas durante o desenvolvimento da enterocolite.....	64
Figura 10: IgA secretória e tolerância oral.	66
Figura 11: Produção de IL-12p70 em macrófagos de camundongos alimentados com dieta de aminoácidos.....	68
Figura 12: Índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados com dieta contendo aminoácidos livres.....	70
Figura 13: sIgA de camundongos com colite tratados com dieta contendo aminoácidos livres.....	72
Figura 14: Índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados com dieta contendo di-tripeptídeos.....	73
Figura 15: Índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados previamente com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.	75
Figura 16: Citocinas no extrato do cólon de camundongos com colite tratados previamente com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	78
Figura 17: Aparecimento de células T durante o curso da enterocolite em animais tratados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.	80
Figura 18: Razão Treguladora/Tefetora no baço de animais tratados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	81
Figura 19: Expressão de CD44 em linfócitos T CD4 ⁺ dos linfonodos drenantes da mucosa.....	83
Figura 20: Histogramas representativos da frequência e expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas de camundongos com colite.....	85
Figura 21: Histogramas representativos da frequência e expressão de CD40 e CD103 em células dendríticas de camundongos com colite.....	86

Figura 22: Ativação <i>in vitro</i> de TLR2 e TLR4 pelo sobrenadante de <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	87
Figura 23: Histogramas representativos da frequência e expressão de TLR2 e TLR4 em células dendríticas de camundongos com colite.	89
Figura 24: índices macroscópicos e histológicos de camundongos TLR4 ^{-/-} e TLR2 ^{-/-} com colite tratados previamente com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65. ..	91
Figura 25: índices macroscópico e histológico de camundongos IL-10 ^{-/-} tratados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	93
Figura 26: Perfil de citocinas e células T em camundongos deficientes em IL-10 tratados com <i>L. lactis</i> produtor de Hsp65.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: índice macroscópico da colite aguda induzida por DSS	38
Tabela 2: índice macroscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos deficientes para IL-10	39
Tabela 3: índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos	40
Tabela 4: Composição centesimal da dieta AIN-93G para roedores	41
Tabela 5: Composição de aminoácidos da molécula de Caseína	42
Tabela 6: Linhagens bacterianas	44
Tabela 7: Anticorpos utilizados nos experimentos	49
Tabela 8: Dosagens de albumina, proteínas séricas totais e hemoglobina em camundongos tratados com dieta isenta de proteínas inteiras	71
Tabela 9: IgA secretória e permeabilidade intestinal	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- µg- micrograma
µL- microlitro
µm- micrometro
Aa- aminoácido
AIN93G- *American Institute of Nutrition 93-Growth*
ALDH- retinal desidrogenase
ANOVA- análise de variância
APC- célula apresentadora de antígeno
BCR- receptor de células B
BL- bactéria láctica
BSA- albumina bovina sérica
CARD- domínio de recrutamento e ativação de caspase
Cas- caseína
CD- *cluster of differentiation*
cm- centímetros
Cy- *CyChrome*
DC- célula dendrítica
DII- Doença inflamatória intestinal
DSS- *dextran sulfate sodium*
DTPA- *diethylenetriamine pentaacetate*
DTT- dihidrotreitol
EAE- encefalomielite alérgica experimental
EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA- ensaio de absorção imunoenzimático
EPO- peroxidase eosinofílica
FACs- *fluorescence activated cell sorting*
FITC- isotiocianato de fluoresceína
Foxp3- Fator de transcrição *forkhead box p3*
G α i2 – subunidade α i2 da proteína G
GALT- *gut associated lymphoid tissue*
GRAS- *Generally recognized as safe*
H₂O- água

H₂O₂- peróxido de hidrogênio
HBSS- *Hank's balanced salt solution*
H&E- hematoxilina & eosina
HEPES- *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
Hsp- *heat shock protein* - proteína de choque térmico
ICAM-1 – molécula de adesão intercelular
IEL- linfócito intraepitelial
IFN- interferon
Ig- imunoglobulina
IL- interleucina
IMF - intensidade média de fluorescência
i.p. Intraperitoneal
Kiu- *Kallicrein inactivator units*
LAL- Lisado do Amebócito do *Limulus*
LAP- *latency associated peptide*
LM- linfonodo mesentérico
LP- *lamina propria*
LPS- lipopolissacarídeo
MBP- *myelin basic protein*
MBq- megaBecquerel
MDP- *Recognizes muramyl dipeptide*
MHC- complexo principal de histocompatibilidade
mm- milímetro
N- normal
NaN₃- azida de sódio
NF-κB- fator nuclear Kappa B
NOD- *nucleotide-binding oligomerization domain*
OPD- Ortofenileno-diamino
Ova- ovalbumina
PBS- tampão salina fosfato
PE- ficoeritrina
pH- potencial hidrogeniônico
PKC- proteína quinase C
PMSF- *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PP- Placa de Peyer
PRR- receptor de reconhecimento padrão
RAG- *recombination activating genes*
ROS- *reative oxigen species*
rpm- rotações por minuto
SCID- imunodeficiência combinada severa
slgA- imunoglobulina A secretória
SPF- *specific pathogen free*
Tc- tecnécio
TCR- receptor de células T
TGF- β -Fator- β de transformação do crescimento
Th- T *helper*
TLR- receptor do tipo *Toll*
TNBS- ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
TNF α - fator de necrose tumoral alfa
Treg- célula T reguladora

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

As doenças inflamatórias do intestino (DII) incluem a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn. Essas são doenças crônicas, de etiologia desconhecida. Enquanto na retocolite a inflamação restringe-se ao cólon, na doença de Crohn qualquer porção do trato gastrointestinal pode ser afetada. Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no desencadeamento de ambas as doenças (Strober *et al.*, 2007).

As doenças inflamatórias intestinais constituem um problema médico em todo o mundo como também no Brasil. Atualmente, não há cura para as DIIs. Além disso, estudos epidemiológicos demonstraram o aumento de sua incidência nos últimos anos que não pode ser atribuída apenas ao aprimoramento nos meios de diagnóstico. Os sintomas variam de indivíduo para indivíduo, mas é comum haver dor abdominal, diarreia, perda de peso e febre. O tratamento para a doença é restrito à utilização de drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras (Gaburri *et al.*, 1998; Lakatos, 2006; Lakatos e Lakatos, 2007; Gissera e Aladren, 2008).

Nas doenças inflamatórias intestinais, ocorre um desequilíbrio de interações entre a microbiota intestinal e o sistema imune. Portanto, o estado fisiológico de tolerância imunológica à microbiota é perturbado pela presença de uma população de linfócitos T reativos a essa microbiota comensal. É possível que exista também uma reatividade imunológica alterada às proteínas da dieta. A atividade defeituosa das células T reguladoras também tem sido descrita como importante na patogênese da doença. As células T reguladoras estão normalmente presentes no intestino e são importantes na homeostase da mucosa. Experimentalmente, vários modelos animais de doença inflamatória intestinal evidenciaram o importante papel de defeitos do sistema imune, particularmente aqueles que afetam os genes ligados à atividade das células T, na patogênese da doença. Dentre os modelos murinos, destacam-se os camundongos em que os genes codificadores para IL-2, IL-10, e as cadeias α ou β do receptor de células T (TCR) foram depletados (Macdonald, 1995; Sartor, 1997; Strober *et al.*, 2007).

A IL-10 é uma citocina imunossupressiva que atua diretamente sobre as células apresentadoras de antígeno (APCs) inibindo a produção de IL-12 e regulando negativamente a expressão do MHC de classe II bem como das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (Skeen *et al.*, 1996). A importância dessa citocina na regulação da atividade imunológica da mucosa intestinal foi demonstrada em camundongos deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}) que desenvolvem uma inflamação espontânea na mucosa (Kuhn *et al.*, 1993).

Em condições convencionais, camundongos IL-10^{-/-} apresentam uma enterocolite crônica com 2-3 meses de idade, enquanto que nenhuma evidência da doença é vista em neonatos. Perda de peso, esplenomegalia e uma anemia leve ou moderada acompanham a doença (Kuhn *et al.*, 1993). No entanto, os animais mantidos sob condições isentas de patógenos específicos (SPF) desenvolvem apenas uma colite leve enquanto que camundongos mantidos em condições isentas de germe (*germ free*) não a desenvolvem (Sellon *et al.*, 1998). Dessa maneira, a microbiota convencional possui significativo papel no desencadeamento da doença. A quebra de tolerância imunológica a microbiota já foi, inclusive, demonstrada em humanos com doenças inflamatórias crônicas do intestino (Duchmann *et al.*, 1995). Diante de tais características do modelo, decidimos estudar primeiramente, as alterações imunológicas e inflamatórias que acompanham a gravidade da doença. A maioria dos animais geneticamente deficientes utilizados como modelo experimental nascem sem sinais da colite, sendo esta uma oportunidade para se elucidar as mudanças imunológicas que precedem a doença (Kundig *et al.*, 1993; Ohman *et al.*, 2000). Essa caracterização é fundamental uma vez que o entendimento da doença nos permite encontrar novas oportunidades terapêuticas e momentos de intervenção no quadro da doença.

Em um segundo momento, propusemos duas diferentes estratégias de imuno-modulação como intervenções terapêuticas nas doenças inflamatórias intestinais. Ambas as estratégias propostas no trabalho envolvem a manipulação de elementos reguladores na mucosa. A primeira delas consistiu em modificações de componentes antigênicos da dieta enquanto que a segunda estratégia envolveu a administração oral de um

microorganismo geneticamente modificado secretor de uma proteína com potencial tolerogênico, a proteína de choque térmico 65 (Hsp65).

Atualmente, o tratamento para pacientes com DII consiste no uso de anti-inflamatórios e imunossuppressores como sulfasalazina, mesalamina, corticóides, azatioprina, mercaptopurina e, mais recentemente, anticorpos monoclonais inibidores de TNF- α (infliximab). Os medicamentos utilizados no momento apresentam diversos efeitos colaterais e alto custo (Souza *et al.*, 2002). As recomendações dietéticas para os pacientes com DII se baseiam na retirada de alimentos não tolerados, como o caso do leite, ou na tentativa de repor deficiências ocasionadas pela má absorção observada na doença (Smith, 2008). Por outro lado, alguns estudos clínicos demonstraram que a administração, por via enteral ou parenteral, de dietas elementares (compostas por aminoácidos ou oligopeptídeos, açúcares simples ou polímeros de glicose, quantidades mínimas de lipídeos, minerais e vitaminas) têm um efeito benéfico nas DIIs (O'sullivan e O'morain, 2001), com melhora significativa na atividade inflamatória da doença. Conforme mencionado, na DII ocorre uma reatividade exagerada de linfócitos T a microbiota e proteínas dietéticas (Strober *et al.*, 2007). Assim, a redução da estimulação antigênica pela retirada das proteínas da dieta pode ser crucial para evitar os eventos inflamatórios locais.

Nossa segunda estratégia alternativa de imuno-modulação consistiu na indução de tolerância oral à proteína de choque térmico 65 (Hsp65). Nosso grupo de pesquisa vem estudando, há anos, esse fenômeno imunológico (Faria e Weiner, 1999; Faria *et al.*, 2003; Faria e Weiner, 2005; 2006). A tolerância oral é definida como uma supressão da reatividade imunológica ao antígeno que tenha sido contatado primeiramente pela via oral (Vaz *et al.*, 1987). A administração oral de antígenos é capaz de gerar tolerância imunológica e suprimir respostas imunes pró-inflamatórias pela indução de células T antígeno-específicas secretoras de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- β (Faria e Weiner, 2005). A tolerância oral tem sido utilizada com sucesso em vários modelos experimentais de doenças autoimunes tais como encefalomielite alérgica experimental (EAE), diabetes e artrite, bem como em outras condições inflamatórias tais como

aterosclerose, colite, alergias e na transplantação (Faria e Weiner, 2006). Associamos, juntamente com esse fenômeno imunológico, a administração oral de bactérias lácticas com a finalidade de potencializar o efeito terapêutico e criar um mecanismo natural de liberação de antígenos diretamente no intestino.

A designação “bactérias lácticas (BL) se aplica a um grupo de bactérias que tem o ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de carboidratos. Essas bactérias são utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos. Diversas espécies foram consideradas seguras e adquiriram o *status* de GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Algumas dessas bactérias são consideradas probióticas por terem efeitos benéficos na saúde. Recentemente, as BL vêm sendo utilizadas por vários laboratórios uma vez que são facilmente submetidas a modificações genéticas (De Vrese *et al.*, 2001; Carr *et al.*, 2002). Essas bactérias geneticamente modificadas funcionam como veículo para a liberação de antígenos exógenos na superfície de mucosas. Durante o trânsito intestinal, elas fazem a liberação lenta da proteína heteróloga (de interesse) (Seegers, 2002; Pontes *et al.*, 2011). No caso das DII, essa estratégia tem interesse especial, uma vez que a liberação da proteína se dá diretamente no local inflamado: a mucosa intestinal. Com base nisto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma bactéria geneticamente modificada (*Lactococcus lactis*) para produzir e secretar a proteína de choque térmico 65 (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*.

As Hsps constituem um grupo de proteínas evolutivamente conservadas entre diferentes espécies, desde bactérias até mamíferos. Baseado em seu peso molecular, as Hsps são divididas em famílias que incluem Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e a família das Hsps pequenas. Essas proteínas estão envolvidas na manutenção do formato funcional de outras proteínas celulares, sendo portanto, chaperonas (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988). Por definição, a expressão de Hsp é elevada em situações de estresse, como em condições de elevação da temperatura, hipóxia, irradiação, infecção e exposição a agentes químicos tóxicos. As Hsps podem ser reconhecidas por receptores de antígeno (TCR) de células T e também pelo BCR de células B. Além disso, a Hsp60 é

também um ligante para receptores do tipo *Toll* (TLR) em várias células do sistema imune. Portanto as Hsps são pleiotrópicas em suas interações com o sistema imune (Van Eden *et al.*, 1998; Van Eden *et al.*, 2005).

O fato de as Hsps apresentarem sua expressão aumentada em tecidos inflamados tornam essas proteínas alvos potenciais para estratégias terapêuticas; especialmente no caso da doença em que o auto-antígeno é desconhecido ou onde ocorre reatividade a múltiplos antígenos no tecido alvo, como é o caso das DII. Estudos anteriores utilizando a Hsp65 em protocolos de indução de imuno-modulação já foram relatados em modelos de aterosclerose, artrite e diabetes (Maron *et al.*, 2002; Van Eden *et al.*, 2005; Van Eden *et al.*, 2007).

Nesse estudo, associamos ao fenômeno imunológico da tolerância oral, a utilização de bactérias lácticas que realizam a liberação de proteínas exógenas diretamente na mucosa e o efeito imuno-modulador da Hsp, proteína única do ponto de vista imunológico (Cohen e Young, 1991).

Assim, nosso estudo se baseia fundamentalmente no envolvimento da tolerância oral à microbiota e proteínas da dieta nas doenças inflamatórias intestinais. A caracterização morfológica e imunológica de um dos principais modelos de colite utilizados na literatura, a de camundongos deficientes em IL-10^{-/-}, nos permite elucidar as alterações que precedem e acompanham o desenvolvimento da doença. Isso pode nos proporcionar um maior entendimento da patogênese da doença e o conhecimento dos momentos de intervenção terapêutica na inflamação crônica. Além disso, em um segundo momento, desenvolvemos duas estratégias alternativas de imuno-modulação baseadas na manipulação dos elementos reguladores da mucosa. Como as DII são o resultado da excessiva função de células T efectoras e/ou de uma função deficiente das células T reguladoras (figura 1)(Bouma e Strober, 2003), nossas estratégias de intervenção visam a modificação do excesso de reatividade das células T a antígenos naturais pela retirada de proteínas inteiras da dieta como também pelo aumento da capacidade reguladora do sistema imune pela indução de tolerância oral a uma proteína imunodominante. Com as duas terapias em questão, pretendemos retornar o tônus do sistema imune para o estado de homeostase.

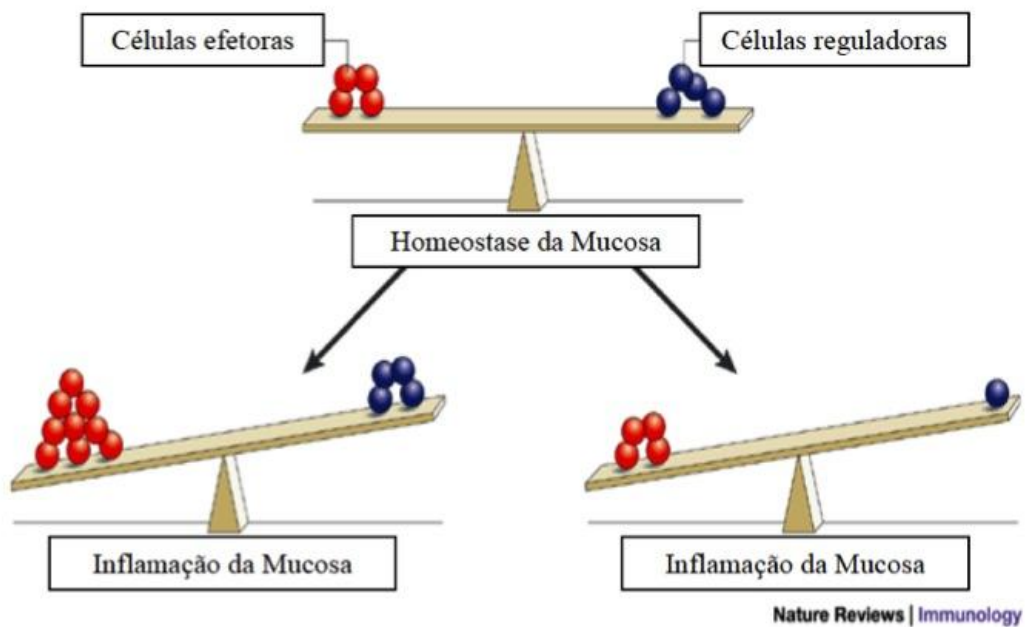


Figura 1: Balanço entre células T efetoras x células T reguladoras.

Na primeira balança: o estado de homeostase na mucosa intestinal é mantido pelo balanço entre células T efetoras e reguladoras. Nas doenças inflamatórias intestinais, ocorre tanto o aumento de células T efetoras (balança à esquerda) como também a redução de células T reguladoras (à esquerda). A quebra do balanço entre células reguladoras e efetoras contribui para o desencadeamento das DIIs. Adaptado de Bouma e Strober (2003).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da Literatura

2.1. Mucosa intestinal

O trato gastrointestinal é o maior sítio de integração do organismo com o meio externo. A mucosa do intestino delgado humano é estimada em 300 m² (Moog, 1981). Essa extensa superfície entra em contato com aproximadamente 30 quilos de proteínas alimentares por ano. Já a porção distal do intestino humano é habitado por mais de 100 trilhões de bactérias comensais (Gill *et al.*, 2006).

As bactérias comensais do trato gastrointestinal promovem diversos benefícios ao hospedeiro no qual habitam pois fornecem nutrientes essenciais, metabolizam compostos indigeríveis, impedem a colonização por patógenos oportunistas e contribuem para o desenvolvimento da arquitetura da mucosa intestinal (Baumgart e Carding, 2007; Round e Mazmanian, 2009). Esta relação simbiótica em humanos é estabelecida durante os primeiros 2-3 anos de vida (Macdonald, 1995). A partir do nascimento, a colonização bacteriana no trato intestinal é drasticamente aumentada, devido aos contatos do bebê com o ambiente externo e com a microbiota da mãe (Cebra, 1999). Em animais isentos de germes nos quais a microbiota foi introduzida (convencionalizados), o aparecimento de plasmócitos secretores de IgA na mucosa é diretamente proporcional à colonização bacteriana (Crabbe *et al.*, 1968).

Conforme mencionado, as proteínas da dieta são outra fonte de estimulação antigênica cotidiana na mucosa. Diariamente, são absorvidas de 130 a 190 gramas de proteínas (Brandtzaeg, 1998). As proteínas são assimiladas de modo eficiente pelas células epiteliais intestinais após a ação de enzimas gástricas, pancreáticas, além de outras proteases. A ação dessas enzimas resulta na redução da maioria das proteínas da dieta a uma mistura de aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos que podem ser absorvidos pelas células epiteliais intestinais (Erickson e Kim, 1990). No entanto, as proteínas podem escapar ou resistir à digestão e passar para o lúmen

intestinal em forma intacta. Os produtos da proteólise bem como as proteínas intactas que escapam da digestão, podem ser captadas por distintas células imunes e induzir um estado de tolerância imunológica (Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2006).

Os dois principais eventos imunológicos que ocorrem na mucosa intestinal em condições fisiológicas são a indução de tolerância imunológica às bactérias comensais e às proteínas da dieta, e a produção de IgA secretória (sIgA)(Faria e Weiner, 2006). Várias estruturas e compartimentos na mucosa intestinal estão envolvidos na manutenção desse ambiente tolerogênico (Uhlig e Powrie, 2003). O primeiro contato do antígeno que entra pela via oral se dá no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT). Esse é composto pelos nódulos linfáticos (placas de Peyer- PP), pelas células epiteliais do vilo intestinal, linfócitos intraepiteliais (IEL) e por outros linfócitos distribuídos na *lamina propria* (LP) intestinal (figura 2) (Bienenstock e Befus, 1980; Mowat, 2003; Izcue *et al.*, 2009).

Os sítios de indução da resposta imune na mucosa são as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos (LMs). As placas de Peyer são agregados linfóides macroscópicos que se localizam ao longo de todo intestino delgado. As PP são compostas por folículos de células B intercaladas com áreas de células T. Os linfonodos mesentéricos são os maiores linfonodos do corpo e servem como um cruzamento entre as vias periférica e de recirculação da mucosa. Para induzir uma resposta imune na mucosa, o antígeno deve ter acesso às células apresentadoras de antígeno (APC). A absorção de antígenos ocorre através de uma variedade de mecanismos, incluindo a passagem por células M presentes nas PP, a absorção por células epiteliais colunares e a captação direta por células dendríticas (DCs). Essas células podem estender seus dendritos (prolongamentos) através do epitélio e captam o antígeno no lúmen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Ainda existe uma via alternativa, que é a entrada do antígeno diretamente pelas células do epitélio (Mowat, 2003).

Os linfócitos intraepiteliais (IELs), como o próprio nome diz, localizam-se entre as células do epitélio intestinal e estão também envolvidas na regulação da homeostase da mucosa. Em camundongos, existe um IEL para cada 10 vilosidades intestinais. Diferentemente da *lamina propria* que contém

em sua maioria linfócitos T CD4⁺, os IEL são predominantemente células T CD8⁺. Essas células podem expressar o TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ (Lambolez *et al.*, 2007). A depleção de células T $\gamma\delta$ prejudica a indução de tolerância oral (Mengel *et al.*, 1995; Ke *et al.*, 1997).

Além dos IEL, típicos da mucosa intestinal, diferentes subpopulações de DCs estão presentes nas PP, LMs e ao longo da mucosa do intestino delgado e da *lamina propria* do colón (Manicassamy e Pulendran, 2011). Por exemplo, as DCs ativadas na PP produzem altos níveis de IL-10 quando comparado às DCs do baço (Iwasaki e Kelsall, 1999). Além disso, células dendríticas do LM e LP são capazes de induzir a expressão de Foxp3 (*forkhead box protein 3*), fator de transcrição encontrado em células T reguladoras. No entanto, essa capacidade não é comum para todas as DCs, uma vez que as CD103⁻ não promovem a expressão de Foxp3, mesmo na presença de TGF- β . Dessa forma, as células dendríticas que expressam CD103⁺ apresentam maior capacidade na conversão de células T CD4⁺ em células reguladoras na periferia. Além disso, essas células expressam altos níveis da enzima retinal desidrogenase (ALDH), responsável por converter o retinol oxidado em ácido retinóico (Coombes *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007; Weiner *et al.*, 2011). O ácido retinóico (forma ativa da vitamina A) tem papel fundamental em aumentar a migração de células T para a mucosa, em direcionar a geração de células T reguladoras e em promover a troca de isotipo para IgA secretória (sIgA) (Iwata *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2006).

A IgA secretória é a imunoglobulina mais abundante na mucosa do trato gastrointestinal. Ela é produzida fisiologicamente em resposta às bactérias comensais e proteínas da dieta que penetram no enterócito. Após a entrada do antígeno, as DCs induzem a troca de isotipo para IgA nos linfonodos mesentéricos. A sIgA produzida pelos plasmócitos na *lamina propria* contribui para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que estas reduzem a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal. Diversas citocinas incluindo TGF- β , IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6 são necessárias para promover a troca de classe e a maturação para sIgA (Brandtzaeg, 1998; Suzuki e Fagarasan, 2009).

A citocina TGF- β é encontrada em grandes quantidades na mucosa do

intestino normal. Além de ser importante mediador na troca de isotipo para IgA também atua na diferenciação de células epiteliais (Li e Flavell, 2008). Já a IL-10, produzida por uma variedade de células incluindo o epitélio intestinal, macrófagos ativados, células dendríticas e linfócitos (Saraiva e O'garra, 2010), apresenta importância fundamental na manutenção da homeostase de mucosa, uma vez que os camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem enterocolite espontânea (Kuhn *et al.*, 1993).

antígenos estranhos sobreviveriam. O encontro de antígenos na periferia com essas células, induziria a expansão clonal e a geração das respostas imunes. Nesse ponto de vista, a tolerância seria a simples ausência da resposta imune, uma vez que os clones de células que reconhecem epítopos próprios seriam eliminados (Vaz *et al.*, 2006).

No entanto, imunoglobulinas e células imunes auto-reativas a antígenos do cérebro, albumina sérica, colágeno dentre outros antígenos, estão presentes em indivíduos saudáveis (Pereira *et al.*, 1985; Avrameas, 1991). Uma vez que essas células e imunoglobulinas auto-reativas são encontradas sem que isto represente a emergência de doenças auto-imunes, a auto-reatividade parece ser uma característica intrínseca do sistema imune. Dessa maneira, é possível que exista uma diferença fundamental entre auto-imunidade fisiológica e patológica (Cohen e Young, 1991).

Segundo a teoria do *homunculus* imunológico proposta por Irwin Cohen em 1991, a tolerância aos auto-componentes seria dirigida a grupos de antígenos imunologicamente dominantes em relação a outros. A reatividade a esses antígenos dominantes organizaria o repertório de linfócitos em redes celulares que incluiriam tanto linfócitos reativos aos auto-componentes, quanto linfócitos com reatividade anti-idiotípica (Cohen e Young, 1991). A idéia de organização do sistema imune em rede foi inicialmente sugerida por Jerne, em 1974. Na Teoria da Rede Idiotípica foi proposto que os anticorpos, por serem proteínas muito variáveis entre si, são capazes de reagir uns com os outros. Cohen extrapolou a idéia de rede de Jerne ao propor que a rede hierarquizada de grupos de linfócitos reativos a antígenos próprios dominantes assim como os linfócitos anti-idiotípicos pertencentes àquela reatividade seria a representação imunológica do próprio corpo. Essa representação foi então denominada *homunculus* imunológico em analogia às representações sensorial e motora do corpo organizadas no sistema nervoso central por uma série de redes neurais. Portanto, enquanto na teoria de Burnet, a deleção de linfócitos auto-reativos é necessária pois a reatividade ao *self* gera doenças autoimunes, na teoria de Cohen o reconhecimento do próprio é fundamental para manter a homeostase do sistema imune.

2.3. Tolerância Oral

A tolerância oral é um evento análogo à tolerância aos auto-componentes mas ocorrendo no intestino e dirigida a antígenos externos. Conceitualmente, a tolerância oral se refere a uma supressão ativa da reatividade imunológica ao antígeno que tenha sido contatado primeiramente pela via oral (Vaz *et al.*, 1977). Ela é um evento imunológico único uma vez que este processo envolve a assimilação contínua de antígenos exógenos. Assim, as proteínas da dieta e a microbiota comensal que entram em contato diário com a mucosa, representam a fronteira entre o externo e os componentes próprios. Então, a tolerância oral é uma forma de tolerância periférica que envolve o reconhecimento dos antígenos externos que acessam o corpo pela via oral como componentes internos, que por sua vez, tornam-se parte do próprio (Faria e Weiner, 2005; 2006).

Três mecanismos principais foram descritos para explicar o fenômeno da tolerância oral: anergia, deleção clonal e regulação ativa (células T reguladoras). Foi sugerido por alguns autores que altas doses do antígeno administrado por via oral induzem anergia ou deleção enquanto que baixas doses favoreceriam a indução de células T reguladoras (Tregs) (Weiner *et al.*, 1994). No entanto, esses mecanismos não são excludentes e podem se sobrepor. Além disso, é importante ressaltar que a administração de baixas doses de antígeno assemelha-se ao que ocorre naturalmente, já que ingerimos os alimentos em pequenas quantidades ao longo do dia (Faria e Weiner, 2006).

As células T reguladoras são geradas após a apresentação do antígeno pelas APCs da mucosa. A apresentação de antígenos na mucosa induz as células T antígeno-específicas a secretarem, preferencialmente, as citocinas TGF- β , IL-10 e IL-4. Essas células reguladoras migram para os órgãos linfoides onde elas inibem as respostas inflamatórias pela secreção das citocinas anti-inflamatórias mencionadas (Faria e Weiner, 1999; 2005).

As células T reguladoras foram primeiramente descritas em 1970 e constituíam células T CD8⁺ que eram denominadas células supressoras. Em meados da década de 90, dois grupos de pesquisa (Sakaguchi e Powrie) redescobriram as células reguladoras. O grupo de Sakaguchi mostrou que

camundongos timectomizados no período neonatal apresentavam doenças autoimunes em múltiplos órgãos como resultado da remoção de uma subpopulação de linfócitos T tímicos. Após transferência adotiva, essas células eram capazes de restaurar a função imuno-reguladora em camundongos doentes (Sakaguchi *et al.*, 1985). Posteriormente, essas células foram identificadas como sendo CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi *et al.*, 1995). CD25 é a cadeia alfa do receptor de IL-2, sendo fundamental na função reguladora dessas células (Sakaguchi *et al.*, 2008). Paralelamente, Powrie e colaboradores mostraram que a depleção de uma subpopulação particular de células T causava perda da tolerância ao próprio, causando uma variedade de doenças autoimunes. Essas células foram descritas como sendo CD45RB^{low} e a depleção delas levava ao desenvolvimento da colite. Somente depois, o grupo mostrou que as células reguladoras entre as CD45RB^{low} eram também CD25⁺. Essas células são diferentes daquelas descritas por Sakaguchi porque são induzidas na periferia (intestino) e medeiam sua ação pela secreção de citocinas (Powrie e Mason, 1990; Powrie *et al.*, 1993).

Além do receptor de IL-2, as células reguladoras também expressam outras moléculas tais como Foxp3. O Foxp3 é um fator de transcrição nuclear envolvido no desenvolvimento e função dessas células. As células reguladoras não proliferam, apresentam atividade supressora e medeiam sua função reguladora por contato célula-célula e/ou pela produção de citocinas, conforme mencionado anteriormente (Sakaguchi e Powrie, 2007).

Além das células reguladoras de origem tímica, outras células com potencial regulador (Th3 e Tr1) denominadas células reguladoras adaptativas já foram descritas. Essas células medeiam a supressão por meio da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , sendo importantes na tolerância periférica. A relação entre as células reguladoras tímicas e induzidas na periferia deve ainda ser esclarecida (Weiner *et al.*, 2011). No entanto, Mucida e colaboradores demonstraram que a tolerância oral pode ser induzida mesmo na ausência de células T reguladoras naturais, de origem tímica. Nesse estudo, os autores identificaram uma célula com o fenótipo CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} semelhante às descritas pela Fiona Powrie

no modelo de colite, também positiva para Foxp3, que foi induzida após exposição oral ao antígeno (Mucida *et al.*, 2005).

As células Th3 foram assim denominadas após serem identificadas como células supressoras em um estudo de tolerância oral. Nesse estudo foi utilizado o antígeno da mielina em modelo de encefalomielite experimental autoimune (EAE). Essas células atuam por meio da produção de TGF- β (Miller *et al.*, 1992). Além disso, uma importante característica dessas células induzidas na mucosa é a expressão de LAP (*latency associated peptide*). LAP é um propeptídeo que está não covalentemente associado ao domínio amino-terminal do TGF- β , formando um complexo de TGF-latente (Weiner *et al.*, 2011). Quando essa forma precursora é liberada da célula, ela é clivada por enzimas como a trombospondina-1 e o TGF- β ativo é liberado. Uma população de linfócitos T com o fenótipo CD4⁺CD25⁻LAP⁺ foi identificada no baço de camundongos com colite. Essa população celular era parte da população de células supressoras CD4⁺CD45RB^{low} e suprimia as células CD4⁺CD45RB^{high} por meio de TGF- β (Oida *et al.*, 2003). Posteriormente, células CD4⁺CD25⁺LAP⁺ foram também identificadas em camundongos, bem como linfócitos CD8⁺LAP⁺. Além disso, células Tregs naturais que expressam LAP já foram encontradas tanto em camundongo como também em humanos (Nakamura *et al.*, 2004).

2.4. Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs)

Diante dos mecanismos imuno-reguladores presentes na mucosa intestinal tais como as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , o ácido retinóico e as células dendríticas e T reguladoras tolerogênicas (Faria e Weiner, 2006); apenas alguns indivíduos desenvolvem doença inflamatória intestinal. As DIIs afetam 1 a 2 indivíduos para cada 1000 nos países ocidentais, representando um problema de saúde pública devido a ausência de um tratamento curativo. Apesar das mudanças significativas na epidemiologia das DIIs nas últimas décadas, a incidência da doença continua a aumentar ou a se estabilizar na maioria dos países desenvolvidos, enquanto que esta tem crescido em regiões onde ela era menos comum.

Ainda não temos dados epidemiológicos concretos da incidência da doença no Brasil (Lakatos, 2006; Lakatos e Lakatos, 2007; Gissera e Aladren, 2008).

As doenças inflamatórias intestinais incluem a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn, que apresentam muitas similaridades, mas diferem entre si em vários aspectos clínicos e patológicos (Fiocchi, 1998). A retocolite ulcerativa restringe-se ao cólon enquanto que, na doença de Crohn, qualquer porção do trato gastrointestinal pode ser afetado, sendo o íleo terminal, o mais acometido. A inflamação na doença de Crohn é transmural e descontínua. Em contraste, a retocolite ulcerativa afeta mais superficialmente as camadas mucosa e submucosa da parede intestinal (Cho, 2008).

Na doença de Crohn, os sintomas gastrointestinais dependem da área afetada e da gravidade e extensão da inflamação. Pacientes com acometimento do íleo vivenciam dores abdominais, enquanto pacientes com acometimento gastroduodenal, apresentam saciedade precoce, náusea, dor epigástrica, vômitos e disfagia. Também pode ocorrer presença de sangue, muco e pus nas fezes diarréicas (Hendrickson *et al.*, 2002). A DII alterna períodos sem qualquer sintoma com exacerbações de início e duração imprevisíveis. Em 60 a 70% dos casos ocorre ausência completa dos sintomas entre os ataques.

O tratamento medicamentoso para a colite ulcerativa e a doença de Crohn inclui sulfasalazina via oral, utilizada principalmente em pacientes com sintomas médios, medicação intravenosa a base de corticóides para pacientes hospitalizados com câimbras abdominais graves, intensa diarreia sanguinolenta, anemia e hipoalbumemia, agentes antiespasmódicos, e terapia imunossupressora, composta por ciclosporina, tacrolimus e azatioprina (Lakatos e Lakatos, 2007).

É importante ressaltar que o tratamento clínico da doença de Crohn não é curativo. Esse é dispendioso, sujeito a efeitos colaterais importantes além de limitar a qualidade de vida do paciente (Barkin e Lewis, 1992). Aproximadamente 25 a 40% dos pacientes com a forma grave dessas doenças, são submetidos à cirurgia para retirada da porção intestinal gravemente inflamada.

Apesar da etiologia desconhecida das DIIs, é amplamente aceito que a doença é o resultado de uma inflamação inapropriada contínua contra as

bactérias comensais em indivíduos geneticamente susceptíveis (Sartor, 1997). Diversos genes e loci gênicos que contribuem para a susceptibilidade para DII já foram identificados. A análise desses genes estão relacionados a diversas vias cruciais para a homeostase intestinal incluindo a função de barreira intestinal, a renovação do epitélio, a defesa anti-microbiana, regulação da imunidade inata e adaptativa, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), autofagia, estresse do retículo endoplasmático e vias metabólicas associadas com a homeostase celular (Khor *et al.*, 2011).

A primeira mutação gênica relacionada diretamente com a doença de Crohn foi o gene CARD15, o qual codifica a proteína NOD-2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*). A proteína NOD-2 reconhece um produto bacteriano específico denominado MDP (*muramyl dipeptide*). A estimulação com MBP induz autofagia, que controla a replicação bacteriana e a apresentação de antígenos, e age nas células dendríticas em conjunto com os ligantes de receptores do tipo *Toll* (TLR) para promover a diferenciação de células Th17. NOD-2 parece também contribuir para a tolerância imunológica (Shaw *et al.*, 2011).

Mutações nos receptores do tipo *Toll* (TLR) também estão associadas com as DIIs. Os TLRs são expressos por tipos celulares diferentes no intestino incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e células do epitélio intestinal. Esses receptores reconhecem microorganismos e ou substâncias produzidas por estes no lúmen intestinal, estando envolvidos na manutenção da homeostase do epitélio (Cario e Podolsky, 2005). Estudos têm demonstrado uma variação na expressão dos receptores *Toll* entre indivíduos normais e pacientes portadores de doença de Crohn e retocolite ulcerativa (Petermann *et al.*, 2009).

2.5. Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais

Modelos animais são importantes ferramentas para se investigar os mecanismos nos quais as doenças inflamatórias intestinais têm início e se perpetuam. Os modelos experimentais de DII são basicamente divididos em três grupos: o de animais geneticamente modificados através da inserção ou

deleção de genes, os modelos induzidos por agentes químicos e o de animais imunodeficientes submetidos a transferência de células CD4⁺CD45RB^{high} (Strober *et al.*, 2002). Esse último modelo foi descrito por Fiona Powrie no trabalho em que ela relatou uma nova população de células T reguladoras com o fenótipo CD4⁺CD45RB^{low}. Essas células reguladoras quando co-transferidas com as células CD4⁺CD45RB^{high} inibiam o desenvolvimento da colite (Powrie *et al.*, 1993).

Inflamações intestinais espontâneas têm sido observadas em camundongos geneticamente modificados com vários defeitos imunológicos. Esses incluem camundongos deficientes para IL-10, IL-2, MHC de classe II, receptor de células T (TCR) e camundongos transgênicos para IL-7 (Strober *et al.*, 2002). Dentre os modelos de inflamação espontânea, escolhemos estudar os camundongos deficientes em IL-10, uma vez que essa deficiência genética envolve defeitos na imuno-regulação de mucosa.

Camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem enterocolite espontânea a partir de 3 meses de idade. A doença é caracterizada pela perda de peso, esplenomegalia e anemia leve ou moderada. As características histopatológicas da inflamação incluem formação anormal das criptas, depleção das células caliciformes e um marcante espessamento da parede intestinal. O infiltrado inflamatório consiste de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. Esse modelo se revelou muito semelhante à doença de Crohn humana inclusive com uma grande incidência de adenocarcinoma durante a fase tardia (Kuhn *et al.*, 1993).

O desenvolvimento da colite nos camundongos deficientes em IL-10 parece ser mediado por células T CD4⁺ e uma resposta Th1 desequilibrada (Berg *et al.*, 1996). As citocinas e quimiocinas diretamente correlacionadas com a atividade da doença são: IL-12, IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-13 e IL-17 (Montufar-Solis *et al.*, 2008). Tanto os linfócitos intraepiteliais quanto aqueles presentes na *lamina propria* são importantes células efetoras da inflamação crônica em camundongos deficientes para IL-10 (Davidson *et al.*, 1996).

Camundongos deficientes em IL-10 mantidos em condições *germ free* não desenvolvem colite, evidenciando o papel dos antígenos da microbiota no desencadeamento da doença (Elson *et al.*, 2001). A colite espontânea

desenvolvida nesses animais parece estar fortemente relacionada ao papel imuno-regulador da citocina IL-10, produzida por macrófagos e por linfócitos. Na ausência da citocina, a área do corpo constantemente exposta a antígenos, o intestino, inflama (Strober *et al.*, 2002). Esse modelo experimental também é uma evidência de que as doenças inflamatórias crônicas se originam de distúrbios na regulação da atividade imunológica iniciada na mucosa intestinal (Bouma e Strober, 2003).

Em relação a administração de substâncias químicas para indução da colite, várias substâncias já foram descritas como indutoras da doença: o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), polímeros de polissacarídeo-peptídeoglicano, solução intra-retal de etanol 50% (v/v), ácido acético, indometacina, carrageina, polímero de PG-OS e sulfato de sódio dextrano (DSS) (Okayasu *et al.*, 1990). Nesse último, os camundongos que recebem DSS por via oral desenvolvem colite aguda semelhante à retocolite ulcerativa humana. O modelo de colite induzido por DSS foi originalmente descrito por Okayasu *et al.* (1990), e desde então, foi amplamente utilizado devido à facilidade na indução. Na colite aguda, ocorre perda de peso, sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e estrutura glandular do intestino. O infiltrado inflamatório é composto principalmente por neutrófilos que infiltram a base das criptas intestinais, afetando a estabilidade do epitélio intestinal (Okayasu *et al.*, 1990; Kitajima *et al.*, 1999; Melgar *et al.*, 2005; Kawada *et al.*, 2007).

Apesar de camundongos SCID, deficientes em linfócitos B e T, desenvolverem colite por DSS (Dieleman *et al.*, 1998), a participação de linfócitos na doença também já foi descrita (Shintani *et al.*, 1998; Melgar *et al.*, 2006). As citocinas mais relevantes durante a fase aguda são: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IFN- γ (Melgar *et al.*, 2005) e também IL-17 (Ito *et al.*, 2008).

O mecanismo pelo qual o DSS promove a colite ainda não foi esclarecido, mas foi sugerido que o DSS tem efeitos tóxicos no epitélio, aumentando a exposição aos antígenos luminiais pela destruição do conteúdo de mucina ou alterando a função dos macrófagos devido a fagocitose do DSS (Ni *et al.*, 1996; Kitajima *et al.*, 1999). Dessa forma, a perda da homeostase

do epitélio intestinal causada pelo efeito tóxico direto do agente químico consistiria em um evento inicial importante para a inflamação da mucosa nesse modelo (Kitajima *et al.*, 1999; Poritz *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).

A forma crônica da doença pode ser causada pela administração de DSS em água, durante sete dias, seguidos de mais sete dias de intervalo e posteriormente, uma nova administração de DSS durante cinco a sete dias (Kawada *et al.*, 2007; Wirtz *et al.*, 2007). A inflamação crônica é marcada pelo aumento de citocinas no plasma, por infiltrado celular rico em macrófagos, linfócitos e agregados linfóides na *lamina propria* e serosa do intestino (Araki *et al.*, 2005; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2006; Kawada *et al.*, 2007).

O modelo de transferência de células foi descrito por Powrie na década de 90. A transferência adotiva de células T CD4⁺CD45RB^{high} de um camundongo saudável (*wild type*) para um receptor singênico (SCID), em que faltam células T e B, induz uma pancolite com inflamação no intestino delgado 5 a 8 semanas após a transferência. A análise histológica do cólon distal revela uma inflamação transmural, hiperplasia de células epiteliais, infiltração de leucócitos, formação de abscesso de cripta e erosão de células epiteliais. Os camundongos apresentam perda de peso e diarreia. No entanto, a co-transferência de células CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} juntamente com as células CD4⁺CD45RB^{high} impedem a indução da doença, demonstrando a importância de células reguladoras em suprimir ou limitar o início e a perpetuação da inflamação intestinal (Powrie *et al.*, 1993).

2.6. Dieta isenta de antígenos proteicos

Embora a microbiota seja um fator de estimulação intensa do sistema imune não só local, mas também sistêmico, a dieta também exerce influência na formação do tecido linfóide da mucosa. De fato, nosso grupo de pesquisa

demonstrou que a exposição antigênica na mucosa intestinal pelas proteínas da dieta é fundamental para a maturação do sistema imune.

Camundongos alimentados, logo após o desmame, com uma dieta livre de antígenos protéicos apresentaram o tecido linfóide associado à mucosa deficientemente desenvolvido com redução de linfócitos intraepiteliais TCR $\alpha\beta$, de IgA secretória e de IgG e IgA séricas. A produção de citocinas pelas células linfóides mostrou predominância do perfil Th2 com altas concentrações de IL-4 e IL-10, além de baixas concentrações de IFN- γ (Menezes *et al.*, 2003). Esses camundongos também desenvolvem menor tolerância nasal à asma alérgica quando comparado com camundongos controles, evidenciando a manutenção do perfil Th2 imaturo (Mucida *et al.*, 2004).

Como dito anteriormente, nas doenças inflamatórias intestinais os antígenos “naturais” como a microbiota e as proteínas da dieta encontram um contexto inflamado na mucosa intestinal desencadeando a patologia em áreas da mucosa exposta a esses antígenos. Linfócitos T dos linfonodos mesentéricos de camundongos saudáveis e de camundongos susceptíveis à colite (G α i2 $^{-/-}$) foram re-estimulados *in vitro* com componentes isolados da dieta. Enquanto camundongos saudáveis produziram altos níveis da citocina reguladora IL-10 em resposta à estimulação pelos antígenos da dieta, camundongos com pré-disposição à colite produziram uma resposta Th1 com altos níveis de IFN- γ . Assim, uma resposta de linfócitos T desequilibrada frente à antígenos proteicos pode ser um mecanismo patogênico que contribua para desencadear as DIIs (Bjursten e Hultgren Hornquist, 2005).

Na clínica, dietas com finalidade médica promovem suporte nutricional suplementar ou completo a indivíduos com incapacidade de digerirem quantidades adequadas de alimento na forma convencional; ou promovem suporte nutricional especializado a pacientes com necessidades nutricionais especiais (Smith, 2008). Atualmente, sabe-se que proteínas intactas não podem ser administradas a pacientes com danos hepáticos ou estomacais específicos, dificuldades de hidrólise e reduzida capacidade absorptiva. Esse é, muitas vezes, o caso de pacientes com DII (Fernandez-Banares *et al.*, 1994).

A dietoterapia para pacientes com DII tem como objetivos diminuir a atividade da doença, manter e/ou recuperar o estado nutricional do paciente, aumentar o tempo de remissão da doença, reduzir as indicações cirúrgicas e complicações pós-operatórias (Gassull *et al.*, 1986). A ingestão de 1 a 1,5 g/Kg do peso ideal de proteína/dia satisfaz a demanda de proteínas e energia da maioria dos pacientes adultos com DII ativa. A terapia nutricional oral, enteral e parenteral são necessárias durante diferentes fases da DII. Atualmente, existe uma tendência favorável à utilização de dieta enteral em pacientes com DII, uma vez que estudos comparativos entre as vias de administração enteral e parenteral mostram resultados nutricionais semelhantes. A nutrição enteral além de fornecer os nutrientes para a recuperação e manutenção do estado nutricional oferece algumas vantagens como: melhora imunológica do paciente e preservação da mucosa intestinal, evitando a translocação bacteriana. Além disso, a frequência de infecções pós-operatórias é maior em pacientes com nutrição parenteral (Riordan *et al.*, 1993).

Na clínica, duas formas principais de suporte nutricional são utilizados em substituição às proteínas inteiras: os hidrolizados proteicos enzimáticos ou uma mistura de aminoácidos livres. Os hidrolizados proteicos contêm peptídeos de cadeia curta com uma composição de aminoácidos característica de cada hidrolisado. Eles mostram importante vantagem quando comparado a dieta elementar, em que o componente proteico consiste exclusivamente de uma mistura de aminoácidos livres: absorção de peptídeos de cadeia curta (di e tripeptídeos) é mais eficiente do que a de aminoácidos livres os quais por sua vez são melhores do que os tetra ou mais peptídeos (Clemente, 2000). Portanto, o uso de di e tripeptídeos é particularmente útil em casos de redução da capacidade absorptiva intestinal. Nesse estudo, testamos separadamente, tanto aminoácidos livres quanto hidrolizados proteicos como dietoterapia para doença inflamatória intestinal.

2.7. Bactérias lácticas na indução de tolerância oral

As bactérias do ácido láctico são amplamente utilizadas na indústria de alimentos na produção e preservação de produtos fermentados. A designação “bactérias lácticas (BL) se aplica a um grupo de bactérias gram positivas, não patogênicas, que tem o ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de carboidratos. As principais espécies do grupo BL são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*. Diversas espécies foram consideradas seguras e adquiriram o status de GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (De Vrese *et al.*, 2001; Carr *et al.*, 2002).

Dentre as várias propriedades atribuídas às bactérias lácticas, a mais antiga é sua capacidade de promover efeitos benéficos na saúde humana, sendo denominadas probióticas. As principais espécies descritas como probióticas são *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus reuteri* (Ouwehand *et al.*, 2002).

Uma nova aplicação para as bactérias do ácido láctico, e provavelmente a mais promissora, é o seu uso como vetores vivos para entrega de proteína antigênica ou de DNA nas superfícies mucosas. Vários projetos de investigação científica já testaram *Lactobacillus* sp. e *Lactococcus* sp. como vetores. Sistemas eficientes de expressão já foram desenvolvidos para a produção controlada e direcionada dos antígenos desejados (terapêuticos) com a finalidade de serem liberados na mucosa gastrointestinal (Pontes *et al.*, 2011).

Dentre as BL, *Lactococcus lactis* é a mais bem caracterizada e estudada do grupo por ter seu genoma completamente sequenciado, ser de fácil manipulação e por muitas ferramentas genéticas terem sido desenvolvidas nessa espécie. O *L. lactis* é uma bactéria gram positiva, facultativa, não invasiva, mesófila (com temperatura ideal de crescimento em torno de 30°C), amplamente utilizada na indústria de laticínios (Steidler *et al.*, 1998; Steidler e Rottiers, 2006; Wells e Mercenier, 2008).

Steidler e seu grupo de pesquisa foram os primeiros a desenvolverem *L. lactis* geneticamente modificados para sintetizar e secretar, de modo

eficiente, proteínas eucarióticas. As citocinas IL-2, IL-6 e IL-10 foram, então, produzidas por *Lactococcus* e testadas em diversos modelos experimentais (Steidler *et al.*, 1998). O mais bem sucedido deles foi com o *L. lactis* modificado para secretar IL-10, que preveniu, de forma significativa, a colite em camundongos deficientes para IL-10 e no modelo de colite induzida por DSS (Steidler *et al.*, 2000). Recentemente, um estudo (fase I), em pacientes com doença de Crohn moderada tem demonstrado que *L. lactis* produtor de IL-10 é seguro e pode ser efetivamente utilizado no tratamento dos pacientes (Braat *et al.*, 2006).

Com a intenção de desenvolver uma estratégia para induzir mecanismos tolerogênicos e prevenir a reatividade aumentada do sistema imune associada às doenças inflamatórias intestinais, utilizamos a bactéria *Lactococcus lactis* geneticamente modificado para produzir e secretar a proteína de choque térmico 65 de *Micobacterium leprae* (Hsp 65).

Embora a tolerância oral seja eficiente no tratamento de várias doenças em modelos animais, os ensaios clínicos em humanos não tiveram até hoje o mesmo sucesso (Faria e Weiner, 2006). Os motivos para essa falha são múltiplos e um deles parece ser a dose e o protocolo de administração oral dos antígenos que ainda não é bem adaptado para uso em humanos. Nosso grupo demonstrou que a maneira mais eficaz para a indução de tolerância oral em modelos experimentais é a administração oral do antígeno por *continuous feeding* ou ingestão contínua (na mamadeira). Esse protocolo de administração oral foi capaz de induzir tolerância oral em camundongos idosos, refratários à indução de tolerância por gavagem (administração intragástrica *in bolus*) da mesma dose de antígeno (De Faria *et al.*, 1998) e ainda de inibir com maior eficiência a indução da encefalomielite experimental alérgica (Faria *et al.*, 2003). Esse tipo de protocolo de administração é facilmente aplicável a animais experimentais, mas dificilmente adaptável ao uso clínico em humanos já que ele exigiria a ingestão de várias doses ao longo do dia.

A utilização de bactérias lácticas geneticamente modificadas para produção de proteínas heterólogas surge, então, como uma alternativa desenvolvida para imitar os efeitos da ingestão voluntária de antígenos. Nesse caso, a bactéria realiza a liberação lenta e gradual do antígeno na

mucosa. Essa nova alternativa tem o potencial de reproduzir em humanos os efeitos já demonstrados em modelos experimentais de tolerância oral por ingestão voluntária (Rottiers *et al.*, 2009).

A capacidade tolerogênica de *L.lactis* foi testada em um estudo em que a bactéria foi modificada para produzir ovalbumina (LL-Ova). Comparando-se a *L. lactis*-Ova com a proteína solúvel, em altas ou em baixas doses, a bactéria secretora de Ova aumentou as quantidades de IL-10 no tecido linfóide associado à mucosa (GALT) e no baço após estímulo com o mesmo antígeno. Além disso, promoveu a geração de células com o fenótipo CD4⁺CD25⁻ que expressam CTLA-4 e Foxp3, típico de células T reguladoras induzidas. Também foi observada redução da proliferação de esplenócitos e de IFN- γ por *Lactococcus* selvagem. O mecanismo específico pelo qual *L. lactis* aumenta os sinais tolerogênicos ainda é desconhecido. *L. lactis* pode modular o processamento e a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas. A maioria da Ova luminal após a administração oral por gavagem foi encontrada no íleo terminal, no ceco e no cólon, sugerindo que essa estratégia pode ser utilizada no tratamento de DIIs (Huibregtse *et al.*, 2007; Maillard e Snapper, 2007).

Além de *L. lactis* ser uma importante ferramenta para aumentar os mecanismos regulatórios na mucosa, possivelmente disponibilizando lentamente o antígeno nesse sítio e gerando células reguladoras específicas e não específicas, a produção de Hsp65 também pode ser fundamental para prevenir e tratar desordens inflamatórias.

2.8. Proteínas de Choque Térmico e Inflamação

As proteínas de choque térmico ou *heat shock proteins* (Hsp) constituem uma classe funcional de proteínas encontradas em todos os organismos vivos, desde bactérias até humanos e cuja expressão se torna aumentada quando células são expostas a elevadas temperaturas ou outros tipos de estresse (Lindquist e Craig, 1988; Ellis, 1990). As Hsps são caracterizadas de acordo com seus pesos moleculares. Por exemplo, Hsp60, Hsp70 e Hsp90 (proteínas de choque térmico mais amplamente estudadas)

referem-se aos pesos moleculares de 60, 70 e 90 kilodáltons, respectivamente (Ellis, 1990). Uma vez que suas concentrações encontram-se aumentadas frente às mais diversas condições de estresse, como infecção, inflamação, temperatura, dentre outros, as Hsps são também chamadas de proteínas de estresse (Santoro, 2000).

Essas proteínas desempenham as mais variadas funções. Podem atuar como chaperonas intracelulares, desempenhando importante papel na manutenção da conformação de diversas proteínas na célula, bem como prevenindo agregações indesejadas das mesmas (Walter e Buchner, 2002; Borges e Ramos, 2005). Também contribuem para a “reciclagem” celular, favorecendo a destruição de proteínas pelos proteassomas (Borges e Ramos, 2005). Entretanto, uma de suas mais importantes funções vem sendo amplamente estudada recentemente, sendo relacionada à regulação do sistema imune (Nishikawa *et al.*, 2008).

Imunizações com Hsp foram capazes de inibir desordens autoimunes tais como diabetes e artrites tanto em modelos animais como em estudos clínicos em pacientes com doença inflamatória crônica. Esse efeito protetor foi explicado pela expansão ou aumento da atividade das células reguladoras reativas a Hsp. Em modelo de artrite, essas células produziram IL-10 uma vez re-estimuladas com o antígeno (Wieten *et al.*, 2009). Além disso, a Hsp60 em particular, liga-se a receptores imunes inatos como o TLR2, levando à inibição da migração de células T e a consequente redução da entrada dessas células no sítio inflamado (Zanin-Zhorov *et al.*, 2003; Zanin-Zhorov *et al.*, 2005). A sinalização via TLR2 em células T reguladoras acarreta a expansão de células Treg CD25⁺ e aumenta a capacidade supressora dessas células reguladoras *in vitro* (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006).

As Hsps podem, de fato, ativar o sistema imune através de receptores de superfície como TLR2, TLR4, CD14, CD91 e CD40 (Binder *et al.*, 2004). No entanto, a ligação da Hsp em receptores da imunidade inata foi muitas vezes questionada, acreditando-se tratar de contaminantes bacterianos presentes na Hsp, particularmente do LPS (Gaston, 2002). Apesar disso, estudos demonstraram que Hsp altamente purificada pode ativar células dendríticas e macrófagos, via sinalização de TLR2 e de TLR4. A sinalização de TLRs via Hsp parece também ser diferente daquela induzida por LPS.

Esta é dependente de CD14 quando estimulado por Hsp enquanto que na via de estimulação pelo LPS a sinalização ocorre mesmo na ausência do CD14. A sinalização via Hsp parece ser dependente de endocitose enquanto o LPS sinalizaria na superfície celular (Tsan e Gao, 2004).

Além de induzirem células T reguladoras e se ligarem a receptores da imunidade inata, as Hsps constituem auto-antígenos dominantes (Quintana *et al.*, 2008), segundo a teoria do *homunculus* imunológico proposto por Irwin Cohen (Cohen e Young, 1991). Segundo o autor, o repertório de linfócitos auto-reativos envolvidos na auto-imunidade fisiológica seria direcionado a três classes principais de antígenos homunculares: moléculas do sistema imune, moléculas de manutenção e moléculas tecido-específicas. As proteínas de choque térmico, conforme dito anteriormente, são moléculas de manutenção envolvidas em uma série de processos de homeostase intracelular. Com o estudo mais detalhado das Hsps proporcionado por técnicas avançadas de biologia molecular, foi possível observar que essas proteínas, altamente expressas em condições de estresse na célula, desempenham um mecanismo adicional no controle do processo imune inflamatório: células T efetoras ativadas aumentam a expressão de Hsp60 (ergotopo) e apresentam seus próprios epítomos via MHC-I ou MHC-II à células T reguladoras anti-ergotópicas (Quintana *et al.*, 2008). Tais células anti-ergotópicas promovem a redução dos efeitos pró-inflamatórios produzidos pelos linfócitos efetores, ocasionando, por exemplo, diminuição dos danos causados pela resposta inflamatória autoimune nos modelos de EAE (Mor *et al.*, 1996) e de artrite adjuvante em roedores (Mimran *et al.*, 2004).

Dessa forma, uma vez demonstrado o aumento da expressão de Hsp60 pelos linfócitos T efetores ativados e a regulação dos efeitos pró-inflamatórios dessas células por linfócitos T reguladores anti-ergotópicos, torna-se de extrema relevância avaliar se a indução de tolerância oral às proteínas de choque térmico 65 produzidas e liberadas por bactérias, como *Lactococcus lactis* é capaz de prevenir doenças inflamatórias intestinais.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar as alterações imunológicas que acompanham a colite espontânea em camundongos deficientes para IL-10 e testar o potencial imuno-modulador da retirada das proteínas inteiras dietéticas e do *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal.

3.2. Objetivos específicos

Parte I

Caracterização das alterações imunológicas durante o curso da enterocolite espontânea em camundongos deficientes em IL-10. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- ✓ Análise macroscópica e microscópica (histológica) do cólon.
- ✓ Análise fenotípica das populações de linfócitos intraepiteliais e da *lamina propria* do intestino delgado e grosso.
- ✓ Perfil de citocinas nas porções do intestino delgado e grosso.
- ✓ Produção de IgA secretória e de Imunoglobulinas séricas (IgM, IgG e IgA).
- ✓ Determinação da porcentagem de células B e B1 no intestino delgado e grosso, PP, peritônio e medula óssea.
- ✓ Indução de tolerância oral em camundongos com colite estabelecida.

Parte II

Avaliar os efeitos da administração de dietas isentas de antígenos protéicos na retocolite experimental induzida por DSS em camundongos por meio dos seguintes parâmetros:

- ✓ Análise macroscópica e microscópica (histológica) do cólon.
- ✓ Avaliação do estado nutricional por meio das dosagens de hemoglobina, albumina, proteínas séricas totais.
- ✓ Produção de IgA secretória por ELISA.

Parte III

1) Avaliar os efeitos imunológicos da administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 na colite ulcerativa experimental. Os seguintes parâmetros foram determinados:

- ✓ Análise macroscópica e microscópica (histológica) do cólon.
- ✓ Determinação da concentração de sIgA nas fezes.
- ✓ Teste de permeabilidade intestinal.
- ✓ Perfil de citocinas no extrato de cólon.
- ✓ Análise fenotípica das populações de leucócitos do baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal.
- ✓ Indução da sinalização *in vitro* de TLR2 e TLR4.
- ✓ Determinação *in vivo* da dependência de TLR2 e de TLR4 para a melhora da colite por *L. lactis* produtor de Hsp65.

2) Avaliar os efeitos imunológicos da administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 no modelo de colite espontânea experimental. Os seguintes parâmetros foram determinados:

- ✓ Análise macroscópica e microscópica (histológica) do cólon.
- ✓ Determinação da concentração de sIgA nas fezes.
- ✓ Perfil de citocinas no extrato de cólon.
- ✓ Análise fenotípica das populações de linfócitos na *lamina propria* do intestino grosso, linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e baço.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1. Animais experimentais

Camundongos 129 Sv/Ev deficientes para IL-10 e controles (selvagens) foram doados pela Prof. Donna-Marie McCafferty (Calgary University- Canadá) e mantidos em microisoladores para criação. Posteriormente, após o desmame, esses foram transferidos para gaiolas abertas.

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com aproximadamente 18 gramas, foram utilizados nos experimentos de colite induzida por DSS (dextrana sulfato de sódio). No experimento *in vitro* com macrófagos peritoneais utilizamos também camundongos BALB/c. Esses foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em gaiolas coletivas durante o experimento. Também utilizamos camundongos deficientes para TLR2 e para TLR4 no fundo genético C57BL/6 que foram cedidos pelo Prof. Sérgio Costa.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética animal da UFMG (protocolo 114/10) (anexo 1).

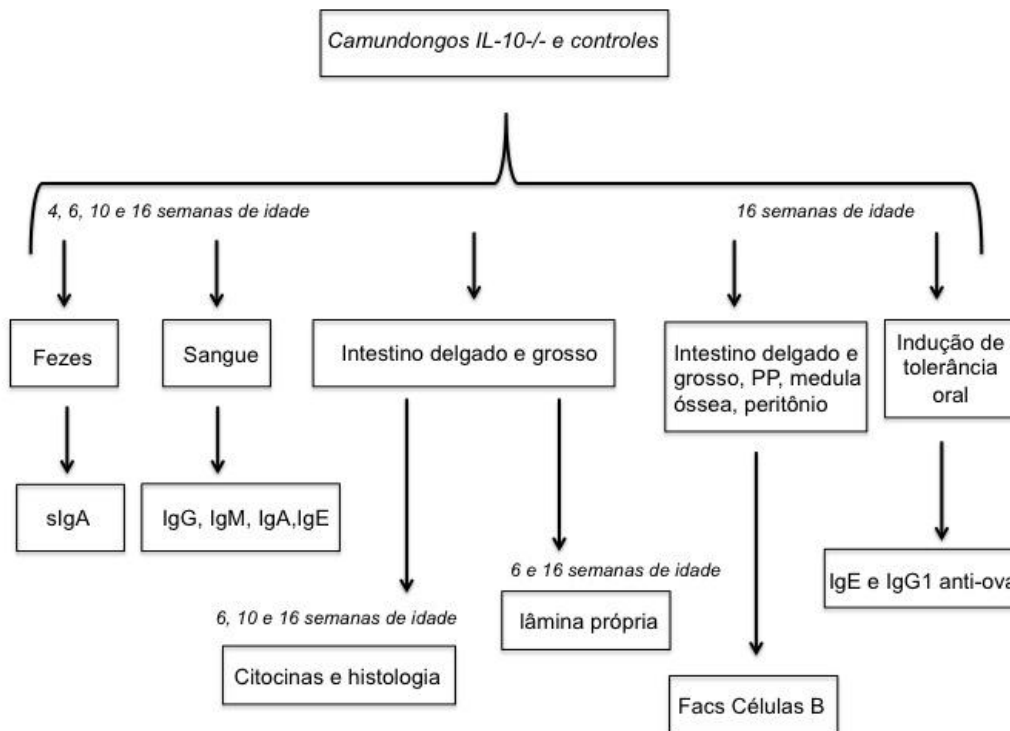
4.2. Desenho experimental

Parte I

Camundongos deficientes em IL-10 e controles (129 Sv/Ev) com 4, 6, 10 ou 16 semanas de idade foram utilizados no estudo. No dia da eutanásia, esses foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após anestesia geral, o sangue dos animais foi retirado pela aorta abdominal. Posteriormente, retiramos o intestino delgado cuidadosamente e então, esse foi limpo sobre um papel filtro para retirada de gordura e fezes. Esse foi dividido em porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) e armazenado em freezer -80°C ou submetido a separação de IEL e células da *lamina propria*. Nesse caso, as placas de Peyer foram retiradas. O intestino grosso também foi removido e dividido em duas partes. A porção ascendente com aproximadamente 1

cm foi emersa em formol 10% para histologia e o restante foi armazenado no freezer -80 °C para mensuração de citocinas ou então, submetido a separação de células da *lamina propria*. Nos experimentos para marcação de linfócitos B também foram retiradas células do lavado peritoneal e da medula óssea.

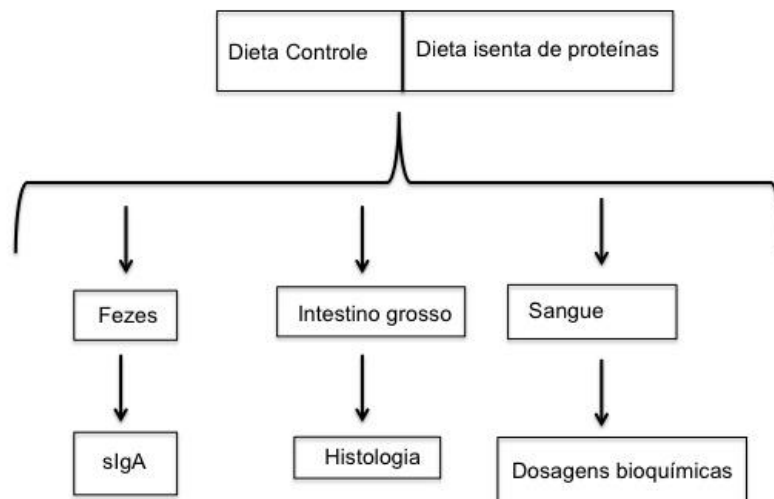
Esquema experimental parte I



Parte II

Camundongos C57BL/6 fêmeas com peso corpóreo entre 18 e 20 gramas foram separados em dois grupos de acordo com as dietas experimentais controle contendo proteínas inteiras ou a dieta experimental isenta de proteínas. No primeiro experimento utilizamos caseína (cas) como fonte proteica e aminoácidos livres (Aa). No segundo experimento, utilizamos proteína do soro do leite como fonte proteica ou di-tripeptídeos (di-tri) obtidos da hidrólise das proteínas do soro do leite. Após uma semana de ingestão das dietas oferecidas *ad libitum*, a indução da colite foi realizada pela administração de DSS a 2%, ofertado na mamadeira, como única fonte líquida. Durante esse período os animais continuaram se alimentando das dietas experimentais.

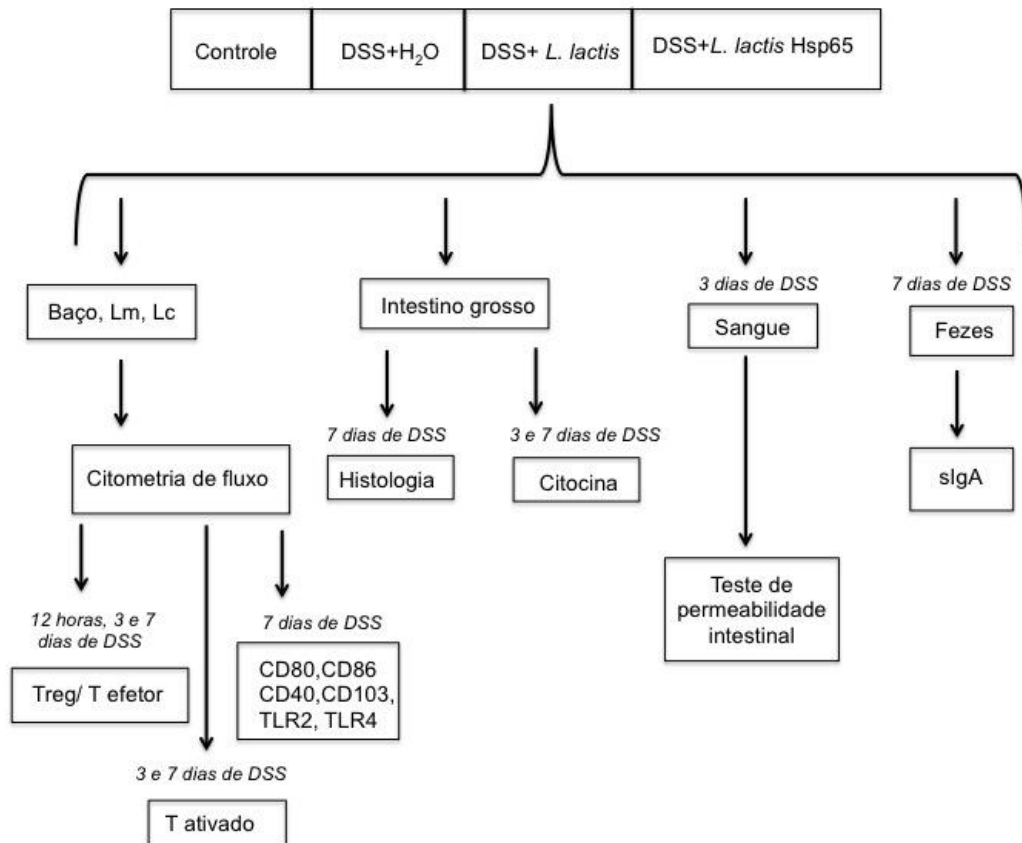
Esquema experimental parte II



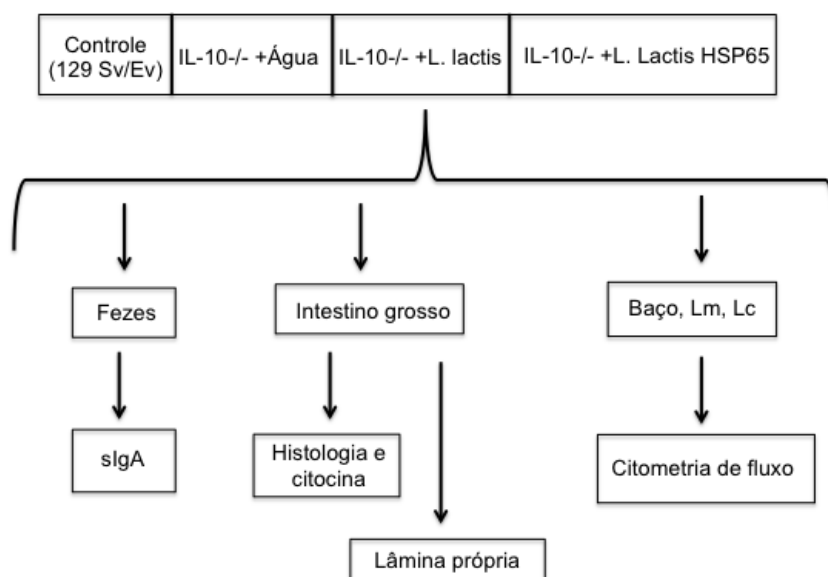
Parte III

Camundongos C57BL/6 foram pesados e divididos em grupos experimentais de maneira homogênea. Esses receberam água, *L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65 na mamadeira por 4 dias consecutivos. O meio contendo as bactérias foi trocado diariamente. Após 10 dias de intervalo a partir do último dia de tratamento oral, a colite foi induzida. Os camundongos receberam por via oral *ad libitum* uma solução de DSS (dextrana sulfato de sódio) a 2% (peso/volume) diluído em água. Essa solução foi administrada durante 7 dias consecutivos. Os camundongos controles receberam somente água por via oral, em vez de DSS. Na eutanásia, retiramos baço, linfonodo cecal e linfonodo mesentérico. Posteriormente, o cólon foi removido e dividido em partes. A porção descendente (aproximadamente 1cm) foi reservada para histologia. O restante foi congelado a -80°C para dosagem de citocinas.

Esquema experimental parte III – Modelo de colite induzida



Esquema experimental parte III – Modelo de colite espontânea



4.3. Análise macroscópica

Os parâmetros macroscópicos para avaliação da gravidade da colite induzida por DSS foram listados na Tabela 1. O índice macroscópico representa a soma de cada parâmetro ranqueado (% de perda de peso, diarreia e sangramento). O índice máximo possível é igual a 12 (Kang *et al.*, 2006).

Tabela 1: índice macroscópico da colite aguda induzida por DSS

Índice	% perda de peso	Diarréia	Sangramento
0	nenhuma	nenhuma	Ausente
1	1 a 5		
2	5 a 10	moderada	oculto
3	11 a 15		
4	>15	grave	Visível

O índice macroscópico utilizado para avaliação da doença inflamatória intestinal de camundongos deficientes em IL-10 está listado na tabela 2. Esse sistema de índice incluiu características clínicas da colite, a presença ou ausência de adesão, estreitamento, diarreia (diarreia foi definida como fezes aquosas) e a espessura da parede do intestino (medida em milímetros). A cada parâmetro, se observado, foi atribuído 1 ponto, com exceção do espessamento da parede do intestino (Mccafferty *et al.*, 2000).

Tabela 2: índice macroscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos deficientes para IL-10

Parâmetros
Eritema
Diarreia
Edema
Estreitamento do cólon
Hemorragia
Adesão
Ulceração
Hiperplasia da mucosa
Espessamento da parede do intestino

4.4. Análise histológica

Amostras do cólon ascendente de camundongos IL-10^{-/-} e do cólon descendente de camundongos C57BL/6 com colite induzida por DSS foram fixados em formalina e processados para análise histológica. Cortes corados com hematoxilina e eosina foram ranqueados às cegas, baseado no sistema de índice previamente descrito (Mccafferty *et al.*, 2000) que classifica as seguintes

características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa, presença e grau de infiltração celular, extensão do espessamento do músculo, presença ou ausência de abscessos das criptas e a presença ou ausência de depleção das células caliciformes conforme tabela a seguir. Os índices para cada característica foram somados com o índice máximo possível de 11.

Tabela 3: índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos

Parâmetro	Classificação
Extensão da destruição da arquitetura da mucosa	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 dano extensivo
Presença e grau de infiltração celular	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 infiltração transmural
Extensão do espessamento do músculo	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 espessamento extensivo
Presença ou ausência de abscessos das criptas	0 ausente e 1 presente
Presença ou ausência de depleção das células caliciformes	0 ausente e 1 presente

4.5. Dieta experimental com aminoácidos livres

Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta controle contendo 15% de caseína (Cas) como fonte de proteína ou uma dieta contendo 15% de aminoácidos (Aa) na mesma proporção encontrada na caseína. Ambas as dietas são isocalóricas e idênticas em relação aos outros nutrientes. As dietas foram feitas tomando como base a dieta padrão para roedores AIN93G (*American Institute of Nutrition*) (Reeves *et al.*, 1993), sendo ofertadas em forma de peletes *ad libitum* durante todo o experimento. A composição da dieta e dos aminoácidos utilizados encontram-se nas tabelas abaixo.

Tabela 4: Composição centesimal da dieta AIN-93G para roedores

Composição da dieta	g/Kg de dieta
Amido de milho	447,5
Caseína	150
Amido dextrinizado	132
Sacarose	100
Óleo de soja	70
Celulose	50
Mix mineral	35
Mix vitamínico	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
BHT	0,014

Os ingredientes foram individualmente pesados e misturados para obtenção de 1 kg de dieta em pó. Os *pellets* foram feitos posteriormente com a adição de água filtrada e congelados a 4 °C.

Tabela 5: Composição de aminoácidos da molécula de Caseína

Aminoácidos	(g)
Arginina	6,15
Histidina	4,65
Isoleucina	9,15
Leucina	13,8
Lisina	12,3
Metionina	4,8
Fenilalanina	7,5
Treonina	7,35
Triptofano	1,8
Valina	10,8
Alanina	4,5
Ácido aspártico	10,65
Cistina	0,45
Acido glutâmico	10
Glicina	27,65
Prolina	16,95
Serina	9,45
Tirosina	9,45

A composição de aminoácidos (em gramas) corresponde a 167,4 gramas de caseína.

4.6. Dieta experimental com di-tripeptídeos

O concentrado proteico do soro do leite na forma de pó foi doado pela Kerry do Brasil. Para a obtenção dos hidrolizados, um volume de 100mL de solução aquosa da proteína do soro do leite a 10% (p/v) foi colocado em um erlenmeyer e o pH ajustado na faixa ótima apresentada na ficha técnica da enzima utilizada para hidrólise assim como a temperatura. A enzima foi adicionada para se obter a relação

enzima-substrato desejada (1:100, 2:100, 3:100 e 4:100). Após 5 horas, o processo foi interrompido por aquecimento em banho maria a 75 °C por 15 segundos para inativar a enzima. O grau de hidrólise é definido como a porcentagem de grupamentos amino que são liberados no rompimento da molécula proteica pela ação de enzimas. Nesse caso, o grau de hidrólise foi calculado por meio da relação entre o nitrogênio α -aminado (NA) e o nitrogênio total (NT) de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Grau de hidrólise} = \text{nitrogênio } \alpha\text{-aminado (NA)} / \text{nitrogênio total (NT)} \times 100.$$

Para a determinação do NA foi utilizado o método de Sorensen e para a determinação do NT o método de Kjeldahl. Os hidrolizados foram preparados no laboratório de Bromatologia da Prof. Marialice Pinto Coelho, Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.7. Dosagens bioquímicas de albumina e proteínas totais e hemoglobina

O método de dosagem de albumina se baseia na ligação da albumina com o corante verde de bromocresol. Essa ligação promove um desvio do pico de absorvidade do corante e permite que a cor resultante possa ser medida colorimetricamente na presença do excesso do corante. Para tal, 100 μ L do reagente de cor (bromocresol) foram adicionados a 1 μ L de soro ou de padrão e incubado por 10 minutos a 37 °C (Kit Labtest). As absorvâncias do teste e do padrão foram determinadas em 630 nm. O cálculo de albumina foi feito dividindo a absorvância do teste pela absorvância do padrão e multiplicado por 3,8 (fator de calibração).

O método de dosagem de proteínas totais utiliza a especificidade de reação do biureto com as proteínas de líquidos biológicos. O procedimento foi feito conforme o utilizado para albumina (Kit Labtest). Porém as absorvâncias foram lidas a 550 nm. O cálculo foi feito dividindo-se a absorvância do teste pela absorvância do padrão e multiplicado por 4 (fator de calibração).

A dosagem de hemoglobina foi realizada em sangue coletado do plexo axilar. A reação para dosagem de hemoglobina foi feita de acordo com o recomendado pelo fabricante dos reagentes (Doles - Goiânia, Goiás - Brasil).

4.8. *Lactococcus lactis*: linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico

As linhagens bacterianas que foram empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 6. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco) suplementado com 0,5% de glicose ou 1% de xilose (GM17 ou XM17, respectivamente). Para o cultivo das bactérias, 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado. As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio sólido por um período de 18 horas (*overnight*). Em seguida, colônias isoladas foram individualmente coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável e inoculadas em meio líquido. Depois de cultivadas, as culturas foram diluídas (4:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em freezer -80°C. A representação dos vetores de expressão de *L. lactis* produtor de Hsp65 está ilustrado na figura 3. Foi estimado por *Western Blotting* que *L. lactis* pSEC (produtor de HSP na forma secretada) produz 7mg/L de Hsp65. Além disso, a Hsp65 produzida por *L. lactis* é livre de LPS (Azevedo, 2009).

Tabela 6: Linhagens bacterianas

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

Cmr: Resistência ao antibiótico cloranfenicol.

LGCM: Laboratório de genética celular e molecular.

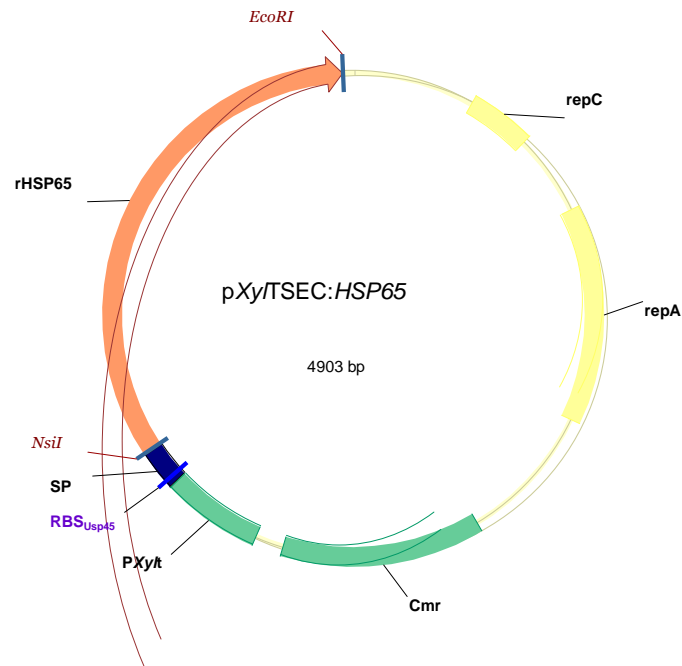


Figura 3: Representação dos vetores de expressão pXylT:SEC:hsp65.

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

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

Primeiro dia

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

Segundo dia

As culturas crescidas *overnight* foram diluídas (1:10.000) em 10 mL de XM17. Posteriormente, os inóculos foram incubados na estufa a 30°C, sem agitação, por mais 18 horas.

Terceiro dia

Após as culturas terem alcançado uma densidade óptica 2.0 (OD 600nm), o que corresponde a 1×10^9 bactérias/mL, as culturas crescidas *overnight* foram acondicionadas em mamadeiras de vidro estéreis e ofertadas aos camundongos. O

procedimento foi feito por 4 dias consecutivos. As mamadeiras foram trocadas diariamente.

4.10. Preparação das suspensões de células

As suspensões das células do baço, linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e placa de Peyer foram homogeneizadas e centrifugadas a 400g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A lise de hemácias do baço foi feita com PBS 10X diluído 1:10 em água. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 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 50µM de β-mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2. As células foram contadas no microscópio óptico.

4.11. Análise da produção de IL-12p70 por macrófagos obtidos do peritônio

Os macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos que receberam injeção, 72 horas antes do sacrifício, de tioglicolato a 3%. Os macrófagos obtidos foram ressuspensos em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium*). Para a cultura celular, 5 x10⁶ células foram plaqueadas por poço. As células não aderentes foram removidas 4 horas após o plaqueamento. O meio DMEM foi utilizado como controle negativo. Os macrófagos foram estimulados com LPS (20 ng/poço) e com IFN-γ (20 ng/poço) por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram coletados 24 horas depois. As concentrações de IL-12p70 foram mensuradas por ELISA.

4.12. Separação de linfócitos intraepiteliais e de leucócitos da lamina própria

O intestino delgado e grosso foram cuidadosamente removidos, retirando o tecido adiposo aderido. Posteriormente, esses foram abertos longitudinalmente e lavados cuidadosamente com solução de HBSS 1x, em um papel filtro, para remoção das fezes e das placas de Peyer. O intestino foi, então, picotado em

pequenos pedaços de 0,5 cm e colocado sob agitação lenta. A solução de HBSS 1X foi trocada 4X após intervalo de 15 minutos cada, para limpeza dos tecidos. Os linfócitos intraepiteliais bem como as células epiteliais foram removidas após incubação em uma solução de HBSS 1x com acréscimo de 1mm de DTT por 30 minutos a 37°C em agitação lenta. O procedimento foi repetido 2 vezes. O tecido restante após a separação dos linfócitos intraepiteliais foi incubado por 1 hora a 37°C com collagenase tipo 2 (100U/mg) para separação das células da *lamina propria*. O procedimento foi repetido 2 vezes e a cada etapa, o sobrenadante foi recolhido. As células foram lavadas, contadas e submetidas a marcação celular por citometria de fluxo (Davies e Parrott, 1981).

4.13. Preparação de extratos de tecidos

Amostras do intestino delgado, jejuno proximal, jejuno distal, íleo e cólon foram pesadas e adicionados 1mL 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 20 KIU de aprotinina A para cada 100 mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador e centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos, a 4°C . As amostras foram mantidas a - 20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

4.14. Medida da produção de citocinas por ELISA

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , IFN- γ , IL-6 e IL-17A foram determinados nos extratos de tecidos por ELISA (Maron *et al.*, 1999). Para tal, utilizou-se anticorpos monoclonais (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) anti-IL-6, anti-TNF- α , anti-IL-4, anti-IL5, anti-IL10, anti-TGF- β , anti- IFN- γ ou anti-IL-17 murinos. Após 18 horas de incubação a 4°C as placas (NUNC) foram lavadas com salina acrescida de 0,05% de Tween-20 e bloqueadas com PBS a 0,5% de caseína. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, os extratos de tecido foram adicionados às placas e as mesmas foram incubadas *overnight* a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas novamente com salina com 0,05% de Tween-20 e posteriormente foi adicionado anticorpos monoclonais (Pharmingen) conjugados com biotina específicos para as citocinas em questão. Após 2 horas de incubação,

as placas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 1:15000 vezes em PBS contendo 0,5% caseína durante uma hora a 37°C. Finalmente, a revelação foi feita através da incubação de uma solução de citrato de sódio pH 4,5 acrescida de OPD e H₂O₂ 30 volumes como substrato. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N e a leitura foi realizada em leitor de ELISA automático usando o comprimento de onda de 492nm. As reações de ELISA tiveram como controle positivo citocinas recombinantes de camundongo (RD Systems).

4.15. Determinação de IgM, IgA, IgG séricas e de IgA secretória

Os títulos de anticorpos no soro e nas fezes foram medidos por ELISA. As placas de poliestireno foram incubadas com solução de tampão carbonato pH=9,6 contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1µg/mL por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,5% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. Os soros foram incubados em diluição seriada (1:2) em PBS-0,5% caseína, durante uma hora a 37°C. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas. Anticorpos de cabra anti-Ig, IgG, IgM ou IgA de camundongo conjugados com biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) e diluídos (1:5000) em PBS – 0,5% caseína foram adicionados aos poços (100 µL/poço) durante uma hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 1:15000 vezes em PBS-0,5% caseína durante uma hora a 37°C. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito utilizando a H₂O₂ como substrato e orto fenilenediamina (OPD) como reagente de cor. Essa solução foi diluída em tampão citrato, adicionada à placa (100 µl/ poço) e incubada por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (20µl/poço) e a leitura realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em 492 nm.

4.16. Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos (1×10^6) foram plaqueadas e em seguida, adicionados 25 μ l por poço do coquetel de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina), Cy5 (Cy-chrome) ou PerCP Cy5.5. Os anticorpos utilizados estão relacionados na tabela abaixo. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas com 100 μ l por poço de PBS-BSA-NaN₃ e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, então, o procedimento de lavagem foi novamente repetido. Posteriormente, as células marcadas com anticorpo biotina foram submetidas a uma nova incubação com estreptavidina e lavadas conforme descrito. Finalmente, as células marcadas foram ressuspensas em 200 μ l de solução fixadora (0,5% de formaldeído em PBS1X) e mantidas a 4°C, no escuro até o dia seguinte. A leitura foi feita usando o FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, Califórnia). Leu-se 30.000 eventos na região de linfócitos ou 150.000 eventos totais para análise de células dendríticas.

Tabela 7: Anticorpos utilizados nos experimentos

Parte I

Marcação	FITC	PE	Cy5.5	PerCP Cy5.5	Biotina	Streptavidina
IEL	Thy1.2	TCR $\gamma\delta$	X	X	TCR $\alpha\beta$	Cy5.5
LP T ativado	CD4	CD44	X	CD69	X	X
LP T reg	CD25	Foxp3	CD4	X	X	X
LP LAP	CD4	CD25	X	X	LAP	Cy5.5
B	CD5	X	CD19	X	X	X

Parte III

Marcação	FITC	PE	Cy5.5	PerCP Cy5.5	Biotina	Streptavidina
Treg/T efetor	CD4	CD45RB	X	CD25	X	X
LAP	CD4	CD25	X	X	LAP	Cy5.5
T ativado	CD4	CD44	X	X	X	X
CD80	CD11c	CD80	X	CD11b	X	X
CD86	CD11c	CD86	X	CD11b	X	X
CD40	CD11c	CD40	X	CD11b	X	X
CD103	CD11c	X	X	CD11b	CD103	PE
TLR4	CD11c	TLR4	X	CD11b	X	X
TLR2	CD11c	TLR2	X	CD11b	X	X

4.17. Análise da citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi feita no programa FlowJo. Inicialmente, a região de linfócitos ou de células mielóides foi delimitada por tamanho e granulosidade (FSC-H X SSC-H). Dentro dessas regiões, selecionamos a região positiva de linfócitos marcados com CD4⁺ ou CD19⁺ ou de células dendríticas (CD11c⁺, CD11b⁻). A população positiva dos demais marcadores foi selecionada em conjunto com os marcadores principais acima descritos (região duplo positiva) ou dentro da região selecionada anteriormente. *Dot plots* representativos das estratégias de análise estão ilustrados nas figura a seguir.

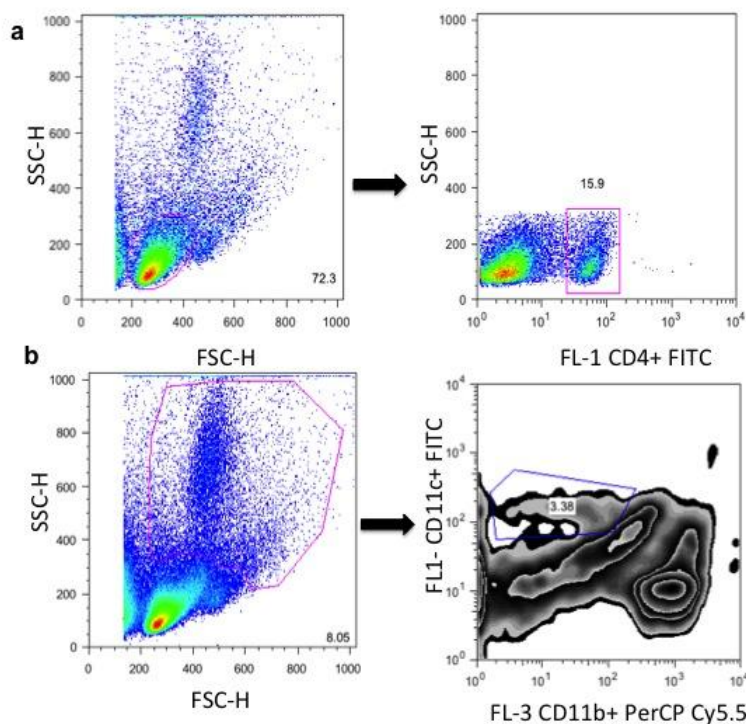


Figura 4: Estratégia de análise de linfócitos e células dendríticas por citometria de fluxo. Análise realizada no programa FlowJo. Perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos e posteriormente as células CD4⁺ foram selecionadas (a). Perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente a população de células mielóides e, posteriormente, as células CD11c⁺CD11b⁻ foram também selecionadas (b).

4.18. Indução de tolerância oral

A tolerância oral a Ovalbumina (Ova) foi induzida em camundongos IL-10^{-/-} e controles com 16 semanas de idade. Esses receberam 20mg de Ova por gavagem (intubação gástrica) ou uma solução de ovalbumina diluída na água de beber durante 3 dias consecutivos (a ingestão final foi de 20 mg). Os grupos controles receberam água por via oral. Sete dias após o tratamento oral, os animais foram sensibilizados com uma injeção intraperitoneal de 0,2 mL de solução salina contendo 10 mg de Ova adsorvida em 1 mg de hidróxido de alumínio. Quatorze dias depois, os animais receberam a mesma dose de Ova em PBS.

4.19. Teste de permeabilidade intestinal

Os camundongos foram previamente tratados com *L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65. O grupo controle recebeu somente água por via oral. Após 10

dias de intervalo, os camundongos receberam DSS por via oral, durante 3 dias. No dia seguinte, os animais receberam 0,1mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc por gavagem, para avaliação da permeabilidade intestinal. O padrão de dose que corresponde a alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA oferecido aos animais foi utilizado para a determinação da radioatividade no mesmo tempo dos demais tubos. Os camundongos foram eutanasiados 6 horas após o procedimento supracitado, para a retirada de 500 μL de sangue a partir da aorta abdominal. O sangue foi posteriormente submetido à contagem da radioatividade. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual da dose de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose} = [(\text{CPM do sangue} * 100) / \text{CPM do padrão de dose}]$$

4.20. Ensaio repórter luciferase

Células HEK 293 (ATCC, Rockville, MD) foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (ATCC, Rockville, MD) suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram colocadas em placas de 24 poços de cultura de tecidos (10^6 células / poço) e mantidas no meio acima mencionado por 24h. As células foram transfectadas com o polyethylenimine (PEI) com 1 mg de pcDNA3 do TLR correspondente cDNA ou DNA do vetor (pcDNA3, Invitrogen, Inc.) e 200 ng de plasmídeo NF- κ B-Luc contendo o gene sintético *firefly luc2 (Photinius pyralis)* sob o controle de NF- κ B. Todas as células também foram transfectadas com 50 ng de PRL-TK plasmídeo controle expressando constitutivamente o gene *Renilla hRluc (Reniformis renilla)* luciferase para normalizar a eficiência de transfecção. Após a transfecção, as células foram mantidas em meio *Dulbecco* suplementado com 1% de soro bovino fetal *overnight*. No dia seguinte, as células foram incubadas ou não com o agonista indicado ou com o sobrenadante da cultura de *L. lactis* ou de *L. lactis* produtor de Hsp65 por 6 horas a 37°C CO₂ / 5%. Após o período de incubação, as células foram ressuspendidas em tampão de lise e analisadas para a atividade de luciferase, conforme determinado pelo protocolo do fabricante Dual-luciferase® System Assay Reporter (Promega, Madison, WI, EUA). 5 mL de lisado de células foi adicionado a 45 mL de luciferase Assay Reagente II (Promega) e a luminescência (FLUC) foi quantificada por luminômetro (LumiCount™-Packard). Em

seguida, foi adicionado 45 mL Stop & Glo Reagente e, mais uma vez, a luminescência foi quantificada por luminômetro (RLuc).

4.21. 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 Teste t de Student foi também utilizado para comparações entre dois grupos experimentais.

5. RESULTADOS

5. Resultados- Parte I

Alterações imunológicas em camundongos deficientes para IL-10

5.1. Caracterização da colite durante o curso da inflamação intestinal em camundongos IL-10^{-/-}

Os índices macroscópico e histológico da mucosa do cólon de camundongos deficientes em IL-10 e controles foram avaliados com 6, 10 e 16 semanas de idade. Camundongos IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade não apresentaram sinais macroscópicos de colite nem de inflamação na mucosa do cólon proximal. Já com 10 semanas de idade, camundongos deficientes em IL-10 apresentaram uma colite moderada, sendo que a gravidade da doença atinge um *plateau* com 16 semanas de idade. O índice macroscópico não aumentou após o estabelecimento da doença uma vez que camundongos IL-10^{-/-} com 10 ou 16 semanas apresentam índices semelhantes (Figuras 5 e 6).

5.2. Morfologia do intestino delgado e perfil dos linfócitos intraepiteliais em camundongos deficientes para IL-10

Uma vez que camundongos deficientes para IL-10 podem apresentar focos de inflamação em áreas do intestino delgado e não somente no intestino grosso (Kuhn *et al.*, 1993), nós avaliamos histologicamente as seguintes porções do intestino delgado: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Somente camundongos deficientes em IL-10 com 16 semanas de idade apresentaram inflamação na porção do jejuno proximal mas não nas outras porções analisadas. Além disso, esses animais tiveram a razão vilo/cripta alterada devido ao encurtamento do vilo. Em camundongos IL-10 com 6 semanas de idade também houve uma menor razão vilo/cripta, mas desta vez, devido ao aumento do tamanho da cripta.

Após observarmos modificações na mucosa do intestino delgado de camundongos deficientes em IL-10 com 16 semanas, nós analisamos o perfil dos linfócitos intraepiteliais (IEL). Os IELs estão envolvidos na manutenção da

integridade das células epiteliais (Lambolez *et al.*, 2007). A frequência de IELs TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ foi analisada por citometria de fluxo. Nós utilizamos o Thy 1.2 como marcador para discriminar os IELs ativados. O Thy 1.2 (CD90) é uma proteína de superfície celular abundante em timócitos de camundongo e em células T periféricas. Thy 1.2 participa da ativação e recrutamento de linfócitos (Crawford e Barton, 1986). Camundongos deficientes em IL-10 possuem porcentagem reduzida de linfócitos $\gamma\delta$ ativados enquanto nenhuma alteração foi observada na população de linfócitos $\alpha\beta$.

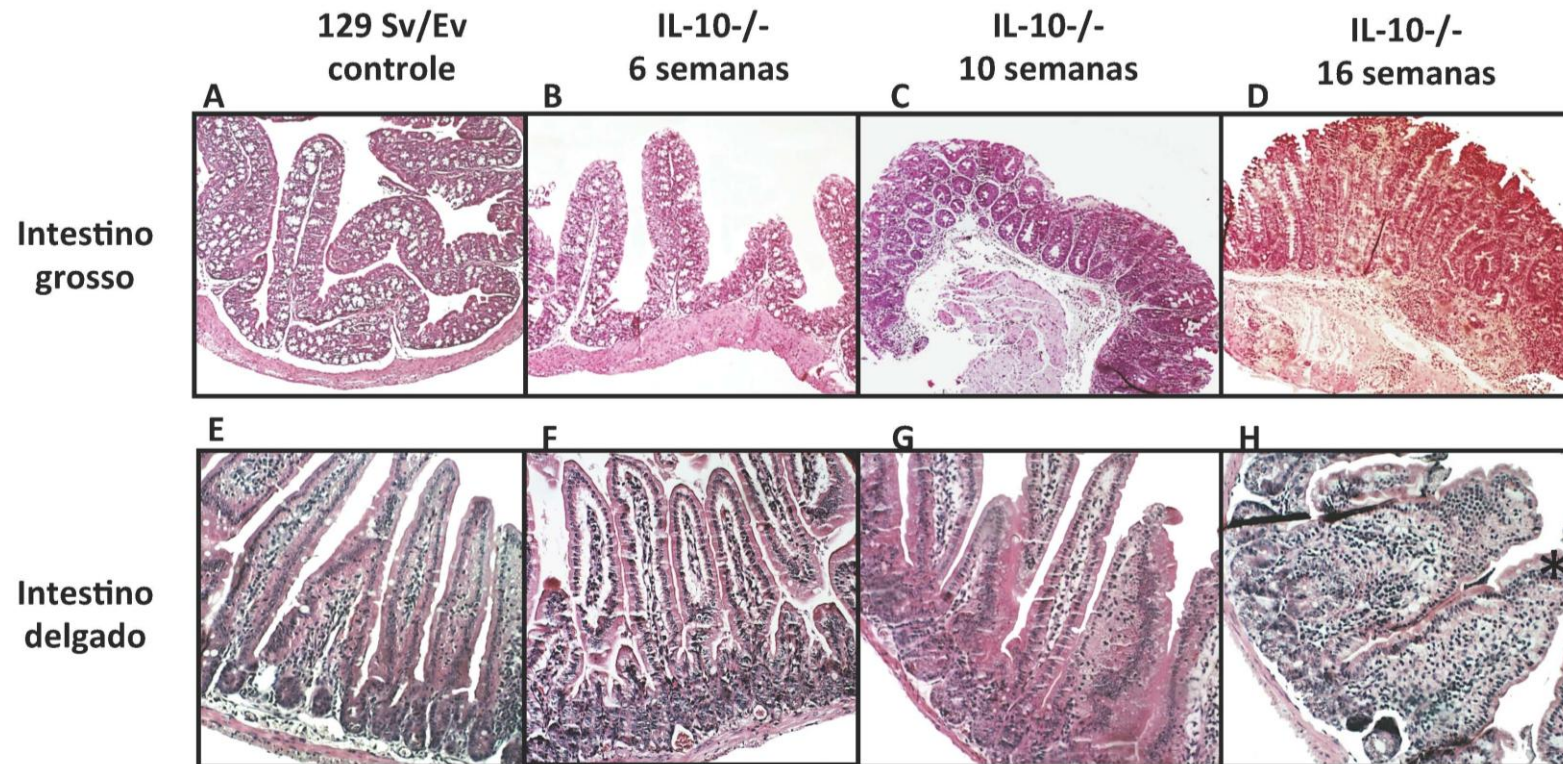


Figura 5: Histopatologia das alterações intestinais em camundongos deficientes em IL-10.

A- Histologia da porção proximal do cólon representativa de camundongos 129 Sv/Ev (controles). B- cólon proximal de IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade. Camada mucosa e submucosa semelhante a de animais 129 Sv/Ev. C- Cólon proximal de IL-10^{-/-} com 10 semanas. Infiltração multifocal de leucócitos na camada mucosa e submucosa. D- cólon proximal de IL-10^{-/-} com 16 semanas. Inflamação transmural atinge a camada muscular. E- jejuno proximal representativo de 129 Sv/Ev. F- jejuno proximal de IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade. G- jejuno proximal de IL-10^{-/-} com 10 semanas de idade. H- jejuno proximal de IL-10^{-/-} com 16 semanas de idade. *Lamina propria* do vilão com infiltração celular (asterisco). Lâminas histológicas coradas em H&E, aumento de 100X.

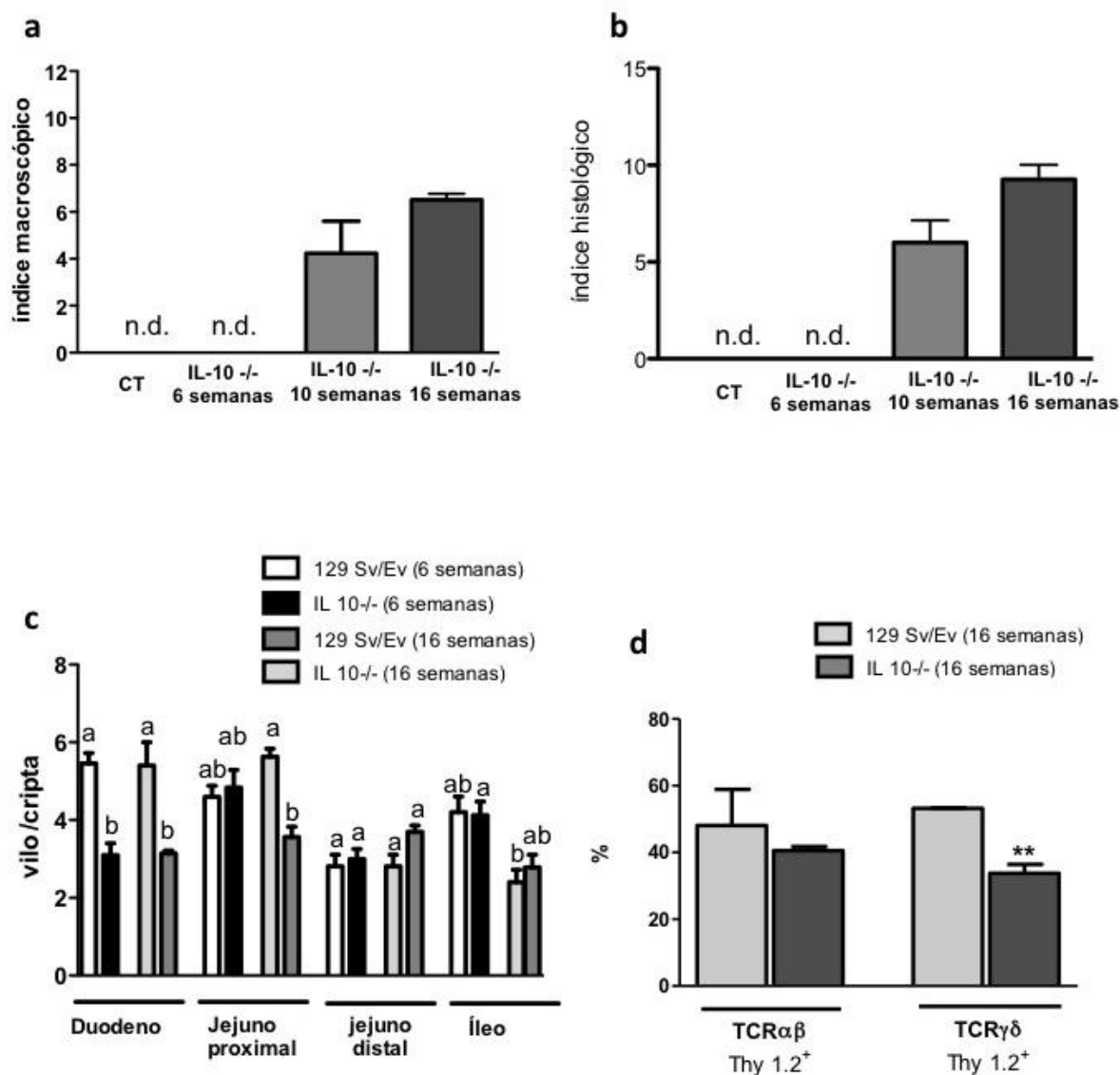


Figura 6: Índice inflamatório e perfil de linfócitos intraepiteliais.

A- índice macroscópico de camundongos deficientes em IL-10^{-/-} com 6, 10 e 16 semanas de idade e 129 Sv/Ev (controle). B- índice histológico de camundongos deficientes em IL-10^{-/-} com 6, 10 e 16 semanas de idade e 129 Sv/Ev (controle). N.d., não detectado. C- Razão vilo/crípta de camundongos IL-10^{-/-} com 6 e 16 semanas de idade e controles. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Letras representam diferença entre os grupos no mesmo segmento do intestino (p<0,05). D- Análise por citometria de fluxo da frequência de IELs isolados de camundongos IL-10^{-/-} e controles com 16 semanas de idade marcados com anticorpos fluorescentes para TCRγδ, TCRαβ e Thy 1.2. Barras representam a média e o erro padrão da amostra, n=3/grupo. Asteriscos representam diferença entre os grupos (p<0,05).

5.3. Camundongos deficientes em IL-10 possuem frequência reduzida de linfócitos T reguladores no intestino

Posteriormente, nós avaliamos o perfil dos linfócitos presentes na *lamina propria* do intestino delgado e grosso de camundongos deficientes em IL-10. O CD44 e o CD69 foram utilizados como marcadores de ativação de linfócitos tardia e recente, respectivamente. O CD44⁺ é uma glicoproteína de superfície celular envolvida na interação célula-célula, na migração e adesão celular. O ácido hialurônico é o principal ligante para CD44⁺. Após estimulação antigênica, os linfócitos T ativados passam a expressar grande quantidade de CD44. A alta expressão dessa molécula após a ativação permite que os linfócitos migrem para o sítio da inflamação (Goodison *et al.*, 1999). O CD69 é uma glicoproteína rapidamente induzida após a ativação de linfócitos. A ativação da proteína quinase (PKC) pela estimulação do TCR/CD3 direciona a indução de CD69 em células T (Testi *et al.*, 1994). Conforme mostrado na figura 7, camundongos IL-10^{-/-} com 6 e 16 semanas de idade apresentaram aumento de células T CD4⁺CD44⁺ na *lamina propria* do intestino grosso mas não no intestino delgado. Também não foram encontradas diferenças em linfócitos CD69⁺ na *lamina propria* do intestino delgado e grosso em IL-10^{-/-} com 6 e 16 semanas de idade. No entanto, a frequência de linfócitos recentemente ativados aumenta com a idade tanto em camundongos deficientes para IL-10 quanto nos controles (129 Sv/Ev). Na caracterização de células reguladoras do intestino delgado e grosso utilizamos as moléculas LAP (TGF- β de membrana) e o fator de transcrição Foxp3. Camundongos deficientes em IL-10 com 6 semanas de idade apresentaram frequência reduzida de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3 positivas no intestino grosso mas não de células T CD4⁺CD25⁺LAP⁺ enquanto nenhuma diferença foi encontrada no intestino delgado. A frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺LAP⁺ foi reduzida no intestino delgado e grosso de camundongos deficientes em IL-10 com colite grave (16 semanas de idade). Além disso, assim como os linfócitos T CD69⁺, as células T CD4⁺CD25⁺LAP⁺ também aumentaram com a idade em camundongos controles (129 Sv/Ev).

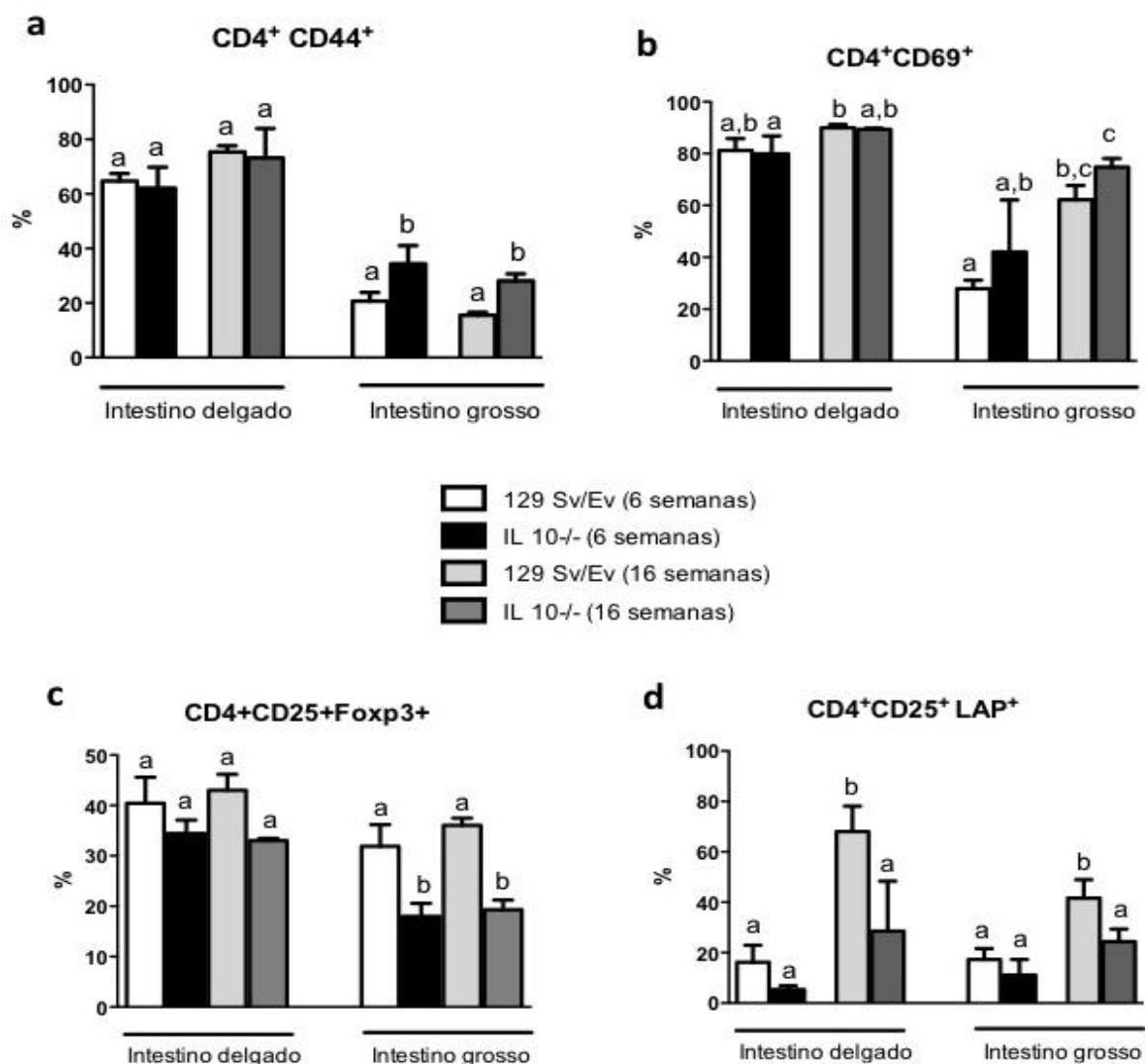


Figura 7: Perfil de linfócitos T na lamina própria do intestino delgado e grosso de camundongos IL-10^{-/-} durante o curso da inflamação intestinal.

Células da lamina própria de camundongos IL-10^{-/-} e controles com 6 e 16 semanas de idade foram obtidas através da extração com collagenase e submetidas a citometria de fluxo. A frequência de linfócitos T CD4⁺CD44⁺ (a), CD4⁺CD69⁺ (b), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (c) e CD4⁺CD25⁺LAP⁺ (d) foram determinadas no gate de linfócitos T CD4⁺. Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Letras representam diferença entre os grupos na mesma porção analisada (p<0,05).

5.4. Alterações na secreção de citocinas no intestino delgado e grosso de camundongos IL-10^{-/-}

Camundongos deficientes em IL-10 com 6 semanas de idade apresentaram aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17A somente no cólon. Os níveis das citocinas IFN- γ e TGF- β não foram alteradas em nenhuma porção intestinal nessa idade. Já com 10 semanas de idade, camundongos IL-10^{-/-} apresentaram níveis reduzidos de IL-17A no duodeno e aumento na produção de TGF- β no cólon. Com a gravidade da doença, camundongos deficientes em IL-10 passam a ter aumento na produção de IFN- γ no cólon e de TGF- β no jejuno proximal.

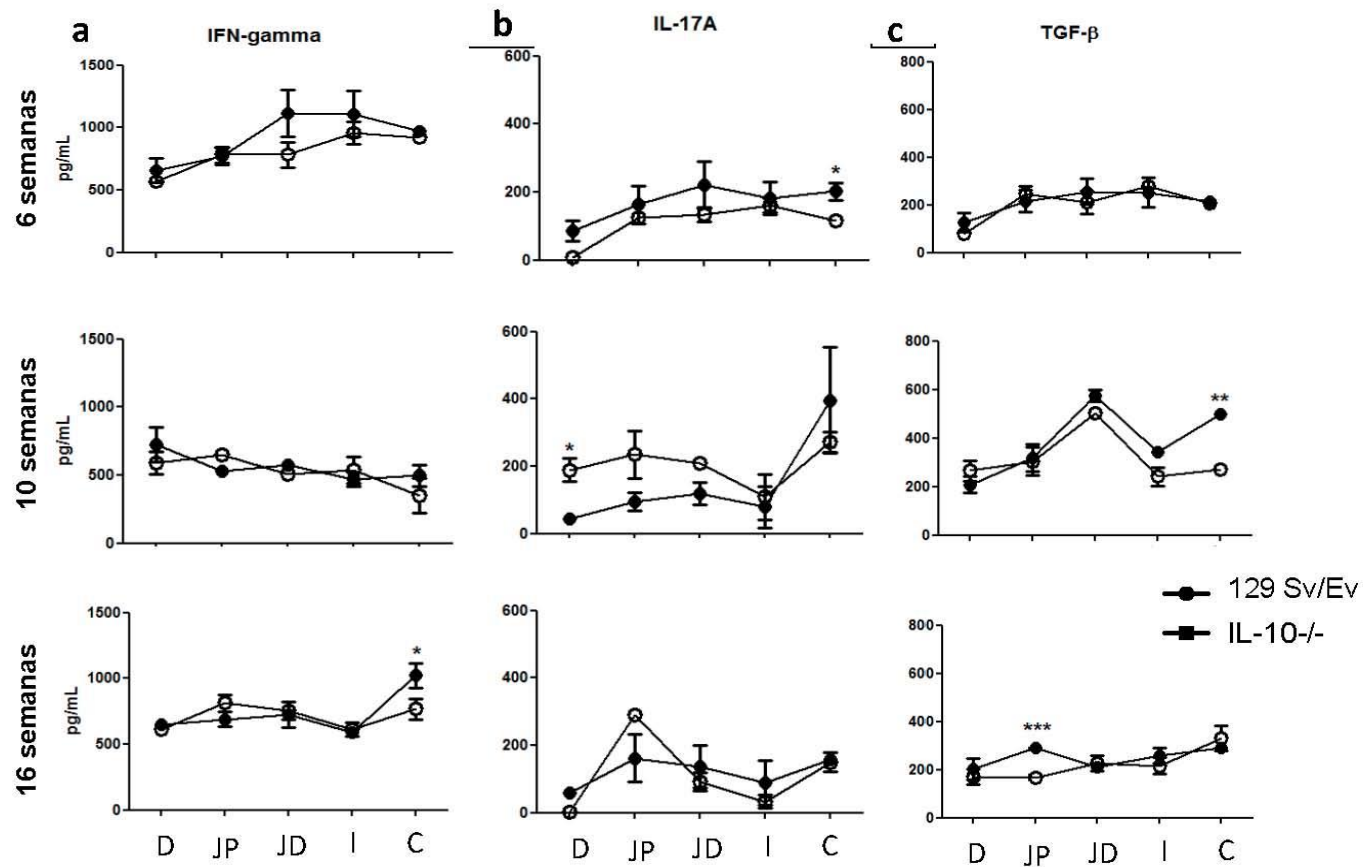


Figura 8: Perfil de citocinas na mucosa intestinal durante o curso da inflamação intestinal espontânea.

O intestino de camundongos IL-10^{-/-} com 6, 10 e 16 semanas de idade foram removidos, separados em porções intestinais (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal, íleo e cólon), pesados e e homogeneizados em um tampão. IFN- γ (a), IL-17A (b) e TGF- β (c) foram mensurados por ELISA. n=5/grupo. Asteriscos representam diferença entre os grupos no mesmo segmento intestinal (p<0,05). D- duodeno, JP- jejuno proximal, JD- jejuno distal, I- íleo, C- cólon.

5.5. A frequência de linfócitos B1 aumenta no peritônio e *lamina propria* de camundongos IL-10^{-/-} com colite

Uma vez que a citocina IL-10 é um potente estimulante da diferenciação de células B, da secreção de imunoglobulinas e geração de células B1 (Skeen *et al.*, 1996), nosso próximo passo foi investigar o impacto da ausência da IL-10 e inflamação na população de células B e na produção de imunoglobulinas. Não houveram mudanças na frequência de células B CD19⁺ no baço, peritônio e *lamina propria* mas a frequência dessas células estava reduzida na medula óssea. Já os linfócitos B1 (CD19⁺CD5⁺) aumentaram no peritônio, placa de Peyer e *lamina propria* tanto do intestino delgado quanto do intestino grosso em camundongos deficientes em IL-10 com 16 semanas de idade.

5.6. Os níveis de imunoglobulinas séricas se alteram durante o curso da doença em camundongos IL-10^{-/-}

A mensuração das imunoglobulinas séricas totais foi realizada em camundongos deficientes em IL-10 desde o desmame até 16 semanas de idade. Os níveis de IgG, IgM, IgA e IgE foram similares em camundongos IL-10^{-/-} e controles com 4 semanas de idade. Com 6 semanas de idade, houve um aumento nos níveis séricos da imunoglobulina IgM enquanto nenhuma mudança foi detectada para IgG, IgA e IgE. Porém, camundongos IL-10^{-/-} com 10 semanas de idade apresentam aumento nos níveis de IgG enquanto que com 16 semanas, houve um aumento pronunciado nos níveis de IgA sérica.

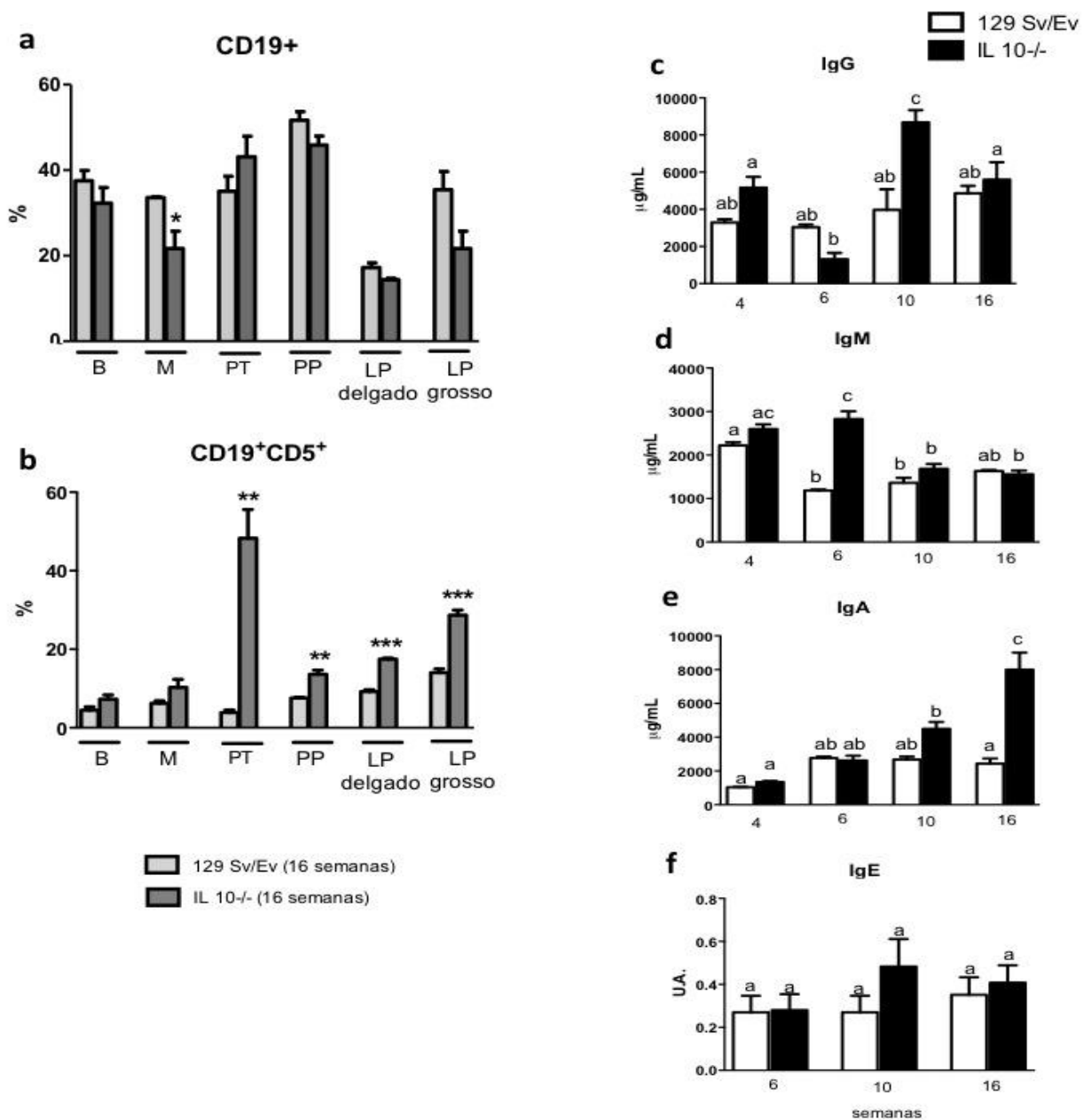


Figura 9: Células B e isotipo de imunoglobulinas durante o desenvolvimento da enterocolite. Células do baço (B), medula óssea (M), peritônio (PT), placa de Peyer (PP), *lamina propria* (LP) do intestino delgado e grosso foram obtidas de camundongos com 16 semanas de idade. A frequência de células B positivas (CD19⁺) (a) ou CD19⁺CD5⁺ (b) foram obtidas do gate de linfócitos ou na população CD19⁺, respectivamente. Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Asteriscos representam diferença entre grupos (p<0,05). O soro de camundongos IL-10^{-/-} ou controles com 4, 6, 10 ou 16 semanas de idade foram coletados e os níveis de IgG (c), IgM (d), IgA (e) e IgE (f) foram medidos por ELISA. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Letras representam diferença entre os grupos (p<0,05).

5.7. Camundongos deficientes em IL-10 com inflamação estabelecida na mucosa podem se tornar tolerantes somente por ingestão voluntária

Por fim, nós testamos o impacto da inflamação na mucosa de camundongos deficientes para IL-10 nas duas maiores atividades imunológicas que acontecem na mucosa intestinal: a produção de IgA secretória e a indução de tolerância oral. A concentração de IgA secretória foi medida nas fezes. De forma similar aos trabalhos descritos na literatura (Kuhn *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1996), camundongos deficientes em IL-10 apresentam aumento de sIgA com 10 semanas de idade mas não antes do estabelecimento da doença (com 4 e 6 semanas de idade). Além disso, notamos que os níveis de sIgA não estavam alterados em camundongos IL-10^{-/-} com inflamação grave (16 semanas de idade). Para testar a indução de tolerância oral, os camundongos receberam 20mg de ovalbumina (Ova) por administração intragástrica (gavagem) ou por ingestão voluntária em uma solução contendo 4mg/mL de Ova, como única fonte líquida. Sete dias após o tratamento oral, eles foram imunizados intraperitonealmente com o mesmo antígeno em adjuvante. Os níveis de IgE anti-Ova estavam reduzidos em camundongos controles (129 Sv/Ev) e em camundongos deficientes em IL-10 que receberam tratamento oral com Ova, tanto por ingestão voluntária como por gavagem, quando comparados aos animais do grupo imunizado. No entanto, os camundongos deficientes para IL-10 tornaram-se tolerantes para a produção de IgG1 anti-ova somente quando tratados com ovalbumina por ingestão voluntária, mas não por gavagem (Anexo 3).

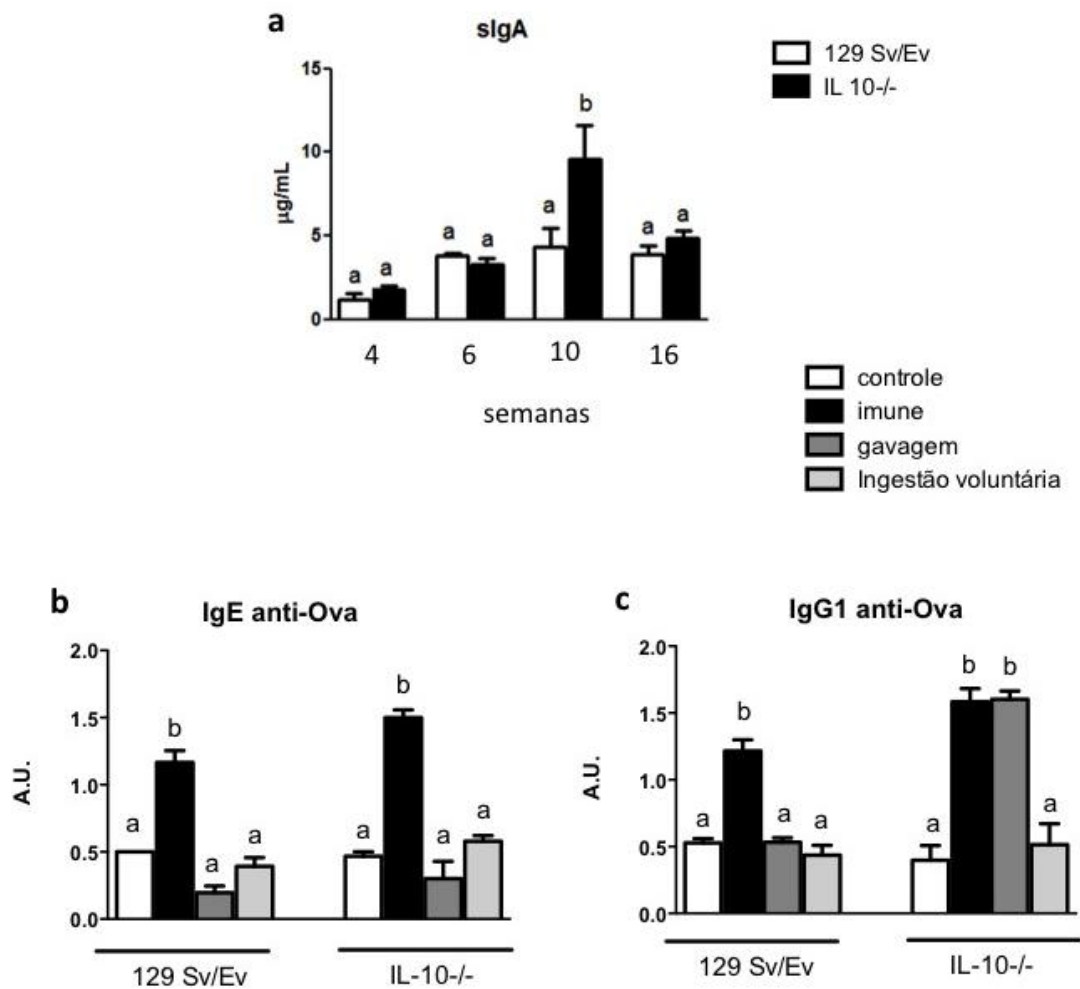


Figura 10: IgA secretória e tolerância oral.

Fezes intestinais de camundongos com 4, 6, 10 ou 16 semanas de idade foram coletadas e a sIgA total (a) foi medida por ELISA. Camundongos IL-10^{-/-} ou controles com 16 semanas de idade receberam ovalbumina por gavagem ou ingestão voluntária durante 3 dias consecutivos. Sete dias depois, os camundongos foram imunizados com uma injeção intraperitoneal de 0,2 ml de salina contendo 10 microgramas de Ova adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio. Quatorze dias depois, os animais receberam a mesma dose de Ova diluída em PBS, em injeção intraperitoneal. Os animais controles receberam 0,2mL de salina. Os anticorpos IgE e IgG1 anti-Ova (b) foram medidos por ELISA. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Letras representam diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

5. Resultados - Parte II

Efeito das dietas livres de proteínas inteiras na colite ulcerativa

5.8. Perfil de células apresentadoras de antígeno em animais alimentados com dieta isenta de proteínas inteiras desde o desmame

Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório mostraram que a ausência das proteínas da dieta resulta em um efeito inibitório na ativação imunológica local e sistêmica, impedindo o processo normal de maturação do sistema imune e afetando várias atividades imunológicas. Os animais alimentados com dieta isenta de proteínas apresentam um perfil Th2 sendo detectados altos níveis de IL-4 e IL-10 no baço (Menezes e cols., 2003). Nos perguntamos se as células apresentadoras de antígeno (APCs) estariam afetadas pela retirada das proteínas alimentares. Decidimos medir a produção de IL-12 em macrófagos já que essa citocina está envolvida na diferenciação de células T *naive* em células Th1 produtoras de IFN- γ e os níveis dessa citocina encontraram-se reduzidos em animais alimentados com dieta isenta de proteínas inteiras. Camundongos C57BL/6 e BALB/c receberam desde o desmame (3 semanas de idade) até completarem 8 semanas de idade uma dieta controle contendo caseína (Cas) como fonte protéica ou uma dieta experimental em que a caseína foi substituída pelos aminoácidos livres que compõe a molécula de caseína. Essa dieta livre de proteínas inteiras foi denominada Aminoácido (Aa). Macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais foram estimulados *in vitro* com IFN- γ e LPS. Os níveis de IL-12p70 foram detectados por ELISA nos sobrenadantes de cultura. Conforme mostrado na figura a seguir, camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam dieta isenta de proteínas inteiras desde o desmame apresentam uma dramática redução nos níveis de IL-12 quando comparado a animais controles. Além disso, os níveis de IL-12 nesses animais foram similares aos encontrados em animais neonatos. Dessa forma, a ausência de proteínas alimentares afeta a capacidade de APCs em produzir IL-12 (Anexo 2).

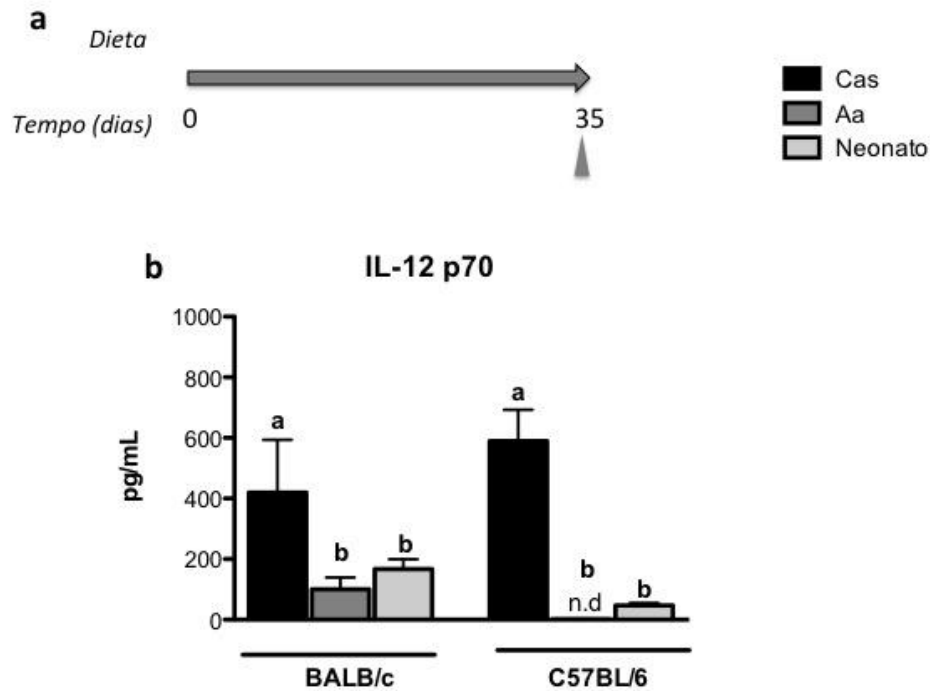


Figura 11: Produção de IL-12p70 em macrófagos de camundongos alimentados com dieta de aminoácidos.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 receberam desde o desmame até 8 semanas de idade uma dieta AIN93G contendo caseína (Cas) ou aminoácidos livres (Aa). Camundongos BALB/c neonatos foram utilizados para comparação (a). Macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos camundongos foram estimulados *in vitro* com LPS (20 ng/poço) mais INF- γ (20 ng/poço). Sobrenadantes foram coletados 24 horas depois e a produção de IL-12 foi medida por ELISA. N.d., não detectado. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Letras diferentes mostram diferenças entre grupos ($p < 0,05$).

5.9. Dieta de aminoácidos livres agrava a colite experimental em camundongos

Nossa primeira estratégia de imuno-modulação para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII) consistiu da retirada de proteínas inteiras da dieta. Uma vez que modelo de colite induzida por DSS, as células apresentadoras de antígeno apresentam papel crucial na iniciação da inflamação intestinal e a citocina IL-12 é relevante nessa etapa, nosso dado anterior endossa a utilização de dieta contendo aminoácidos livres na prevenção da colite.

Os camundongos receberam as dietas experimentais por duas semanas. Iniciamos a introdução da nova dieta na semana anterior a indução de colite por DSS. Isso foi feito tendo em vista que o padrão alimentar é modificado pela introdução de novas dietas. Os animais de ambos grupos ingeriram as mesmas quantidades de dieta, conforme descrito em outros estudos do laboratório (dados não mostrados). Os camundongos que receberam dieta contendo aminoácidos livres apresentaram menor comprimento do cólon quando comparado aos animais que receberam dieta contendo proteínas inteiras. O índice macroscópico inclui a porcentagem de perda de peso, diarreia e sangramento retal. Esse não diferiu entre os grupos apesar da perda de peso em camundongos que ingeriram Aa ter sido maior. No entanto, a análise histológica revelou que camundongos do grupo Aa apresentaram uma maior perda da arquitetura da mucosa e um extenso infiltrado inflamatório. O índice histológico confirmou o agravamento da colite nos animais que ingerirem aminoácidos livres.

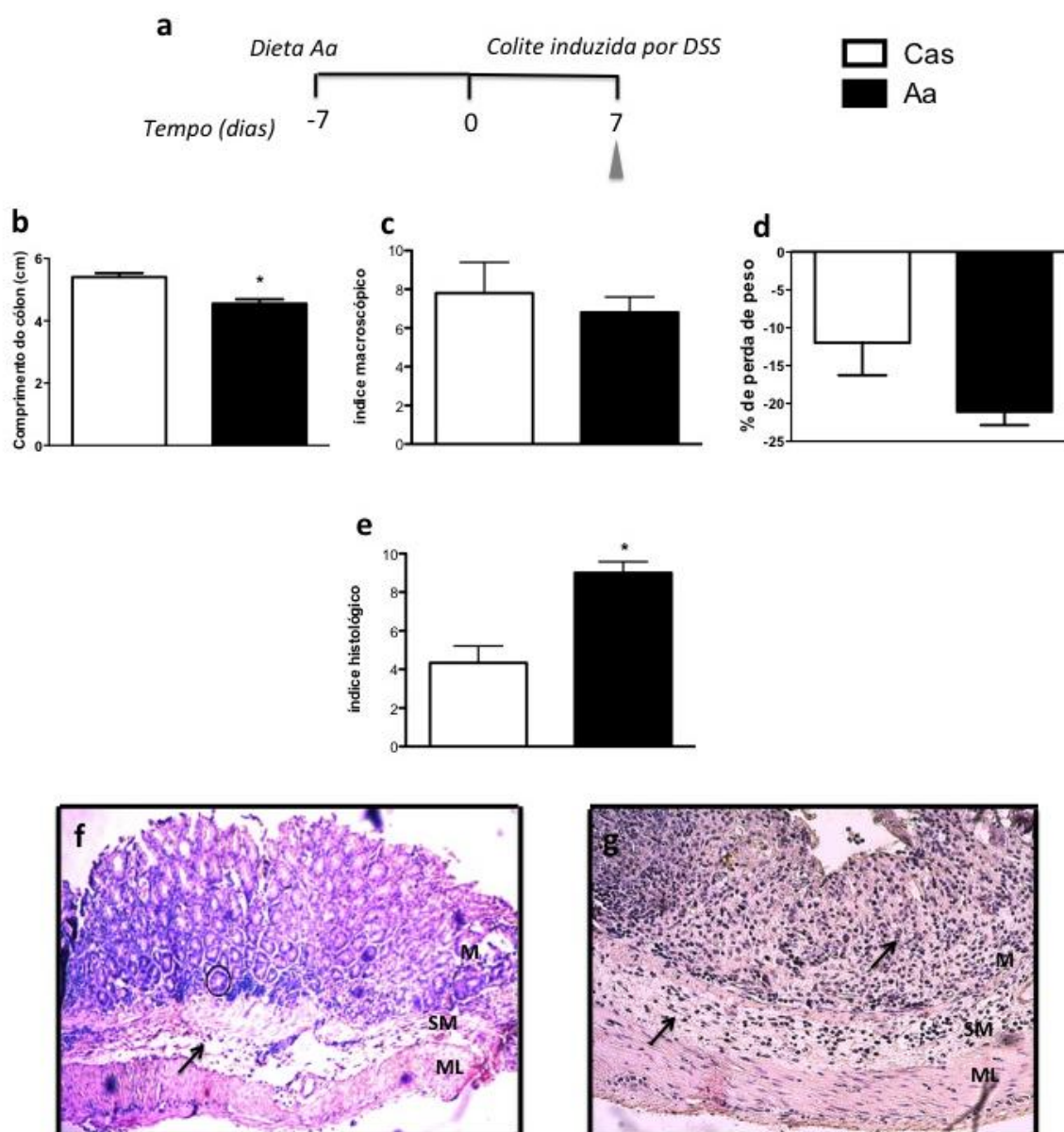


Figura 12: índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados com dieta contendo aminoácidos livres.

Camundongos C57BL/6 com aproximadamente 18 gramas receberam por 2 semanas dieta AIN93G contendo caseína (Cas) ou aminoácidos livres (Aa) em substituição a caseína. Na segunda semana de ingestão das dietas, a colite foi induzida com DSS a 2% diluído em água durante 7 dias (a). Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em cm do ceco à porção terminal do cólon) (b), índice macroscópico da colite (c), % de perda de peso (d) índice histológico (e). Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Cortes histológicos representativos dos grupos caseína (f), Aminoácido (g). As lâminas histológicas foram coradas em H&E, aumento de 40x. Círculos mostram as criptas da camada mucosa (M). As setas apontam para o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa (M) e submucosa (SM) dos camundongos. ML, camada muscular. Asterisco indica diferença entre grupos ($p < 0,05$).

5.10. Dieta de aminoácidos livres reduz hemoglobina sérica de camundongos com colite

Para averiguar os possíveis efeitos da dieta com aminoácidos no estado nutricional dos camundongos submetidos ao protocolo de indução de colite, realizamos as dosagens de albumina, proteínas séricas totais e hemoglobina no sangue. Os camundongos que receberam dieta com aminoácidos livres apresentaram redução na concentração de hemoglobina mas não de albumina e proteínas séricas totais.

Tabela 8: Dosagens de albumina, proteínas séricas totais e hemoglobina em camundongos tratados com dieta isenta de proteínas inteiras

	Caseína	Aminoácido
Albumina (mg/dL)	6,4 ± 2,3	4,6 ± 2,4
Proteínas séricas totais (mg/dL)	15,3 ± 2,4	14,2 ± 2,9
Hemoglobina (mg/dL)	5,15 ± 1,0	3,7 ± 0,7 *

Média ± Desvio padrão da amostra

5.11. Dieta de aminoácidos livres reduz IgA secretória em camundongos com colite

Posteriormente, nos perguntamos se o agravamento da colite pela retirada de proteínas da dieta não estava relacionado a alterações na IgA secretória. A sIgA está envolvida em diversos eventos imuno-moduladores na mucosa e seu papel protetor já foi evidenciado no modelo de colite por DSS (Murthy *et al.*, 2006; Suzuki e Fagarasan, 2008). De fato, a retirada de proteínas inteiras da dieta levou a uma redução nos níveis de sIgA no cólon de camundongos com colite.

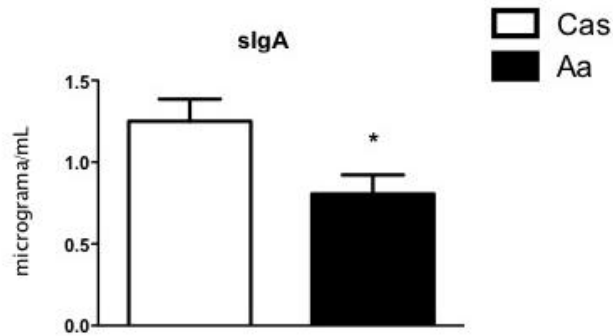


Figura 13: sIgA de camundongos com colite tratados com dieta contendo aminoácidos livres. Camundongos C57BL/6 com aproximadamente 18 gramas receberam por 2 semanas dieta AIN93G contendo caseína (Cas) ou aminoácidos livres (Aa) em substituição a caseína. Na segunda semana de ingestão das dietas, a colite foi induzida com DSS a 2% diluído em água durante 7 dias. IgA secretória mensurada por ELISA nas fezes dos camundongos com colite. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Asterisco indica diferença entre grupos ($p < 0,05$).

5.12. Dieta contendo di-tripeptídeos reduz a perda de peso mas não a inflamação intestinal

Uma vez a dieta com aminoácidos livres agravou a colite experimental dos camundongos com redução da IgA secretória, decidimos testar uma dieta contendo di-tripeptídeos que podem ser mais facilmente absorvidos pela mucosa intestinal. Utilizamos o mesmo desenho experimental realizado com a dieta contendo aminoácidos livres. Conforme observado na figura 14, a dieta contendo di-tripeptídeos não melhorou nem o comprimento do cólon nem o índice macroscópico de inflamação. No entanto, a porcentagem de perda de peso foi menor nos animais que ingerirem di-tripeptídeos. Apesar disso, não houve melhora na inflamação do cólon e o índice histológico foi semelhante entre os grupos.

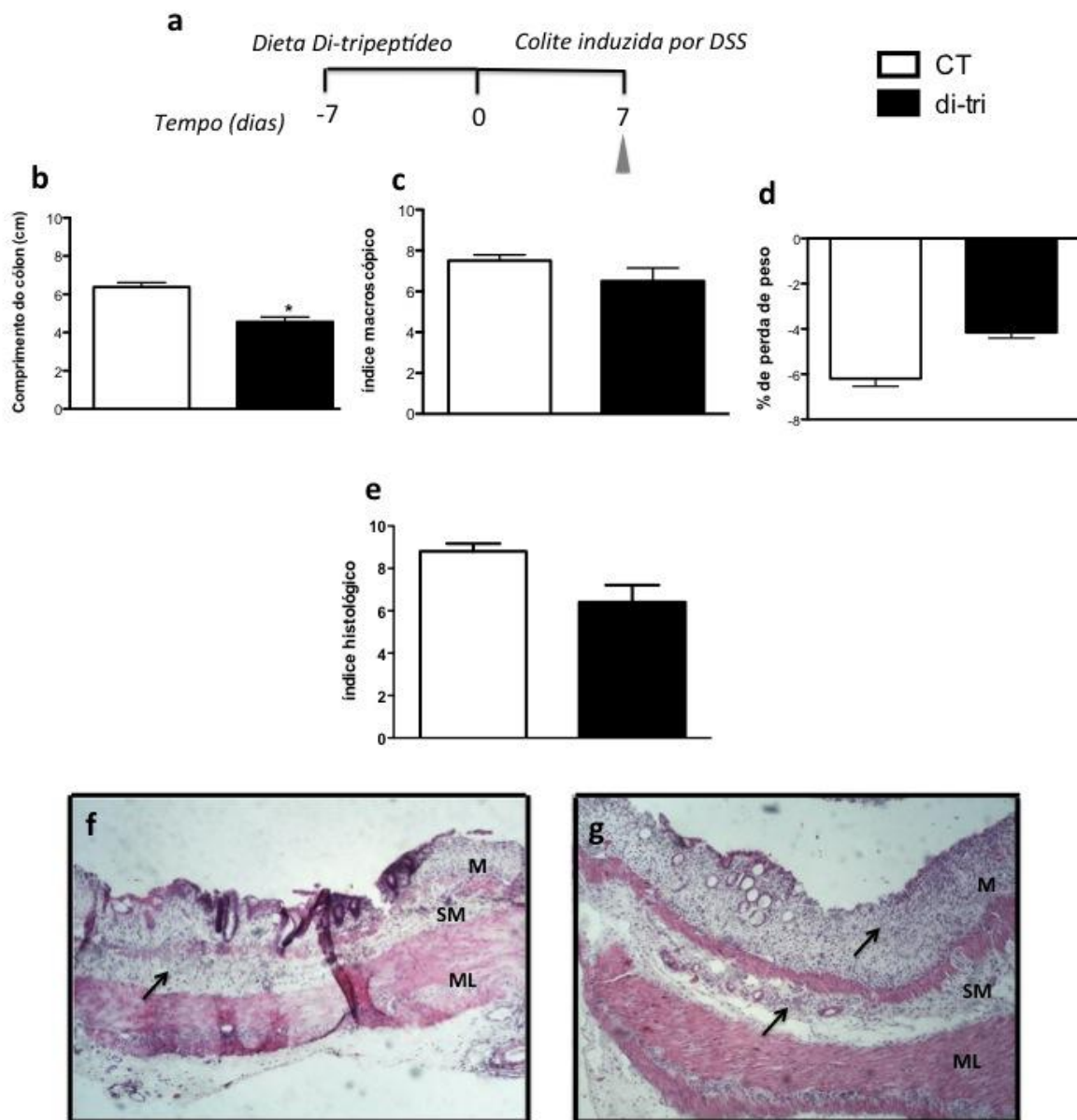


Figura 14: Índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados com dieta contendo di-tripeptídeos.

Camundongos C57BL/6 com aproximadamente 18 gramas receberam por 2 semanas dieta AIN93G contendo proteína do soro do leite (CT) ou aminoácidos livres (Aa) em substituição a caseína. Na segunda semana de ingestão das dietas, a colite foi induzida com DSS a 2% diluído em água durante 7 dias (a). Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em cm do ceco à porção terminal do cólon) (b), índice macroscópico da colite (c), % de perda de peso (d) índice histológico (e). Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Cortes histológicos representativos dos grupos CT (proteína do soro do leite) (f), di-tripeptídeos (hidrolisado do soro do leite) (g). As lâminas histológicas foram coradas em H&E, aumento de 40x. As setas apontam para o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa (M) e submucosa (SM) dos camundongos. ML, camada muscular. Asterisco indica diferença entre grupos (p<0,05).

5. Resultados - parte III

Lactococcus lactis produtor de Hsp65 modula colite murina

5.13. *L. lactis* produtor de Hsp65 melhora inflamação aguda induzida por DSS

Camundongos C57BL/6 foram divididos em 4 grupos experimentais. No primeiro grupo, os camundongos C57BL/6 não foram manipulados, sendo o grupo denominado controle (CT). No segundo grupo, a colite foi induzida pela administração de DSS mas os animais não receberam tratamento oral prévio, ingerindo somente água (grupo H₂O+DSS). Esse grupo foi denominado colite. O terceiro grupo de animais recebeu tratamento oral com o *Lactococcus lactis* contendo o plasmídeo vazio e a colite também foi induzida pela administração de DSS (grupo *L. lactis*+DSS). O último grupo recebeu tratamento oral prévio com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 e a colite também foi induzida (grupo *L. lactis* Hsp65+DSS). Os animais tratados previamente receberam o *L. lactis* contendo o plasmídeo vazio ou *L. lactis* produtor de Hsp65 por 4 dias consecutivos. Dez dias após o último dia de tratamento oral, os camundongos receberam DSS diluído na água de beber por 7 dias conforme ilustrado no esquema da Figura 15. Houve uma redução no comprimento do cólon de camundongos que receberam DSS quando comparados aos animais não manipulados (grupo controle). Essa redução não ocorreu nos camundongos tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65, estando o comprimento do cólon nesses camundongos similar ao de camundongo do grupo controle (figura 15b). Conforme apresentado na figura 15c, enquanto camundongos dos grupos colite e *L. lactis*+DSS apresentaram índice em torno de 4 e 6, respectivamente, os camundongos tratados com *L. lactis* Hsp65 tiveram índice em torno de 1. Posteriormente, avaliamos a histologia da porção distal do cólon, porção mais usualmente comprometida nesse modelo de colite. Novamente, os camundongos que receberam água ou *L. lactis* anteriormente à indução de colite apresentaram inflamação evidente na mucosa e submucosa colônica (figuras f e g) enquanto que camundongos tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65 apresentaram uma discreta infiltração de células na submucosa sem qualquer sinal de dano à arquitetura da mucosa (figura h).

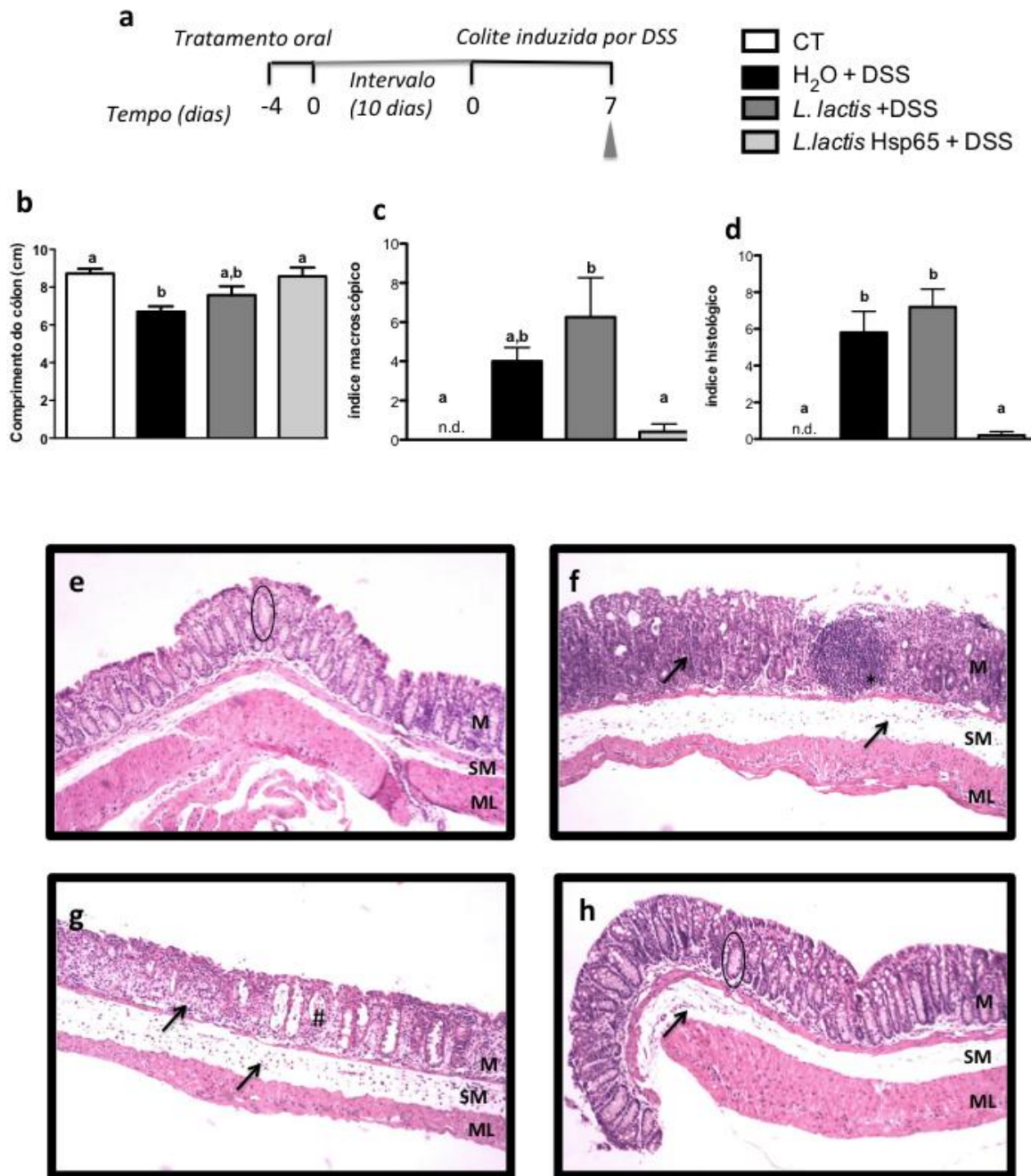


Figura 15: índices macroscópico e histológico de camundongos com colite tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos C57BL/6 com aproximadamente 18 gramas receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias (a). Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em cm do ceco à porção terminal do cólon) (b), índice macroscópico da colite (c) e índice histológico (d). Nd, não detectado. Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Cortes histológicos representativos dos grupos controle (animais não manipulados) (e), H₂O+DSS (f), *L. lactis*+DSS (g), *L. lactis* Hsp65+DSS (h). As laminae histológicas foram coradas em H&E, aumento de 40x. Círculos mostram as criptas da camada mucosa (M). As setas apontam para o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa (M) e submucosa (SM). O asterisco (*) identifica um agregado linfóide. # indica o abscesso da cripta. ML, camada muscular. Letras indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

5.14. Efeito de *L. lactis* produtor de Hsp65 na permeabilidade intestinal e IgA secretória de camundongos com colite

Uma vez que a ingestão de bactérias pode alterar a permeabilidade intestinal e a produção de sIgA (Perdigon *et al.*, 1995), nosso próximo passo foi averiguar quais os efeitos de *L. lactis* produtor de Hsp65 nesses parâmetros. O tratamento prévio com *L. lactis* produtor de Hsp65 não alterou a produção de sIgA nem a permeabilidade intestinal em camundongos com colite.

Tabela 9: IgA secretória e permeabilidade intestinal

	H₂O+DSS	<i>L. lactis</i>+DSS	<i>L. Lactis</i> Hsp65+ DSS
sIgA (µg/mL)	18,35 ± 1,67	13,70 ± 7,0	13,25 ± 1,21
Permeabilidade intestinal (% de dose)	0,0075 ± 0,003	0,0077 ± 0,001	0,0068 ± 0,002

Média ± Desvio padrão da amostra

5.15. *L. lactis* produtor de Hsp65 altera a secreção de citocinas no cólon de camundongos com colite

As citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β foram mensuradas no extrato de cólon em dois tempos experimentais: 3 dias após a primeira administração de DSS, período de início da infiltração de células no cólon (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2006) e com 7 dias da administração do fármaco. Com 3 dias de indução da colite, houve um aumento nos níveis de IFN- γ no cólon de camundongos do grupo colite quando comparados aos animais do grupo controle, que se manteve alta também com 7 dias de ingestão de DSS (figura 16a). A citocina IL-6 encontrou-se reduzida em animais que receberam *L. lactis* quando comparado ao grupo colite. No entanto, com 7 dias de indução da doença, os níveis de IL-6 elevam-se em animais do grupo colite enquanto os animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 apresentaram os níveis de IL-6 similares a de animais não manipulados. A citocina IL-17 não foi alterada em nenhum tempo experimental avaliado. A citocina IL-4 aumentou somente com 7 dias de administração de DSS em animais do grupo colite enquanto os animais do grupo *L. lactis* Hsp65 novamente mantiveram os níveis similares aos dos camundongos controles. As concentrações de IL-5 encontraram-se reduzidas no grupo *L. lactis* Hsp65 quando comparado ao grupo colite tanto com 3 quanto com 7 dias de ingestão de DSS. Já a citocina anti-inflamatória IL-10 reduz em animais do grupo *L. lactis*+DSS. Porém, animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 mantém os níveis semelhantes a de camundongos controles. Por fim, a citocina TGF- β estava reduzida em animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 com 3 dias de administração de DSS quando comparada ao grupo colite. Com 7 dias de ingestão do fármaco, a produção de TGF- β eleva-se em animais doentes enquanto o grupo *L. lactis* Hsp65 apresenta novamente níveis similares a dos animais não manipulados.

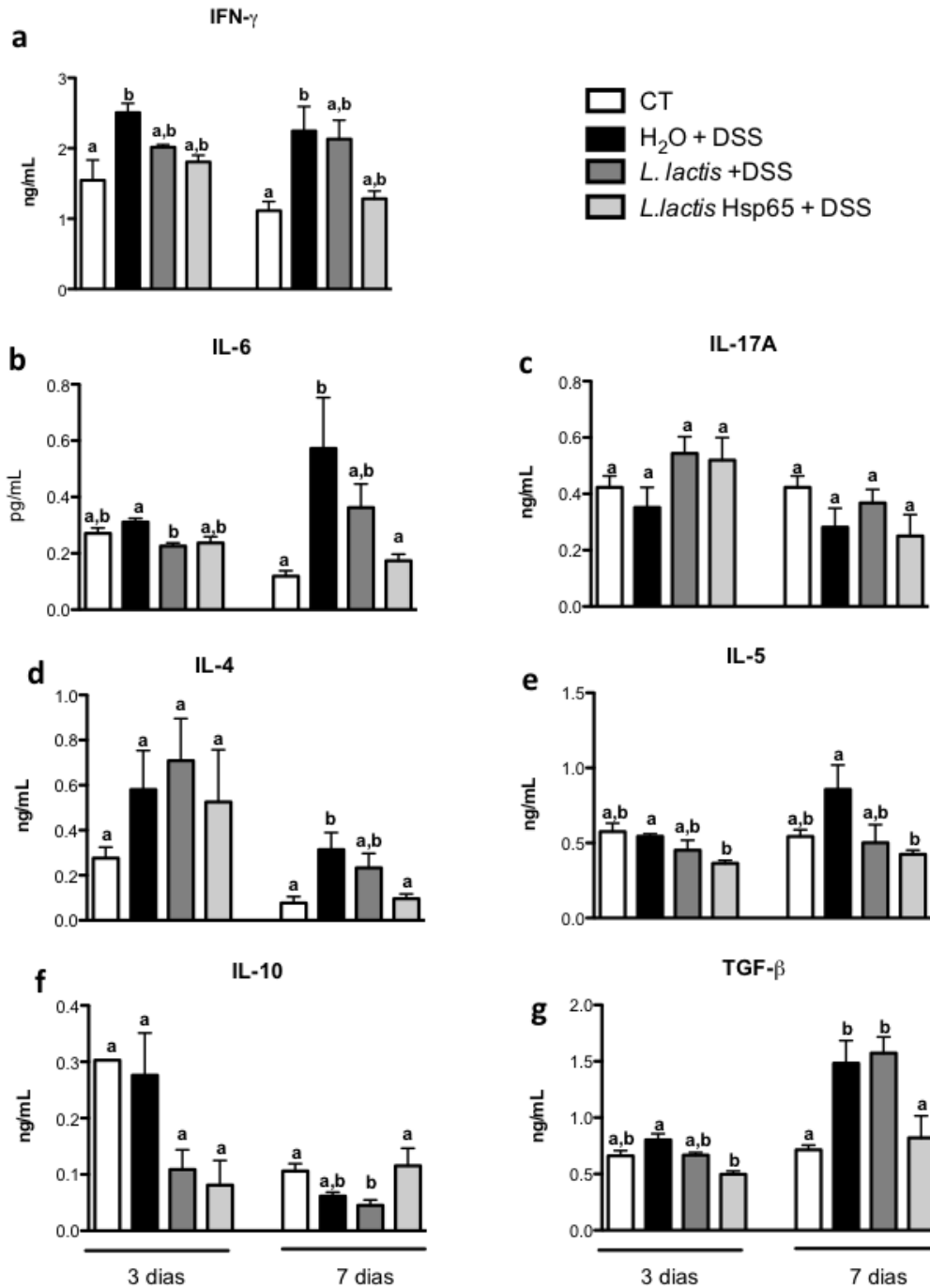


Figura 16: Citocinas no extrato do cólon de camundongos com colite tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Dois tempos experimentais foram analisados: com 3 e 7 dias de administração de DSS. Amostras do cólon de camundongos foram limpas, secas, pesadas e homogeneizadas em um tampão de extração. A mensuração das citocinas foi realizada por ELISA. IFN- γ (a), IL-6 (b), IL-17 (c), IL-4 (d), IL-5 (e), IL-10 (f) e TGF- β (g). Barras representam a média e o erro padrão, n=5/grupo. Letras indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

5.16. *L. Lactis* produtor de Hsp65 aumenta células T reguladoras com 3 dias da indução da colite

Avaliamos o aparecimento de células T efetoras e células T reguladoras nos linfonodos cecais, linfonodos mesentéricos e baços de camundongos em que a colite foi induzida por DSS. Denominamos de células T efetoras àquelas com o fenótipo $CD4^+CD25^-CD45RB^{low}$ e de células T reguladoras àquelas com fenótipo $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$. O CD45RB é expresso em altos níveis nas células T *naive* e é regulado negativamente em células que contataram o antígeno. A população $CD45RB^{hi}CD25^+$ representa as células recentemente ativadas enquanto a população $CD45RB^{low}$ é heterogênea e contém tanto células T efetoras ($CD4^+CD25^-CD45RB^{low}$) como também células T reguladoras ($CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$) (Bottomly *et al.*, 1989; Annacker *et al.*, 2001). Também investigamos o aparecimento de células expressando LAP (TGF- β de membrana). Com 12 horas de administração de DSS, observamos redução de células T efetoras nos linfonodos mesentéricos e baços de camundongos que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 enquanto *L. lactis* foi capaz de reduzir as células T efetoras apenas no baço. Houve um aumento nas células reguladoras $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ nos linfonodos mesentéricos de camundongos do grupo colite quando comparados aos animais do grupo controle. Esse aumento não foi observado nos animais que receberam previamente tanto *L. lactis* quanto *L. lactis* produtor de Hsp65. Já as células T $CD4^+CD25^+LAP^+$ estavam aumentadas no baço de animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65. Com 3 dias de administração de DSS, observamos uma redução das células reguladoras $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ nos baços dos animais do grupo colite enquanto que, nos camundongos do grupo *L. lactis* Hsp65+DSS, a porcentagem manteve-se similar àquela encontrada no grupo controle. Além disso, a ingestão de *L. lactis* produtor de Hsp65 levou a um aumento da porcentagem de células $CD4^+CD25^+LAP^+$ e de células efetoras nos baços desses animais quando comparados aos do grupo colite. Com 7 dias, houve um aumento de células T efetoras nos linfonodos cecais dos animais que receberam a bactéria quando comparados aos animais do grupo DSS.

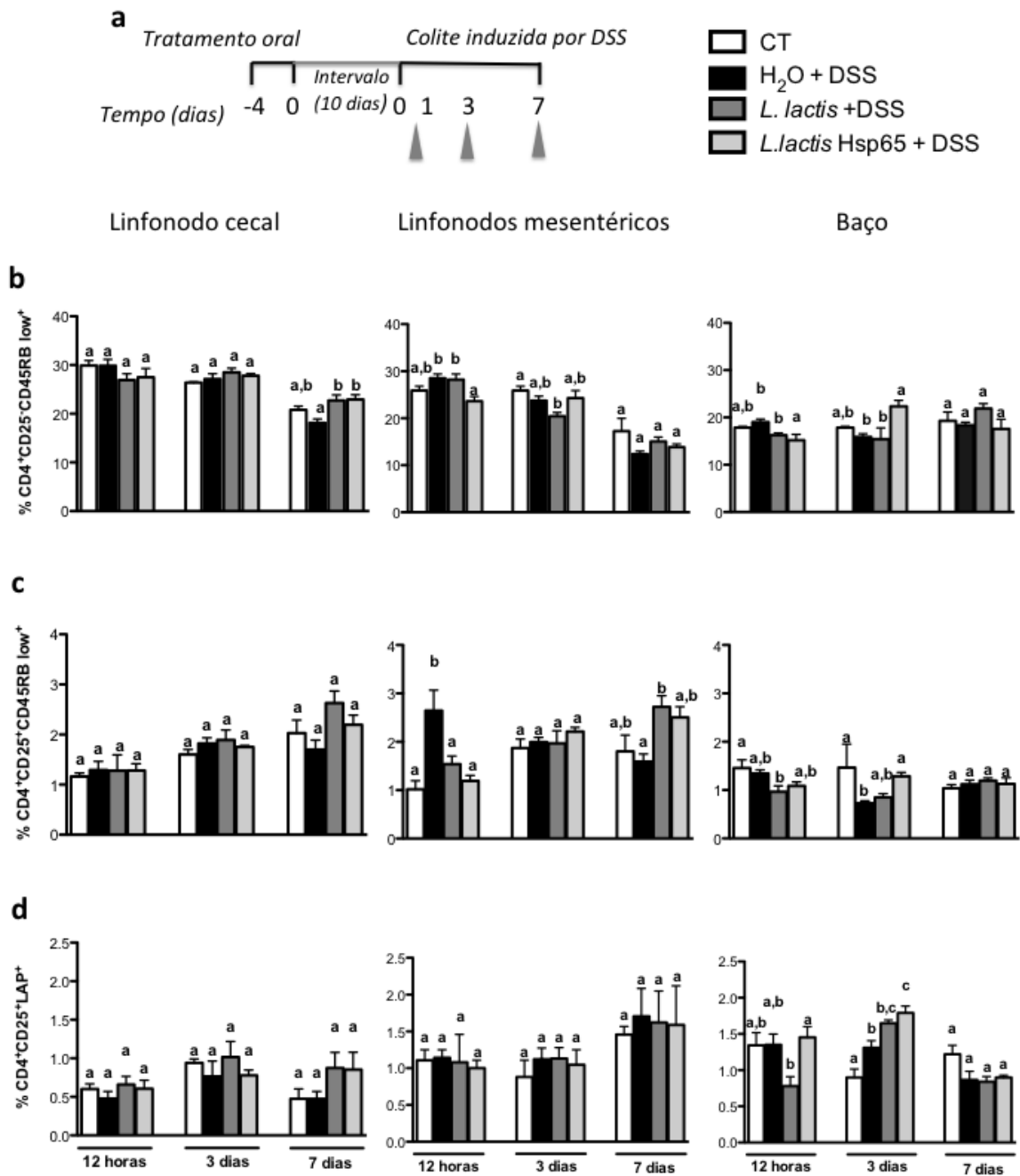


Figura 17: Aparecimento de células T durante o curso da enterocolite em animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Três tempos experimentais foram analisados: com 12 horas, 3 e 7 dias de administração de DSS (setas) (a). Células dos linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e baço foram isoladas e submetidas a técnica de citometria de fluxo. A frequência de células CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low}⁺ (a), CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low}⁺ (b) e CD4⁺CD25⁺LAP⁺ (c) fora obtidas a partir do *gate* de linfócitos totais. Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Letras indicam diferença entre grupos (p<0,05).

5.17. *L. lactis* produtor de Hsp65 apresenta maior razão de células T reguladora/T efetora

Uma vez que existiram oscilações nas populações de linfócitos efetores e reguladores de animais tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65, principalmente no baço, analisamos a relação entre células reguladoras com o fenótipo CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} e células efetoras CD4⁺CD25⁻CD45RB^{low}. Esse tipo de análise foi descrito anteriormente por Monteiro e colaboradores (2008). Nesse estudo, os autores demonstraram que um aumento na razão entre células T efetoras patogênicas e células T regs estava associado à gastrite autoimune pós-timectomia em camundongos (Monteiro *et al.*, 2008). A razão Treg/T efetora foi semelhante entre os grupos experimentais com 12 horas e 3 dias de administração de DSS. No entanto, com 7 dias de ingestão de DSS, *L. lactis* produtor de Hsp65 promoveu aumento da razão Treg/Tefetora quando comparamos com os animais do grupo que recebeu *L. lactis* com plasmídeo vazio.

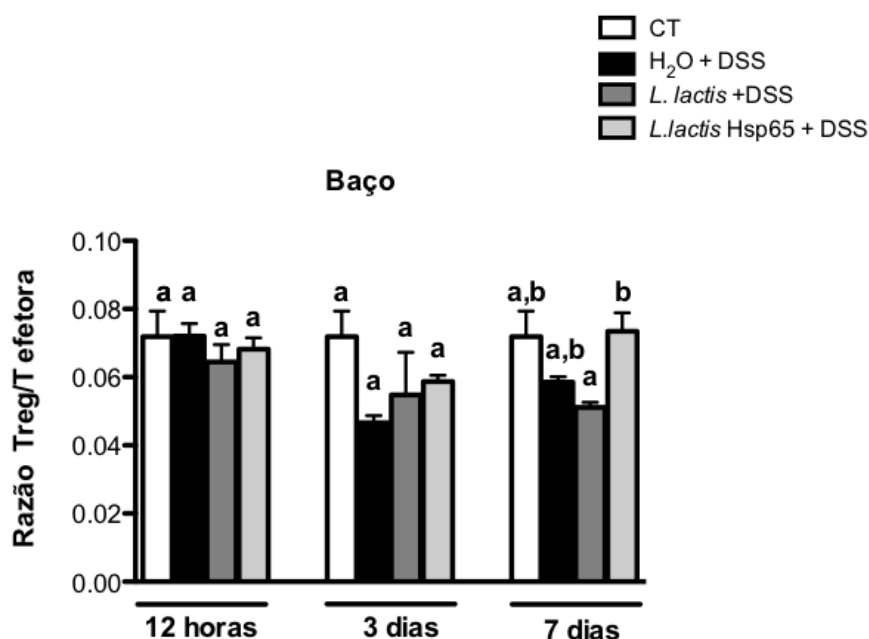


Figura 18: Razão Treguladora/Tefetora no baço de animais tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65.

A porcentagem de células reguladoras CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} foi dividida pela porcentagem de células efetoras CD4⁺CD25⁻CD45RB^{low} de cada animal nos tempos experimentais de 12 horas, 3 ou 7 dias de administração de DSS. Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Letras indicam diferença entre grupos (p<0,05).

5.18. *L. lactis* produtor de Hsp65 reduz a expressão de CD44⁺ em linfócitos T nos linfonodos de camundongos com colite

Nosso próximo passo foi verificar a expressão de CD44⁺ em linfócitos presentes nos linfonodos que drenam a mucosa. Com 3 dias de administração de DSS, os camundongos dos grupos colite e *L. lactis*+DSS apresentaram aumento da expressão de CD44 em linfócitos T CD4⁺ nos linfonodos mesentéricos, enquanto que *L. lactis* com o plasmídeo vazio também aumentou a expressão de CD44 em células T CD4⁺ no linfonodo cecal. Porém, com 7 dias de administração de DSS nenhuma diferença na expressão de CD44 em linfócitos T CD4⁺ foi encontrada nos linfonodos mesentéricos enquanto que o aumento da expressão de CD44 em linfócitos CD4⁺ foi novamente notada nos grupos colite e *L. lactis*+DSS. A expressão de CD44⁺ em células T CD4⁺ positivas nos animais que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 permanecem similares a expressão observada no grupo controle.

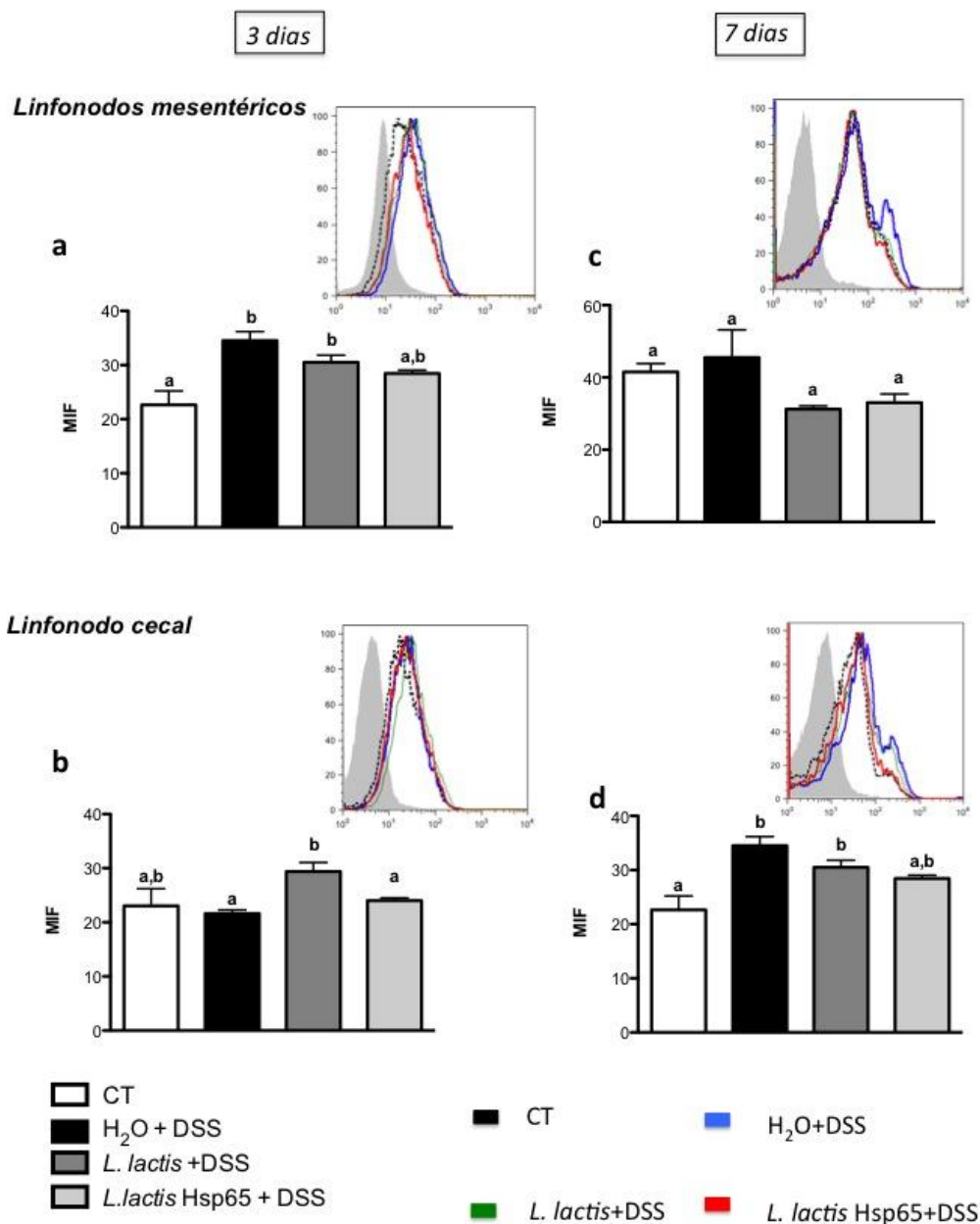


Figura 19: Expressão de CD44 em linfócitos T CD4⁺ dos linfonodos drenantes da mucosa.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Dois tempos experimentais foram analisados: com 3 e 7 dias de administração de DSS. (a) Células T CD4⁺CD44⁺ dos linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal com 3 dias de ingestão de DSS. (b) Células T CD4⁺CD44⁺ dos linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal com 7 dias de ingestão de DSS. A expressão (média geométrica) de CD44 foi obtida a partir da região de linfócitos T CD4⁺. Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Letras indicam diferença entre grupos (p<0,05).

5.19. *L. lactis* produtor de Hsp65 aumenta a frequência de células dendríticas positivas para CD80, CD86, CD40 e CD103 no baço de camundongos após indução de colite

Uma vez que o tratamento oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 alterou o aparecimento de células T efetoras e reguladoras durante o curso da colite, nosso próximo passo foi averiguar seu efeito em células dendríticas (DCs). As células dendríticas são as mais eficientes células apresentadoras de antígeno (Manicassamy e Pulendran, 2011). O CD11c é usualmente utilizado como marcador para essas células. CD11c é uma integrina expressa principalmente em macrófagos teciduais e em células dendríticas. A integrina CD11c se liga ao fragmento do complemento iC3b, a moléculas da matriz celular como o fibrinogênio e a moléculas de adesão celular (Steinman *et al.*, 1997). Dois subtipos principais de DCs foram caracterizadas em camundongos: as células dendríticas mielóides com o fenótipo CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻ e as células dendríticas linfóides com o fenótipo CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁺ (Chirido *et al.*, 2005). Nesse estudo, analisamos as células CD11c⁺CD11b⁻, consideradas críticas na indução da tolerância periférica (Manicassamy e Pulendran, 2011). Essas células foram também marcadas com anticorpos para CD80, CD86, CD40 e CD103. CD80 e CD86 promovem o sinal de co-estimulação necessário para a ativação e sobrevivência de células T. CD80 e CD86 são ligantes para duas diferentes proteínas na superfície de células T: CD28 (envolvido na associação intercelular) e CTLA-4 (envolvido na regulação e dissociação celular) (Lanier *et al.*, 1995). CD40 é também um co-estimulador encontrado em APCs. Esse se liga a CD40L em linfócitos (Banchereau *et al.*, 1994). O CD103 é a integrina α E β 7 que direciona as células para a mucosa (Coombes *et al.*, 2007). A frequência de células positivas para CD80, CD86, CD40 e CD103 encontraram-se elevadas em animais que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 por via oral quando comparado aos demais grupos. No entanto, a análise da intensidade média de fluorescência de CD80, CD86 e CD40 não diferiu entre os grupos experimentais. Apenas a expressão de CD103 encontrou-se elevada no grupo *L. lactis* Hsp65.

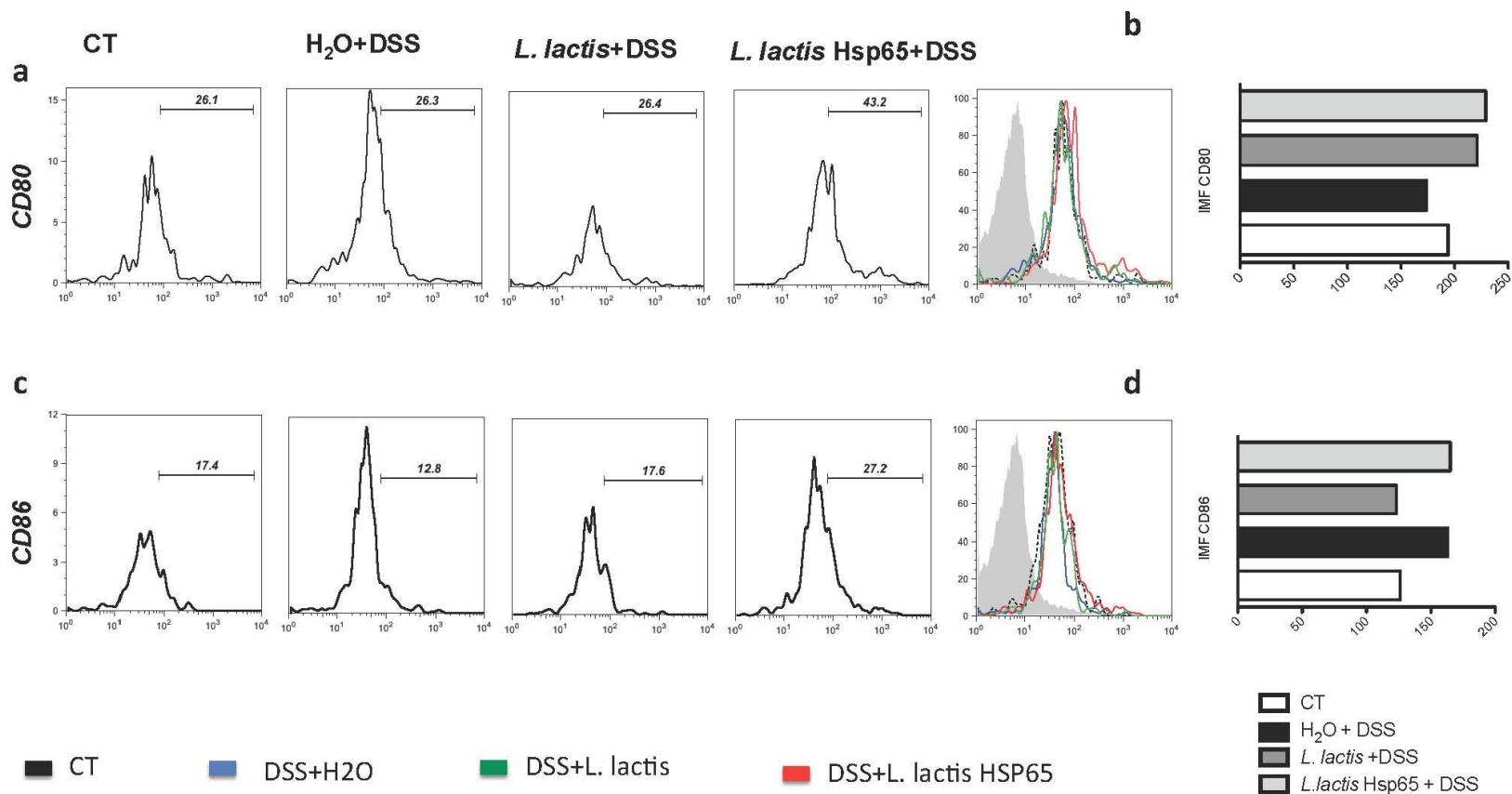


Figura 20: Histogramas representativos da frequência e expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas de camundongos com colite.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Células extraídas do baço foram submetidas a citometria de fluxo. A frequência de CD80 (a) e CD86 (c) foram determinados na região de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁻. Histograma representativo e intensidade média de fluorescência (IMF) de CD80 (b) e CD86 (d).

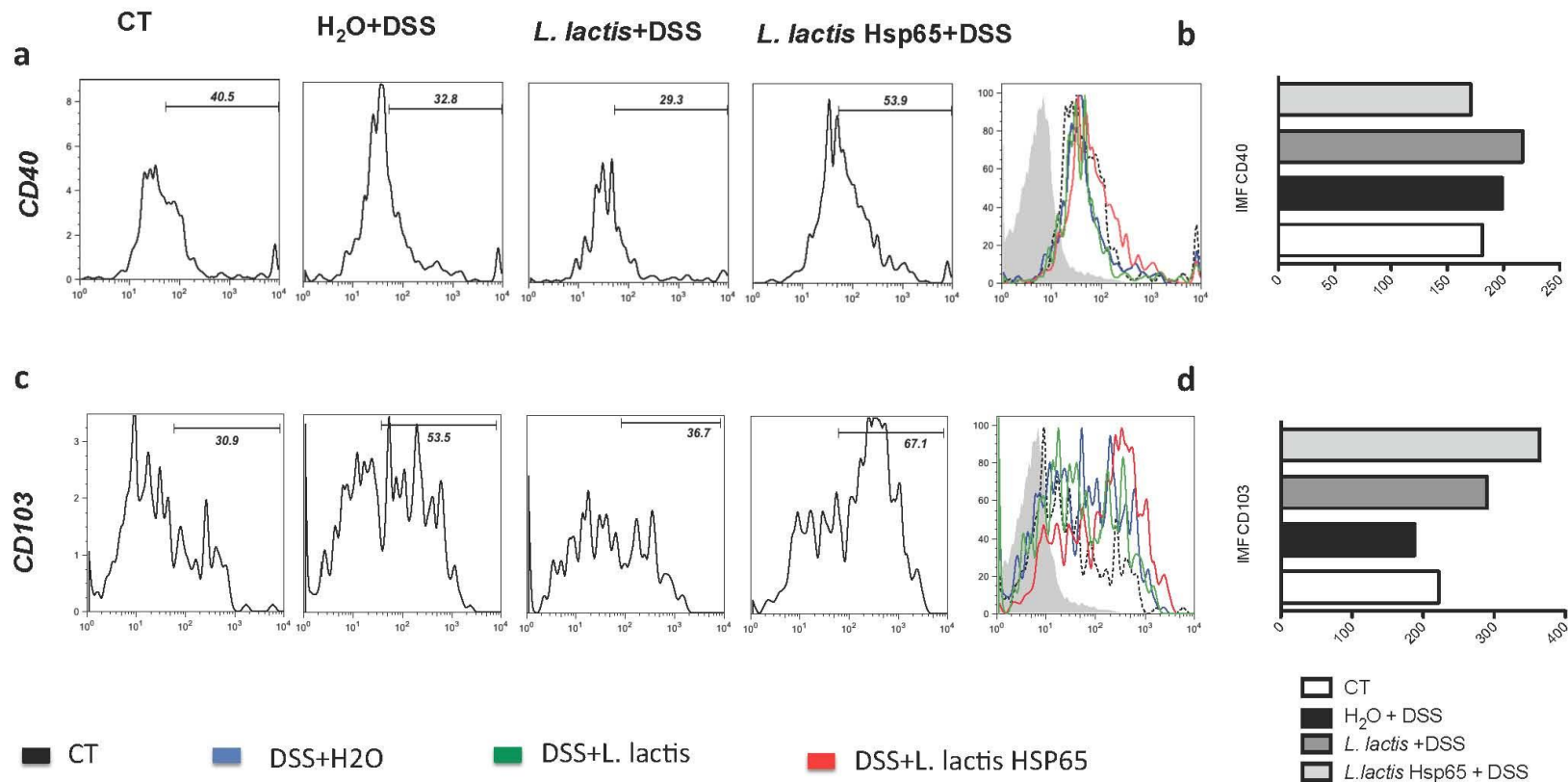


Figura 21: Histogramas representativos da frequência e expressão de CD40 e CD103 em células dendríticas de camundongos com colite.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Células extraídas do baço foram submetidas a citometria de fluxo. A frequência de CD40 (a) e CD103 (c) foram determinados na região de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁻. Histograma representativo e intensidade média de fluorescência (IMF) de CD40 (b) e CD103 (d).

5.20. Sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65 ativa TLR2 e TLR4 *in vitro*

Os receptores do tipo *Toll* 2 e 4 estão descritos como ligantes para Hsp (Binder *et al.*, 2004). Para confirmar esse achado, utilizamos células de rim humano que não apresentam nenhum receptor de reconhecimento padrão (PRR). Essas células foram transfectadas com os plasmídeos que codificam, individualmente, TLR2 ou TLR4. Utilizamos o sobrenadante da cultura de *L. lactis* e de *L. lactis* produtor de Hsp65 como estímulo. O sobrenadante de *L. lactis* causou um aumento sutil na expressão de TLR2 e de TLR4. No entanto, o sobrenadante de *L. lactis* Hsp65 elevou ainda mais a expressão tanto de TLR2 quanto de TLR4. A expressão de TLR2 após incubação com sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65 foi similar àquela encontrada após o estímulo com o agonista sintético de TLR2. O mesmo não foi observado para TLR4.

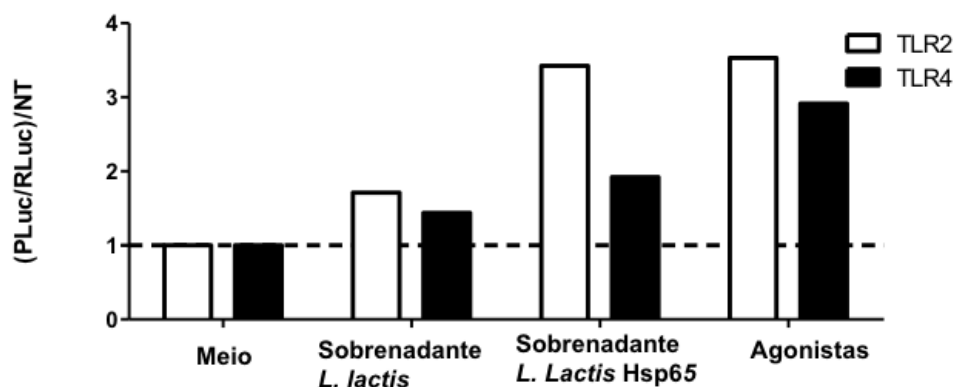


Figura 22: Ativação *in vitro* de TLR2 e TLR4 pelo sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65.

Células HEK 293 foram transfectadas com o plasmídeo para TLR2 ou para TLR4 e incubadas com os agonistas para TLR4 (LPS) ou para TLR2 (Pam3CysSK4) sendo esses os controles positivos ou com o sobrenadante de cultura de *L. lactis* ou de *L. lactis* produtor de Hsp65 por 6 horas. Utilizamos o meio de crescimento para as bactérias (M17) como controle negativo. A linha pontilhada delimita o basal detectado pelo meio.

5.21. *L. lactis* produtor de Hsp65 aumenta a expressão de TLR2 e de TLR4 *in vivo*

Após a constatação de que o sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65 ativa TLR2 e a TLR4 *in vitro*, verificamos se a expressão desses receptores seguia o mesmo padrão *in vivo* no modelo de colite induzida por DSS. *L. lactis* produtor de Hsp65 elevou a frequência de células positivas para TLR2 e para TLR4. A expressão dos receptores *Toll* 2 e 4 em células dendríticas do baço também encontrou-se elevada no grupo *L. lactis* Hsp65+ DSS quando comparado aos demais grupos.

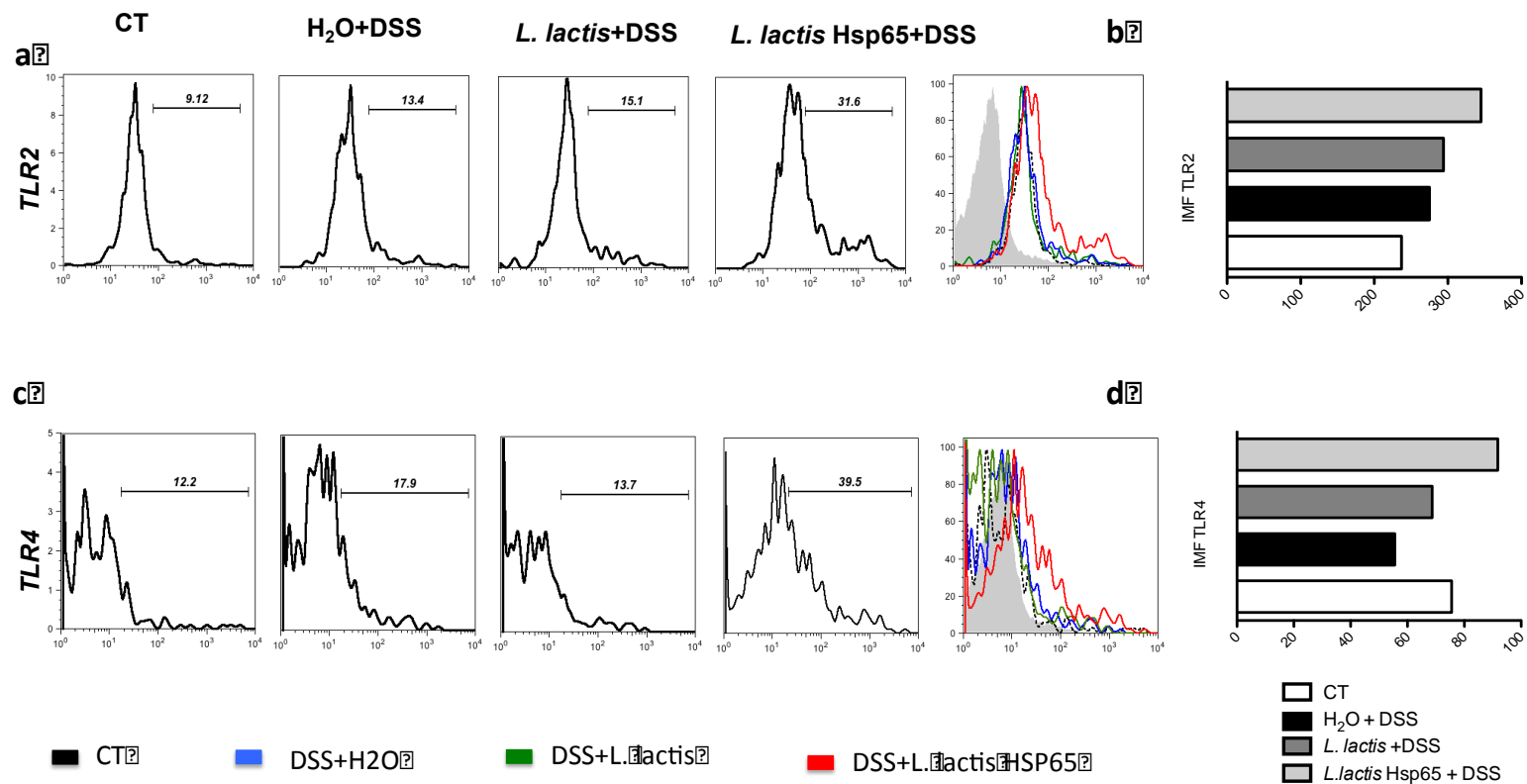


Figura 23: Histogramas representativos da frequência e expressão de TLR2 e TLR4 em células dendríticas de camundongos com colite.

Camundongos C57BL/6 receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias. Células extraídas do baço foram submetidas a citometria de fluxo. A frequência de TLR2 (a) e TLR4 (c) foram determinados na região de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁻. Histograma representativo e intensidade média de fluorescência (IMF) de TLR2 (b) e TLR4 (d)

5.22. *L. lactis* produtor de Hsp65 não melhora colite induzida por DSS em camundongos TLR2-/-

Diante da estimulação de TLR2 e de TLR4 por *L. lactis* produtor de Hsp65 *in vitro* e *in vivo*, utilizamos camundongos deficientes para esses receptores para verificar se a melhora da colite por *L. lactis* produtor de Hsp65 ocorre por essas vias. Para tal, utilizamos o mesmo desenho experimental descrito anteriormente. Assim como observado no primeiro experimento, camundongos C57BL/6 que receberam DSS apresentaram redução do comprimento do cólon. Essa redução foi evitada pela ingestão oral prévia de *L. lactis* produtor de Hsp65. No entanto, em camundongos TLR2-/- e TLR4-/- o comprimento do cólon foi similar entre camundongos tratados ou não. Porém, o índice histológico evidencia que *L. lactis* produtor de Hsp65 é capaz de melhorar a colite induzida por DSS mesmo em camundongos deficientes em TLR4 que apresentam uma colite mais grave mas não em camundongos deficientes em TLR2.

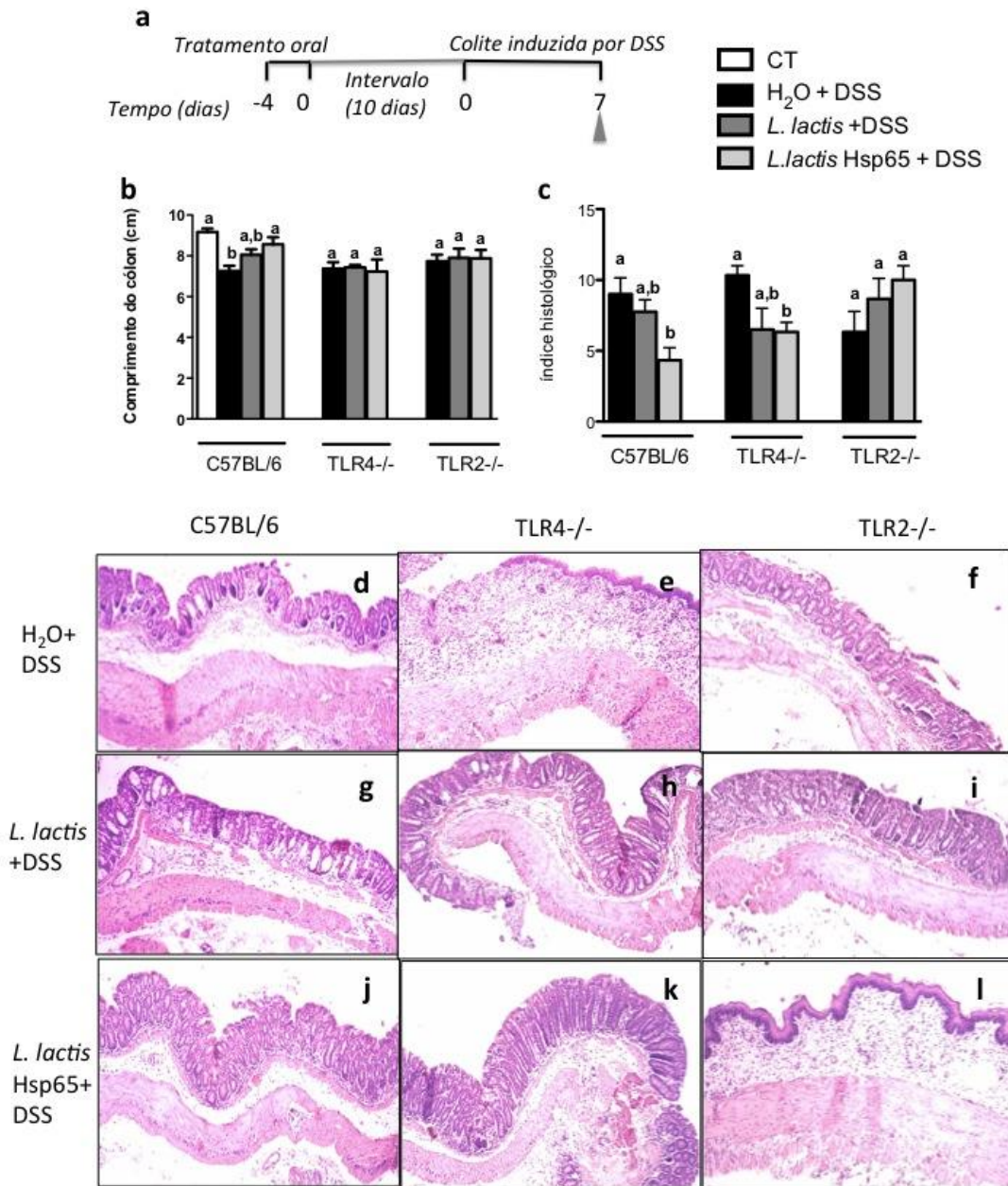


Figura 24: índices macroscópicos e histológicos de camundongos TLR4^{-/-} e TLR2^{-/-} com colite tratada previamente com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos C57BL/6, TLR4^{-/-} e TLR2^{-/-} receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada. Dez dias após o último dia de tratamento oral, a colite foi induzida com DSS diluído em água durante 7 dias (a). Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em cm do ceco à porção terminal do cólon) (b), e índice histológico (c). Barras representam a média e o erro padrão, n=4/grupo. Cortes histológicos representativos dos grupos H₂O+DSS (d-f), *L. lactis*+DSS (g-i), *L. lactis* Hsp65+DSS (j-l). As lâminas histológicas foram coradas em H&E, aumento de 40x.

5.23. *L. lactis* produtor de Hsp65 melhora índice macroscópico da colite espontânea em camundongo deficientes em IL-10

Com o objetivo de testar o efeito de *L. lactis* produtor de Hsp65 em um segundo modelo de doença inflamatória intestinal, utilizamos camundongos deficientes para IL-10. Camundongos com 6 semanas de idade receberam 4 dias de tratamento oral com *L. lactis* produtor de Hsp65 sendo que os grupos controles receberam *L. lactis* com o plasmídeo vazio ou água. Seis semanas após o tratamento oral, os camundongos com então, 12 semanas de idade, foram eutanaziados. *L. lactis* produtor de Hsp65 foi capaz de melhorar o índice macroscópico nesses animais mas não o índice histológico. As imagens feitas da região proximal do cólon mostram a inflamação transmural, com infiltração de células em todas as camadas: mucosa, submucosa e camada muscular. Apesar de *L. lactis* e *L. lactis* produtor de Hsp65 apresentarem a arquitetura da mucosa mais preservada, o índice histológico não diferiu entre os grupos.

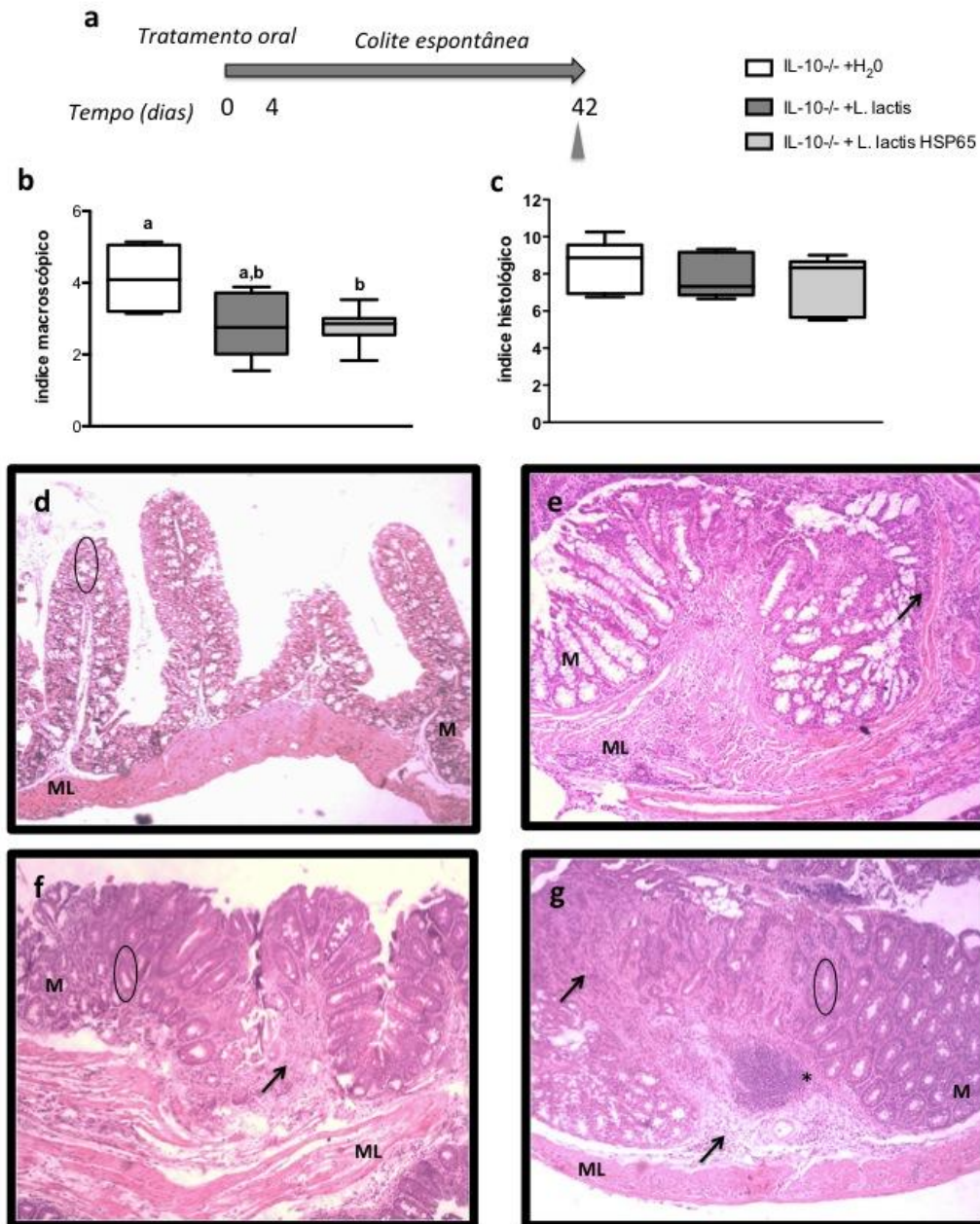


Figura 25: índices macroscópico e histológico de camundongos IL-10^{-/-} tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada por 4 dias consecutivos. Os animais foram eutanaziados com 42 dias de idade (a). índice macroscópico da colite (b) e índice histológico (c). Barras representam a média e o erro padrão, n=8/grupo. Cortes histológicos representativos do grupos Controle (129Sv/Ev) (d), IL-10^{-/-}+H₂O (e), IL-10^{-/-} +*L. lactis* (f), DSS+*L. lactis* Hsp65 (g). As lâminas histológicas foram coradas em H&E, aumento de 40x. Círculos mostram as criptas da camada mucosa (M). As setas apontam para o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa (M) e submucosa (SM) dos camundongos. O asterisco (*) identifica um agregado linfóide. ML, camada muscular. Note a inflamação transmural e o espessamento da camada muscular nas lâminas e-f. Letras indicam diferença entre grupos (p<0,05).

5.24. Perfil de citocinas e células T em camundongos deficientes em IL-10 tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65

Os níveis de IgA secretória foram mensuradas no lavado intestinal dos camundongos. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre animais tratados ou não. Posteriormente, avaliamos o perfil de citocinas no extrato do cólon. As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A foram similares entre os grupos IL-10^{-/-}+H₂O, IL-10^{-/-}+*L. lactis* e IL-10^{-/-}+*L. lactis* produtor de Hsp65. No entanto, a secreção de TGF- β estava aumentada em camundongos que receberam *L. lactis* produtor de Hsp65 por via oral quando comparado ao grupo colite. Decidimos então, avaliar o perfil de linfócitos ativados (CD4⁺CD44⁺) e reguladores (CD4⁺CD25⁺LAP⁺) na *lamina propria*, linfonodo cecal, linfonodos mesentéricos e baço. Camundongos IL-10^{-/-} apresentaram aumento de linfócitos ativados na *lamina propria* quando comparado a camundongos 129 Sv/Ev. O mesmo não foi encontrado nos grupos IL-10^{-/-}+*L. lactis* e IL-10^{-/-}+*L. lactis* Hsp65. O tratamento com *L. lactis* produtor de Hsp65 elevou a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺LAP⁺ na *lamina propria* do cólon.

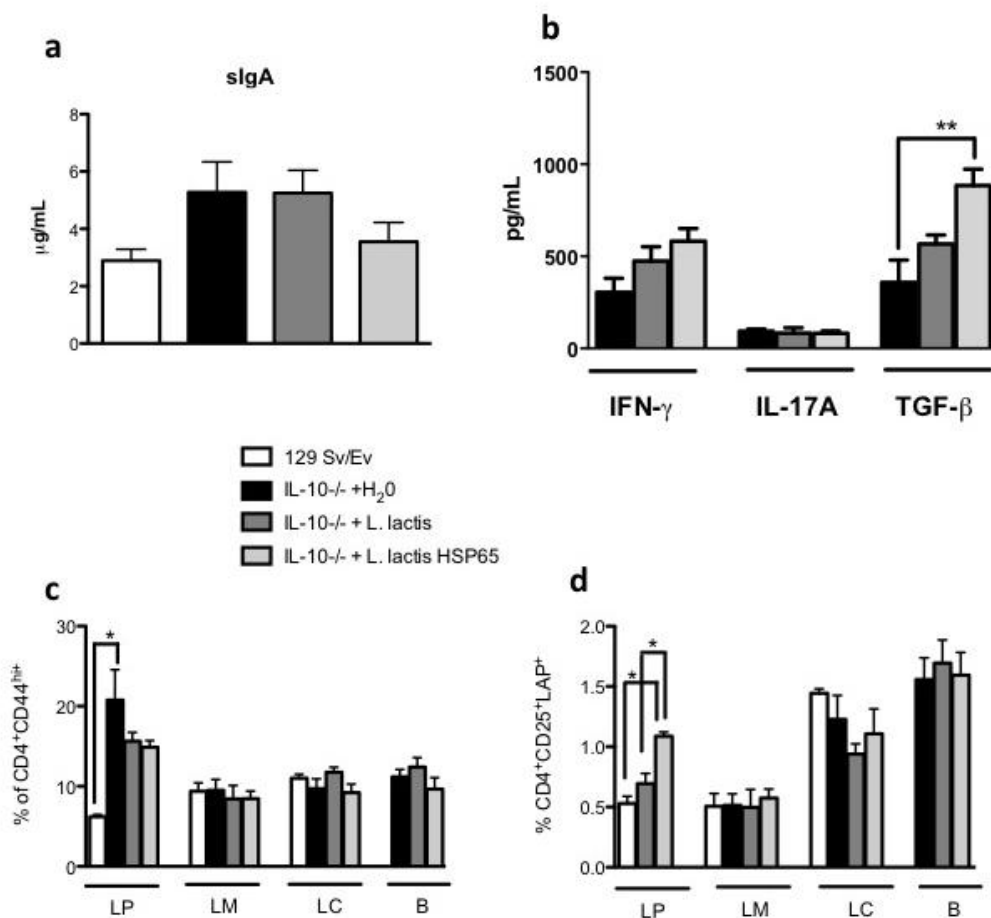


Figura 26: Perfil de citocinas e células T em camundongos deficientes em IL-10 tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65.

Camundongos IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade receberam tratamento oral com ingestão voluntária do meio de crescimento das bactérias (*L. lactis* ou *L. lactis* produtor de Hsp65) ou água filtrada por 4 dias consecutivos. Os animais foram eutanaziados com 42 dias de idade (a). Iga secretória (sIgA) mensurada por ELISA no lavado intestinal (b) Dosagem de citocinas no extrato do cólon (c). Porcentagem de linfócitos CD4⁺CD44^{hi} fenotipados por citometria de fluxo obtidos na região de linfócitos totais. (d). Porcentagem de linfócitos CD4⁺CD25⁺LAP⁺ fenotipados por citometria de fluxo obtidos na região de linfócitos. LP, *lamina propria*, LM, linfonodos mesentéricos, LC, linfonodo cecal e B, baço. Asteriscos indicam diferença entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

Muitos dos progressos recentes na compreensão da imunidade da mucosa foi alcançado pelos estudos de novos modelos animais experimentais de inflamação intestinal. Embora esses modelos não representem a complexidade das doenças humanas e não substituam os estudos com os pacientes, eles são valiosas ferramentas para o estudo de muitos aspectos importantes da doença que são difíceis de se abordar em seres humanos, como os mecanismos fisiopatológicos nas fases iniciais da colite e o efeito de estratégias terapêuticas emergentes. O estado clínico de pacientes com DII é bastante heterogêneo, fato que é refletido também no número crescente de camundongos transgênicos ou geneticamente modificados exibindo alterações intestinais característica das DIIs. A maioria desses modelos baseam-se na indução química, na transferência de células imunológicas ou na deleção de genes alvo (Strober, 2008). Escolhemos trabalhar com os camundongos deficientes para IL-10 já que essa é uma importante citocina imuno-reguladora e o modelo experimental é espontâneo, refletindo também o envolvimento dos fatores genéticos e da microbiota na patologia da doença.

Esse estudo descreveu alterações histológicas e imunológicas que ocorreram no intestino de camundongos deficientes em IL-10 em diferentes momentos durante o desenvolvimento da enterocolite espontânea. Nós utilizamos camundongos deficientes em IL-10 no fundo genético 129Sv/Ev. Essa linhagem é considerada a mais susceptível ao desenvolvimento da colite seguida pela linhagem BALB/c e por fim a linhagem C57BL/6. Além disso, camundongos 129 Sv/Ev apresentam manifestações clínicas da colite de maneira mais homogênea entre os camundongos afetados pela doença (Berg *et al.*, 1996). Uma vez que camundongos mantidos em condições SPF apresentam apenas pequenos focos de lesão na mucosa do cólon proximal (Kuhn *et al.*, 1993), nós escolhemos manter os camundongos do estudo em condições convencionais pois nesse ambiente ocorre o desenvolvimento completo da doença.

Com 6 semanas de idade, logo após o desmame, nenhuma mudança histológica foi observada no intestino grosso dos camundongos. Por outro lado, camundongos deficientes em IL-10 com 10 semanas de idade apresentaram enterocolite estabelecida com infiltração de leucócitos nas camadas mucosa e submucosa do cólon. Como a doença progride com a idade, camundongos IL-10^{-/-} com 16 semanas apresentam inflamação transmural no cólon. O início e a gravidade da colite em camundongos deficientes para IL-10 podem variar de acordo com o biotério em que foram mantidos. A re-derivação de camundongos IL-10^{-/-} do ambiente convencional para condições isentas de germe (*germ free*) abole o desenvolvimento da colite, demonstrando claramente a influência da microbiota no desenvolvimento da doença (Sellon *et al.*, 1998). Além disso, camundongos IL-10^{-/-} no fundo genético C3H provenientes do mesmo cruzamento parenteral mas mantidos em biotérios distintos apresentam diferentes índices histopatológicos na mesma idade. Essa discrepância foi atribuída a fonte de dieta e seus ingredientes bem como ao tratamento da água (autoclavada ou não) uma vez que o monitoramento da saúde dos animais revelou o mesmo status SPF (Mahler e Leiter, 2002). Berg e colaboradores descreveram pequenas infiltrações multifocais na *lamina propria* do cólon de camundongos IL-10^{-/-} com 3 semanas de idade enquanto camundongos com 12 semanas possuíam lesões multifocais e hiperplasia de epitélio em todas as regiões do intestino grosso (Berg *et al.*, 1996). Então, em camundongos mantidos em nosso biotério o início da enterocolite foi atrasada mas a progressão da doença foi mais rápida.

Nesse estudo, avaliamos não somente as alterações inflamatórias que ocorrem no intestino grosso, mas também no intestino delgado de camundongos deficientes em IL-10. Embora nenhuma inflamação visível foi observada no intestino delgado de camundongos com 6 semanas de idade, a razão vilo/cripta foi reduzida e esta alteração manteve-se até a vida adulta do animal (16 semanas de idade). Alterações na razão vilo/cripta já foram descritas em várias desordens imunes do trato gastrointestinal, incluindo a doença celíaca, a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Esse tipo de mudança ocorre devido a uma acelerada renovação das células epiteliais e apoptose, desencadeada pela liberação de citocinas produzidas pelas células

inflamatórias do infiltrado bem como pelo próprio enterócito (Ramachandran *et al.*, 2000). Isso pode ter contribuído para a inflamação no intestino delgado encontrada em camundongos IL-10^{-/-} com 16 semanas de idade.

A mucosa do intestino delgado possui uma população particular de linfócitos denominada linfócitos intra-epiteliais (IEL). IELs estão intercalados entre as células epiteliais logo na superfície da mucosa. As principais subpopulações de IELs são os TCR $\alpha\beta$ e os TCR $\gamma\delta$, ambos envolvidos na inibição de linfócitos T citotóxicos (Kapp *et al.*, 2004; Lambolez *et al.*, 2007). O compartimento de linfócitos intraepiteliais provavelmente promove a primeira linha de defesa contra patógenos de infecção que atacam as superfícies do corpo, sendo também uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Os IELs TCR $\gamma\delta$ apresentam papel imunorregulador na manutenção da integridade das células epiteliais (Lambolez *et al.*, 2007), na indução de tolerância oral (Ke *et al.*, 1997) e na modulação da colite (Chen *et al.*, 2002). Em modelos de colite aguda induzida por TNBS ou DSS, o papel protetor dessas células foi evidenciado (Chen *et al.*, 2002). Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que a frequência de linfócitos TCR $\gamma\delta$ diminui com a idade paralelamente com a redução na susceptibilidade a indução de tolerância oral (Santiago *et al.*, 2011). Nesse trabalho, nós observamos que a frequência de linfócitos TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ no compartimento dos IELs não se altera em camundongos deficientes em IL-10 com colite estabelecida porém há uma redução na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$, ativados (apresentando o marcador Thy 1.2). Uma vez que os linfócitos TCR $\gamma\delta$, estão envolvidos em atividades regulatórias na mucosa, essa redução pode representar um momento de falha nos mecanismos reguladores associado ao desenvolvimento da doença em camundongos IL-10^{-/-}.

Estudos clássicos descreveram que a enterocolite em camundongos deficientes em IL-10 estão associados a uma descontrolada produção de citocinas produzidas por macrófagos ativados e por células T CD4⁺ Th1 (Berg *et al.*, 1996). A excessiva geração de IFN- γ liberado por células T e direcionada por células apresentadoras de antígeno produtoras de IL-12 foi descrita como responsáveis por disparar o início da doença (Davidson *et al.*, 1998). No entanto, estudos posteriores revelaram que a IL-23, mas não a IL-

12, direciona a inflamação intestinal em camundongos IL-10^{-/-}. O alvo crítico de células IL-23 são as células T de memória, que produzem mediadores pró-inflamatórios como IL-17 e IL-6 (Yen *et al.*, 2006). Nós demonstramos que o IFN- γ estava aumentado no cólon de camundongos deficientes para IL-10 com 16 semanas mas não em camundongos jovens. Além disso, camundongos IL-10^{-/-} com 6 semanas de idade apresentaram aumento dos níveis de IL-17 na mucosa colônica. Esse resultado está de acordo com o achado de que a IL-17 é a citocina que inicia a inflamação intestinal em camundongos deficientes para IL-10 seguido do aumento de IFN- γ . Células Th17 podem se converter em células Th1 através da indução, por IL-17, da produção de IL-12 em células dendríticas da mucosa intestinal (Feng *et al.*, 2011). Recentemente, Mikami e colaboradores mostraram que a co-transferência de células T CD4⁺ Th1/Th17 misturadas de camundongos IL-10^{-/-} com colite com células T CD4⁺ Th1 com fenótipo CD4⁺CD45^{high} induzidas em camundongos RAG^{-/-} com colite transferidas a camundongos RAG^{-/-} melhora a “*wasting disease*”, observada nesses animais. Então, parece que células Th17 competem com as células Th1 e que a secreção predominante de IFN- γ está relacionado com uma forma mais grave de colite (Mikami *et al.*, 2010). Baseando-se nesses resultados, a produção de TGF- β no cólon de camundongos IL-10^{-/-} com 10 semanas de idade pode representar uma tentativa de regulação da inflamação em dois sentidos: pela ação reguladora direta de TGF- β e pelo seu efeito indireto juntamente com IL-6 na indução de células Th17. Também foi notável que a mudança na produção de IL-17 para IFN- γ na mucosa colônica de camundongos IL-10^{-/-} coincidiu com o agravamento da colite, espalhando-se também a inflamação para o intestino delgado (figura 5) e ocorrendo a deterioração dos sinais clínicos dos animais. O perfil de citocinas foi também avaliado em todas as porções do intestino delgado. Nós encontramos aumento das citocinas IL-17 no duodeno de camundongos IL-10^{-/-} com 10 semanas de idade. Por outro lado, houve um aumento de TGF- β no cólon no mesmo tempo experimental. Com 16 semanas de idade, também houve aumento de TGF- β produzido no jejuno proximal. O aumento da produção de IL-17 no cólon de camundongos com 10 semanas de idade desaparece com 16 semanas. A regulação

positiva da produção de TGF- β em camundongos com 10 semanas de idade pode ser uma tentativa de imuno-regulação no intestino delgado para controlar a inflamação. No entanto, esse não foi um evento regulatório bem sucedido uma vez que a análise histológica nesse estágio mostrou uma inflamação pronunciada no cólon como também no intestino delgado. Isso sugere que o TGF- β pode ser um importante mecanismo compensatório envolvido na homeostase do sistema imune de camundongos deficientes para IL-10 já que esses animais não apresentam nenhuma outra desordem inflamatória além da colite. No entanto, na mucosa do intestino, a IL-10 tem papel crítico uma vez que o aumento da produção de TGF- β não foi suficiente para controlar a inflamação intestinal.

Apesar da ausência de inflamação intestinal em camundongos deficientes em IL-10 jovens, nós encontramos aumento da frequência de células T CD4⁺ expressando fenótipo de memória (CD44^{high}) na mucosa do intestino grosso antes do estabelecimento da colite (com 6 semanas de idade). Berg e colaboradores mostraram aumento do número de células T presentes em camundongos deficientes em IL-10^{-/-} com apenas 3 semanas de idade (Berg *et al.*, 1996). Em um estudo utilizando um modelo de colite em camundongos *Gai2* deficientes, um número elevado de linfócitos CD4⁺CD44⁺ foram isolados da *lamina propria* de camundongos antes do início da doença (Ohman *et al.*, 2000). Presumidamente, o influxo de células T para a *lamina propria* do colon é um importante fator no subsequente estabelecimento da doença. Em camundongos IL-10^{-/-} com colite grave, o aumento da frequência de células CD44⁺ foi mantido. Nós obtivemos distintos resultados para linfócitos T expressando o marcador de ativação recente CD69⁺. Houve aumento da frequência de células CD69 positivas tanto em camundongos deficientes em IL-10 como controles (129 Sv/Ev) de 6 para 16 semanas de idade. Outro estudo também descreveu aumento de células T CD4⁺ ativadas com a progressão da idade (Santiago *et al.*, 2011), sendo que o aumento pode ser explicado pela contínua exposição a antígenos em condições convencionais de bioterismo. Isso parece estar associado com a estimulação pela microbiota uma vez que nenhuma alteração equivalente na frequência

de células CD4⁺CD44⁺ foi observada no intestino delgado onde a colonização por bactérias é muito menos intensa.

Células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ já foram descritas como importantes na manutenção da homeostase intestinal. Uma frequência reduzida de células reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi encontrada no intestino grosso de camundongos jovens com 6 semanas de idade. Isso pode estar diretamente relacionado à deficiência da IL-10. Além disso, a IL-10 secretada por células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ é fundamental para a manutenção da expressão de Foxp3 em células reguladoras induzidas na periferia durante o desenvolvimento da colite (Murai *et al.*, 2009).

Nosso próximo passo foi analisar a frequência de células CD4⁺LAP⁺ durante o desenvolvimento da colite nesses animais. Células CD4⁺LAP⁺ representam um subgrupo de células reguladoras que expressam o TGF-β em sua forma precursora ligado a suas membranas (associado ao peptídeo latente, LAP). Linfócitos T CD4⁺CD25⁺LAP⁺ participam do controle da inflamação intestinal em modelo experimental de colite e células CD4⁺LAP⁺ expressando CD25⁺ ou não, foram recentemente descritas como um distinto subgrupo de células T reguladoras denominadas Th3 (Gandhi *et al.*, 2011). A frequência de células CD4⁺LAP⁺ não foi afetada em camundongos IL-10^{-/-} jovens. No entanto, houve uma redução dessas células tanto no intestino grosso como também no intestino delgado de camundongos IL-10^{-/-} com colite grave. Além disso, observamos um aumento de células CD4⁺LAP⁺ com a idade em camundongos 129 Sv/Ev controles assim como descrito para as células CD4⁺CD69⁺, mas dessa vez o aumento ocorreu tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso. Estudos recentes de nosso laboratório demonstraram o aumento de células CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos mesentéricos e placas de Peyer com a idade. Esse aumento pode estar relacionado com mecanismos compensatórios responsáveis pela manutenção da homeostase da mucosa durante o processo de envelhecimento já que esse processo afeta outros elementos regulatórios na mucosa intestinal (Santiago *et al.*, 2011).

Não somente os componentes celulares como também os humorais do sistema imune estão implicados na patogênese das doenças inflamatórias

intestinais humanas e de modelos animais experimentais. Camundongos com reatividade a proteínas do cólon foram detectados em camundongos IL-2-/- com colite (Sadlack *et al.*, 1993). Anticorpos reativos a microbiota entérica como aqueles contra *Campylobacter jejuni* já foram identificados em pacientes com colite ulcerativa (Berberian *et al.*, 1994). Nesse estudo, nós encontramos concentrações elevadas de imunoglobulinas séricas IgG e IgA em camundongos deficientes em IL-10 com colite estabelecida e grave, respectivamente. Nossos achados estão em acordo com outros estudos em camundongos deficientes em IL-10. Kuhn e colaboradores foram os primeiros a demonstrar elevados níveis séricos de IgG1 e IgA em camundongos IL-10-/- com 8 semanas de idade (Kuhn *et al.*, 1993). Davidson e colaboradores também mostraram reatividade cruzada de Ig do soro de camundongos IL-10-/- contra células epiteliais colônicas e células não-epiteliais na maioria dos soros testados. No entanto, os mesmos autores desenvolveram o camundongo deficiente em células B também nocaute para IL-10 e esse camundongo apresentou gravidade da colite análoga à de camundongos IL-10-/-, demonstrando que as células B não são as mediadoras primárias da inflamação nesse modelo de DII (Davidson *et al.*, 1996). Assim, nós não podemos dizer se essas alterações nas imunoglobulinas são uma resposta compensatória a inflamação ou se são simplesmente um fenômeno relacionado a inflamação no cólon. Camundongos deficientes em IL-10 com 4-6 semanas de idade apresentam porcentagem similar de células B no timo e baço, além de células B1 no peritônio (Kuhn *et al.*, 1993). As células B1 foram inicialmente identificadas como sendo CD5⁺ (Herzenberg, 2000). Surpreendentemente, a frequência de células CD19⁺CD5⁺ estava aumentada na *lamina propria* do intestino grosso e delgado bem como no peritônio e placas de Peyer de camundongos IL-10-/- com 16 semanas de idade. As células B1 do peritônio produzem predominantemente IgM, mas a mudança de classe para IgA já foi demonstrada para essa população de células B e as células B1 da *lamina propria* são responsáveis por pelo menos metade da IgA secretória da mucosa intestinal (Fagarasan *et al.*, 2000). Os níveis séricos de IgA aumentaram concomitantemente com a inflamação em camundongos IL-10-/. Os níveis de IgA secretória também estavam aumentados em camundongos IL-10-/- com 10 semanas de idade. Então, é

razoável especular que as células B1 podem ser as principais responsáveis por essa elevação na IgA.

A tolerância oral é a principal e a mais comum consequência da administração oral de antígeno (Faria e Weiner, 2005). Embora diversos mecanismos tenham sido propostos para explicar tal indução, a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e a indução de células T reguladoras como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺LAP⁺ parecem ser críticas para a indução de tolerância oral (Weiner *et al.*, 2011). Existem estudos prévios controversos sobre o papel da IL-10 na indução de tolerância oral. Rizzo e colaboradores mostraram que camundongos geneticamente deficientes em IL-10, IL-4 ou em ambas as citocinas são refratários a indução de tolerância oral (Rizzo *et al.*, 1999). Posteriormente, Menguel e co-autores mostraram que a depleção de IL-10 *in vivo* utilizando anticorpos monoclonais não afeta a indução de tolerância oral em camundongos (Aroeira *et al.*, 1995). No presente estudo, nós observamos que a tolerância oral para IgE pode ser induzida em camundongos deficientes para IL-10 com 16 semanas de idade pelos dois regimes alimentares utilizados, gavagem ou ingestão voluntária. A supressão de anticorpos IgG1 anti-ova foi também observada mas somente para o regime de ingestão voluntária. Esse protocolo já foi descrito previamente como protocolo ótimo para indução de tolerância oral (Faria *et al.*, 2003). Dessa forma, a deficiência em IL-10 e a gravidade da inflamação na mucosa parece reduzir mas não abolir a susceptibilidade a indução de tolerância oral. Esse resultado indica que mesmo na presença de uma inflamação severa e enterite, a tolerância oral pode ser utilizada como ferramenta e terapia alternativa para doenças inflamatórias intestinais.

Resumidamente, na primeira parte do trabalho nós demonstramos que camundongos apresentam uma inflamação espontânea e progressiva com alterações marcantes no sistema imune. A ausência de uma importante citocina anti-inflamatória tal como a IL-10 leva a um defeito dramático de imuno-regulação, com redução de linfócitos T reguladores na mucosa intestinal, alterações na produção de isotipos de imunoglobulina e na frequência de células B1. Além disso, é importante ressaltar que embora diversos mecanismos de imuno-regulação estão comprometidos em

camundongos deficientes para IL-10, a tolerância oral pode ainda assim ser induzida.

Em um segundo momento, testamos duas terapias para o tratamento de DIIs. A primeira delas consistiu na retirada de proteínas inteiras da dieta que foram substituídas por aminoácidos livres ou por peptídeos de cadeia curta. Na clínica, a terapia com dietas enterais melhoram não somente o estado nutricional dos pacientes mas também os sintomas clínicos e morfológicos da doença de Crohn, sendo essa a primeira terapia utilizada para pacientes pediátricos (Homan *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). As dietas elementares além de conterem aminoácidos livres apresentam baixo conteúdo lipídico. Apesar dos mecanismos de ação das dietas elementares serem desconhecidos, as possibilidades são: 1) a baixa antigenicidade da dieta que reduz as reações imunes na mucosa; 2) o baixo conteúdo de lipídeos que são menos pró-inflamatórios e 3) a alteração nas populações da microbiota. De fato, foi demonstrado experimentalmente que uma dieta rica em lipídeos exacerba a colite induzida por DSS (Ma *et al.*, 2008) e que as dietas elementares alteram o número e a diversidade da microbiota de camundongos (Kajiura *et al.*, 2009). Apesar de não termos descartado as outras possibilidades e acreditarmos que elas podem agir em conjunto no caso dos efeitos clínicos com a utilização das dietas elementares; nossa hipótese foi a de que a melhora observada no tratamento de pacientes com DII ao utilizarem essas dietas ocorre devido ao menor contato ou aporte antigênico das proteínas dietéticas com a área inflamada do corpo, o intestino. Recentemente, foi demonstrado que as dietas elementares reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 na mucosa (Yamamoto *et al.*, 2005), que estão envolvidas nas DIIs.

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que as proteínas da dieta são importantes na formação do tecido linfóide associado a mucosa intestinal (GALT) e afetam drasticamente o sistema imune. A retirada de proteínas inteiras da dieta mantém, em camundongos adultos, um estado imunológico imaturo com predominância do perfil Th2 semelhante ao de camundongos neonatos (Menezes *et al.*, 2003). Primeiramente, demonstramos que os macrófagos dos camundongos com 12 semanas de

idade que receberam dieta com aminoácidos livres em substituição a proteínas inteiras produzem baixos níveis de IL-12p70, similares aos níveis produzidos por animais neonatos. Uma vez que a citocina IL-12 participa do desencadeamento da inflamação no modelo de colite induzida por DSS (Takagi *et al.*, 2003), esse resultado reforça a hipótese de que dietas isentas de proteínas inteiras podem melhorar a colite.

Decidimos testar a imunoterapia em camundongos adultos ao invés de os alimentarmos desde o desmame com dieta contendo aminoácidos livres. Isso aproximaria nosso teste das condições normais da clínica, isto é, os pacientes ingerem proteínas normalmente, antes do diagnóstico da doença. Testamos também se a retirada momentânea das proteínas alimentares alteraria o curso da doença. É importante destacar que a dieta contendo aminoácidos livres apresenta a mesma composição dos demais nutrientes que a dieta controle. Portanto, o conteúdo de lipídeos é similar entre a dieta controle contendo caseína e a dieta com aminoácidos livres eliminando a possibilidade da interferência do conteúdo lipídico da dieta nos resultados encontrados.

Ao contrário do que esperávamos, a dieta contendo aminoácidos livres agravou a colite experimental. Houve redução do comprimento do cólon, aumento da perda de peso e do índice histológico. Estudos clínicos iniciais demonstraram que dietas poliméricas com proteínas inteiras também se mostraram efetivas no desencadeamento das exacerbações agudas da doença Crohn (Wilschanski *et al.*, 1996). No entanto, Kajiura e colaboradores demonstraram que a dieta elementar foi capaz de melhorar a colite crônica desencadeada pela transferência de células de camundongos IL-10^{-/-} doentes para camundongos SCID. Segundo os autores, isso ocorreu devido a redução do número e da diversidade de bactérias intestinais e pelo decréscimo das citocinas pró-inflamatórias produzidas também pela mudança na composição das bactérias ácido lácticas da microbiota (Kajiura *et al.*, 2009). Em outro estudo, os autores investigaram se a melhora obtida na administração de dieta elementar ocorria devido a efeitos diretos dos aminoácidos na supressão da inflamação intestinal. Eles demonstraram a eficácia da histidina em reduzir a colite no modelo de transferência de células de camundongos IL-10^{-/-} para camundongos SCID. A histidina diminuiu a

ativação de NF- κ B e a produção de TNF- α e IL-6 em macrófagos (Andou *et al.*, 2009). Portanto, é possível que a diferença de resultados encontrados seja devida a diferenças na composição de aminoácidos das dietas utilizadas ou mesmo dos outros nutrientes tais como lipídeos, carboidratos e vitaminas.

Além disso, outra possibilidade é a de que a antigenicidade das proteínas da dieta contribua para a exacerbação da inflamação somente na fase crônica da doença e, como utilizamos um modelo agudo e induzido de colite, não encontramos os mesmo resultados. É possível que a dieta isenta de proteínas inteiras tenha efeitos melhores na colite crônica semelhante à doença de Crohn do que na colite aguda que se assemelha mais da colite ulcerativa. O perfil inflamatório e as citocinas envolvidas nos modelos experimentais são distintos. Temos como perspectivas testar a dieta com aminoácidos livres em camundongos deficientes para IL-10^{-/-} que desenvolvem colite espontânea, com inclusive, focos inflamatórios no intestino delgado.

Experimentos utilizando camundongos *germ free* revelaram o papel dual da microbiota e da estimulação antigênica no desencadeamento e modulação da inflamação. Camundongos IL-10^{-/-} mantidos em condições isentas de germe não desenvolvem a colite espontânea (Sellon *et al.*, 1998) enquanto que os camundongos *germ free* apresentam intenso sangramento retal e morrem no terceiro dia da indução de colite por DSS, o que não acontece em animais mantidos em condições convencionais. A análise histológica de camundongos *germ-free* submetidos à indução de colite por DSS revelou a ausência de lesão no cólon (Kitajima *et al.*, 2001). Em um trabalho clássico, o grupo de Medzhitov demonstrou que as bactérias comensais são reconhecidas pelos receptores do tipo *Toll* em condições fisiológicas e que essa interação têm papel crucial na manutenção da homeostase de células epiteliais. Além disso, a ativação de receptores do tipo *Toll* por bactérias comensais é crítica na proteção contra injúria tecidual intestinal no modelo de colite induzida por DSS (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2006). Sendo assim, a estimulação das células da mucosa e do sistema imune é necessária no controle da colite aguda e a retirada de proteínas inteiras pode prejudicar o desencadeamento dessa estimulação. Posteriormente,

pretendemos esclarecer se a estimulação antigênica pelas proteínas da dieta tem contribuição semelhante a da microbiota no desencadeamento das doenças inflamatórias intestinais.

Além de piorar a inflamação intestinal, a dieta com aminoácidos livres reduziu os níveis de IgA secretória de mucosa. Essa redução pode estar relacionada a uma mudança na composição de bactérias da microbiota. Nossos resultados anteriores, mostraram que a dieta com aminoácidos livres não alterara o número total de bactérias gram-positivas e gram-negativas nas fezes dos animais tratados com a dieta (Amaral *et al.*, 2010). No entanto, uma descrição mais detalhada das espécies de bactérias deve ser realizada para se esclarecer se a retirada de proteínas inteiras alimentares afeta ou não a composição da microbiota intestinal.

Testamos também se a dieta com aminoácidos livres afetava o estado nutricional de camundongos com colite. Encontramos redução apenas nos níveis de hemoglobinas séricas. Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram que a administração de dieta com aminoácidos livres não afeta o estado nutricional dos camundongos, mesmo quando alimentados desde o desmame com a dieta (durante 5 semanas) (Menezes *et al.*, 2003). Portanto, é possível que a redução nos níveis de hemoglobina tenha acontecido pelo agravamento da doença nos animais alimentados pela dieta com aminoácidos livres e não pelo comprometimento nutricional em si. É importante ressaltar que os animais apresentam intenso sangramento retal como também caquexia concomitante com alterações no metabolismo e decréscimo da taxa metabólica (Melgar *et al.*, 2007). Diante disso, especulamos que a redução da hemoglobina poderia ter ocorrido devido às modificações metabólicas da doença.

Por fim, testamos se a utilização de dieta com di-tripeptídeos seria capaz de controlar a inflamação intestinal aguda. Apesar da limitação experimental de não termos utilizado o hidrolisado proteico no mesmo experimento com aminoácidos livres já que a proteína de referência utilizada foi diferente (caseína *versus* proteína do soro do leite), o resultado confirma que a retirada de proteínas da dieta não melhora a inflamação aguda por DSS. Além disso, a utilização de di-tripeptídeos apresenta a vantagem de serem melhores absorvidos na mucosa intestinal (Clemente, 2000). Isso é

extremamente relevante para pacientes com inflamações em áreas do trato gastrointestinal envolvidas com a absorção de nutrientes, como os pacientes com Doença de Crohn e alergia alimentar. Foi interessante notar que enquanto a dieta com aminoácidos livres levou a uma maior perda de peso corporal, a dieta com hidrolizados proteicos reduziu essa perda. Isso pode estar diretamente relacionado a perda de aminoácidos que não foram absorvidos pela mucosa intestinal. Os aminoácidos livres são transportados em diferentes velocidades por carreadores, em mecanismos saturáveis e competitivos, com especificidade para aminoácidos básicos, ácidos e neutros. Os di-tripeptídeos tem pelo menos dois carreadores, ambos H⁺ dependentes (Frenhani e Burini, 1999). Então, a perda de aminoácidos livres não absorvidos pode gerar uma perda energética que contribua para a perda de peso corporal, principalmente em uma situação catabólica de doença como é o caso da colite aguda.

Portanto, a retirada de proteínas dietéticas não apresentou resultado positivo no tratamento da retocolite ulcerativa. Apesar disso, a utilização de dietas com di-tripeptídeos podem ter efeitos benéficos pelo aumento da absorção proteica, principalmente na fase crônica da inflamação.

Nossa segunda estratégia experimental consistiu na administração oral de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65. Diversos estudos já demonstraram a eficácia da administração oral de antígenos em modelos animais de autoimunidade e de doenças inflamatórias (Faria e Weiner, 2005; 2006). No caso das DIIs foi demonstrado que a administração oral de TNBS preveniu a indução da colite pelo mesmo agente químico (Neurath *et al.*, 1996). Em um segundo estudo utilizando o mesmo modelo experimental, a ingestão de células epiteliais humanas ou de ratos também impediu a indução da doença (Dasgupta *et al.*, 2001). Além disso, a mesma inibição ocorreu pela ingestão oral de ovalbumina (Ova), um evento conhecido como *bystander suppression*. Nesse estudo, camundongos SCID reconstituídos com células T CD4⁺CD45RB^{high} provenientes de camundongos DO11.10 (com TCR reativo para Ova) não desenvolvem a colite quando alimentados previamente com a Ova (Zhou *et al.*, 2004).

Na grande maioria dos estudos de tolerância oral, utiliza-se a administração oral do mesmo antígeno que participa diretamente da iniciação

da inflamação. Esse é o caso, por exemplo, da administração oral de insulina no modelo de diabetes do tipo 1 ou de MOG no modelo de encefalomielite experimental (Higgins e Weiner, 1988; Zhang *et al.*, 1991). Porém, conforme destacado, antígenos não relacionados também inibem processos inflamatórios via *bystander suppression*. Essa estratégia tem ganhado atenção especial em situações em que o antígeno alvo é desconhecido ou se existem múltiplos antígenos que desencadeiam a patologia (Faria e Weiner, 2006). Esse é o caso das doenças inflamatórias intestinais (DIIs). Nas DIIs não existe um antígeno clássico descrito como envolvido na inflamação, apesar das intensas pesquisas para identificar um único gênero de bactéria como causador da doença (Baumgart e Carding, 2007). Atualmente, é amplamente aceito que a doença ocorre pelo reconhecimento inapropriado da microbiota autóctone pelo sistema imune e assim, as bactérias comensais tornam-se uma fonte de antígenos não-próprios (Abraham e Medzhitov, 2011). Nesse contexto, surgem as proteínas de choque térmico (Hsp).

Uma vez que as Hsps são chaperonas, essas proteínas encontram-se elevadas em todo e qualquer evento inflamatório (Hauet-Broere *et al.*, 2006; Quintana e Cohen, 2010). Além disso, as Hsps são altamente conservadas entre as espécies e presentes em vários organismos desde bactérias a mamíferos. Aliás, algumas espécies da microbiota residente tais como *Helicobacter pylori* e *Escherichia coli* apresentam Hsps (Arsene *et al.*, 2000; Yunoki *et al.*, 2000). As Hsps foram descritas como auto-antígenos imuno-dominantes, sendo altamente reconhecidas pelo repertório de linfócitos auto-imunes em condições fisiológicas (não inflamatórias) (Cohen e Young, 1991). Por exemplo, Luna e colaboradores estudaram a reatividade fisiológica de células T à Hsp60 em diferentes linhagens de camundongos. Os autores demonstraram que diferentes peptídeos da molécula da Hsp60 induzem respostas imunes distintas. Além disso, os autores ainda propuseram como perspectiva, a imunoterapia com peptídeos capazes de induzirem a produção de citocinas anti-inflamatórias para doenças inflamatórias crônicas e para a rejeição de transplantes (Luna *et al.*, 2007). A reatividade a Hsp já foi encontrada em células T reguladoras e auto-anticorpos naturais em camundongos saudáveis (Luna, Postol, Caldas, Mundel *et al.*, 2007; Merbl *et al.*, 2009). Assim, a tolerância à Hsp pode ser usada para reforçar os

mecanismos fisiológicos de homeostase no intestino, impedindo a inflamação local.

Nesse estudo, utilizamos como tentativa terapêutica para as doenças inflamatórias intestinais o *Lactococcus lactis* como veículo de liberação da Hsp na mucosa de camundongos. Esse sistema apresenta diversas vantagens. Primeiro, a tolerância oral é uma ótima ferramenta para induzir tolerância a um antígeno, mas implementar essa estratégia em humanos tem sido difícil, principalmente devido a dificuldades em encontrar a dose ideal do antígeno, o tempo e o intervalo de administração (Faria e Weiner, 2006). Isso pode ser feito utilizando bactérias geneticamente modificadas para realizar a liberação da Hsp após sua indução (Pontes *et al.*, 2011). Isso é ainda mais vantajoso pelo fato de que a Hsp purificada ser cara. Segundo, outra grande preocupação em estudos envolvendo HSP é a presença da contaminação por LPS, muito comum mesmo em Hsps purificadas comerciais que podem interferir em seu efeito (Tsan e Gao, 2009). Isso é resolvido, uma vez que *L. lactis* é uma bactéria gram-positiva que não tem LPS (Azevedo, 2009). Terceiro, a cepa de *L. lactis* é segura e adequada como sistema de fornecimento de antígenos na mucosa intestinal (Pontes *et al.*, 2011).

Baseado em tais premissas, nós utilizamos o *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 como tentativa de prevenção da retocolite ulcerativa. Nesse segundo modelo de doença inflamatória intestinal, a colite foi induzida pelo agente químico DSS. Trata-se de um modelo agudo de inflamação usualmente utilizado na literatura devido a sua fácil indução. O DSS promove uma destruição massiva do epitélio intestinal com a subsequente infiltração celular (Okayasu *et al.*, 1990). A administração de DSS a 2% diluído na água de beber promoveu perda de peso acentuada, diarreia e sangramento retal em camundongos C57BL/6 (figura 15). A inflamação desenvolve-se predominantemente na porção terminal do cólon com a infiltração de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos como também de linfócitos (Wirtz *et al.*, 2007). Apesar de menos relatada, a presença de células T CD4⁺ já foi observada na *lamina propria* do cólon nesse modelo de colite (Kanwar *et al.*, 2008) bem como seu papel em exacerbar a inflamação colônica (Shintani *et al.*, 1998).

Primeiramente, observamos que o tratamento prévio à indução da colite por DSS em camundongos C57BL/6 foi capaz de praticamente abolir os sinais de inflamação na mucosa bem como o índice macroscópico (sinais clínicos da doença). A característica mais evidente de tal melhora foi a preservação da arquitetura da mucosa em animais tratados que assemelhou-se à mucosa de camundongos saudáveis. Apenas um discreto infiltrado inflamatório foi notado. O papel anti-inflamatório da Hsp em modular doenças inflamatórias e autoimunes já foi demonstrado em diversos modelos de doença tais como diabetes, artrite, aterosclerose e esclerose múltipla (Van Den Broek *et al.*, 1989; Elias *et al.*, 1990; Maron *et al.*, 2002; Chandawarkar *et al.*, 2004) bem como na transplantação em modelo murino (Luna, Postol, Caldas, Benvenuti *et al.*, 2007) e em humanos (Caldas *et al.*, 2004). No entanto, esse foi o primeiro estudo utilizando Hsp na prevenção da doença inflamatória intestinal.

Alguns estudos já investigaram se a reatividade do sistema imune à Hsp (no caso, Hsp60) está alterada em pacientes com a doença. A elevação de anticorpos auto-reativos a Hsp já foi detectado no soro de pacientes com doença de Crohn e a proteína foi detectada em biópsias de cólon (Winrow *et al.*, 1993; Baca-Estrada *et al.*, 1994). Experimentalmente, uma enterite semelhante a colite ulcerativa foi induzida por *Escherichia coli* transformada com o gene Hsp60 de *Yersinia enterocolitica* (Yagita *et al.*, 1999).

Primeiramente, nos perguntamos se a melhora do processo inflamatório em animais tratados com Hsp poderia ser explicado por alterações na produção de IgA secretória de mucosa ou mesmo na permeabilidade intestinal dos animais. Alterações nas concentrações de sIgA bem como seu papel protetor já foram descritos em modelo de colite por DSS (Murthy *et al.*, 2006; Suzuki e Fagarasan, 2008). Alterações na permeabilidade intestinal parecem preceder e/ou acompanhar a inflamação em diversos modelos de DIIs (Xavier e Podolsky, 2007). Além disso, a alteração nos fatores citados já foi demonstrado como mecanismo protetor da ação de probióticos na mucosa inflamada (Perdigon *et al.*, 1995). No entanto, nenhuma mudança foi observada nesses parâmetros após a administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp ou da bactéria selvagem.

Quanto ao perfil de citocinas no modelo de colite induzida por DSS, este é descrito como sendo misto, porém com predominância das citocinas TNF- α , IL-1, IL-12 e IFN- γ (Dieleman *et al.*, 1998). Em nosso estudo, observamos aumento de TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-5, IL-4 e de TGF- β . TNF- α e IFN- γ são capazes de alterar a função de barreira das *tight junctions* do epitélio intestinal, com consequente aumento da permeabilidade intestinal (Wang *et al.*, 2006). TNF- α e IL-6, apesar do seu papel inflamatório amplamente descrito, apresentam importante função na proteção do epitélio intestinal contra a injúria auxiliando no reparo e reconstituição do enterócito (Tebbutt *et al.*, 2002). Já as citocinas IL-4 e IL-5, usualmente produzidas por eosinófilos, também contribuem com a exacerbação da inflamação. Camundongos geneticamente deficientes para IL-4 apresentam melhora no índice histológico quando submetidos à indução de colite por DSS (Stevceva *et al.*, 2001). A produção de peroxidase eosinofílica (EPO) bem como de eotaxina e IL-5 causam disfunção no trato gastrointestinal contribuindo para a patogênese da doença (Forbes *et al.*, 2004). Quanto à citocina TGF- β produzida por enterócitos, macrófagos, linfócitos e células mesenquimais, seu aumento parece estar relacionado ao processo de fibrose. No modelo de DSS, ocorre deposição de colágeno do tipo-1, aumento de TGF- β como também de metaloproteinases (Suzuki *et al.*). Apenas a citocina IL-10 esteve reduzida nesse modelo, novamente evidenciando a importância da citocina na homeostase do intestino grosso.

A administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 reduziu todas as citocinas citadas como também manteve os níveis de IL-10 semelhantes àqueles de animais controles. Assim, o perfil de citocinas em animais que receberam Hsp acompanhou o mesmo padrão de animais não manipulados. O aumento de IL-10 via Hsp já foi evidenciado em outros trabalhos. Em um modelo de artrite induzida por proteoglicano, Wieten e colaboradores demonstraram que a imunização com Hsp70, 10 dias antes da indução da doença, foi capaz de inibir os sinais clínicos e histológicos da artrite via a produção de IL-10 (Wieten *et al.*, 2009). Em um outro modelo, dessa vez de aterosclerose, Maron e colaboradores mostraram que de fato, a

administração oral de Hsp65 é capaz de reduzir a inflamação bem como de aumentar os níveis de IL-10 no local inflamado (Maron *et al.*, 2002).

Uma vez que um dos principais mecanismos explicativos pra a indução de tolerância oral é a supressão via células reguladoras (Weiner *et al.*, 2011), nós realizamos uma cinética em diferentes tempos de indução da colite por DSS para avaliar o aparecimento de células T reguladoras e efetoras. Para tal, retiramos o baço e os linfonodos drenantes na mucosa intestinal. Linfócitos T efetores com o fenótipo $CD4^+CD25^-CD45Rb^{low}$ estavam elevados no linfonodo mesentérico de camundongos com colite (grupos H_2O+DSS e $L. lactis+DSS$) com apenas 12 horas da administração oral do fármaco. A ingestão oral de $L. lactis$ produtor de Hsp65 impediu o aumento dessas células. Quanto às células reguladoras, houve aumento tanto de células com o fenótipo $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ como também de células $CD4^+CD25^+LAP^+$ no baço de camundongos que receberam $L. lactis$ Hsp65 após 3 dias de indução de DSS. Por fim, realizamos a razão entre células reguladoras e efetoras e observamos um aumento nessa razão em camundongos tratados oralmente com Hsp65. Recentemente, Mucida e colaboradores demonstraram que o aparecimento de células T reguladoras em animais tolerantes é anterior ao aparecimento dessas células em animais imunes. Utilizando modelo de asma experimental induzida por Ova, os autores encontraram aumento da expressão de Foxp3 em células $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ no grupo tolerante após 2 e 4 dias da imunização com o antígeno. Porém, 10 e 22 dias após a imunização, tanto animais imunes quanto tolerantes apresentaram a mesma expressão de Foxp3 (Mucida *et al.*, 2005). Nossos dados estão de acordo com os apresentados por Mucida uma vez que, no grupo que recebeu $L. lactis$ produtor de Hsp65 oralmente, há um pico de células Tregs com 3 dias de DSS enquanto que a frequência dessas células é a mesma entre os grupos com 7 dias da indução da doença.

É importante notar que não somente a frequência de células Tregs estava aumentada pelo tratamento oral $L. lactis$ produtor de Hsp65 como também houve um aumento na frequência de células T efetoras. As células T reguladoras não proliferam e não produzem IL-2. O mecanismo de ação das células T reguladoras envolve o contato célula-célula e a produção de

citocinas anti-inflamatórias mas essas células dependem, para sua sobrevivência e expansão, da IL-2 produzida por outros linfócitos T. Essa dependência de IL-2 proveniente de outras células parece ser não somente importante para sua manutenção e funcionamento como também para o controle da frequência dessas células no corpo. Recentemente, Almeida e colaboradores descreveram que a expressão do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) por essas células confere a elas uma vantagem na utilização da IL-2 secretada por linfócitos T CD4⁺ ativados durante uma resposta imune clássica. Assim, se as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) regulam a atividade de linfócitos ativados, esses últimos são capazes de regular o *pool* de células Tregs pela secreção de IL-2. Desta maneira, o equilíbrio das subpopulações de linfócitos T pode ser mantido independentemente do número absoluto desses linfócitos (Almeida *et al.*, 2006). Observamos também um estado de homeostase periférica de linfócitos T reguladores e T efetores como descrito por Almeida e colaboradores. Esse mecanismo de controle homeostático entre as populações de células T explica também a ausência de autoimunidade e inflamação mesmo perante o aumento de células T efetoras.

Posteriormente, avaliamos também a expressão de CD44⁺ em linfócitos T CD4⁺. Como mencionado anteriormente CD44⁺ é encontrado em células T em estado de ativação tardia. Os animais com colite apresentaram aumento da expressão de CD44⁺ em células T dos linfonodos mesentéricos e cecal com 3 e 7 dias de DSS, respectivamente. Novamente, os animais que ingeriram *L. lactis* produtor de Hsp apresentaram expressão de CD44⁺ similar a de animais saudáveis, evidenciando que os linfócitos T CD4⁺ em animais tratados apresentavam-se em um estágio mais basal de ativação. É importante ressaltar que a tolerância oral é um processo ativo e que a ativação de linfócitos ocorre nesse processo (Richman *et al.*, 1978).

Vários estudos identificaram aumento do número e/ou atividade de células reguladoras após contato com Hsp. Por exemplo, estudos *in vitro* utilizando Hsp60 demonstraram que a proteína é capaz de aumentar a atividade supressora de células Treg via a sinalização por TLR2. Nesse estudo, as células Tregs tratadas com Hsp60 suprimiram células T efetoras

por contato célula-célula como também via citocinas TGF- β e IL-10 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006). Em trabalho desenvolvido em nosso laboratório utilizando o modelo de EAE, também foi observado o aumento do número de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺) positivas para Foxp3 assim como de células CD4⁺CD25⁺LAP⁺ em animais tratados previamente por via oral com *L. lactis* produtor de Hsp65. Além disso, essas células foram identificadas com sendo T reguladoras naturais pela presença do fator de transcrição *helios* (Rezende, 2010).

Apesar de não termos identificado a reatividade das células T encontradas no presente estudo, é possível que as células T reguladoras sejam reativas a Hsp. Como existe reatividade cruzada entre Hsp murina e de *Mycobacterium*, células T reguladoras que reconheceram a Hsp expressa pelo epitélio tímico durante a seleção tímica (células T reguladoras naturais) podem ter sido recrutadas para a via de mucosa. Alternativamente, as células T reguladoras periféricas reativas à Hsp geradas na periferia pela própria microbiota ou ainda, induzidas pela tolerância oral à Hsp, podem ter se expandido.

Depois das alterações no aparecimento de células T após a administração oral de Hsp65, passamos a analisar o perfil de células dendríticas (DCs) com o fenótipo CD11c⁺CD11b⁻. As DCs são as mais eficientes células apresentadoras de antígeno. Além disso, diversos estudos evidenciaram que as DCs são críticas na manutenção da tolerância periférica através da geração de células T reguladoras (Manicassamy e Pulendran, 2011). Essas células apresentam *in vivo*, o fenótipo CD11c⁺DEC205⁺CD11b⁻CD8 α ⁺ (Shortman e Liu, 2002). No presente estudo, encontramos frequência aumentada de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁻ expressando CD80, CD86 e CD40 no baço de animais tratados previamente com Hsp. O grupo de Weiner demonstrou que CD86 mas não CD80 é necessário para a indução de tolerância oral com baixas doses do antígeno e que CD86 apresenta papel fundamental na regulação positiva de TGF- β na mucosa intestinal (Liu *et al.*, 1999; Gonnella *et al.*, 2006). A importância das moléculas co-estimuladoras na tolerância oral é consistente com o fato da indução de tolerância ser um evento imunológico ativo. Além disso, também encontramos nesses animais

aumento da frequência de células expressando a integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103⁺). No intestino, as DCs CD11c^{hi} que expressam CD103⁺ são capazes de gerar células reguladoras Foxp3⁺, na presença de ácido retinóico (Coombes *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007; Weiner *et al.*, 2011). É plausível que as células encontradas no estudo são tolerogênicas e provenientes da mucosa, uma vez que expressam a integrina $\alpha E\beta 7$, receptor de migração que direciona as DCs para a mucosa intestinal.

Posteriormente, incubamos o sobrenadante da cultura de *L. lactis* produtor de Hsp65 e de *L. lactis* com o plasmídeo vazio em células HEK para analisarmos se Hsp65 induzia a expressão de TLR2 e de TLR4 *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o sobrenadante de *L. lactis* produtor de Hsp65 induz a expressão tanto TLR2 quanto TLR4, porém a expressão de TLR2 assemelhou-se àquela induzida pelo agonista Pam3CysSK4. Por citometria de fluxo, confirmamos que células de baço de animais tratados previamente com *L. lactis* produtor de Hsp também apresentavam frequências elevadas de células dendríticas TLR2⁺ e TLR4⁺. Apesar da ativação de TLR, em muitos casos, promover uma resposta pró-inflamatória, alguns produtos microbianos que ativam TLR2 em células dendríticas promovem uma resposta tolerogênica. Por exemplo, o zimozan de leveduras e o fator de virulência Lcr de *Yersinia pestis* que sinalizam através de TLR2/TLR6 em DCs induzem células T reguladoras (Dillon *et al.*, 2006; Depaolo *et al.*, 2008). Além disso, as próprias T regs expressam receptores *Toll* e podem ser ativadas por ligantes endógenos tais como Hsp (Caramalho *et al.*, 2003).

A ligação direta de Hsps a receptores do tipo *Toll* já foi evidenciada em vários trabalhos da literatura (Ohashi *et al.*, 2000; Zanin-Zhorov *et al.*, 2006; Quintana e Cohen, 2010). No entanto, em muitos casos, surgiu a dúvida se os efeitos observados na produção de citocinas e expressão de moléculas co-estimuladoras foram devido a contaminação com LPS ao a própria Hsp (Tsan e Gao, 2009). Nosso grupo de pesquisa mostrou pelo teste do Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL) que o sistema de produção de Hsp65 por *L. lactis* é livre de endotoxina (Azevedo, 2009).

Chamorro e colaboradores estudaram o repertório de receptores de células dendríticas tolerogênicas comparado a células dendríticas diferenciadas de monócitos. Os autores relataram que as DCs tolerogênicas expressam o mesmo padrão de TLRs do que as DCs derivadas de monócito mas respondem diferentemente aos ligantes de *Toll*. Essas células, após estimulação com LPS, expressam CD80, CD86, CD83 e MHC-II. As células tolerogênicas expressam mais IL-10 e pouco ou nenhuma IL-12. Foi interessante notar que somente as DCs tolerogênicas, quando estimuladas, aumentam a expressão de TLR2. Isto eleva o potencial tolerogênico da célula já que células com alta expressão de TLR2, aumentam a produção de IL-10 (Chamorro *et al.*, 2009). Em nosso estudo, mostramos que as DCs do baço de camundongos que ingeriram *L. lactis* produtor de Hsp65 apresentaram aumento de expressão de moléculas co-estimuladoras e de receptores do tipo *Toll* 2 e 4. Além disso, essas células expressaram mais CD103⁺. Portanto, é possível que a tolerância oral a Hsp65 auxilie no recrutamento e ou diferenciação de células dendríticas tolerogênicas na mucosa e que essas células migrem posteriormente para os órgãos linfóides, como o baço.

Diversas famílias de receptores de reconhecimento padrão (PRR) são centrais no controle da resposta imune e na homeostase do intestino, atuando através de uma série de eventos de sinalização interdependentes. Os receptores semelhante a *Toll* e o domínio de oligomerização de nucleotídeo (NOD) apresentam papel no reconhecimento de micróbios e sinais endógenos de perigo, na inibição da invasão de patógenos, na produção de fatores anti-microbianos e no controle de respostas adaptativas. Ambos PRRs são amplamente expressos em vários tipos celulares na mucosa do trato gastrointestinal. Na saúde, a sinalização normal de PRRs protege a integridade da barreira intestinal e confere tolerância a microbiota. Na doença, a expressão exacerbada de PRRs acarreta injúria tecidual associada à inflamação crônica e resposta autoimune (Cario, 2008).

Uma vez que os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) estão intimamente relacionados ao desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais e, ao mesmo tempo, à ativação de circuitos protetores da mucosa intestinal (Cario, 2008; Gribar *et al.*, 2008), nós testamos a mesma estratégia terapêutica com *L. lactis* produtor de Hsp65

desta vez em camundongos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-}. *L. lactis* produtor de Hsp65 foi capaz de melhorar a colite mesmo em camundongos TLR4^{-/-} que apresentam colite mais grave do que camundongos C57BL/6, mas em não camundongos deficientes em TLR2^{-/-}.

TLR2 foi o único receptor do tipo *Toll* identificado até agora com participação direta no aumento da resistência transepitelial da barreira de células epiteliais intestinais (Podolsky *et al.*, 2009). O tratamento com o ligante de TLR2, Pam3CysSK4 (PCSK) protege a integridade do epitélio e leva à melhora de todos os sinais clínicos no modelo de colite induzida por DSS. A estimulação por ligantes de TLR2, mas não por TLR4, induz a fosforilação de AKt e a sua regulação negativa controlando a sobrevivência das células epiteliais e limitando a sinalização pró-inflamatória de estresse no epitélio (Cario e Podolsky, 2005; Cario *et al.*, 2007; Cario, 2008). Além disso, a sinalização de PRRs leva a translocação de NFκB, que mantém a homeostase intestinal. A ativação basal controlada de TLR/NFκB em células epiteliais intestinais aumenta a integridade da barreira intestinal, a produção de peptídeos anti-microbianos e a sobrevivência celular, atenuando então, a inflamação aguda no intestino (Spehlmann e Eckmann, 2009; Turner, 2009).

Recentemente, Round e colaboradores demonstraram que uma bactéria comensal humana, *Bacterioides fragilis*, direciona o desenvolvimento de células T reguladoras Foxp3⁺ e aumenta sua capacidade supressiva. Essa capacidade de *B. fragilis* se deve ao polissacáride A (PSA) produzido pela bactéria que medeia a conversão de células T CD4⁺ em células Foxp3⁺ produtoras de IL-10 durante a colonização da bactéria em camundongos *germ free*. A sinalização via TLR2 é necessária para a indução de células Tregs e para a produção de IL-10 (Round *et al.*, 2011).

Portanto, sugerimos que a Hsp65 produzida por *L. lactis* seja capaz de aumentar a expressão de TLR2 em células dendríticas e, provavelmente, em células epiteliais, induzindo o aumento na produção de IL-10 no cólon. Além disso, nossos resultados mostram que *L. lactis* produtor de Hsp65 foi capaz de induzir a expressão de receptores tolerogênicos em células dendríticas como também de antecipar o aparecimento de células T reguladoras.

Finalmente, nos perguntamos se *L. lactis* produtor de Hsp65 era capaz de tratar a colite espontânea em camundongos deficientes para IL-10. Apesar da melhora no índice macroscópico, *L. lactis* produtor de Hsp65 não foi capaz de controlar a inflamação intestinal nesse modelo. É importante ressaltar que a indução de tolerância oral é comprometida em condições inflamatórias (Faria e Weiner, 2006). Além disso, uma vez que demonstramos que *L. lactis* produtor de hsp65 direciona a células dendríticas para um perfil tolerogênico em condições normais (antes da indução da colite), pode ser que o mesmo não ocorra em condições de estresse (inflamação). Um importante papel das DCs em prevenir ou promover a colite foi demonstrado no modelo de colite induzido por DSS. A depleção de DCs antes da administração do DSS exacerba a colite (Qualls *et al.*, 2009) enquanto a eliminação dessas células durante o tratamento com DSS melhora a doença (Abe *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que as DCs podem ter um papel protetor na fase inicial e se tornarem patogênicas durante a fase inflamatória. Além disso, células dendríticas CD103⁺ dos linfonodos mesentéricos de camundongos com colite não apresentam a mesma capacidade tolerogênica do que as células dendríticas CD103⁺ de animais saudáveis. As DCs obtidas do animal inflamado reduzem a expressão de TGF- β e de ALDH1 além de perderem a capacidade de induzir células Treg. Pelo contrário, as DCs obtidas da inflamação favorecem a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (Laffont *et al.*, 2010). Como as proteínas de choque térmico apresentam papel duplo podendo controlar ou aumentar a inflamação (Van Eden *et al.*, 1998; Quintana e Cohen, 2010), pode ser que em condições de estresse a proteína não seja capaz de modular as DCs para um perfil tolerogênico já que essas estão comprometidas com a inflamação. Esse papel duplo da Hsp em exacerbar ou regular a inflamação foi demonstrado por Granja e colaboradores em 2004. Nesse estudo, os autores investigaram o papel da auto-reatividade à Hsp60 e Hsp70 na transplantação humana. A proliferação de células mononucleares sanguíneas induzida por Hsp60 e por Hsp70 no período pré-transplante foi associada com episódios de rejeição nos primeiros meses após a transplantação. Em contraste, a produção de IL-4

(estimulada por Hsp) foi associada com ausência de rejeição (Granja *et al.*, 2004).

Na primeira parte do presente trabalho, demonstramos que camundongos deficientes em IL-10 mesmo com colite estabelecida, são capazes de tolerizar para um antígeno administrado por via oral, mas somente por ingestão voluntária. Portanto, é possível que os animais IL-10^{-/-} tenham se tornado tolerantes para Hsp65. Encontramos frequência aumentada de células reguladoras CD4⁺LAP⁺ na *lamina propria* do intestino grosso bem como aumento de TGF- β . No entanto, conforme mencionado, a administração oral de *L. lactis* produtor de Hsp65 não foi capaz de controlar a inflamação na mucosa intestinal. É possível que a citocina IL-10 seja necessária para a modulação da inflamação intestinal por *L. lactis* produtor de Hsp65. Outra possibilidade é que a tolerância a Hsp65 tenha sido reduzida com o passar das semanas já que os animais foram tratados com 6 semanas de idade e sacrificados com 12 semanas.

No presente estudo, demonstramos que *L. lactis* produtor de Hsp65 foi capaz de manter a mucosa de animais tratados submetidos a indução de colite por DSS semelhante a de animais saudáveis. Houve aumento de IL-10 no cólon e redução de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e INF- γ . Além disso, *L. lactis* produtor de Hsp foi capaz de antecipar o aparecimento de células T reguladoras como também de gerar células dendríticas com perfil tolerogênico. A expressão de TLR2 foi crucial para a modulação da inflamação na mucosa intestinal. No entanto, *L. lactis* produtor de Hsp65 não melhorou a colite em animais com inflamação intestinal estabelecida, evidenciando o papel duplo da Hsp65 em modular ou exacerbar a inflamação.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

1- Camundongos deficientes em IL-10 apresentam uma inflamação espontânea e progressiva na mucosa intestinal com alterações marcantes no sistema imune. A ausência de uma importante citocina anti-inflamatória como a IL-10 leva à defeitos dramáticos na imuno-regulação, com redução de linfócitos T reguladores na mucosa intestinal, alterações na produção de isotipos de imunoglobulinas e na frequência de células B1. Apesar das alterações em diversos elementos reguladores na mucosa intestinal, a tolerância oral pode, ainda assim, ser induzida por ingestão voluntária de antígeno.

2- A retirada de proteínas dietéticas não melhora a retocolite experimental. É provável que a estimulação antigênica pelas proteínas alimentares auxilie na regulação do processo inflamatório agudo. Dietas contendo di-tripeptídeos podem ser utilizadas como alternativa terapêutica, do ponto de vista nutricional, para o controle da inflamação intestinal.

3- A bactéria láctica *Lactococcus lactis* geneticamente modificada para produzir e secretar Hsp65 emerge como uma nova possibilidade terapêutica para prevenção da doença inflamatória intestinal. Seu mecanismo de ação parece ser dependente da sinalização via TLR2, que auxilia na manutenção da homeostase da mucosa intestinal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Abe, K., *et al.* Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.43, Oct 23, p.17022-7. 2007.

Abraham, C. e R. Medzhitov. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.140, n.6, May, p.1729-37. 2011.

Almeida, A. R., *et al.* Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. J Immunol, v.177, n.1, Jul 1, p.192-200. 2006.

Amaral, J. F., *et al.* Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. Immunology, v.129, n.3, Mar, p.455-64. 2010.

Andou, A., *et al.* Dietary histidine ameliorates murine colitis by inhibition of proinflammatory cytokine production from macrophages. Gastroenterology, v.136, n.2, Feb, p.564-74 e2. 2009.

Annacker, O., *et al.* CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. J Immunol, v.166, n.5, Mar 1, p.3008-18. 2001.

Araki, A., *et al.* MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. J Gastroenterol, v.40, n.1, Jan, p.16-23. 2005.

Aroeira, L. S., *et al.* Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA. Scand J Immunol, v.41, n.4, Apr, p.319-23. 1995.

Arsene, F., *et al.* The heat shock response of *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol, v.55, n.1-3, Apr 10, p.3-9. 2000.

Avrameas, S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. Immunol Today, v.12, n.5, May, p.154-9. 1991.

Azevedo, M. S. P. D. Avaliação da imunogenicidade de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 138 p.

Baca-Estrada, M. E., *et al.* Intestinal expression and cellular immune responses to human heat-shock protein 60 in Crohn's disease. Dig Dis Sci, v.39, n.3, Mar, p.498-506. 1994.

- Banchereau, J., *et al.* The CD40 antigen and its ligand. Annu Rev Immunol, v.12, p.881-922. 1994.
- Barkin, R. e J. H. Lewis. Overview of inflammatory bowel disease in humans. Semin Vet Med Surg (Small Anim), v.7, n.2, May, p.117-27. 1992.
- Baumgart, D. C. e S. R. Carding. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet, v.369, n.9573, May 12, p.1627-40. 2007.
- Berberian, L. S., *et al.* Expression of a novel autoantibody defined by the VH3-15 gene in inflammatory bowel disease and *Campylobacter jejuni* enterocolitis. J Immunol, v.153, n.8, Oct 15, p.3756-63. 1994.
- Berg, D. J., *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. J Clin Invest, v.98, n.4, Aug 15, p.1010-20. 1996.
- Bienenstock, J. e A. D. Befus. Mucosal immunology. Immunology, v.41, n.2, Oct, p.249-70. 1980.
- Binder, R. J., *et al.* The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. Tissue Antigens, v.64, n.4, Oct, p.442-51. 2004.
- Bjursten, M. e E. Hultgren Hornquist. Dietary antigen-specific T-cell responses: switch from an interleukin-10-dominated response in normal mice to a T-helper 1 cytokine profile in Galphai2-deficient mice prior to colitis. Scand J Immunol, v.61, n.1, Jan, p.29-35. 2005.
- Borges, J. C. e C. H. Ramos. Protein folding assisted by chaperones. Protein Pept Lett, v.12, n.3, Apr, p.257-61. 2005.
- Bottomly, K., *et al.* A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. Eur J Immunol, v.19, n.4, Apr, p.617-23. 1989.
- Bouma, G. e W. Strober. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol, v.3, n.7, Jul, p.521-33. 2003.
- Braat, H., *et al.* A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol, v.4, n.6, Jun, p.754-9. 2006.
- Brandtzaeg, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. Nutr Rev, v.56, n.1 Pt 2, Jan, p.S5-18. 1998.
- Caldas, C., *et al.* T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role? Transplant Proc, v.36, n.4, May, p.833-5. 2004.

Caramalho, I., *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. J Exp Med, v.197, n.4, Feb 17, p.403-11. 2003.

Cario, E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. Curr Opin Gastroenterol, v.24, n.6, Nov, p.725-32. 2008.

Cario, E., *et al.* Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. Gastroenterology, v.132, n.4, Apr, p.1359-74. 2007.

Cario, E. e D. K. Podolsky. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. Mol Immunol, v.42, n.8, May, p.887-93. 2005.

Carr, F. J., *et al.* The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit Rev Microbiol, v.28, n.4, p.281-370. 2002.

Cebra, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am J Clin Nutr, v.69, n.5, May, p.1046S-1051S. 1999.

Chamorro, S., *et al.* TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. J Immunol, v.183, n.5, Sep 1, p.2984-94. 2009.

Chandawarkar, R. Y., *et al.* Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. Int Immunol, v.16, n.4, Apr, p.615-24. 2004.

Chen, Y., *et al.* Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.22, Oct 29, p.14338-43. 2002.

Chirido, F. G., *et al.* Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. Eur J Immunol, v.35, n.6, Jun, p.1831-40. 2005.

Cho, J. H. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. World J Gastroenterol, v.14, n.3, Jan 21, p.338-47. 2008.

Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends in Food Science & Technology, p.254-262. 2000.

Cohen, I. R. e D. B. Young. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol Today, v.12, n.4, Apr, p.105-10. 1991.

Coombes, J. L., *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J Exp Med, v.204, n.8, Aug 6, p.1757-64. 2007.

Crabbe, P. A., *et al.* The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.34, n.4, p.362-75. 1968.

Crawford, J. M. e R. W. Barton. Thy-1 glycoprotein: structure, distribution, and ontogeny. Lab Invest, v.54, n.2, Feb, p.122-35. 1986.

Dasgupta, A., *et al.* Oral administration of unmodified colonic but not small intestinal antigens protects rats from hapten-induced colitis. Clin Exp Immunol, v.125, n.1, Jul, p.41-7. 2001.

Davidson, N. J., *et al.* IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. J Immunol, v.161, n.6, Sep 15, p.3143-9. 1998.

_____. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. J Exp Med, v.184, n.1, Jul 1, p.241-51. 1996.

Davies, M. D. e D. M. Parrott. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. Gut, v.22, n.6, Jun, p.481-8. 1981.

De Faria, A. M., *et al.* Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. Mech Ageing Dev, v.102, n.1, May 1, p.67-80. 1998.

De Vrese, M., *et al.* Probiotics--compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr, v.73, n.2 Suppl, Feb, p.421S-429S. 2001.

Depaolo, R. W., *et al.* Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. Cell Host Microbe, v.4, n.4, Oct 16, p.350-61. 2008.

Dieleman, L. A., *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol, v.114, n.3, Dec, p.385-91. 1998.

Dillon, S., *et al.* Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. J Clin Invest, v.116, n.4, Apr, p.916-28. 2006.

Duchmann, R., *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol, v.102, n.3, Dec, p.448-55. 1995.

Elias, D., *et al.* Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.4, Feb, p.1576-80. 1990.

Ellis, R. J. The molecular chaperone concept. Semin Cell Biol, v.1, n.1, Feb, p.1-9. 1990.

Elson, C. O., *et al.* Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. Semin Immunol, v.13, n.3, Jun, p.187-94. 2001.

Erickson, R. H. e Y. S. Kim. Digestion and absorption of dietary protein. Annu Rev Med, v.41, p.133-9. 1990.

Fagarasan, S., *et al.* Mechanism of B1 cell differentiation and migration in GALT. Curr Top Microbiol Immunol, v.252, p.221-9. 2000.

Faria, A. M., *et al.* Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Autoimmun, v.20, n.2, Mar, p.135-45. 2003.

Faria, A. M. e H. L. Weiner. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. Adv Immunol, v.73, p.153-264. 1999.

_____. Oral tolerance. Immunol Rev, v.206, Aug, p.232-59. 2005.

_____. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clin Dev Immunol, v.13, n.2-4, Jun-Dec, p.143-57. 2006.

Feng, T., *et al.* Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. J Immunol, v.186, n.11, Jun 1, p.6313-8. 2011.

Fernandez-Banares, F., *et al.* Enteral nutrition as primary therapy in Crohn's disease. Gut, v.35, n.1 Suppl, Jan, p.S55-9. 1994.

Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology, v.115, n.1, Jul, p.182-205. 1998.

Forbes, E., *et al.* Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. J Immunol, v.172, n.9, May 1, p.5664-75. 2004.

Frenhani, P. B. e R. C. Burini. [Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. Control and implications in human diet therapy]. Arq Gastroenterol, v.36, n.4, Oct-Dec, p.227-37. 1999.

Gaburri, P. D., *et al.* [Epidemiology, clinical features and clinical course of Crohn's disease: a study of 60 cases]. Arq Gastroenterol, v.35, n.4, Oct-Dec, p.240-6. 1998.

Gandhi, R., *et al.* Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. J Immunol, v.184, n.9, May 1, p.4620-4. 2011.

Gassull, M. A., *et al.* Enteral nutrition in inflammatory bowel disease. Gut, v.27 Suppl 1, Nov, p.76-80. 1986.

Gaston, J. S. Heat shock proteins and innate immunity. Clin Exp Immunol, v.127, n.1, Jan, p.1-3. 2002.

Gill, S. R., *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, v.312, n.5778, Jun 2, p.1355-9. 2006.

Gismera, C. S. e B. S. Aladren. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? World J Gastroenterol, v.14, n.36, Sep 28, p.5491-8. 2008.

Gonnella, P. A., *et al.* Induction of oral tolerization in CD86 deficient mice: a role for CD86 and B cells in the up-regulation of TGF-beta. J Autoimmun, v.26, n.2, Mar, p.73-81. 2006.

Goodison, S., *et al.* CD44 cell adhesion molecules. Mol Pathol, v.52, n.4, Aug, p.189-96. 1999.

Granja, C., *et al.* T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. Hum Immunol, v.65, n.2, Feb, p.124-34. 2004.

Gribar, S. C., *et al.* The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. J Leukoc Biol, v.83, n.3, Mar, p.493-8. 2008.

Hauet-Broere, F., *et al.* Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. Ann Rheum Dis, v.65 Suppl 3, Nov, p.iii65-8. 2006.

Hendrickson, B. A., *et al.* Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev, v.15, n.1, Jan, p.79-94. 2002.

Herzenberg, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. Immunol Rev, v.175, Jun, p.9-22. 2000.

Higgins, P. J. e H. L. Weiner. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. J Immunol, v.140, n.2, Jan 15, p.440-5. 1988.

Homan, M., *et al.* Managing complicated Crohn's disease in children and adolescents. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, v.2, n.12, Dec, p.572-9. 2005.

Huibregtse, I. L., *et al.* Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of Lactococcus lactis secreting ovalbumin. Gastroenterology, v.133, n.2, Aug, p.517-28. 2007.

Ito, R., *et al.* Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. Biochem Biophys Res Commun, v.377, n.1, Dec 5, p.12-6. 2008.

Iwasaki, A. e B. L. Kelsall. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. J Exp Med, v.190, n.2, Jul 19, p.229-39. 1999.

Iwata, M., *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. Immunity, v.21, n.4, Oct, p.527-38. 2004.

Izcue, A., *et al.* Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. Annu Rev Immunol, v.27, p.313-38. 2009.

Johnson, T., *et al.* Treatment of active Crohn's disease in children using partial enteral nutrition with liquid formula: a randomised controlled trial. Gut, v.55, n.3, Mar, p.356-61. 2006.

Kajiura, T., *et al.* Change of intestinal microbiota with elemental diet and its impact on therapeutic effects in a murine model of chronic colitis. Dig Dis Sci, v.54, n.9, Sep, p.1892-900. 2009.

Kang, O. H., *et al.* Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. Int J Mol Med, v.18, n.5, Nov, p.893-9. 2006.

Kanwar, B., *et al.* In vivo imaging of mucosal CD4+ T cells using single photon emission computed tomography in a murine model of colitis. J Immunol Methods, v.329, n.1-2, Jan 1, p.21-30. 2008.

Kapp, J. A., *et al.* gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. Immunology, v.111, n.2, Feb, p.155-64. 2004.

Kawada, M., *et al.* Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, v.13, n.42, Nov 14, p.5581-93. 2007.

Ke, Y., *et al.* Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. J Immunol, v.158, n.8, Apr 15, p.3610-8. 1997.

Khor, B., *et al.* Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature, v.474, n.7351, Jun 16, p.307-17. 2011.

Kitajima, S., *et al.* Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. Exp Anim, v.50, n.5, Oct, p.387-95. 2001.

_____. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. J Vet Med Sci, v.61, n.1, Jan, p.67-70. 1999.

Kuhn, R., *et al.* Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

Kundig, T. M., *et al.* Immune responses in interleukin-2-deficient mice. Science, v.262, n.5136, Nov 12, p.1059-61. 1993.

Laffont, S., *et al.* Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. Eur J Immunol, v.40, n.7, Jul, p.1877-83. 2010.

Lakatos, L. e P. L. Lakatos. [Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]. Orv Hetil, v.148, n.5, Feb 4, p.223-8. 2007.

Lakatos, P. L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? World J Gastroenterol, v.12, n.38, Oct 14, p.6102-8. 2006.

Lambolez, F., *et al.* Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. Immunol Rev, v.215, Feb, p.178-88. 2007.

Lanier, L. L., *et al.* CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. J Immunol, v.154, n.1, Jan 1, p.97-105. 1995.

Li, M. O. e R. A. Flavell. TGF-beta: a master of all T cell trades. Cell, v.134, n.3, Aug 8, p.392-404. 2008.

Lindquist, S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem, v.55, p.1151-91. 1986.

Lindquist, S. e E. A. Craig. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet, v.22, p.631-77. 1988.

Liu, L., *et al.* B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) costimulation is required for the induction of low dose oral tolerance. J Immunol, v.163, n.4, Aug 15, p.2284-90. 1999.

Luna, E., *et al.* Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. Scand J Immunol, v.66, n.1, Jul, p.62-70. 2007.

_____. Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. Cell Stress Chaperones, v.12, n.2, Summer, p.112-22. 2007.

Ma, X., *et al.* High-fat diet modulates non-CD1d-restricted natural killer T cells and regulatory T cells in mouse colon and exacerbates experimental colitis. Clin Exp Immunol, v.151, n.1, Jan, p.130-8. 2008.

Macdonald, T. T. Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol, v.102, n.3, Dec, p.445-7. 1995.

Mahler, M. e E. H. Leiter. Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice. Inflamm Bowel Dis, v.8, n.5, Sep, p.347-55. 2002.

Maillard, M. H. e S. B. Snapper. Teaching tolerance with a probiotic antigen delivery system. Gastroenterology, v.133, n.2, Aug, p.706-9. 2007.

Manicassamy, S. e B. Pulendran. Dendritic cell control of tolerogenic responses. Immunol Rev, v.241, n.1, May, p.206-27. 2011.

Maron, R., *et al.* Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. Int Immunol, v.11, n.9, Sep, p.1573-80. 1999.

_____. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Circulation, v.106, n.13, Sep 24, p.1708-15. 2002.

Mccafferty, D. M., *et al.* Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.279, n.1, Jul, p.G90-9. 2000.

Melgar, S., *et al.* Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.292, n.1, Jan, p.G165-72. 2007.

_____. Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute, chronic and recovery phase of murine experimental colitis. Cytokine, v.35, n.5-6, Sep, p.275-83. 2006.

_____. 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, v.288, n.6, Jun, p.G1328-38. 2005.

Menezes, J. S., *et al.* Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. Int Immunol, v.15, n.3, Mar, p.447-55. 2003.

Mengel, J., *et al.* Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. Immunol Lett, v.48, n.2, Dec, p.97-102. 1995.

Merbl, Y., *et al.* A systems immunology approach to the host-tumor interaction: large-scale patterns of natural autoantibodies distinguish healthy and tumor-bearing mice. PLoS One, v.4, n.6, p.e6053. 2009.

Mikami, Y., *et al.* Competition between colitogenic Th1 and Th17 cells contributes to the amelioration of colitis. Eur J Immunol, v.40, n.9, Sep, p.2409-22. 2010.

Miller, A., *et al.* Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.1, Jan 1, p.421-5. 1992.

Mimran, A., *et al.* DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiertgotypic response. J Clin Invest, v.113, n.6, Mar, p.924-32. 2004.

Miyoshi, A., *et al.* A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett, v.239, n.2, Oct 15, p.205-12. 2004.

Monteiro, J. P., *et al.* Pathogenic effector T cell enrichment overcomes regulatory T cell control and generates autoimmune gastritis. J Immunol, v.181, n.9, Nov 1, p.5895-903. 2008.

Montufar-Solis, D., *et al.* Massive but selective cytokine dysregulation in the colon of IL-10^{-/-} mice revealed by multiplex analysis. Int Immunol, v.20, n.1, Jan, p.141-54. 2008.

Moog, F. The lining of the small intestine. Sci Am, v.245, n.5, Nov, p.154-8, 160, 162 et passiom. 1981.

Mor, F., *et al.* IL-2 and TNF receptors as targets of regulatory T-T interactions: isolation and characterization of cytokine receptor-reactive T cell lines in the Lewis rat. J Immunol, v.157, n.11, Dec 1, p.4855-61. 1996.

Mora, J. R., *et al.* Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. Science, v.314, n.5802, Nov 17, p.1157-60. 2006.

Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol, v.3, n.4, Apr, p.331-41. 2003.

Mucida, D., *et al.* Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. J Clin Invest, v.115, n.7, Jul, p.1923-33. 2005.

_____. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science, v.317, n.5835, Jul 13, p.256-60. 2007.

Mucida, D. S., *et al.* Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. Ann N Y Acad Sci, v.1029, Dec, p.361-5. 2004.

Murai, M., *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nat Immunol, v.10, n.11, Nov, p.1178-84. 2009.

Murthy, A. K., *et al.* Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis. J Gastroenterol Hepatol, v.21, n.9, Sep, p.1372-80. 2006.

Nakamura, K., *et al.* TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. J Immunol, v.172, n.2, Jan 15, p.834-42. 2004.

Neurath, M. F., *et al.* Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. J Exp Med, v.183, n.6, Jun 1, p.2605-16. 1996.

Ni, J., *et al.* Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. Gut, v.39, n.2, Aug, p.234-41. 1996.

Nishikawa, M., *et al.* Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. Int J Pharm, v.354, n.1-2, Apr 16, p.23-7. 2008.

O'sullivan, M. e C. O'morain. Liquid diets for Crohn's disease. Gut, v.48, n.6, Jun, p.757. 2001.

Ohashi, K., *et al.* Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol, v.164, n.2, Jan 15, p.558-61. 2000.

Ohman, L., *et al.* Immune activation in the intestinal mucosa before the onset of colitis in Galphai2-deficient mice. Scand J Immunol, v.52, n.1, Jul, p.80-90. 2000.

Oida, T., *et al.* CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. J Immunol, v.170, n.5, Mar 1, p.2516-22. 2003.

Okayasu, I., *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology, v.98, n.3, Mar, p.694-702. 1990.

Ouwehand, A. C., *et al.* Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek, v.82, n.1-4, Aug, p.279-89. 2002.

Perdigon, G., *et al.* Immune system stimulation by probiotics. J Dairy Sci, v.78, n.7, Jul, p.1597-606. 1995.

Pereira, P., *et al.* Natural effector T lymphocytes in normal mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.22, Nov, p.7691-5. 1985.

Podolsky, D. K., *et al.* Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. Gastroenterology, v.137, n.1, Jul, p.209-20. 2009.

Pontes, D. S., *et al.* Lactococcus lactis as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. Protein Expr Purif, Jun 16. 2011.

Poritz, L. S., *et al.* Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. J Surg Res, v.140, n.1, Jun 1, p.12-9. 2007.

Powrie, F., *et al.* Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. Int Immunol, v.5, n.11, Nov, p.1461-71. 1993.

Powrie, F. e D. Mason. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. J Exp Med, v.172, n.6, Dec 1, p.1701-8. 1990.

Qualls, J. E., *et al.* Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells. Inflamm Bowel Dis, v.15, n.2, Feb, p.236-47. 2009.

Quintana, F. J. e I. R. Cohen. The HSP60 immune system network. Trends Immunol, v.32, n.2, Feb, p.89-95. 2010.

Quintana, F. J., *et al.* HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. PLoS One, v.3, n.12, p.e4026. 2008.

Rakoff-Nahoum, S., *et al.* Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. Immunity, v.25, n.2, Aug, p.319-29. 2006.

Ramachandran, A., *et al.* Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. J Gastroenterol Hepatol, v.15, n.2, Feb, p.109-20. 2000.

Reeves, P. G., *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Rescigno, M., *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol, v.2, n.4, Apr, p.361-7. 2001.

Rezende, R. M. Oral administration of Hsp65-producing Lactococcus lactis prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Imuno 2010. Porto Alegre, Brasil 2010.

Richman, L. K., *et al.* Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. J Immunol, v.121, n.6, Dec, p.2429-34. 1978.

Riordan, A. M., *et al.* Treatment of active Crohn's disease by exclusion diet: East Anglian multicentre controlled trial. Lancet, v.342, n.8880, Nov 6, p.1131-4. 1993.

Rizzo, L. V., *et al.* IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. J Immunol, v.162, n.5, Mar 1, p.2613-22. 1999.

Rocha, C. S. Construção de linhagens recombinantes de Lactococcus lactis produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de Mycobacterium leprae: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações científicas. Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. 105 p.

Rottiers, P., *et al.* Modulation of gut-associated lymphoid tissue functions with genetically modified Lactococcus lactis. Int Rev Immunol, v.28, n.6, p.465-86. 2009.

Round, J. L., *et al.* The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. Science, v.332, n.6032, May 20, p.974-7. 2011.

Round, J. L. e S. K. Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol, v.9, n.5, May, p.313-23. 2009.

Sadlack, B., *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.253-61. 1993.

Sakaguchi, S., *et al.* Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med, v.161, n.1, Jan 1, p.72-87. 1985.

Sakaguchi, S. e F. Powrie. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. Science, v.317, n.5838, Aug 3, p.627-9. 2007.

Sakaguchi, S., *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, v.155, n.3, Aug 1, p.1151-64. 1995.

_____. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, v.133, n.5, May 30, p.775-87. 2008.

Santiago, A. F., *et al.* Aging correlates with reduction in regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. Immunobiology, May 14. 2011.

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

Saraiva, M. e A. O'garra. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol, v.10, n.3, Mar, p.170-81. 2010.

Sartor, R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. Am J Gastroenterol, v.92, n.12 Suppl, Dec, p.5S-11S. 1997.

Seegers, J. F. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol, v.20, n.12, Dec, p.508-15. 2002.

Sellon, R. K., *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. Infect Immun, v.66, n.11, Nov, p.5224-31. 1998.

Shaw, M. H., *et al.* The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. Trends Immunol, v.32, n.2, Feb, p.73-9. 2011.

Shintani, N., *et al.* Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. Gen Pharmacol, v.31, n.3, Sep, p.477-81. 1998.

Shortman, K. e Y. J. Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol, v.2, n.3, Mar, p.151-61. 2002.

Skeen, M. J., *et al.* Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. J Immunol, v.156, n.3, Feb 1, p.1196-206. 1996.

Smith, P. A. Nutritional therapy for active Crohn's disease. World J Gastroenterol, v.14, n.27, Jul 21, p.4420-3. 2008.

Souza, M. H., *et al.* [Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]. Arq Gastroenterol, v.39, n.2, Apr-Jun, p.98-105. 2002.

Spehlmann, M. E. e L. Eckmann. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. Curr Opin Gastroenterol, v.25, n.2, Mar, p.92-9. 2009.

Steidler, L., *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science, v.289, n.5483, Aug 25, p.1352-5. 2000.

_____. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. Infect Immun, v.66, n.7, Jul, p.3183-9. 1998.

Steidler, L. e P. Rottiers. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. Ann N Y Acad Sci, v.1072, Aug, p.176-86. 2006.

Steinman, R. M., *et al.* Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. Immunol Rev, v.156, Apr, p.25-37. 1997.

Stevceva, L., *et al.* Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. Genes Immun, v.2, n.6, Oct, p.309-16. 2001.

Strober, W. Why study animal models of IBD? Inflamm Bowel Dis, v.14 Suppl 2, Oct, p.S129-31. 2008.

Strober, W., *et al.* The fundamental basis of inflammatory bowel disease. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.514-21. 2007.

_____. The immunology of mucosal models of inflammation. Annu Rev Immunol, v.20, p.495-549. 2002.

Suzuki, K. e S. Fagarasan. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. Trends Immunol, v.29, n.11, Nov, p.523-31. 2008.

_____. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. Mucosal Immunol, v.2, n.6, Nov, p.468-71. 2009.

Suzuki, K., *et al.* Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. Pathol Int, v.61, n.4, Apr, p.228-38.

Takagi, H., *et al.* Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. Scand J Gastroenterol, v.38, n.8, Aug, p.837-44. 2003.

Tebbutt, N. C., *et al.* Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. Nat Med, v.8, n.10, Oct, p.1089-97. 2002.

Testi, R., *et al.* The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. Immunol Today, v.15, n.10, Oct, p.479-83. 1994.

Tsan, M. F. e B. Gao. Endogenous ligands of Toll-like receptors. J Leukoc Biol, v.76, n.3, Sep, p.514-9. 2004.

_____. Heat shock proteins and immune system. J Leukoc Biol, v.85, n.6, Jun, p.905-10. 2009.

Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol, v.9, n.11, Nov, p.799-809. 2009.

Uhlig, H. H. e F. Powrie. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. J Clin Invest, v.112, n.5, Sep, p.648-51. 2003.

Untersmayr, E. e E. Jensen-Jarolim. Mechanisms of type I food allergy. Pharmacol Ther, v.112, n.3, Dec, p.787-98. 2006.

Van Den Broek, M. F., *et al.* Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. J Exp Med, v.170, n.2, Aug 1, p.449-66. 1989.

Van Eden, W., *et al.* Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? Immunol Today, v.19, n.7, Jul, p.303-7. 1998.

_____. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. Nat Rev Immunol, v.5, n.4, Apr, p.318-30. 2005.

_____. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. Ann N Y Acad Sci, v.1113, Oct, p.217-37. 2007.

Vaz, N. M., *et al.* Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. J Allergy Clin Immunol, v.60, n.2, Aug, p.110-5. 1977.

_____. The conservative physiology of the immune system. A non-metaphoric approach to immunological activity. Clin Dev Immunol, v.13, n.2-4, Jun-Dec, p.133-42. 2006.

_____. Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. Braz J Med Biol Res, v.20, n.6, p.785-90. 1987.

Walter, S. e J. Buchner. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. Angew Chem Int Ed Engl, v.41, n.7, Apr 2, p.1098-113. 2002.

Wang, F., *et al.* IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. Gastroenterology, v.131, n.4, Oct, p.1153-63. 2006.

Weiner, H. L., *et al.* Oral tolerance. Immunol Rev, v.241, n.1, May, p.241-59. 2011.

_____. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annu Rev Immunol, v.12, p.809-37. 1994.

Wells, J. M. e A. Mercenier. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nat Rev Microbiol, v.6, n.5, May, p.349-62. 2008.

Wieten, L., *et al.* IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. PLoS One, v.4, n.1, p.e4186. 2009.

Wilschanski, M., *et al.* Supplementary enteral nutrition maintains remission in paediatric Crohn's disease. Gut, v.38, n.4, Apr, p.543-8. 1996.

Winrow, V. R., *et al.* Stress proteins in colorectal mucosa. Enhanced expression in ulcerative colitis. Dig Dis Sci, v.38, n.11, Nov, p.1994-2000. 1993.

Wirtz, S., *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat Protoc, v.2, n.3, p.541-6. 2007.

Xavier, R. J. e D. K. Podolsky. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature, v.448, n.7152, Jul 26, p.427-34. 2007.

Yagita, A., *et al.* Mouse colitis induced by Escherichia coli producing Yersinia enterocolitica 60-kilodalton heat-shock protein: light and electron microscope study. Dig Dis Sci, v.44, n.2, Feb, p.445-51. 1999.

Yamamoto, T., *et al.* Impact of elemental diet on mucosal inflammation in patients with active Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histological findings. Inflamm Bowel Dis, v.11, n.6, Jun, p.580-8. 2005.

Yen, D., *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest, v.116, n.5, May, p.1310-6. 2006.

Yunoki, N., *et al.* Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of Helicobacter pylori eradication treatment. Clin Diagn Lab Immunol, v.7, n.4, Jul, p.574-7. 2000.

Zanin-Zhorov, A., *et al.* Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. J Clin Invest, v.116, n.7, Jul, p.2022-32. 2006.

_____. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. FASEB J, v.17, n.11, Aug, p.1567-9. 2003.

_____. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. J Immunol, v.175, n.1, Jul 1, p.276-85. 2005.

Zhang, Z. J., *et al.* Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.22, Nov 15, p.10252-6. 1991.

Zhou, P., *et al.* Expression of dual TCR on DO11.10 T cells allows for ovalbumin-induced oral tolerance to prevent T cell-mediated colitis directed against unrelated enteric bacterial antigens. J Immunol, v.172, n.3, Feb 1, p.1515-23. 2004.

ANEXOS