

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**Utilização Biotecnológica de *Lactococcus lactis*
como veículo de liberação da 15-Lipoxigenase-1 no
tratamento de doenças inflamatórias intestinais**

ORIENTADA: Kátia de Moraes Costa Leite

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

BELO HORIZONTE

2014

Costa-Leite K.M.

Kátia de Moraes Costa Leite



**Utilização Biotecnológica de *Lactococcus lactis*
como veículo de liberação da 15-Lipoxigenase-1 no
tratamento de doenças inflamatórias intestinais**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Biotecnologia e Formulações Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston De Carvalho Azevedo

BELO HORIZONTE

2014

II

043 Leite, Kátia de Moraes Costa.

Utilização biotecnológica de lactococcus lactis como veículo de liberação da 15-lipoxigenase-1 no tratamento de doenças inflamatórias intestinais [manuscrito] / Kátia de Moraes Costa Leite. – 2014.

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

Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. Colite - Teses. 2. Intestinos - Doenças inflamatórias - Teses. 3. Lactococcus lactis - Teses. 4. Lipoxigenase - Teses. 5. Biotecnologia - Teses. I. Azevedo,



**UTILIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE *LACTOCOCCUS LACTIS*
COMO VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DA *15-LIPOXIGENASE-1* NO
TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Kátia de Moraes Costa Leite

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Denise Carmona Cara Machado- Departamento de Morfologia/UFMG

Prof. Dr. Túlio Marcos Santos UNICLON Biotecnologia Ltda/PUC Minas

Suplente: Dr^a. Marcela Santiago Pacheco Azevedo- Pós Doutoranda ICB/UFMG

Dissertação defendida e aprovada em: 28/07/2014

Agradecimentos

À Deus, por me proporcionar a vida e todas as experiências maravilhosas que passei, por me iluminar e abençoar minhas escolhas e por me dar força através da minha fé para sempre seguir em frente e obter sucesso.

Agradeço ao professor e grande pesquisador, Prof. Vasco Azevedo. Obrigada pela oportunidade, pelo incansável incentivo, por sua valiosa orientação durante esses anos, por sua tamanha disponibilidade e pela confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Anderson Miyoshi, pela oportunidade, e confiança depositada em mim.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pela disponibilidade em avaliarem este trabalho.

À Professora Daniela Pontes pelas contribuições geradas ao dar início a esse projeto.

À Professora Denise, pela contribuição nos experimentos e pelo carinho.

À coordenação, professores, secretária Cynthia e colegas do curso de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica.

Aos meus pais, Marli (*in memoriam*) e Antônio (*in memoriam*), pelo amor, carinho e educação que me prestaram.

Ao meu amigo, amor e companheiro Wilmar, por sempre demonstrar interesse pelos meus planos, acompanhar minhas conquistas e alimentar meus sonhos.

As minhas filhas, pelo carinho e amizade. Vocês fazem parte das minhas conquistas. Obrigada pelo incentivo e palavras de consolo. Por vocês eu cheguei até aqui e para vocês que continuarei a seguir.

As minhas irmãs, que por muitas vezes pude recorrer e sempre tive amparo. Muito obrigada!

Aos meus familiares por apoiarem, por falarem de mim com orgulho e carinho. Vocês também são responsáveis por minhas conquistas, pois nunca deixaram me faltar nada.

À minha amiga e companheira, Flávia, por ser solícita, por dividir experimentos, material de estudo, por me ajudar na execução das minhas tarefas no laboratório, na formatação do manuscrito por estar presente nos momentos de descontração e de aflições, por me passar conhecimentos valiosos, experiências de vida. Irmã de alma, muito obrigada!

As minhas grandes amigas, Aracele, Fernanda Dorella, Fernanda Magalhães e Marcília, que estiveram sempre presentes na minha vida, de perto ou de longe tornando mais importante cada dia da minha vida. Minhas amigas de luz. Muito obrigada.

Às alunas de Pós doutorado Ana Cris, Marcela, Tessália pelas contribuições no artigo e pelas discussões e em especial à aluna Vanessa Bastos, pelas contribuições científicas e pela dedicação e companheirismo.

Ao amigo Alberto, pelas contribuições bioinformáticas e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos amigos funcionários Elimar, José Carlos, Júlio César, Selma, Mércia e Peu pelo imenso apoio e carinho.

À todos os colegas do LGCM, antigos e novos, pelos ensinamentos, pelas alegrias e pelo incentivo.

Às secretárias Sheila Magalhães, Márcia Natália, Mary das Graças, pela grande torcida e apoio.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | X |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS | XIII |
| RESUMO..... | 17 |
| ABSTRACT..... | XVIII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1 BIOTECNOLOGIA E INOVAÇÃO..... | 19 |
| 1.1 BIOTECNOLOGIA E OS PRODUTOS LÁCTEOS..... | 19 |
| 1.1.1 Alimentos funcionais e os probióticos | 20 |
| 1.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS (BL)..... | 21 |
| 1.2.1 <i>Lactococcus lactis</i> : a Bactéria Láctica modelo | 23 |
| 1.2.2 Novas utilizações das Bactérias Lácticas..... | 24 |
| 1.2.3 Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i> | 25 |
| 1.3 MUCOSA INTESTINAL | 27 |
| 1.3.1 Interações microbiota/sistema imune no TGI | 31 |
| 1.3.2 As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal..... | 34 |
| 1.4 ÁCIDOS GRAXOS: UM ELO ENTRE EICOSANÓIDES, INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE | 36 |
| 1.4.1. Eicosanoides | 37 |
| 1.4.2. Lipoxigenases..... | 39 |
| 1.4.3. 15 Lipoxigenase-1 (15-LOX-1)..... | 40 |
| 1.4.4 Propriedades antiinflamatórias e antitumorais da 15-LOX-1 | 42 |
| 1.4.5 Lipoxinas: os produtos de interação da lipoxigenases..... | 43 |
| 3. OBJETIVOS | 47 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 47 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 48 |
| 4.1. LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM ... | 48 |
| 4.2. MANIPULAÇÃO DO DNA | 49 |
| 4.3. RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA..... | 50 |
| 4.4. AMPLIFICAÇÃO DA ORF 15-LOX-1 | 50 |
| 4.5. CLONAGEM DA ORF 15-LOX-1 NO SISTEMA TOPO PCR II-TOPO (INVITROGEN) ... | 52 |
| 4.5.1. Confecção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente | 52 |
| 4.5.2 Transformação de <i>Escherichia coli</i> TG1..... | 53 |
| 4.5.3. Extração do DNA plasmideano de <i>Escherichia coli</i> TG1 | 53 |
| 4.5.4 Confirmação da presença e do tamanho do inserto 15-lox-1 no plasmídeo | 54 |
| 4.5.5 Reação de sequenciamento e análises <i>in silico</i> | 55 |
| 4.6 SUBCLONAGEM DA ORF 15-LOX-1 NOS VETORES DO SISTEMA XIES PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM <i>L.LACTIS</i> | 56 |
| 4.6.1. Digestão enzimática dos vetores <i>pXylIT:CYT:nuc</i> e <i>pXylIT:SEC:nuc</i> | 56 |
| 4.6.2. Purificação do fragmento de DNA <i>pXylIT:CYT</i> e <i>pXylIT:SEC</i> | 56 |
| 4.6.3. Digestão enzimática dos plasmídeos <i>pTP:c15-lox-1</i> e <i>pTP:s15-LOX-1</i> | 56 |
| 4.6.4. Purificação do fragmento de DNA 15-lox-1..... | 57 |
| 4.6.5. Ligação da ORF 15-lox-1 nos vetores <i>pXylIT:CYT</i> e <i>pXylIT:SEC</i> | 57 |
| 4.6.6. Confecção de células eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> NCDO2118..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.7. Transformação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1..... | 58 |
| 4.6.8. Extração do DNA plasmideano pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1 | 58 |
| 4.6.9 Confirmação dos clones de <i>L. lactis</i> portadores dos plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1 | 58 |
| 4.6.10. Reação de sequenciamento e análises <i>in silico</i> | 61 |
| 4.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA R15-LOX-1 PRODUZIDA POR <i>L. LACTIS</i> | 61 |
| 4.7.1 Indução da expressão gênica em <i>L. lactis</i> | 61 |
| 4.7.2. Extração das frações protéicas citoplasmática e secretada das linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> NCDO2118 | 62 |
| 4.7.3 Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante..... | 63 |
| 4.7.4. “Western Blotting” | 63 |
| 4.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DAS LINHAGENS DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> PRODUTORAS DA ENZIMA 15-LOX-1 NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS, EM MURINOS UTILIZANDO MODELO DSS..... | 63 |
| 4.8.1. Esquema experimental | 64 |
| 4.8.2 Tratamento da colite induzida por DSS..... | 64 |
| 4.8.3 Cinética de peso corpóreo dos animais tratados ou não com <i>L. lactis</i> | 68 |
| 4.8.4. Análise macroscópica | 68 |
| 4.8.5. Análise histológica | 68 |
| 4.8.6. Preparação de extratos de tecidos..... | 69 |
| 4.8.7. Medida da produção de citocinas por ELISA..... | 69 |
| 4.8.8. Determinação IgA secretória..... | 70 |
| 4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 71 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 72 |
| 5.1. CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. LACTIS</i> PRODUTORAS DE 15-LOX-1..... | 72 |
| 5.1.1. Amplificação da ORF 15-lox-1 | 72 |
| 5.1.2. Clonagem da ORF 15-lox-1, no sistema TOPO | 73 |
| 5.1.3. Confirmação da clonagem da ORF 15-LOX-1 no sistema TOPO através da técnica de PCR e digestão enzimática..... | 74 |
| 5.1.4. Clonagem da ORF 15-LOX-1 no sistema de expressão XIES (Xylose-Inducible- Expression-System) | 76 |
| 5.1.5. Confirmação da clonagem da ORF 15-LOX-1 nos vetores de expressão XIES de <i>L. lactis</i> através da técnica de PCR e digestão enzimática..... | 76 |
| 5.1.6. Confirmação da integridade da seqüência nucleotídica da ORF 15-LOX-1 clonada nos vetores de expressão de <i>L. lactis</i> através da técnica de sequenciamento e análises <i>in silico</i> | 78 |
| 5.1.7. Transformação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT: 15-LOX-1; XylT:SEC:lox-1 | 80 |
| 5.1.8. Análise da expressão da r15LOX produzida em <i>L. lactis</i> | 81 |
| 5.1.9. SDS-PAGE / Western Blotting | 81 |
| 5.2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> | 85 |
| 5.2.1. Análises macroscópicas da colite inflamatória experimental induzida por DSS..... | 85 |
| 5.2.2. Análise microscópica da colite inflamatória experimental induzida por DSS. | 87 |
| 5.3 AVALIAÇÕES DA IMUNOGENICIDADE DE LINHAGENS DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> PRODUTORAS DA FORMA CITOPLASMÁTICA E SECRETADA DA ENZIMA 15-LOX-1 USANDO MODELO DE INFLAMAÇÃO DSS E AVALIAÇÃO DO SEU PAPEL NO TRATAMENTO DAS DICI. 91 | |
| 5.3.1. Produção de <i>Imunoglobulinas A</i> secretadas durante o tratamento da colite | 91 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.2. Perfil de citocinas no tratamento com linhagens de <i>Lactococcus lactis</i> selvagem e recombinante..... | 93 |
| 6. CONCLUSÕES | 99 |
| 7. PERSPECTIVAS | 101 |
| REFERÊNCIAS | 102 |
| ANEXOS – A: CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA..... | 112 |
| ANEXO – B: SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURAS..... | 118 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Aplicações recentes das BL recombinantes..... | 23 |
| Figura 2: Representação dos elementos formadores do GALT..... | 29 |
| Figura 3: Mecanismos de transporte através do epitélio intestinal..... | 31 |
| Figura 4: Colapso da homeostase da mucosa..... | 34 |
| Figura 5: Esquema da via da síntese de eicosanoides a partir do ácido aracdônico. | 38 |
| Figura 6: Estrutura tridimensional de LOX. | 41 |
| Figura 7: Biossíntese de lipoxinas..... | 43 |
| Figura 8: Representação vetores de expressão pXylT:SEC:15-lox-1 e pXylT:CYT:15 lox-1..... | 60 |
| Figura 9: Representação esquemática do processo de indução da expressão gênica da r15-LOX-1 em <i>L. lactis</i> NCDO2118..... | 62 |
| Figura 10: Grupos Experimentais..... | 66 |
| Figura 11: Representação do esquema experimental de administração com o DSS e do tratamento com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> para avaliação terapêutica..... | 67 |
| Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de ampliações por PCR da ORF 15-LOX-1 humana a partir do plasmídeo pcDNA3. | 73 |
| Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% de ampliações por PCR da ORF 15-lox-1 humana clonada no vetor PCRII-TOPO. | 75 |
| Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% de digestões com enzimas de restrição Nsil e EcoRI para liberação da ORF15-lox-1 humana clonada no vetor PCRII-TOPO..... | 75 |
| Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% de ampliações por PCR da ORF 15-lox-1 humana clonada nos vetores XIES..... | 77 |
| Figura 16: Eletroforese em gel de agarose de digestões com enzimas de restrição Nsil e EcoRI para liberação da ORF15-lox-1 humana clonada nos vetores XIES..... | 78 |
| Figura 17: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1..... | 79 |
| Figura 18: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do plasmídeo pXylT:SEC:15-lox-1..... | 79 |
| Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio de amplificação por PCR da ORF 15-LOX-1 humana a partir do DNA plasmideano | |

| | |
|---|----|
| extraído de células de <i>L. lactis</i> transformadas com os plasmídeos pXyIT:CYT: 15-LOX-1 pXyIT:SEC: 15-LOX-1..... | 80 |
| Figura 20: SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes das culturas induzidas e não induzidas dos clones de <i>L. lactis</i> | 82 |
| Figura 21: Imunodeteccção da r15-LOX-1 a partir de culturas das linhagens <i>L. lactis</i> pCYT:15-LOX-1 e pSEC:15-LOX-1. | 84 |
| Figura 22: Efeitos macroscópicos da administração oral de <i>L. lactis</i> NCDO 2118 selvagem e recombinante em modelo de colite induzido por DSS | 86 |
| Figura 23 : Histopatologia representativa (Fotografia (X400) de parafina em HE) de alterações intestinais do cólon de camundongos sem e com a administração oral de <i>L. lactis</i> selvagens e mutantes. | 89 |
| Figura 24: Índice de atividade histológica inflamatória de colite experimental induzida por DSS de alterações intestinais do cólon de camundongos sem e com a administração oral de <i>L. lactis</i> selvagens e mutantes..... | 90 |
| Figura 25: Níveis de sIgA detectados em amostras do lavado intestinal dos animais com colite experimental induzida por DSS sem e com a administração oral de <i>L. lactis</i> selvagens e mutantes..... | 92 |
| Figura 26: O efeito de <i>L. lactis</i> NCDO 2118 pxy:cyt:15-LOX-1, na produção de citocinas proinflamatórias no tecido do cólon. IL-6 (A), IL-17 (B), o IFN- (C), a TNF (D), IL-12 (E). | 94 |
| Figura 27: O efeito de <i>L. lactis</i> NCDO 2118 + pxy:cyt:15-LOX-1, na produção de citocinas antiinflamatórias no tecido do cólon. IL-10 (A), IL- 4 (B)..... | 97 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas 48

Tabela 2 - Plasmídeos..... 49

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na amplificação, por PCR, da ORF 15-LOX-1
.....51

Tabela 4 - Índice macroscópico da colite aguda induzida por
DSS..... 68

Tabela 5 - Índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos.
..... 69

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- 13-HODE - ácido 13-hidroxiocetadecadienóico
- 15-HETE - ácido 15-hidroxeicosatetraenóico
- 5-LO / 5- LOX - 5-lipoxigenase
- 12-LO /12-LOX -12-lipoxigenase
- 15-LOX -15-lipoxigenase
- AA - ácido aracdônico
- AGP - ácidos graxos poliinsaturados
- Amp - Ampicilina
- APC - Antigen Presenting Cells; Células Apresentadoras de Antígenos
- ATL - aspirin triggered lipoxins– Lipoxinas induzidas por aspirina
- BL - Bactérias lácticas
- BSA - “Bovine Serum Albumin”
- CD - Crohn’s Disease; Doença de Crohn
- Cm - Clorafenicol
- COXs - Cicloxigenases
- DC - Dendritic Cells; Células Dendríticas
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dNTP’s - deoxinucleotídeos trifosfatados
- DO600nm - Densidade ótica em comprimento de onda de 600 nanômetros
- DSS- Dextran SulphateSodium; Sulfato de sódio dextrano
- DTT- Ditioeritritol
- EDTA - Etileno diamino tetra-acetato dissódio
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Ensaio de Imuno-Absorção Ligado à Enzima
- EPA - ácido eicosapentanóico
- FLAP - Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase
- GALT - Gut-Associated Lymphoid Tissue; Tecido Linfóide Associado ao intestino

GRAS - Generally Regarded As Safe; Geralmente considerado seguro

HETEs - ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos

HIV - “Human deficiency vírus” - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA - Human leukocyte antigen

HPETEs – ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos

HSP - heat shock protein

IBD - Inflammatory Bowel Disease; Doença Inflamatória Intestinal

IEC - Intestinal Epithelial Cell; Célula Epitelial Intestinal

IEL- Intraepithelial Lymphocytes; Linfócitos Intraepiteliais IFN- - Interferon gamma

IgA - Imunoglobulina do tipo A IgG - Imunoglobulina do tipo G

IID - Intestinal Inflammatory Disorders; Transtornos Intestinais Inflamatórios

IL - Interleucina

IL-10-/- IL-10 knockout (Modelo murino)

I B - inhibitor of NF- B

KCl - Cloreto de potássio KDa - Quilodaltons (10^3 Da) LB - Luria-Bertani

LMs - Linfonodos Mesentéricos

LP - Lâmina própria

LPS - Lipopolissacarídeos

LTA4 – leucotrieno A4

LTB4 – leucotrieno B4

LTs - Leucotrienos LX - lipoxinas LXA4 - lipoxina A4

M - Molar – unidade de medida de concentração

MAMPs - Microbe Associated Molecular Patterns; Padrões Moleculares Associados à patógenos

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NF- B - nuclear factor kappa B

ng - Nanogramas

- NICE - “Nisin Controlled gene Expression“ (Sistema de Expressão Gênica controlado por nisina)”
- NK - “Natural Killer
- NLRs - Nod-like Receptors; Receptores NOD-like
- NO - Óxido nítrico
- OPD - o-phenylenediamine dihydrochloride
- ORF - Open Reading Frame;
- P450CYP - epioxigenases do citocromo
- PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- PBS - Phosphate Buffered Saline; Tampão Tampão Fosfato Salino
- PCR - Polymerase Chain Reaction; Reacção em Cadeia da Polimerase
- PEG - Polietileno glicol
- PGE2 – Prostaglandina E2
- PGH2 – Prostaglandina H2
- PGN - Peptideoglicanos
- PLA2 – Fosfolipase A2
- PMSF - Fenil-metil sulfonyl fluoreto
- PP - Placas de Peyer
- PRR - Pattern Recognition Receptor; Receptores de Reconhecimento de Padrões
- T20 - Tween 20
- TE-LYS - Tris-EDTA-Lisozima
- TEMED - N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane
- TGF- - Transforming Growth Factor-beta; Fator Transformador de Crescimento-beta
- TGI - Trato Gastrointestinal
- Th1 - Células T helper do tipo 1
- Th17 - Células T helper do tipo 17
- Th2 - Células T helper do tipo 2
- TLRs -Toll-like Receptors; Receptores Toll-like
- TNBS - 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
- TNF- - Tumor Necrosis Factor-alpha; Fator de Necrose Tumoral-alfa

Treg - Células T reguladoras

Tris - Tris-hidroximetilaminometano

TXA2 - tromboxano A2

TXB2 - tromboxano B2

UC - Ulcerative Colitis; Colite Ulcerativa

Usp45 - Unknown Secreted Protein of 45 kDa; Proteína Secretada Desconhecida de 45

XIES - "Xylose-Inducible Expression System" (sistema de expressão induzido por xilose)

RESUMO

O desenvolvimento de alimentos que promovem a saúde humana tem sido o foco de diversas pesquisas. Dentre eles, destacam-se os leites fermentados, queijos e iogurtes produzidos a partir de algumas linhagens de bactérias lácticas (BL), consideradas probióticas, pois quando ingeridas exercem efeitos benéficos sobre o hospedeiro. Dentre as BL, *Lactococcus lactis* figura como microrganismo modelo, devido a sua importância econômica e biotecnológica e por ser considerada segura para consumo humano. Por esse motivo, *L. Lactis* vêm sendo utilizada como usina para a produção heteróloga de moléculas terapêuticas. Estudos recentes vêm demonstrando o potencial terapêutico de linhagens recombinantes de *L. lactis* no tratamento de algumas doenças, como as doenças inflamatórias intestinais (IBDs). As IBDs caracterizam-se por causar inflamação severa no trato gastrointestinal. Sua etiologia não é bem compreendida e os tratamentos disponíveis acarretam em sérios efeitos colaterais aos acometidos. Neste contexto, a utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis* expressando moléculas com potencial antiinflamatório, como a 15-Lipoxigenase-1 (15-LOX-1), representa um tratamento alternativo interessante. A 15-LOX-1 é uma enzima envolvida no metabolismo de ácidos graxos, conhecida por possuir potente atividade antiinflamatória. Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo construir linhagens de *L. lactis* capazes de expressar a 15-lox-1 e avaliar sua capacidade antiinflamatória utilizando modelo de inflamação DSS em murinos. A linhagem expressando a forma citoplasmática da enzima mostrou-se capaz de diminuir a inflamação nos animais tratados reduzindo os níveis de citocinas proinflamatórias (IFN- γ , IL-17, IL-4) e aumentando a citocina regulatória IL-10. Os níveis de imunoglobulina A secretória não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados. Portanto, a presente estratégia apresentou-se promissora no tratamento das IBDs em um futuro próximo.

Palavras chave : colite, inflamação, *Lactococcus lactis*, lipoxigenase, biotecnologia.

ABSTRACT

Functional foods that are able to promote human health have been the focus of several studies. Fermented milks, cheeses and yogurts produced by some probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains are an example as they can exert beneficial effects on the host. The model LAB, *Lactococcus lactis*, has a great economic importance as it is safe for human consumption and widely used for industrial dairy fermentations. Therefore, *L. lactis* has been engineered to express and secrete a variety of therapeutic molecules. Recent studies showed the therapeutic potential of recombinant *L. lactis* strains in the treatment of some diseases, such as inflammatory bowel diseases (IBDs). IBDs are characterized by severe inflammation of the gastrointestinal tract. Its etiology is not well understood and the treatments available may have serious side effects. In this context, the use of recombinant *L. lactis* strains expressing molecules with potential anti-inflammatory properties, such as 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1), represents an interesting alternative. 15-LOX-1 is an enzyme involved in fatty acid metabolism, which is known for its strong anti-inflammatory activity. Thus, this project aimed to construct *L. lactis* strains able to express 15-LOX-1 and verify its anti-inflammatory capacity in a chemically induced mouse model of intestinal inflammation (DSS). The strain expressing the cytoplasmic form of the enzyme was able to decrease inflammation in treated animals by reducing the levels of proinflammatory cytokines (IFN- γ , IL-17, IL-4) and increasing the regulatory cytokine IL-10. No differences were observed in the levels of secretory IgA among treated and untreated groups. This study showed recombinant *L. lactis* strains expressing 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1) was able to reduce damage in colon segments from treated animals. Taken together, this strategy appeared to be very promising for the treatment of IBDs in the near future.

Keywords: Colitis, inflammation, *Lactococcus lactis*, lipoxygenase, biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

1 Biotecnologia e Inovação

A biotecnologia envolve um processo tecnológico que permite a utilização de material biológico na indústria, cuja história teve início há cerca de 4.000 anos a.C., com a preparação de cerveja, por babilônios e sumérios, e de pães, pelos egípcios (Thieman *et.al.*, 2007).

Na sociedade moderna, o impacto da inovação em biotecnologia ocorreu, inicialmente, com a descrição da estrutura da dupla hélice do DNA, por Watson e Crick, em 1953, com a descoberta da transcriptase reversa, em 1970, e com a obtenção do DNA recombinante, em 1972, quando nasceram a engenharia genética e a biotecnologia moderna. Esses métodos permitem a transferência, com grande margem de segurança, de genes de interesse entre diferentes organismos, utilizando-se metodologias antes inimagináveis (Molly *et al.*,2010).

A biotecnologia constitui a face socialmente mais visível do poder tecnológico da engenharia genética, emergindo no cenário público como o principal local desse saber/fazer, no qual a ciência se traduz em tecnologia, produzindo bens com valor econômico e social. Ela é reconhecida no âmbito da inovação como um setor exemplar de organização da inovação tecnológica na atualidade (Bonacelli e Salles Filho, 2000; Lastres e Ferraz, 1999).

1.1 Biotecnologia e os Produtos Lácteos

O aumento do envelhecimento da população e de consumidores buscando produtos mais funcionais e dietas mais saudáveis impulsiona cada vez mais as pesquisas e o desenvolvimento de novos produtos lácteos. O mercado global de produtos lácteos tem seu crescimento estimado em 24% entre 2008 e 2013, com um valor de 417 bilhões de dólares em 2013 (GNPD, 2012).

Mercados emergentes de produtos lácteos crescerão em termos de valores de venda em torno de 30% (2008 – 2013) enquanto os países líderes (Europa, Japão e EUA) apresentam taxa média de crescimento de 14,6%. O Brasil é um dos maiores mercados emergentes, atingindo valores de U\$ 35 bilhões em 2013, seguido por China e Rússia (GNPD,2012).

O aumento no grau de exigência do consumidor tem levado a indústria a procurar, cada vez mais, o desenvolvimento de novos produtos, ou de novas

tecnologias de produção de produtos já conhecidos, para suprir as necessidades do mercado. Como exemplo, há a necessidade do aumento do valor nutritivo e das qualidades terapêuticas, sendo estes produtos amplamente empregados como veículos para a aplicação de culturas probióticas e outros ingredientes funcionais.

Seguindo as mesmas tendências do mercado de alimentos funcionais, destaca - se também os leites fermentados. O impulso na popularidade dos leites fermentados se deve à relação desses produtos com a melhoria da saúde, a simplicidade da tecnologia de produção de leites fermentados, o baixo custo e longa vida de prateleira.

De acordo com a IN nº 46, de 23/10/2007 (MAPA), que estabelece os “Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados”, estes são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, os quais devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade (MAPA,2007)

1.1.1 Alimentos funcionais e os probióticos

Segundo a Portaria nº398 de 30/04/99 (ANVISA - MS: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, agência reguladora ligada ao Ministério da Saúde), alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (FAO/WHO, 2002).

A legislação brasileira atualizou recentemente, a lista dos alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Constam nesta lista da ANVISA, os alimentos funcionais hoje no mercado, que são 17 substâncias (nutrientes ou não nutrientes) e 10 diferentes espécies de microrganismos probióticos. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro (Gallina.D.A.,I. 2013).

Alguns efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos são: fermentação de substratos como os polissacarídeos, amidos resistentes e fibras, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta e conseqüentemente redução do pH, que exerce ação bactericida; influência na diminuição dos níveis intestinais de

amônia; participação na produção de vitaminas do complexo B; redução dos níveis de lipídeos séricos bem como influência na resposta imune (Cummings *et al.*, 2001; Blaut, 2000;).

No intestino, os probióticos possuem capacidade de atuar diretamente na mucosa, competindo/impedindo que patógenos ocupem estas áreas. Além disso, as bacteriocinas, consideradas proteínas ou peptídeos metabolicamente ativos, são capazes de exercer ação local contra microrganismos patogênicos e de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Denipote. *et al.*, 2010).

Os alimentos probióticos mais disponíveis no mercado incluem sobremesas à base de leite, leite fermentado, leite em pó, sorvete, iogurte e diversos tipos de queijo. Existem também, os probióticos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, sucos fortificados, bebidas de origem vegetal e maioneses (Saad, 2006).

A grande maioria dos probióticos usados atualmente pertencem ao grupo das bactérias lácticas (BL), sendo estas bactérias ingeridas há séculos pelos seres humanos em alimentos fermentados. Os principais gêneros utilizados são *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., além da espécie *Lactococcus lactis*, presentes na lista atualizada da ANVISA. Além disto, muitas das linhagens de BL consideradas probióticas vêm sendo geneticamente modificada a fim de melhorar as suas características intrínsecas.

1.2 Bactérias Lácticas (BL)

As Bactérias Lácticas (BL) constituem um grupo filogeneticamente heterogêneo de microrganismos ubíquos, que ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos, que vão desde a superfície das plantas até o trato gastrointestinal dos animais. Atualmente, 32 gêneros bacterianos com porcentagem de G+C no genoma inferior a 55% compõem o grupo das BL (König e Fröhlich, 2009), dentre os quais estão incluídos os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus*, sendo este último o maior representante do grupo contendo cerca de 80 espécies (Carr *et al.*, 2002).

Embora sejam bastante diversos, os membros desse grupo apresentam várias características em comum, incluindo o fato de serem: (i) Gram-positivos; (ii) anaeróbios facultativos, (iii) não formarem esporos, (iv) serem imóveis, e, especialmente, (v) serem capazes de metabolizar açúcares, principalmente, em

ácido láctico (Carr *et al.*, 2002). Devido à capacidade de transformar açúcares (hexoses) em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007), as BL são um dos mais importantes grupos de bactérias utilizadas industrialmente em uma variedade de processos, incluindo a produção de alimentos, macromoléculas, enzimas e metabólitos (Pfeiler e Klaenhammer, 2007), atuando na formação de sabor (Urbach, 1995), na preservação (Stiles, 1996) e na produção de suplementos ou aditivos (Hugenholtz *et al.*, 2002).

A estes microrganismos ainda é dado um importante papel na manutenção da saúde e da prevenção de infecções (Reid *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2005), muitos deles atuando assim como probióticos.

Dentre as aplicações terapêuticas associadas ao uso de produtos probióticos, as BL têm se mostrado eficientes na proteção do trato gastrointestinal (TGI), atuando como uma barreira à colonização do TGI por bactérias patogênicas, sendo particularmente eficazes no tratamento de diarreias em neonatos (Ouwehand *et al.*, 2002) e benéficas em indivíduos com deficiência congênita de lactase e alérgicos a proteínas do leite de vaca (Majamaa e Isolauri, 1997; Roberfroid, 2000). Dentre as várias espécies de BL conhecidas como probióticas, *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. reuteri* se destacam pelas suas aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de diversos distúrbios (Ouwehand *et al.*, 2002). Atualmente, uma série de produtos lácteos, contendo probióticos, está disponível no mercado, sendo os leites fermentados os produtos mais difundidos (Miyoshi *et al.*, 2010).

Em 2001 foi sequenciado e publicado o primeiro genoma de uma BL (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403) (Bolotin *et al.*, 2001), sendo que mais de 25 genomas completos do grupo BL já foram sequenciados, anotados e publicados, enquanto muitos outros projetos estão em andamento (Zhu *et al.*, 2009).

Desta forma, dentre as aplicações biotecnológicas recentes das BL, têm-se o desenvolvimento de recombinantes, sendo estas utilizadas como usinas celulares para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004) e também como veículo para apresentação de antígenos e outras moléculas de interesse na superfície de mucosas (Mercenier *et al.*, 2000) (Figura 1).

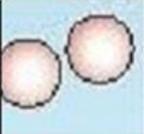
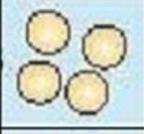
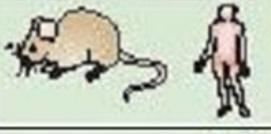
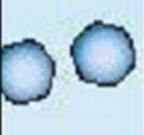
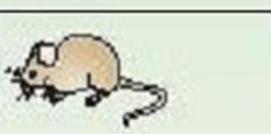
| PRODUTOS | MODELOS | APLICAÇÕES |
|---|---|--|
| Antígenos  |  | Vacinas |
| Citocinas  |  | Doenças inflamatórias, adjuvante de vacinas |
| Enzimas  |  | Suprimento de enzimas deficientes no organismo Terapia para colites |
| Alérgenos  |  | Terapia e prevenção de alergias |

Figura1 : Aplicações recentes das BL recombinantes. (Adaptado de Wells e Mercenier, 2008).

Dentre as bactérias lácticas, *Lactococcus lactis*, o modelo das BL, aparece como uma boa escolha para a produção de proteínas recombinantes relacionadas à saúde animal e humana.

1.2.1 *Lactococcus lactis*: a Bactéria Láctica modelo

Lactococcus lactis é a espécie de BL mais bem caracterizada e figura atualmente como organismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica e interesse industrial, mas também devido ao fato de i) ser um microrganismo de fácil manipulação, ii) ser considerada segura (*Generally Recognized As Safe*, GRAS), iii) ter o seu genoma completamente sequenciado e iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Miyoshi *et al.*, 2010).

Estas características, juntamente com os importantes avanços nas duas últimas décadas nas áreas de genética e sistemas de expressão, tem expandido o uso de *L. lactis*, a partir do seu uso tradicional na indústria alimentícia, para aplicações em novas áreas. *L. lactis* também é utilizada para a produção de vacinas vivas de mucosas para entrega de proteínas terapêuticas ou imunogênicas, genes e

drogas à superfície das mucosas pela via oral (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004), e ainda apresenta uma gama de aplicações promissoras (Wells e Mercenier, 2008).

L. lactis é resistente à acidez gástrica quando administrada em conjunto aos alimentos, mantendo-se biologicamente ativa em todo o trajeto através do trato digestivo (Bernasconi *et al.*, 2002). Além disso, por ser uma bactéria não-invasiva e não-comensal, isto é, de passagem transitória através do intestino dos animais, tem um menor potencial de desencadear imunotolerância ou efeitos colaterais sobre o seu uso prolongado (Nouaille *et al.*, 2003). Outra característica importante é que por ser uma bactéria Gram-positiva, *L. lactis* não possui o lipopolissacarídeo (LPS) endotóxico e ainda apresenta menos exoproteínas nativas em comparação com linhagens de *E. coli* (Bahey-El-Din e Gahan, 2010a).

1.2.2 Novas utilizações das Bactérias Lácticas

Existem diferentes formas de utilizações “extra-alimentares” para as BL, tais como a produção em fermentadores de proteínas de interesse econômico, a construção de vacinas vivas de mucosas e, mais recentemente, a utilização destas bactérias como carreadoras de vacinas gênicas.

O uso de *L. lactis* para estes propósitos, em especial, tem se mostrado particularmente atraente, devido ao fato desta bactéria não possuir protease extracitoplasmática (Gasson, 1983a), das duas linhagens selvagens mais utilizadas (IL1403 e MG1363) serem desprovidas de plasmídeos (Gasson, 1983b; Chopin *et al.*, 1984) e de apresentar poucas proteínas secretadas, sendo que apenas uma, Usp45 (*Unknown Secreted Protein of 45kDa*) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) corado pela técnica azul de Commassie (Van Asseldonk *et al.*, 1990); característica que pode facilitar a purificação e análise de proteínas de interesse.

Em 2006, foi realizado o primeiro ensaio clínico de fase 1 em pacientes com Doença de Crohn (CD), utilizando uma linhagem recombinante de *L. lactis* secretora de IL-10 humana. A linhagem foi formulada em cápsulas para otimizar a sobrevivência durante a passagem pelo estômago, tendo sido administrada oralmente em dez pacientes com CD moderada a grave. Durante o ensaio, oito dos dez pacientes mostraram uma melhora clínica significativa e cinco entraram em remissão completa, sem efeitos graves adversos. Esta estratégia não só demonstrou segurança e tolerabilidade, mas também forneceu indicações promissoras para eficiência terapêutica desta linhagem (Braat *et al.*, 2006). Além do

mais, a estratégia foi validada para uso em humanos e um grande ensaio de fase 2 está em curso para uma avaliação mais profunda em relação à segurança, tolerabilidade e eficiência desta linhagem também em pacientes com Colite Ulcerativa (UC) (Rottiers *et al.*, 2009).

1.2.3 Ferramentas genéticas para a produção de proteínas heterólogas em *L. lactis*

Vários motivos, dentre eles a necessidade de se obter um maior controle sobre os processos industriais que envolvem o uso de *L. lactis* na produção de proteínas heterólogas, levaram ao estudo e desenvolvimento de novas ferramentas genéticas para esta bactéria (Nouaille *et al.*, 2003). Com o intuito de obter níveis elevados e de controlar a produção de tais proteínas, vários sistemas de expressão e de endereçamento celular em diferentes localizações celulares foram desenvolvidos, não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL. Esses sistemas são constituídos por plasmídeos de expressão compostos basicamente de: (i) origem de replicação, (ii) marcador de seleção (gene de resistência a antibiótico), (iii) sítio de clonagem múltipla e (iv) um promotor de expressão funcional em procaríotos (Norton *et al.*, 1995; Piard *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001).

Dentre estes sistemas, pode-se destacar o sistema de expressão induzido pela bacteriocina nisina, também conhecido como sistema NICE (*Nisin Controlled Expression System*); o qual é muito bem caracterizado e o mais utilizado em *L. lactis* e outras BL (De Vos e Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993; De Vos, 1999). Esse sistema, que é baseado em genes que participam da biossíntese e regulação da nisina (de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998), faz uso do promotor PnisA e dos genes regulatórios nisRK (de Ruyter *et al.*, 1996). Várias proteínas heterólogas já foram produzidas utilizando-se esse sistema, que dentre todos os desenvolvidos até o momento é o mais versátil (De Ruyter *et al.*, 1996; Mierau e Kleerebezem, 2005).

Contudo, para que algumas das proteínas produzidas por estas bactérias tenham a atividade biológica desejada, é preciso que após sua síntese, estas moléculas sejam corretamente endereçadas ao seu destino final: (i) citoplasma, (ii) membrana ou (iii) meio extracelular. A produção intracelular protege a proteína de condições ambientais adversas (como por exemplo, o baixo pH do estômago), porém, a lise celular será necessária para a entrega da mesma. Já a expressão do antígeno ancorado à parede celular, além de permitir a interação com o

ambiente, também limita a sua possível degradação por proteases. Finalmente, a secreção do antígeno permitirá a sua liberação para o meio externo, direcionando assim a interação deste com o ambiente (trato digestivo, por exemplo) (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004a).

Assim, vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas em diferentes localizações celulares já foram desenvolvidos não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL (Norton *et al.*, 1995; Piard *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001)

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo sistema de expressão e endereçamento protéico para uso em *L. lactis*. O sistema, denominado XIES (*Xylose-Inducible Expression System*; Miyoshi *et al.*, 2004), faz uso do promotor PxyIT, do sítio de ligação do ribossomo (RBS) e da seqüência codificadora do peptídeo sinal (SP) da proteína Usp45 de *L. lactis*. Assim, este sistema foi utilizado com sucesso na linhagem *L. lactis* NCDO2118, demonstrando ser capaz de: (i) produzir, na presença de xilose, elevados níveis da proteína modelo *Nuc* (nuclease) de *Staphylococcus aureus*, comparáveis apenas aos níveis até hoje obtidos utilizando-se o sistema NICE; (ii) corretamente endereçar o produto final para o citoplasma ou meio extracelular; e (iii) diferentemente de todos os sistemas até hoje desenvolvidos, permitir “ligar ou desligar” a expressão gênica pela simples adição de xilose ou glicose, respectivamente.

O sistema apresenta ainda certas vantagens em relação aos atuais sistemas de expressão, como por exemplo, ser de mais fácil manipulação, ser menos dispendioso e principalmente, ser mais seguro para uso humano e animal, visto que o mesmo é induzido por um açúcar.

Diferentes linhagens recombinantes de *L. lactis*, utilizando o sistema XIES de expressão já foram construídas como, por exemplo, para a produção da Quimosina bovina recombinante, uma enzima de grande importância na indústria queijeira e responsável pela coagulação do leite (Saraiva, 2009). Outro trabalho foi a construção de *L. lactis* expressando a enterotoxina B atenuada de estafilococos, sendo essa linhagem posteriormente utilizada para induzir uma resposta imune em modelo murino, como vacina viva de mucosa (Asensi *et al.*, 2013).

Além disto, linhagens de *L. lactis* produtoras de Hsp65, usando também o sistema XIES de expressão, foi construída, agora com o objetivo de imunomodular às respostas inflamatórias em doenças não infecciosas, o que rendeu ao grupo uma patente (WO 2012027814 A1) (Electo de Paiva *et al.*, 2010).

Em outros experimentos, visando a utilização de *L. lactis* como adjuvantes de mucosa, Steidler e colaboradores construíram *L. lactis* recombinantes para a síntese e secreção de proteínas eucarióticas, tais como as interleucinas 2 e 6 (IL-2 e IL-6) murinas e humanas (Steidler *et al.*, 1998).

Além disto, estudos demonstraram que em modelo murino de Doença de Chron, camundongos que receberam leite fermentado produzidos a partir de linhagens de *L. lactis* produtoras de IL-10, apresentaram menores danos no intestino grosso, diminuição dos níveis de IFN- nos seus fluidos intestinais e diminuição da translocação microbiana para o fígado quando comparados com animais não tratados (Del Carmen *et al.*, 2011).

Assim, tanto a capacidade de *L. lactis* em expressar moléculas terapêuticas, como a sua eficácia como veículos de entrega à mucosa, tem sido claramente demonstrada nos últimos anos. Além disso, essas bactérias são capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, atuando como adjuvantes, devido as suas propriedades probióticas e sua capacidade imunomoduladora (Seegers, 2002).

Desta forma, a utilização de *L. lactis* como veículo de entrega à mucosa de moléculas de interesse figura-se uma estratégia de grande importância biotecnológica, pois estas apresentam potencial para reduzir a dose terapêutica e para evitar possíveis efeitos colaterais devido à administração sistêmica, além de não apresentarem riscos de reversão de patogenicidade, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Assim, a maior vantagem do uso dessa bactéria como vetor vivo para entrega, reside no fato de ser segura, não invasiva e não patogênica.

Por fim, a combinação dessas propriedades torna vantajosa a utilização de *L. lactis* como veículo de entrega de moléculas terapêuticas e/ou profiláticas diretamente à superfície de mucosas, representando uma abordagem eficaz para o tratamento de doenças associadas ao TGI.

1.3 Mucosa intestinal

O TGI dos mamíferos é um órgão grande e complexo, completamente revestido por mucosa e colonizado por uma comunidade dinâmica de trilhões de microrganismos, composta por mais de mil espécies bacterianas diferentes (Gill *et al.*, 2006). Em condições normais, a grande variedade de microrganismos que constituem a microbiota intestinal estabelece uma relação simbiótica com os seus hospedeiros, onde o hospedeiro fornece um habitat protegido e rico em nutrientes,

enquanto as bactérias podem conferir funções essenciais e benéficas importantes para metabolismo dos mamíferos (Hooper e Macpherson, 2010).

As mucosas recobrem os tratos gastrointestinais, respiratórios e urogenitais, e somente a mucosa intestinal apresenta uma área 100 vezes maior que a área da pele (Moog, 1981). Essa imensa superfície é banhada cotidianamente por um grande aporte de antígenos da microbiota e da dieta (Brandtzaeg, 1998), que resulta em uma distribuição estratégica de células envolvidas na captura, processamento e apresentação de antígenos, produção de anticorpos e secreção de citocinas (Haberstok *et al.* 2008). Estas superfícies são os sítios de interação principal entre o corpo e o meio externo e representam o maior portal de entrada de numerosos patógenos e, portanto, a primeira linha de defesa do organismo.

Porém para manter a homeostase e evitar que o sistema imune reaja contra os antígenos exógenos inofensivos presentes no intestino, é preciso manter um equilíbrio entre a tolerância aos comensais e a imunidade aos patógenos, permitindo a homeostase intestinal entre o hospedeiro e os microrganismos presentes (Izcue *et al.*, 2009).

As superfícies das mucosas estão separadas do ambiente externo por uma delicada barreira epitelial (do inglês *Intestinal Epithelial Cell*, IECs). Esse epitélio é formado principalmente por enterócitos com junções celulares e borda em escova, seguido de outros tipos celulares como os linfócitos intraepiteliais, as células M, as células de Paneth e as células caliciformes (Mckay, 2005).

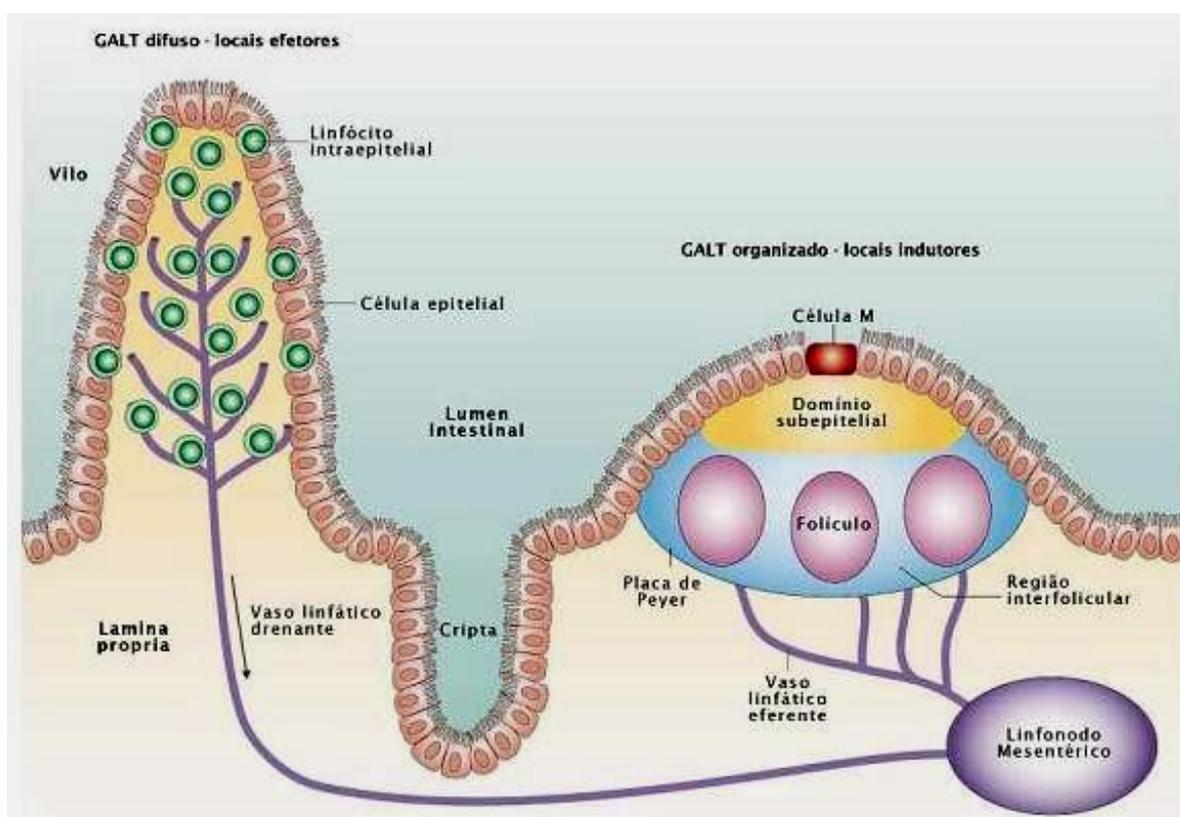
As células caliciformes, IECs especializadas, produzem secreções ricas em mucinas fortemente glicosiladas que criam uma barreira de muco relativamente impermeável, capaz de minimizar o contato entre os microrganismos luminiais e a superfície das células epiteliais do intestino, sendo um dos elementos essenciais para manter a homeostase intestinal (Hill e Artis, 2010).

Por outro lado, junções fortes através das zonas de oclusão (as chamadas “tight junctions”), presentes entre as IECs, são capazes de restringir o tráfego paracelular, e extensões microvilares de actina criam uma borda em escova apical que dificulta a adesão e invasão microbiana (Izcue *et al.*, 2009). As IECs (incluindo as células de Paneth, as células caliciformes e os enterócitos) também secretam uma ampla gama de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas, catelicidinas e lectinas do tipo C. A maioria destas moléculas são ricas em resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos que conferem a estas moléculas propriedades antimicrobianas de largo espectro, pela formação de poros na membrana celular bacteriana (Magalhaes *et al.*, 2007).

Outro mecanismo protetor das mucosas envolve a secreção de Imunoglobulina A (sIgA), com a finalidade de limitar a associação bacteriana com a superfície das IECs e restringir a sua penetração ao epitélio intestinal (Hooper e Macpherson, 2010). Juntos, todos estes mecanismos fornecem um escudo físico e bioquímico, evitando a invasão de microrganismos nas IECs.

Além da sua função de barreira física e bioquímica, o TGI também é composto por um tecido linfóide associado, denominado tecido linfóide associado ao intestino (do inglês *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT), o maior órgão imune do corpo humano (Neish, 2009; Sansonetti, 2004). O GALT é composto por células do sistema imune inato e adaptativo, como células natural-killer (NK), células dendríticas (CD), macrófagos e linfócitos. Assim, ocorre a interação entre os antígenos luminiais e o sistema imune, ativando linfócitos T e B, com a produção de citocinas e sIgA, respectivamente, formando assim os mecanismos imunológicos do TGI (Figura 2) (Izcue *et al.*, 2009; Mowat, 2003).

Figura 2: Representação dos elementos formadores do GALT. GALT organizado,



indução da resposta imune (placas de Peyer, linfonodos mesentéricos), e GALT difuso, local efetor (linfócitos intraepiteliais e células da lâmina própria). Tanto as placas de Peyer quanto os vilos da lâmina própria são drenados por vasos linfáticos que chegam ao linfonodo mesentérico. GALT-tecido linfóide associado ao intestino. Adaptada de (Mowat, 2003).

As Placas de Peyer (PP) e os linfonodos mesentéricos (LMs) são os sítios de indução da resposta imune na mucosa intestinal. As PP são nódulos linfoides agregados de linfócitos B e T, células dendríticas (DCs) e macrófagos localizados sob o epitélio mucoso, que estão cobertos por um epitélio especializado; os LMs são os maiores linfonodos do corpo e servem como cruzamento entre as vias periféricas e de recirculação da mucosa. Para iniciar a indução de uma resposta imune na mucosa é preciso que os antígenos ou patógenos sejam transportados até as células apresentadoras de antígenos (do inglês *Antigen Presenting Cells*, APCs), tais como macrófagos e DCs.

Este transporte pode ocorrer através de vários mecanismos, como evidenciado na figura 3, sendo o mais simples a entrada diretamente pelas células do epitélio (3a) (Mowat, 2003). Outro mecanismo é a passagem por células M (do inglês *Microfold Cells*), também presentes nas PP (Perdigón *et al.*, 2001). As células M são células epiteliais especializadas, capazes de capturar, via endocitose ou fagocitose, o conteúdo luminal e microrganismos, os transportando a uma área povoada por células imunológicas, incluindo APCs como as DCs (3b) (Artis, 2008). Um mecanismo alternativo é a captação direta por DCs especializadas, localizadas na LP do intestino delgado, que são capazes de estender dendritos (prolongamentos) entre as zonas de oclusão do epitélio e captar os antígenos no lúmen intestinal, enquanto a barreira epitelial é mantida intacta (3c) (Rescigno *et al.*, 2001). Em comparação com as duas primeiras rotas de entrada, esta última pode ser utilizada por bactérias não invasivas assim como para a captação de antígenos solúveis (Gewirtz e Madara, 2001).

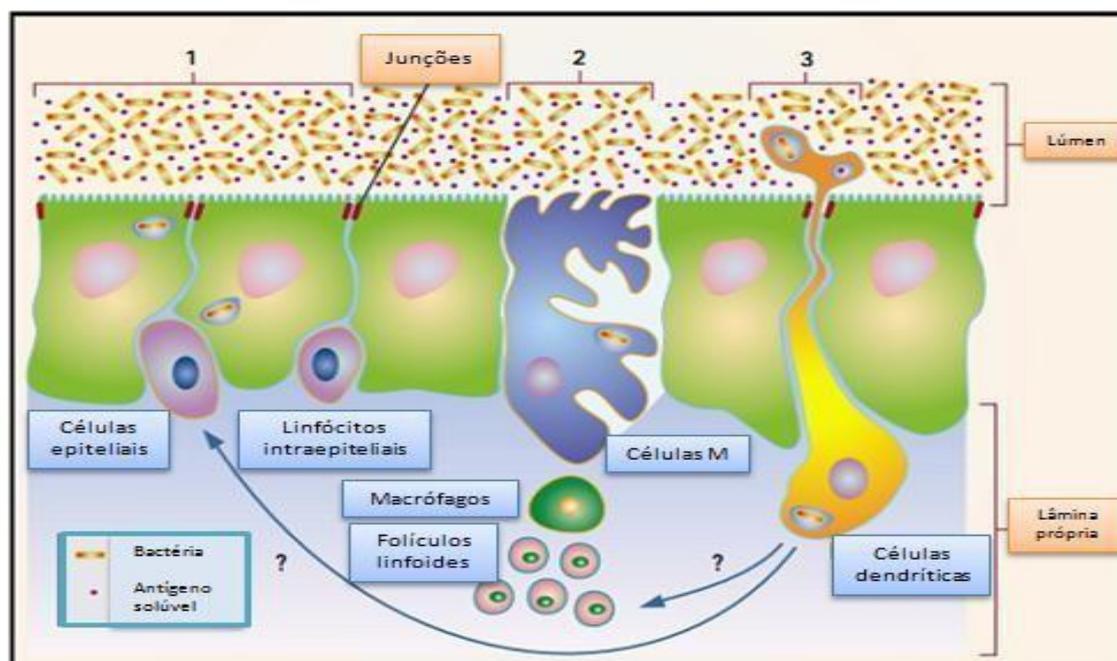


Figura 3: Mecanismos de transporte através do epitélio intestinal. A superfície do intestino está coberta por células epiteliais que formam junções espessas que excluem microrganismos e macromoléculas. Algumas bactérias invasivas podem atravessar as células epiteliais diretamente (1), enquanto outras utilizam células M (2). Uma rota alternativa utiliza as projeções que as células dendríticas projetam ao lúmen intestinal através do epitélio (3). (Gewirtz & Madara, 2001).

Após interagirem com os antígenos, as DCs os apresentam às células T localizadas nos tecidos linfoides, estabelecendo uma comunicação entre a imunidade inata e a adaptativa. As células T ativadas secretam citocinas estimulando as células B, que uma vez expostas ao antígeno, se diferenciam em plasmócitos capazes de produzir e secretar grandes quantidades de anticorpos. A IgA é a imunoglobulina mais abundante na mucosa do TGI, sendo seu papel proteger o epitélio intestinal contra patógenos entéricos e toxinas, contribuindo assim para a homeostase da mucosa intestinal.

1.3.1 Interações microbiota/sistema imune no TGI

Com o objetivo de protegerem-se contra a invasão de microrganismos, todos os organismos multicelulares desenvolveram mecanismos de defesa que utilizam receptores para detectar uma grande variedade de ligantes oriundos destes. Esta estratégia de reconhecimento é baseada na detecção de padrões moleculares conservados pertencentes aos microrganismos. Tanto macrófagos e DCs, quanto as IECs, expressam uma grande variedade desses, conhecidos como receptores de

reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptor*, PRRs). Os PRRs reconhecem componentes microbianos, chamados de MAMPs (do inglês *Microbe Associated Molecular Patterns*) e são essenciais para a defesa inata contra patógenos (Artis, 2008; Winkler, 2007). Os MAMPs estão presentes em bactérias, fungos, protozoários e vírus, e incluem lipoproteínas, ácidos lipotéicos (bactérias Gram-positivas), lipopolissacarídeos (bactérias Gram-negativas), flagelinas bacterianas, peptidoglicanos e RNA (Artis, 2008; Winkler, 2007).

Dentre os PRRs mais bem caracterizados, temos os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) e do tipo *Nod-like* (NLRs). TLRs compreendem uma família de receptores transmembrânicos que formam uma parte do sistema imune inato do hospedeiro. São expressos como homo ou heterodímeros em vários tipos celulares e desempenham um importante papel na interação entre microrganismos e células do epitélio intestinal (Kumagai *et al.*, 2008; Franchi *et al.*, 2009).

Os TLRs estão localizados na superfície celular, ancorados à membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) ou ancorados às membranas de compartimentos intracelulares, como endossomos e lisossomos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) e participam da sinalização inata na superfície celular e nos endossomos. Os NLRs são expressos em diferentes órgãos e tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas e células epiteliais intestinais, localizados no citoplasma de células epiteliais e células imunes, reconhecendo ligantes intracelulares (Franchi *et al.*, 2009).

A ligação de MAMPs aos seus respectivos PRRs leva à ativação de diferentes cascatas de sinalização citoplasmáticas, como a ativação das vias NF- κ B, IRF3 e MAPK (Artis *et al.*, 2008), que por sua vez levam à ativação de genes necessários para a geração de respostas imunes inatas contra bactérias. Assim, os PRRs são extremamente importantes para a manutenção da comunicação microbiota/hospedeiro e, os sinais desencadeados pelas bactérias comensais via PRRs são essenciais para o bom funcionamento da barreira epitelial (Hayden *et al.*, 2006; O'Hara *et al.*, 2006).

Dentre as vias de sinalização desencadeadas pelo contato com microrganismos, uma das mais bem caracterizadas é a NF- κ B. O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição que permanece na sua forma inativa (ligado à proteína inibitória I κ B) no citoplasma da maioria das células de mamíferos. Sua ativação requer uma série de eventos envolvendo inúmeras proteínas quinases, envolvidas na fosforilação de I κ B, evento necessário à sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo. NF- κ B é assim liberado de sua proteína inibitória,

sendo translocado para o núcleo, onde irá se ligar a regiões promotoras e iniciar a transcrição de inúmeros genes que codificam para mediadores inflamatórios, tais como IL-8, TNF- α , COX-2, IL-6 e iNOS (Hayden *et al.*, 2006).

Em indivíduos saudáveis, nenhuma resposta inflamatória é desencadeada contra microrganismos comensais, embora o contato dos PRRs e MAMPs aconteça.

Além disso, certas bactérias da microbiota intestinal exercem um efeito atenuador destas respostas através de mecanismos parcialmente conhecidos. Já em pacientes acometidos com IBDs, esse equilíbrio é quebrado e, respostas inflamatórias são constantemente ativadas (O'Hara *et al.*, 2006).

A falta de regulação do balanço entre tolerância e ativação de respostas imunes pode contribuir para inúmeras condições inflamatórias, incluindo respostas alérgicas aos alimentos ingeridos, doenças inflamatórias intestinais e até mesmo o câncer intestinal (Artis *et al.*, 2008).

Assim, grande importância tem sido dada à questão de como as células intestinais fazem a distinção entre bactéria comensais, antígenos da dieta e patógenos nocivos ao organismo. Indivíduos saudáveis têm uma resposta tolerogênica contra a microbiota intestinal e mostram um balanço entre células T efectoras e reguladoras. Quando este balanço é quebrado, por um aumento na população de células T efectoras ou por uma diminuição na população de células T reguladoras, a homeostase é quebrada levando ao desenvolvimento de inflamação da mucosa (Figura 4). A perda de tolerância para a microbiota intestinal normal pode ser observada em pacientes com doenças intestinais inflamatórias (Strober *et al.*, 2007).

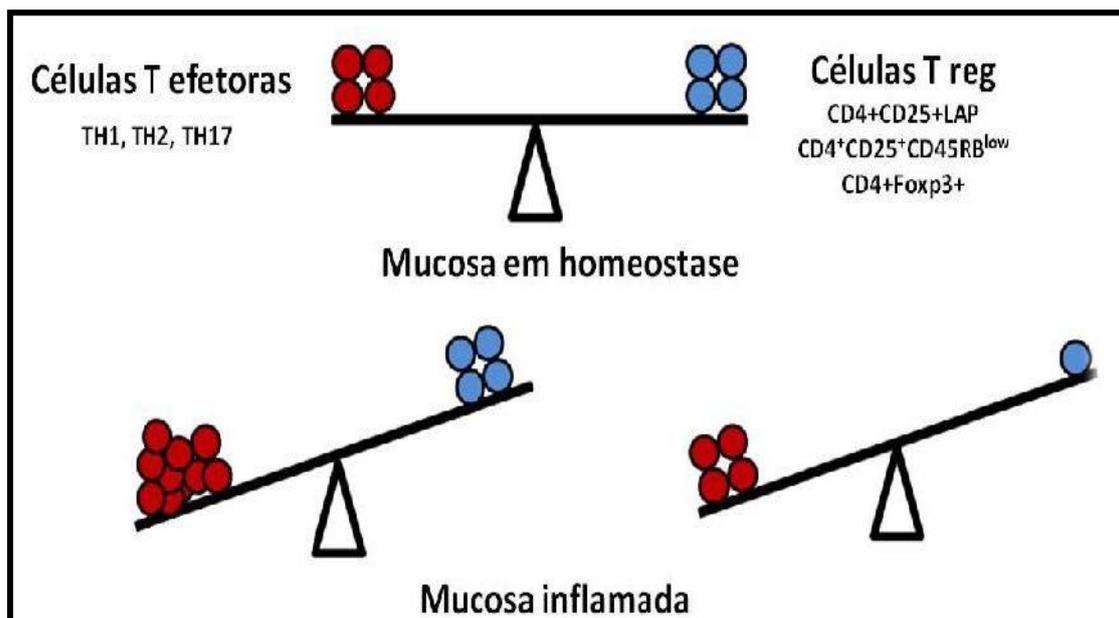


Figura 4: Colapso da homeostase da mucosa. Em condições saudáveis existe um balanço entre células T efectoras e reguladoras. Este balanço pode ser quebrado por um aumento na população de células T efectoras ou por uma diminuição na população de células T reguladoras, resultando na inflamação da mucosa. (Adaptado de Bouma and Strober, 2003).

1.3.2 As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal

As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, também conhecidas como IBD (do inglês *Inflammatory Bowel Diseases*) são doenças complexas crônicas cuja etiologia exata é desconhecida, no entanto, sabe-se que não são devidas a patógenos específicos. A Doença de Crohn (do inglês *Crohn's Disease*, CD) e a Colite Ulcerativa (do inglês *Ulcerative Colitis*, UC) são as duas formas principais da IBD idiopática, e apresentam como principais sintomas clínicos dor abdominal, diarreia, sangramento retal, mal-estar e perda de peso, aparecendo intermitentemente, com períodos de remissão interrompidos por recaídas da doença, que podem durar de semanas até meses. Enquanto a CD é um processo inflamatório multifocal e transmural (afeta todas as camadas da parede do intestino), que pode afetar grande parte do trato digestivo, a UC é caracterizada por uma inflamação contínua e superficial limitada ao intestino grosso ou cólon (Cho, 2008). A incidência destas doenças varia muito entre os diferentes países, mas nos últimos anos tem aumentado consideravelmente no mundo todo, sendo atualmente considerado um problema de saúde pública global (Nell *et al.*, 2010).

Os mecanismos patogênicos exatos envolvidos nas IBDs ainda não são completamente compreendidos e, apesar da etiologia desconhecida, evidências demonstram que alguns fatores como predisposição genética, fatores associados ao meio ambiente, dano na tolerância local e o desequilíbrio das mucosas, com contínua ativação do sistema imune intestinal, podem estar implicados na patogênese das IBDs (Sartor, 2008).

A utilização de modelos animais de inflamação intestinal, em particular modelos murinos, tem levado ao aumento no entendimento dos mecanismos envolvidos nas IBDs. Importantes aplicações destes modelos incluem análises dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução e regulação da inflamação intestinal, bem como as contribuições dos microrganismos na inflamação aguda e crônica (Nell *et al.*, 2010).

1.3.3 Modelos murinos de IBDs

Existem mais de 30 modelos murinos experimentais de IBDs, porém estes podem ser divididos em quatro categorias principais: (i) os que desenvolvem colite espontaneamente como resultado de anormalidades genéticas naturais; (ii) os geneticamente modificados através da inserção ou deleção de genes (transgênicos ou gene *knockout*, respectivamente); (iii) os induzidos pela transferência de populações de células T à hospedeiros imunocomprometidos e (iv) os induzidos por agentes químicos (MacDonald *et al.*, 2005).

Os modelos murinos de inflamação intestinal induzidos quimicamente são os mais comumente utilizados para estudo das IBDs, uma vez que o início da inflamação é imediato, o procedimento é relativamente simples e se assemelha em importantes aspectos imunológicos e histopatológicos às IBDs humanas (Wirtz *et al.*, 2007). Várias substâncias químicas já foram descritas como indutoras da colite em modelos animais, tais como o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), polímeros de polissacarídeo-peptídeoglicano, solução intra-retal de etanol 50% (v/v), ácido acético, indometacina e o sulfato de sódio dextrano (do inglês *Dodecyl Sodium Sulfate*, DSS) (Okayasu *et al.*, 1990).

O modelo de colite induzido por DSS foi originalmente descrito por Okayasu *et al.* (1990), sendo um dos principais modelos murinos utilizados atualmente, devido principalmente à facilidade de induzir a inflamação e ao desenvolvimento da colite aguda semelhante à UC humana, utilizando-se para isto animais geneticamente susceptíveis. Na colite aguda ocorre perda de peso,

sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e da estrutura glandular do intestino. O infiltrado inflamatório é composto principalmente por neutrófilos na base das criptas intestinais, afetando assim a estabilidade do epitélio intestinal (Kawada *et al.*, 2007).

Provavelmente, o DSS promove a colite devido a seus efeitos tóxicos no epitélio, aumentando a exposição aos antígenos luminais pela destruição do conteúdo de mucina, ou ainda alterando a função dos macrófagos devido à fagocitose do DSS (Ni *et al.*, 1996; Kitajima *et al.*, 1999). Dessa forma, a perda da homeostase do epitélio intestinal consistiria em um evento inicial importante para a inflamação da mucosa (Poritz *et al.*, 2007).

Conclusões preliminares obtidas de modelos murinos experimentalmente infectados são que componentes da microbiota intestinal, comensais e/ou patogênicos, representam um papel crucial na ativação e fisiopatologia das IBDs, que em alguns casos podem ser promovidas por predisposição genética do hospedeiro devido à deficiência imunológica (Nell *et al.*, 2010).

Avanços recentes no entendimento desses mecanismos imunopatogênicos das IBDs têm levado ao desenvolvimento de terapias biológicas, que seletivamente inibem mediadores cruciais nos processos de inflamação, destacando-se os mecanismos regulados por lipídeos e por mensageiros lipídicos.

1.4 Ácidos graxos: um elo entre eicosanóides, inflamação e imunidade

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos (AG), estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (Broadhurst *et al.*, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são os mais importantes componentes dos fosfolipídeos que formam as membranas das células. Os AGPI podem ser subdivididos em duas famílias de acordo com a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica, sendo então chamadas de família ômega-6 (W6 ou n-6) e família ômega-3 (W3 ou n-3). As diferentes posições e número de duplas ligações dão aos ácidos graxos diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais.

Os AGPI são sintetizados a partir de dois ácidos graxos independentes e essenciais à nutrição: ácido α -linolênico (AAL) e linoléico (AL), que produzem as famílias ômega-3 e ômega-6 de AGPI, respectivamente. Para cada família tem-se

um ácido graxo precursor específico, chamado essencial, o qual é convertido em outros ácidos graxos da mesma série através e sucessivas reações enzimáticas, onde ocorre a adição de novos carbonos e de insaturações à cadeia original (Lehninger *et al.*, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa (AGPI-CML), como os ácidos araquidônico (AA) e docosaexaenóico (EPA), denominados ácidos graxos essenciais (AGE), não podem ser obtidos pela síntese de novo, mas podem ser sintetizados a partir dos ácidos linoléico e alfa-linolênico presentes na dieta.

O ácido AL pode ser encontrado em abundância nos óleos de milho, girassol, soja, dentre outros. Enquanto, o ácido AAL é encontrado em concentrações elevadas na semente de linho (Carter, 1993). Os AGPIs-w3 são encontrados em concentrações mais expressivas em lipídios de peixes e animais marinhos, especialmente aqueles procedentes de regiões frias (Gibson, 1983).

A essencialidade dos AAL e AL é definida por duas funções básicas: são componentes estruturais de membranas e precursores de substâncias fisiologicamente ativas, os chamados eicosanóides.

1.4.1. Eicosanóides

Os eicosanóides são metabólitos sintetizados a partir dos ácidos graxos ômega-6, como o ácido araquidônico (AA), ou dos ácidos graxos ômega-3, como os ácidos eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Breyer *et al.*, 2007). Eicosanóide é uma palavra de raiz helênica, sendo eikosi a palavra grega para “vinte”. “Semelhante a vinte” são os metabólitos oxigenados de um ácido graxo insaturado de vinte carbonos, o ácido araquidônico (Breyer *et al.*, 2007).

Os eicosanóides são uma classe de mediadores lipídicos de grande importância. Fisiologicamente atuam como hormônios locais, com meia vida curta, através de processos autócrinos e parácrinos, agindo em pequenas concentrações (nanomolar) nas células alvo, principalmente através de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Breyer *et al.*, 2007).

A síntese de eicosanóides depende da disponibilidade de AA livre para subsequente metabolismo. A principal fonte de AA são as membranas fosfolipídicas, primariamente a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, as quais podem ser ativadas por diversos estímulos como: químicos, inflamatórios e traumáticos, podendo ativar também citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) (Hilário *et al.*, 2006). Essa ativação celular produz distúrbio

na membrana e um aumento de cálcio intracelular que desencadeia uma série de eventos que determina a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (Breyer *et al.*, 2007).

A translocação da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para a membrana do retículo endoplasmático e da membrana nuclear, resulta na hidrólise dos fosfolídeos, culminando com a liberação do AA (Evans *et al.*, 2001). Uma vez liberado, o AA é metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos, incluindo o sistema das Cicloxigenases (COXs), das Lipoxigenases (LOXs) e das Epoxigenases do citocromo P450 (CYP) (Funk, 2001). A enzima específica envolvida é que determina a classe específica de eicosanóides produzidos.

Os produtos resultantes do metabolismo do AA são chamados coletivamente de eicosanóides, como as prostaglandinas (PGs), Tromboxanos, Lipoxinas, HETEs e Leucotrienos (Figura 5) (Breyer *et al.*, 2007).

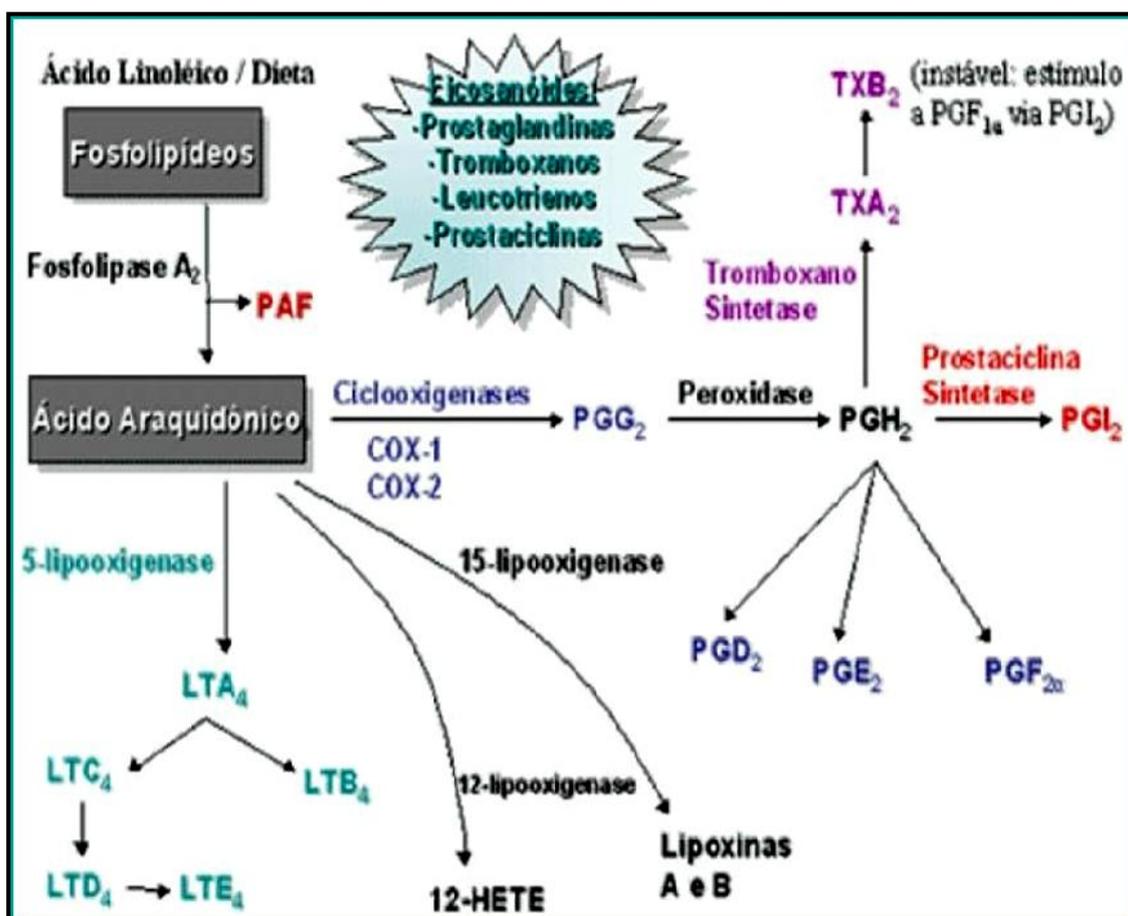


Figura 5: Esquema da via que conduz à síntese de eicosanóides a partir de AA. (Adaptado de SPINOSA *et al.*, 2006).

A Via das COXs resulta na produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. As duas primeiras levam à vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e estão envolvidas na patogenia da dor e da febre no processo

inflamatório. O último está relacionado com o processo de coagulação, uma vez que leva à vasoconstrição e promove a agregação plaquetária. As COXs ocorrem em duas isoformas, a isoforma constitutiva (COX-1) e a isoforma induzível (COX-2).

1.4.2. Lipoxigenases

As lipoxigenases (LOXs) são proteínas globulares, solúveis em solução salina e consistem em uma cadeia polipeptídica simples, de massa molecular em torno de 100 kDa (Hymowitz, 1981; Axelrod *et al.*, 1981). São dioxigenases, contendo um mol de ferro por mol de proteína, sendo assim denominadas metaloproteínas (Vliegenthrt *et al.*, 1979). O Fe^{2+} oxida-se em Fe^{3+} , e então é retirado um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica do ácido graxo e este átomo de hidrogênio se oxida a próton. O radical pentadieno ligado à enzima é convertido em um dieno conjugado que capta o oxigênio. Ocorre então a liberação de hidróperóxido específicos (HPETEs,) iniciando assim uma reação em cadeia (Naveena e Chinthalapally, 2009).

Três lipoxigenases, as 5-, 12- e 15-lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX E 15-LOX), constituem as principais isoformas de LOX encontradas nos seres humanos. As lipoxigenases são designadas de acordo com a posição em que catalisam a inserção de O_2 no carbono do ácido araquidônico. Os produtos intermediários instáveis (ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos – 5-, 12-, ou 15 HPETEs), são então metabolizados em seus ácidos-hidroxeicosatetraenóicos (5-, 12-, ou 15-HETEs) correspondentes. Essas vias levam também à formação dos leucotrienos e das lipoxinas (Bunker *et al.*, 1995; Naveena e Chinthalapally, 2009).

A enzima 5-LOX catalisa a oxidação de ácidos graxos em 5-HPETE que é o precursor direto do leucotrieno LTA₄, que pela ação da enzima LTA₄ hidrolase, é transformado em leucotrieno B₄ (LTB₄) e também em outros leucotrienos que possuem papéis fundamentais nos sistemas respiratórios e cardiovasculares (Ferguson *et al.*, 2007; Shimizu, 2009).

Os leucotrienos possuem papéis fisiológicos na imunidade inata e também patológicos nas doenças inflamatórias (Ferguson *et al.*, 2007), sendo que o LTB₄ é o principal leucotrieno envolvido no processo inflamatório, induzindo a quimiotaxia e agregação de leucócitos, o aumento da permeabilidade vascular, da proliferação de células T e da secreção de IFN- γ , IL-1 e IL-2. Porém, a 5-LO não é importante apenas no desencadeamento da atividade inflamatória. Podemos dizer que esta enzima possui um importante papel dual, tanto na produção de agentes pró-

inflamatórios como o LTB₄, e também promove a síntese de fatores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, as lipoxinas (LX).

Neste contexto, as intervenções farmacológicas em numerosos pontos críticos nas vias dos eicosanóides já foram desenvolvidos incluindo os inibidores das fosfolipases, dos agentes anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), os inibidores da ciclooxygenase-2 (COX-2) e dos inibidores dos leucotrienos, mostrando-se úteis no manejo clínico atual da inflamação, da dor e da febre.

1.4.3. 15 Lipoxigenase-1 (15-LOX-1)

Existem dois tipos diferentes de 15-lipoxigenases, a 15-LOX-1 (tipo leucócitos/reticulócitos) e 15-LOX-2 (tipo epiderme), diferenciados pela sua expressão de tecido e uma homologia de 40% ao nível dos aminoácidos.

A 15-LOX-1 é uma proteína composta por 661 aminoácidos, com peso molecular de 74,7 kDa. Ela contém um átomo de ferro não-heme por mol de enzima. A 15-LOX-1 é uma enzima induzível e altamente regulado em células humanas normais e desempenham um papel fundamental na produção de mediadores lipídicos de sinalização.

A expressão da 15-LOX-1 foi isolada e purificada pela primeira vez em reticulócitos de coelho e posteriormente se verificou serem expressas ou especificamente induzida em mastócitos, eosinófilos, monócitos ativados e células dendríticas e células epiteliais brônquicas de mamíferos (Kamitani *et al.*, 1998; Funk, 1996).

A estrutura tridimensional de 15-LOX-1 apresenta uma porção de peptídeo sinal composta por 7 folhas e 3 short. A porção funcional é composta por 14 hélices, 5 short-hélice e 4 folhas. A face catalítica é composta pelos aminoácidos: His³⁶¹, Leu³⁶⁷, His⁵⁴¹, His⁵⁴⁵, Leu⁵⁶⁴, Ile⁶⁶³. Os aminoácidos catalíticos His³⁶¹, His⁵⁴¹ e His⁵⁴⁵ promovem o ataque nucleofílico ao substrato devido à presença do íon metálico (Figura 6). O íon metálico, que é uma molécula de Ferro (Fe), é coordenado por ligações feitas pelo aminoácido Ile⁶⁶³ estabilizando na molécula a face catalítica, e as Leucinas apresentam a estabilização de cargas entre as histidinas catalíticas (Figura 6) (Prigge *et al.*, 1997).

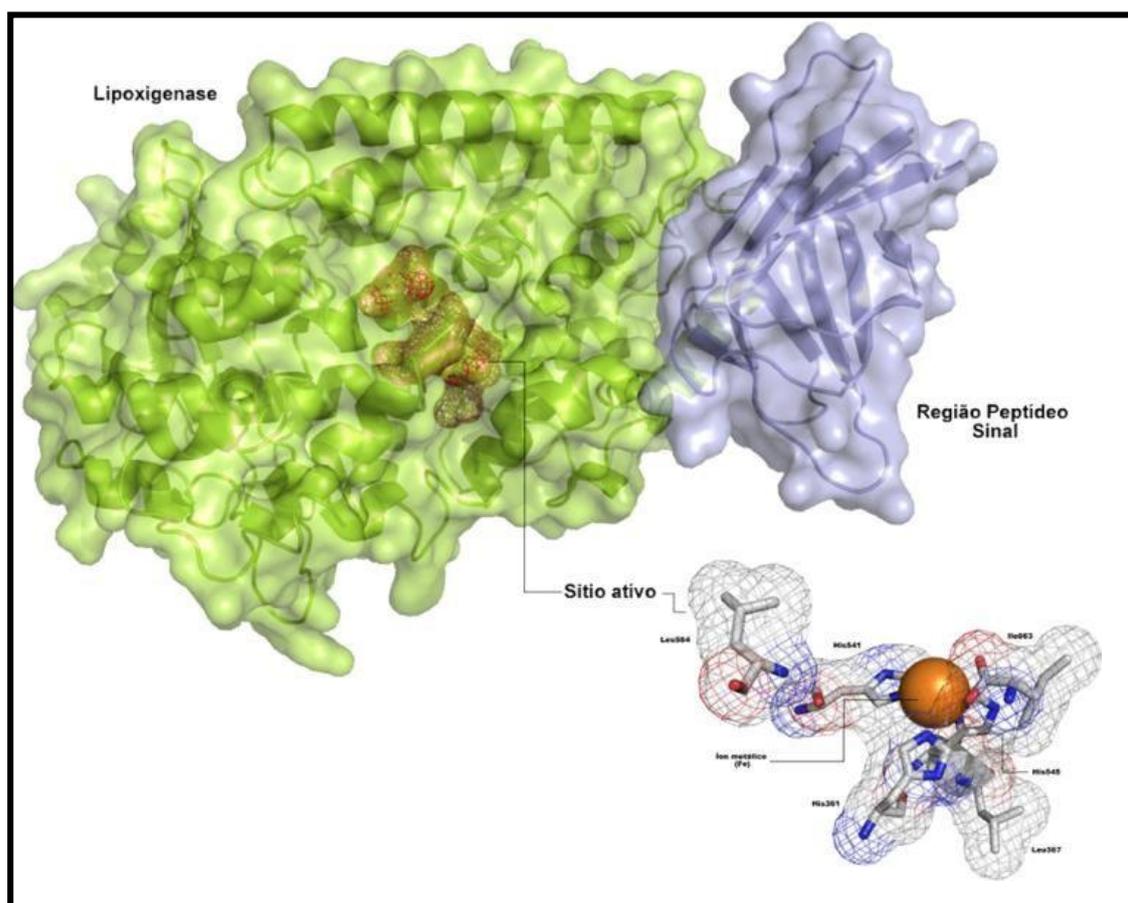


Figura 6: Estrutura tridimensional de LOX. (A): Porção de peptídeo sinal (Lilás); Região funcional (Verde); região do sítio ativo (Vermelho). (B): Região do sítio ativo em destaque. Imagem gerada pelo software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System).

Em função do substrato, esta enzima vai produzir, a partir do AA 15-HPETE e ainda, em pequenas quantidades, a partir do 12S-HPET, os HETEs. A segunda via converte quase que exclusivamente o AA em 15S-HPETE, e este pela ação de uma peroxidase é transformado a 15-HETE e, à partir do ácido linoléico, a ácido 13S- hidroperoxiocetadecadienoico (13-HPODE), e este a ácido 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE). No metabolismo enzimático oxidativo da 15-LOX-1, a partir do omega-3, tais como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA), temos também potentes mediadores anti-inflamatórios, conhecidos como lipoxinas que inibem a inflamação .

1.4.4 Propriedades antiinflamatórias e antitumorais da 15-LOX-1

A 15-LOX-1 é uma enzima que pode contribuir significativamente para a resolução da inflamação intestinal. Esta enzima encontra-se em células endoteliais e epiteliais e desempenha um papel fundamental no metabolismo oxidativo do AA, produzindo mediadores lipídicos, chamados lipoxinas, com ações anti-inflamatórias potentes (Levy *et al.*, 2001; Serhan, 2005; Lee, Zuo e Shureiqi, 2011). A lipoxina A4 (LXA4) estimula a fagocitose dos leucócitos apoptóticos por macrófagos, atenuando a inflamação (Godson *et al.*, 2000).

A 15-LOX-1, é capaz de inibir o ativador de proteína 1 (AP-1) e fator de ativação nuclear kB (NF-kB) em leucócitos humanos, ambas proteínas com propriedades pró- inflamatórias e proliferativas (Levy *et al.*, 1999; József. *et al.*, 2002).

Estudos relacionados à expressão diferencial da 15-LOX-1 em tumores coloretais, em relação a tecidos adjacentes saudáveis, têm demonstrado que a 15-LOX-1 está transcricionalmente silenciada nas células cancerígenas (Ikawa *et al.*, 1999; Shureiqi *et al.*, 1999 e Shureiqi *et al.*, 2009).

No que concerne a função dos produtos da 15-LOX-1, foi demonstrado que eles induzem a apoptose das células epiteliais do cólon *in vitro*, por um mecanismo ainda desconhecido, implicando na inibição do receptor nuclear PPAR- (Shureiqi *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2006; Sazaki *et al.*, 2006). PPAR- é um membro de uma família de receptores nucleares e tem sido proposto como um alvo terapêutico nas IBDs, devido a sua capacidade de inibir a via NF-B (Dubuquoy *et al.*, 2006). Foi também demonstrado que estes produtos regulam a expressão da e-caderina, uma molécula implicada na adesão célula-célula (Blottière, 2001).

Sabe-se ainda que a citocina pró-inflamatória IL-10 desempenha um papel significativo na patogênese das IBDs (Ligumsky *et al.*, 1990) e que a 15-LOX-1 correlaciona-se com a regulação negativa desta citocina (Shureiqi *et al.*, 2010)

Vários outros estudos confirmam o papel antiinflamatório da 15-LOX-1, como em experimentos com ratos tratados com um inibidor seletivo 15-LOX-1 (PD 146176), resultando em uma piora significativa da função intestinal durante a colite induzida experimentalmente (Mangino *et al.*, 2006).

Assim, os produtos da 15-LOX-1 descritos anteriormente, 13-HODE e 15-HETE, influenciam na proliferação celular e a apoptose (Shureiqi *et al.*, 2005). Sobre os granulócitos, a 15-HETE inibe a formação de íons superóxidos, sua ativação

(Smith *et al.*, 1993), sua migração (Takata *et al.*, 1994) e modulam a formação de leucotrienos (Profita *et al.*, 2000). Sobre os macrófagos, os derivados da 15-LOX-1 diminuem a resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e a produção do fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor necrosis factor*, TNF- α) (Ferrante *et al.*, 1997). Foi também demonstrado que a administração local da 15-LOX-1 de soja reduz o infiltrado de neutrófilos e a produção de IL-12 em modelo murino de peritonite (Bannenberg *et al.*, 2004).

1.4.5 Lipoxinas: os produtos de interação da lipoxigenases

As LOX são as responsáveis pela síntese das lipoxinas. As três diferentes LOXs, durante a interação célula-célula, levam a síntese de lipoxinas a partir do AA. Pela via da 5-LOX nos neutrófilos, o leucotrieno A₄ (LTA₄) é formado e é rapidamente convertido pelas plaquetas em lipoxina A₄ (LXA₄) pela via da 12-LOX. Um segundo modo de formação da lipoxina (LX) é pela via da 15-LOX, formando lipoxina A₄ e lipoxina B₄. A lipoxina pode ser sintetizada ainda por uma terceira via, através da acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2) pela aspirina. Esses “*aspirin-triggered-LXs*” (ATLs) são mais potentes e eficazes que a LXA₄ e LXB₄, em alguns efeitos como, por exemplo, inibindo a migração e a adesão de neutrófilos e proliferação celular (Figura 7).

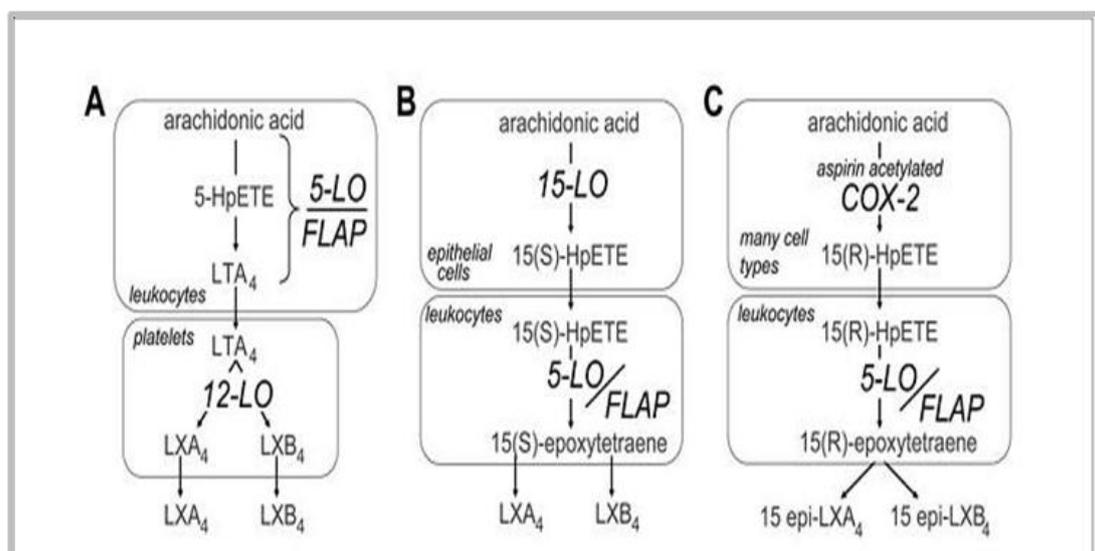


Figura 7: Biossíntese de lipoxinas. As lipoxinas podem ser produzidas durante a interações célula-célula, utilizando enzimas em células adjacentes. Ou LXA₄ por LXB₄ pode ser sintetizado a partir de AA por (A) um 5-LO/FLAP a 12-LO via ou (B) um 15-LOX para 5-LO/FLAP em A.A.

As duas principais lipoxinas, a LXA4 e a LXB4, modulam as ações dos leucotrienos e das citocinas, sendo assim importantes na resolução da inflamação.

Nos locais de inflamação, observa-se, tipicamente, uma relação inversa entre as quantidades de lipoxinas e de leucotrienos presentes. Essa observação levou à sugestão de que as lipoxinas podem atuar como reguladores negativos da ação dos leucotrienos. São encontrados receptores de LXA4 nos neutrófilos, bem como nos pulmões, no baço e nos vasos sanguíneos. As lipoxinas estimulam a captação e a depuração dos neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos e, portanto, medeiam a resolução da resposta inflamatória.

Como a produção de lipoxinas parece ser importante na resolução da inflamação, a existência de um desequilíbrio na homeostasia das lipoxinas e leucotrienos pode constituir um fator-chave na patogenia de doenças inflamatórias.

Assim, a utilização de produtos e/ou enzimas que atuem no metabolismo dos AGPI, com atividade antiinflamatória são importantes alvos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias. Diversas aplicações terapêuticas vêm sendo testadas com sucesso utilizando as lipoxinas, antagonistas das ações inflamatórias dos leucotrienos e de outros mediadores inflamatórios, promovendo a resolução da inflamação.

Atualmente, estão sendo desenvolvidos análogos estáveis de lipoxinas, aumentando a resolução dos surtos recorrentes de inflamação aguda em modelos de inflamação cutânea e inflamação gastrintestinal. Os análogos estáveis da lipoxina A4 constituem um tratamento efetivo em modelos murinos da doença de Crohn e inflamação intestinal, podendo assim representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de doenças intestinais inflamatórias (Shureiqui *et al.*, 2000). Além disso, por se tratar de reguladores endógenos, espera-se que tenham ações seletivas, com poucos efeitos adversos.

Vale ressaltar ainda que dados recentes suportam também o papel supressor tumoral de 15-LOX-1, especialmente no câncer de cólon. Estes dados indicam que 15-LOX-1 promove vários eventos antitumorígenicos, incluindo diferenciação celular e apoptose, e inibe a inflamação crônica, a angiogênese e a metástase. A repressão da transcrição de 15-LOX-1 em células cancerosas é complexa e envolve mecanismos múltiplos, como por exemplo, a metilação de histonas e a ligação de repressores da transcrição. Assim, a ativação da expressão de 15-LOX-1 em células de câncer de cólon pode atuar como um importante mecanismo terapêutico para a doença (Sun e Lee *et al.*, 2011)

Neste contexto, a construção de uma linhagem de *L. lactis*, produtora da 15-*lox*-1 poderá aumentar a síntese de mediadores anti-inflamatórios, como as lipoxinas, diretamente no epitélio intestinal, podendo assim contribuir para a resolução dos processos inflamatórios locais (Lee *et al.*, 2001), podendo vir a ser uma nova estratégia para o tratamento das IBDs.

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência das doenças inflamatórias intestinais (do inglês *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) têm aumentado em países que adotam um estilo de vida ocidental, incluindo o Brasil. As duas principais formas da IBD são a Colite Ulcerativa (do inglês *Ulcerative Colitis*, UC) e a Doença de Crohn (do inglês *Crohn's Disease*, CD). Descobertas há quase 100 anos, a etiologia dessas doenças ainda não é bem compreendida, entretanto, existem crescentes evidências que as IBDs resultam de uma resposta imune anormal à microbiota intestinal em indivíduos com predisposição genética, resultando em uma inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI). Os tratamentos atuais para as IBDs não são eficazes, e ainda incluem o uso de drogas anti-inflamatórias que apresentam vários efeitos colaterais.

Assim, estudos recentes vêm demonstrando o potencial terapêutico de inúmeros microrganismos probióticos isolados do TGI humano, gerando resultados promissores no tratamento das IBDs. Além disto, bactérias recombinantes também vêm sendo utilizadas com este mesmo propósito.

Neste contexto, uma metodologia original para o tratamento das IBDs seria a utilização de uma bactéria segura, *Lactococcus lactis*, como veículo de entrega da enzima 15-LOX-1 diretamente à mucosa intestinal. Esta enzima está envolvida na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares intestinais, gerando mediadores com propriedades anti-inflamatórias e pró-apoptóticas. Sendo assim, *L. lactis* produtoras de 15-lox-1 seria uma interessante estratégia terapêutica a ser utilizada nas IBDs e também do câncer coloretal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Construir linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada da proteína 15-LOX-1 visando ao desenvolvimento de um produto biotecnológico como uma nova estratégia para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

3. 2. Objetivos específicos

- Isolar a seqüência codificadora da 15-LOX-1 através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)
- Clonar a ORF 15-LOX-1 no vetor pCR®-Blunt II-TOPO ®
- Subclonar a ORF 15-LOX-1 nos vetores do sistema XIES: pXylT:CYT e pXylT:SEC
- Transformar *L. lactis* com vetores pXylT:CYT: 15-LOX-1 , pXylT:SEC:15-lox-1
- Verificar a expressão da proteína 15-LOX-1 pelas linhagens recombinantes através da técnica de *Western Blotting*
- Administrar linhagens de *L. lactis* recombinantes, produtoras da forma citoplasmática e secretada da enzima 15-LOX-1 em camundongos C57BL/6 para tratamento das IBDs, utilizando o modelo de inflamação por DSS:
- Analisar macroscópica e histologicamente a inflamação intestinal;
- Avaliar a resposta imune humoral na mucosa intestinal, através da detecção de IgA secretória nas fezes e nolavado intestinal;
- Avaliar a resposta imune celular, através da detecção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL17, TNF- e IFN- produzidas e no intestino dos animais tratados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio *Luria-Bertani* (LB) sob agitação, à 37°C por um período de 18 horas e, quando necessário, o meio foi suplementado com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp). Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido à 37°C por 18 horas e em seguida, as culturas foram diluídas (1:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

Já as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli) à 30°C, sem agitação, por um período de 20 horas, e quando necessário, o meio foi suplementado 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Cm). Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para serem estocadas, as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio líquido e em seguida as culturas foram diluídas (1:4) em uma solução estéril de glicerol 80% e posteriormente acondicionadas em ultrafreezer à -80°C.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas

| Linhagem | Características | Fonte |
|------------------------------|---|------------|
| <i>Escherichia coli</i> TG1 | (supE; <i>hsd</i> ₅ ; lac-proAB), F'(traD36; proAB-lacZ M15) | Invitrogen |
| <i>L. lactis</i> NCDO2118 a | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | LGCM |
| <i>Escherichia coli</i> 83 b | <i>E. coli</i> TG1 portando o plasmídeo pXylT:CYT:nuc, Cm ^r | LGCM |
| <i>Escherichia coli</i> 84 c | <i>E. coli</i> TG1 portando o plasmídeo pXylT:SEC:nuc, Cm ^r | LGCM |

^a : Linhagem selvagem de *L. lactis* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

^b : *Escherichia coli* linhagem TG1 portadora do plasmídeo pXylT:CYT:nuc pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

^c : *Escherichia coli* linhagem TG1 portadora do plasmídeo pXylT:SEC:nuc pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 2 - Plasmídeos

| Plasmídeos | Características relevantes | Fonte |
|---------------------|--|------------------------------|
| pCDNA3:15-lox-1 | Plasmídeo contendo a ORF codificadora 15-lox-1 humana-Km/ColE1 ORI) | Lowrie <i>et al.</i> , 1997 |
| pCR®-Blunt II-TOPO® | Vetor de clonagem/Zeor-Kmr/pUC ORI | Invitrogen |
| pTP:c15-lox-1 | Vetor pCR®-Blunt II-TOPO® contendo a ORF 15-lox-I humana (para clonagem no pXyIT:CYT) | Este trabalho |
| pTP:s15-lox-1 | Vetor pCR®-Blunt II-TOPO® contendo a ORF 15-lox-I humana (para clonagem no pXyIT:SEC) | Este trabalho |
| pXyIT:CYT:nuc | pWV01/Cm ^r ; vetor de expressão do sistema XIES contendo o sítio de ligação do ribossomo (RBS) da seqüência codificadora da proteína Usp45 fusionado à seqüência codificadora da nuclease de <i>Staphylococcus aureus</i> (nuc), sob o controle do promotor PxyIT | Miyoshi <i>et al.</i> , 2004 |
| pXyIT:SEC:nuc | pWV01/Cmr ; vetor de expressão do sistema XIES contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) fusionada à ORF nuc de <i>S. aureus</i> , sob o controle do promotor PxyIT | Miyoshi <i>et al.</i> , 2004 |
| pXyIT:CYT:15-lox-1 | Vetor de expressão pXyIT:CYT:nuc do sistema XIES no qual a ORF nuc foi substituída pela ORF 15-lox-1n | Este Trabalho |
| pXyIT:SEC:15-lox-1 | Vetor de expressão pXyIT:SEC:nuc do sistema XIES no qual a ORF nuc foi substituída pela ORF 15-lox-1 | Este Trabalho |

4.2. Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmídeos foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 2012), com algumas modificações especificadas junto aos métodos e/ou seguindo recomendações dos fabricantes dos kits comerciais. A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também por leitura em espectrofotômetro NanoDrop®1000 v3.5.2 (*Thermo Fisher Scientific*) observando-se as razões de absorbância 260 nm/ 280 nm. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos

fabricantes. A sequência nucleotídica do inserto foi confirmada através de sequenciamento (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977). Os pares de iniciadores (*iniciadors*) utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

4.3. Resolução eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose à 1% após serem misturadas com tampão de amostra TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídio (0,5 µg/mL) em uma proporção 1:5. Todas as corridas foram realizadas a 100V durante aproximadamente 1 hora. Os DNAs também foram visualizados em um fotodocumentador e os géis foram fotografados sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science TM DC40 Camera” (Kodak). Para estimar o peso molecular dos fragmentos desejados foi utilizado o marcador de DNA de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.4. Amplificação da ORF 15-*lox-1*

O fragmento de cDNA de 1989 pb, contendo a sequência codificadora da 15-*lox-1* humana foi amplificado por PCR utilizando como molde a sequência codificadora presente no plasmídeo pCDNA3:15-*lox-1* (Tabela 3). Os oligonucleotídeos iniciadores contendo um sítio artificial de restrição (*Nsi*1 e *EcoR*1) em cada extremidade, foram confeccionados baseados na sequência do mRNA da 15-lipoxygenase Humana, (número de acesso no “GenBank” [M23892](#); (Tabela 3).

Tabela 3 Iniciadores utilizados na amplificação, por PCR, da ORF *15-lox-1*

| Iniciador | Amplificação | Oligonucleotídeos |
|------------------------------|---|---|
| LOXSCF | pXy/Sec Forward ^{Fa} | 5' GATGCAT CAGGTCTCTACCGCATCC 3' |
| LOXCTF | pXy/Cyt Forward ^{Fa} | 5' GATGCAT GGTCTCTACCGCATCC 3' |
| LOXSCR | pXy/Sec e pXy/Cyt Reverse ^{Rb} | 5' GGAATTC TTAGATGGCCACTGTT 3' |
| Tamanho esperado do amplicon | | 1989 pb |

^{Fa}: *Iniciador Forward* da *15-LOX-1*: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima Nsil (negrito);

^{Rb}: *Iniciador Reverse* *15-LOX-1*: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima EcoR1 (negrito);

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 2 pmoles/µL de cada iniciador, 0,5 µL do iniciador forward e 0,5 µL do iniciador reverse, ambos a 100 pmol/µL (reações com iniciadores LOXCF e LOXSCR para a forma citoplasmática e LOXSCF e LOXSCR para forma secretada, e que foram conduzidas separadamente)(Tabela 3), 5 µL do MIX 10X AccuPrime™, 1U de Accuprime™Pfx DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µL (20 ng/ µL) do DNA plasmideano pCDNA3:*15-lox-1*. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 40 segundos; anelamento a 58° durante 1 minuto; extensão a 68°C durante 3 minutos; e extensão final por 5 minutos a 68°C. A reação ocorreu no aparelho termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). As sequencias dos iniciadores, a temperatura de anelamento e os sítios de restrição estão detalhados na Tabela 3. Ao controle negativo da reação adicionou-se água ultrapura estéril em vez de DNA. Para verificar se a reação de PCR foi bem sucedida, 5µL do produto amplificado foi iresolvido em gel de agarose à 1%, como descrito no item 4.3.

4.5. Clonagem da ORF *15-lox-1* no sistema Topo PCR®II-TOPO (Invitrogen)

Os amplicons purificados correspondentes aos insertos *c15-lox-1* e *s15-lox-1* foram submetidos a uma reação de ligação no vetor Zero Blunt® TOPO®(Tabela 2) para a geração dos plasmídeos intermediários denominados de pTP:c15-lox-1 e pTP:s15-lox-1, (Tabela 2). A ligação bem como os procedimentos foram realizados conforme as instruções fabricante. Os produtos das ligações foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* preparadas de acordo com o protocolo descrito no item a seguir.

4.5.1. Confeção de *Escherichia coli* eletrocompetente

Para confecção de células de *E. coli* eletrocompetentes, 100 µL de uma cultura de *E. coli* TG1 foram inoculados em 5 mL de meio LB sem antibiótico. O inóculo foi incubado à 37°C, sob agitação, por um período de 18 horas. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 3 mL dessa cultura foi transferida para 300 mL de meio LB sem antibiótico e incubada à 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade óptica 600 nm (DO600nm) entre 0,2 e 0,3. Em seguida a cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos, redistribuída em seis tubos de 15 mL os quais foram centrifugados a 4.000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e se seguiu a lavagem e ressuspensão do sedimento celular adicionando a cada tubo 40 mL de uma solução estéril e gelada de glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais três vezes e após a última lavagem o sedimento celular total foi ressuspensionado com 1 mL de glicerol 10%. Esse volume foi dividido em alíquotas de 100 µL as quais foram estocadas à -80°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota das células eletrocompetentes foi descongelada em gelo. Às células foram adicionados 10 ng do plasmídeo pUC18 (Ampr) e a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (0,2 cm; BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, utilizando-se o eletroporador GenePulser Xcell™(BIO-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB à 37°C e estas foram incubadas também à 37°C, sem agitação, por duas horas. Em seguida, diluições de 10², 10⁴ e 10⁶ foram semeadas em placas contendo meio LB ágar suplementado

com ampicilina (100 µg/mL) e mantidas em estufa à 37°C durante 18 horas. Ao final, foram obtidas 2×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por micrograma de DNA.

4.5.2 Transformação de *Escherichia coli* TG1

A transformação foi realizada por eletroporação seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item anterior. Para tanto, uma alíquota (6 µL) dos vetores pTP:c15-lox-1 ou pTP:s15-LOX-1 foram misturados com 100 µL de células eletrocompetentes e incubados no gelo por 10 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 50 µL, 100 µL e o restante (850 µL centrifugados), da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina (Amp). As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes à Amp. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas e procedeu-se com a extração plasmideana (miniprep) pelo método de lise alcalina de plasmídeos e a confirmação da presença do inserto 15-LOX-1 nos mesmos.

4.5.3. Extração do DNA plasmideano de *Escherichia coli* TG1

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de Amp e mantidos, por cerca de 18 horas a 37°C sob agitação. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada em freezer a -80°C utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos utilizando o kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante, com algumas modificações: 2 mL da cultura foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e o precipitado celular coletado foi ressuspenso em 100 µL da solução I - Resssuspensão (vide ANEXO B). Após cinco minutos, adicionou-se 200 µL da solução II - Lise (vide ANEXO B). Passados dois

minutos foram adicionados 100 μL de clorofórmio e 150 μL da solução III-Neutralização (vide ANEXO B). O lisado de células foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante (cerca de 500 μL) foi coletado em novos microtubos onde adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de Acetato de Sódio (3 M) e 1% de Glicogênio (20 mg/mL). Posteriormente, os tubos foram incubados por aproximadamente 30 minutos em freezer -80°C e, após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm descartando-se o sobrenadante gerado ao final. Após lavagem com etanol 70% (1mL), o precipitado foi ressuscitado em 20 μL de água milli-Q estéril. Quando necessário, o DNA foi tratado com 1 μL de RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em banho maria a 37°C por uma hora. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3.

4.5.4 Confirmação da presença e do tamanho do inserto *15-lox-1* no plasmídeo pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen)

Para verificar a presença e o peso molecular do amplicon referente a *15-lox-1* que foi clonado no vetor pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen), amplificou-se por PCR os insertos utilizando os mesmos iniciadores descritos na Tabela 3. Utilizou-se também digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Nsi* e *EcoRI* para verificar sua presença no vetor.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 μL contendo: 2,5 μL 10X PCR Buffer (Invitrogen); 0,75 μL de dNTP 10mM (Invitrogen); 0,3 μL de MgSO_4 50 mM (Invitrogen); 0,5 μL do iniciador forward e 0,5 μL do iniciador reverse, ambos a 100 pMoles/ μL ; 0,5 μL da miniprep (100 ng/ μL); 0,5 μL de Taq DNA Polymerase (5 u/ μL) (Invitrogen); 19,65 μL de água milli-Q estéril. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos; anelamento dos iniciadores a 58°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C . A reação ocorreu utilizando termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). Ao final, 1 μL do produto amplificado resolvido em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

A reação de digestão enzimática foi realizada em um volume de 20 μL , utilizando 10 μL de DNA da miniprep (100 ng/ μL), 2 μL de tampão React3 (Invitrogen), 1 μL da enzima *Nsi*I (Invitrogen), 1 μL da enzima *EcoRI* (Invitrogen) e

6 µL de água Milli-Q estéril. A reação foi mantida a 37°C por 18 horas e posteriormente 10 µL da reação de digestão foi resolvida em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

4.5.5 Reação de sequenciamento e análises *in silico*

A presença do inserto *15-lox-1* clonado no vetor pCR®-Blunt II-TOPO ® foi confirmada através de sequenciamento utilizando-se os *iniciadores* M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen). Cada amostra foi amplificada utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), como segue: 0,5 µL de "Reaction Mix"; 1,5 µL de tampão de diluição 5X; 2 µL do *iniciador* M13 *forward* ou *reverse* (0,8 pMoles/µL); 1 µL de DNA (100 ng/µL); 5 µL de água Milli-Q estéril. Homogeneizar o produto final. A reação ocorreu em um termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida por 44 ciclos de 96°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Logo após, os produtos da reação foram precipitados e lavados com o objetivo de remover os nucleotídeos marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para isto, a cada amostra foi adicionado 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se então com a centrifugação 5.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida adicionou-se 35 µL de etanol 70% em cada tubo e os mesmos foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado. A amostra, precipitada e seca, foi armazenada a -20°C até a sua aplicação no Sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas por meio do programa CAP3 *Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde obteve-se um *contig* único de cada clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi analisado pelo algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível: NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a comparação entre sequências de ácidos nucléicos e aminoácidos utilizou-se o programa "BLASTn" e "BLASTx", respectivamente.

4.6 Subclonagem da ORF 15-*lox-1* nos vetores do sistema XIES para expressão de proteínas em *L.lactis*.

4.6.1. Digestão enzimática dos vetores *pXyIT:CYT:nuc* e *pXyIT:SEC:nuc*

Para a subclonagem do fragmento de DNA correspondente a forma citoplasmática e secretada da 15LOX nos vetores de expressão *pXyIT:CYT:nuc* e *pXyIT:SEC:nuc* (Tabela 2)), respectivamente, realizou-se uma reação de digestão enzimática em um volume final de 20 µL onde 15 µL (contendo aproximadamente 1µg de DNA) correspondiam aos plasmídeos *pXyIT:CYT:nuc* ou *XyIT:SEC:nuc*; 2,0 µL foram referentes ao tampão *React 3* (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM), 1,0 µL às enzimas *NsiI* (10 U/µL) e *EcoRI* (10 U/µL) e 2,0 µL referentes à água milliQ estéril. A reação foi mantida a 37°C por quatro horas. Ao final digeriu-se o fragmento correspondente à nuclease (NUC; 511 pb), oriunda de *S. aureus*, presente em ambos os vetores.

4.6.2. Purificação do fragmento de DNA *pXyIT:CYT* e *pXyIT:SEC*

A reação de digestão descrita no anterior teve todo o seu volume aplicado em gel de agarose à 1% e a resolução eletroforética foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 4.3. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes aos vetores *pXyIT:CYT* (3244 pb) e *pXyIT:SEC* (3316 pb), desprovidos da sequência codificadora da *nuc*, foram purificados com o Kit GFX (*Amersham Biosciences*), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos foram avaliadas em gel de agarose à 1%.

4.6.3. Digestão enzimática dos plasmídeos *pTP:c15-lox-1* e *pTP:s15-LOX-1*

Para digerir os fragmentos *c15-LOX-1* e *s15-LOX-1* dos plasmídeos *pTP:c15-lox-1* e *pTP:s15-lox-1* (Tabela 2) realizou-se a seguinte reação enzimática: 15 µL (contendo aproximadamente 1µg de DNA) dos plasmídeos; 2,0 µL do tampão *React 3* (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100

mM); 1,0 μ L de *Nsi*I (10 U/ μ L); 1,0 μ L de *Eco*RI (10U/ μ L) e 2,0 μ L de água milliQ estéril. A reação foi mantida a 37°C por quatro horas.

4.6.4. Purificação do fragmento de DNA *15-lox-1*

A reação de digestão descrita no item anterior foi aplicada em gel de agarose à 1% e a resolução eletroforética em gel de agarose foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 4.3. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao inserto c15-LOX-1 (1989 pb) e s15-LOX-1 (1989 pb) foram purificados utilizando-se o Kit GFX (*Amersham Biosciences*) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos foram estimadas em gel de agarose à 1%.

4.6.5. Ligação da ORF *15-lox-1* nos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto c15-LOX-1 e s15-LOX-1 (item 4.6.3), e aos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC (item 4.6.4) foram submetidos a uma reação de ligação. A reação foi realizada com a enzima T4 DNA polimerase (Invitrogen) à temperatura de 16°C durante 16 horas utilizando uma proporção equimolar (10/1) de inserto/vetor.

4.6.6. Confeção de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118

As células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118 foram preparadas de acordo com protocolo descrito a seguir: Uma colônia foi inoculada em meio M17Glu-Sac (vide item 4.2) e o inóculo foi mantido a 30°C, “overnight” sem agitação. Um segundo inóculo foi realizado em meio M17Glu-Sac e incubado da mesma maneira que o anterior. Posteriormente, 1 μ L desta última cultura foi inoculada em 150 mL de meio M17Glu-Sac contendo glicina 1% e quando alcançou densidade óptica (DO600nm) em torno de 0.4-0.6, a mesma foi centrifugada a 8.700 rpm durante 15 minutos a 4°C. O precipitado celular foi ressuscitado com 150 mL de solução de sacarose 0.5M/ glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e após a última lavagem o “pellet” foi ressuscitado em 1 mL de PEG3000 30%/glicerol 10%. Alíquotas de 100 μ L dessas células foram estocadas a -70° C.

4.6.7. Transformação de *L. lactis* NCDO2118 com os plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1

Uma alíquota contendo 100 ng dos plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1 foram usados para transformar as células de *L. lactis* NCDO2118 eletrocompetentes. As células foram mantidas em contato com o DNA plasmideano por 5 minutos no gelo e, logo após, foram colocadas em uma cubeta de 2 mm para a eletroporação no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD), nas seguintes condições: 2400 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1 mL de M17-Sac-Gli foi adicionado às células e a mistura foi então mantida a 30°C por 4 horas, sem agitação. O controle negativo consistiu transformar células eletrocompetentes na ausência de qualquer plasmídeo.

Semeou-se 100 µL das células eletroporadas com cada um dos plasmídeos em placas de Petri contendo meio M17Glu-Sac ágar suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol. As culturas foram mantidas à 30°C por aproximadamente 30 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes. Os clones selecionados foram cultivados e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C em glicerol 40%.

4.6.8. Extração do DNA plasmideano pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1

As colônias resultantes da transformação descrita no item anterior foram inoculadas em 5 mL de M17-Sac-Gli suplementado com Cm (10 µg/mL) e a cultura foi mantida a 30°C por aproximadamente 18 horas, sem agitação. Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o método de lise alcalina assim como descrito no item 4.5.3, com algumas modificações: após a primeira centrifugação foram adicionados ao precipitado celular 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Após este período, seguiu-se normalmente o protocolo (item 4.5.3).

4.6.9 Confirmação dos clones de *L. lactis* portadores dos plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:SEC:15-lox-1

Os plasmídeos extraídos (item IV.8.6) (aproximadamente 50 ng) foram aplicados em uma reação de PCR com os iniciadores já descritos (Tabela 3) com o objetivo de confirmar a obtenção de plasmídeos recombinantes contendo a ORF 15-

lox-1(Figura 8). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o descrito no item 4.4.

Os mesmos vetores foram submetidos à digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Nsi* e *EcoRI*. Para digerir os fragmentos c15-LOX-1 e s15-LOX-1 dos plasmídeos pXylT:CYT:15-*lox-1* e pXylT:SEC:15-*lox-1* (Tabela 2) realizou-se a seguinte reação enzimática: 15 µL (contendo aproximadamente 1µg de DNA) dos plasmídeos; 2,0 µL do tampão React 3 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM); 1,0 µL de *Nsi*I (10 U/µL); 1,0 µL de *EcoRI* (10U/µL) e 2,0 µL de água milliQ estéril. A reação foi mantida a 37°C por quatro horas.

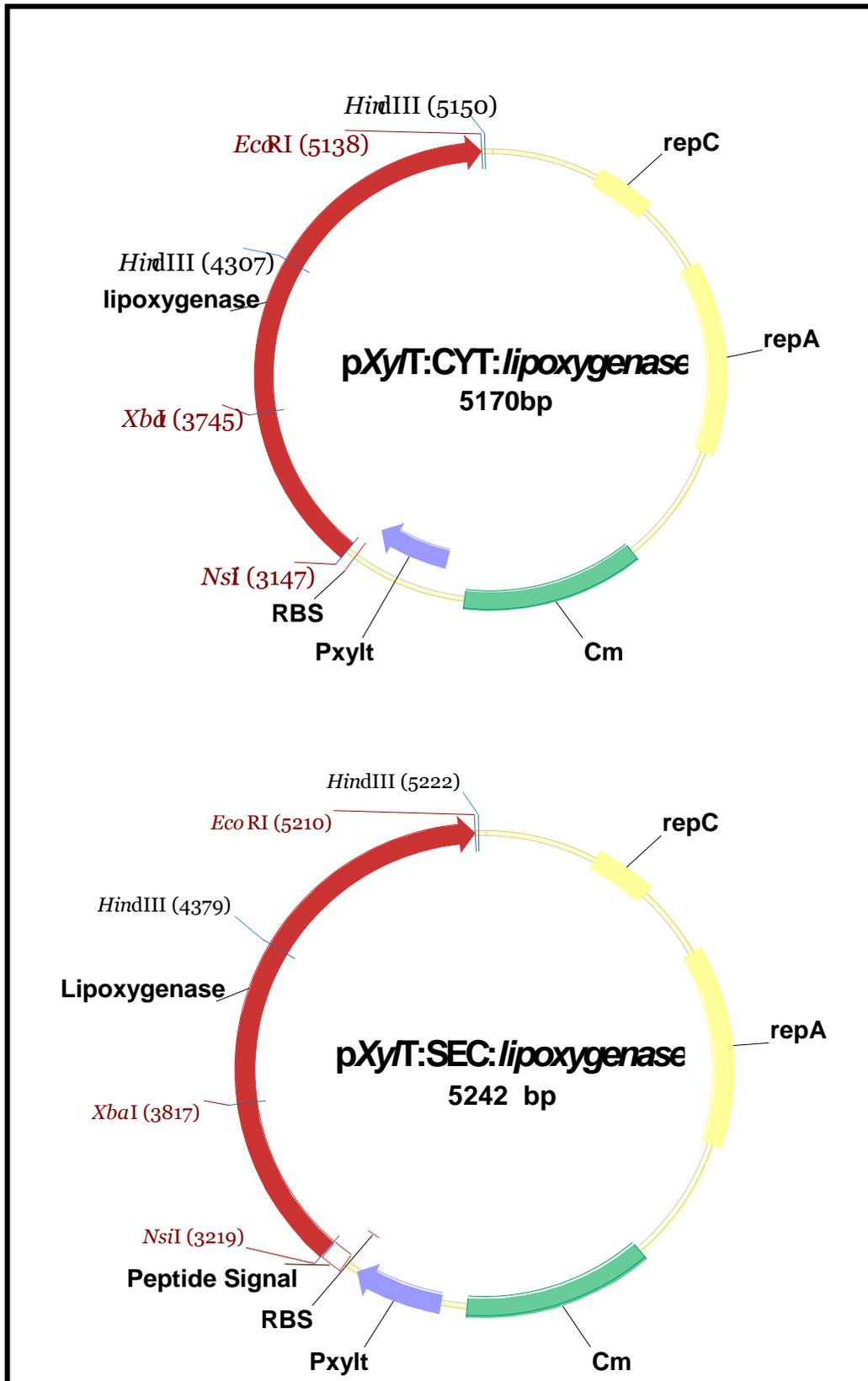


Figura 8: Representação dos vetores de expressão pXylT:SEC:15-lox-1 e pXylT:CYT:15-lox-1. PxyIT: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência NsiI e EcoRI: codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. Sítio para as enzimas de restrição NsiI e

EcoRI. r15-LOX-1: ORF 15-*lox-1* humana. repA e repC: origens de replicação. Cm: Gene que confere resistência ao cloranfenicol.

4.6.10. Reação de sequenciamento e análises *in silico*

A seqüência nucleotídica do inserto 15-LOX-1 clonada nos vetores pXyIT:CYT e pXyIT:SEC foi determinada através de sequenciamento (Sanger et al., 1977), conduzida no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences) por meio da utilização do Kit “DYEnamic ET Dye Terminator” (Amersham Biosciences). Os iniciadores utilizados foram: xyIT1 (forward) 5' GGA GAT CTG GTA ATG ATT GTT GGC TTG 3' e NUCR (reverse) 5' GGT ATC GAT AAG CTT GAT ATC 3'. As seqüências de DNA obtidas através do sequenciamento foram analisadas utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos utilizou-se o programa “BLASTn” e para a comparação entre proteínas o “BLASTx” .

4.7. Análise da expressão da proteína r15-LOX-1 produzida por *L. lactis*.

4.7.1 Indução da expressão gênica em *L. lactis*

Primeiro dia: Colônias isoladas de *L. lactis* pSEC:15-LOX-1, *L. lactis* pCYT:15-LOX-1 e *L. lactis* selvagem individualmente cultivadas em estufa a 30°C por 18 horas, sem agitação.

Segundo dia: As culturas crescidas foram diluídas (1:10000) em 10 mL de GM17 (cultura não induzida) e em 10 mL de XM17 (cultura induzida), ambos meios contendo ou não cloranfenicol. Os inóculos foram incubados na estufa a 30°C, sem agitação, por mais 18 horas.

Terceiro dia: Após as culturas terem alcançado densidade óptica (OD_{600nm}) 2.0, 2 mL foram coletados e centrifugados (7 min., 4°C e 13.000 rpm). O precipitado celular e 1,5 mL do sobrenadante foram coletados para posterior extração protéica das frações citoplasmática e secretada (processo descrito na próxima seção). (Figura 9)

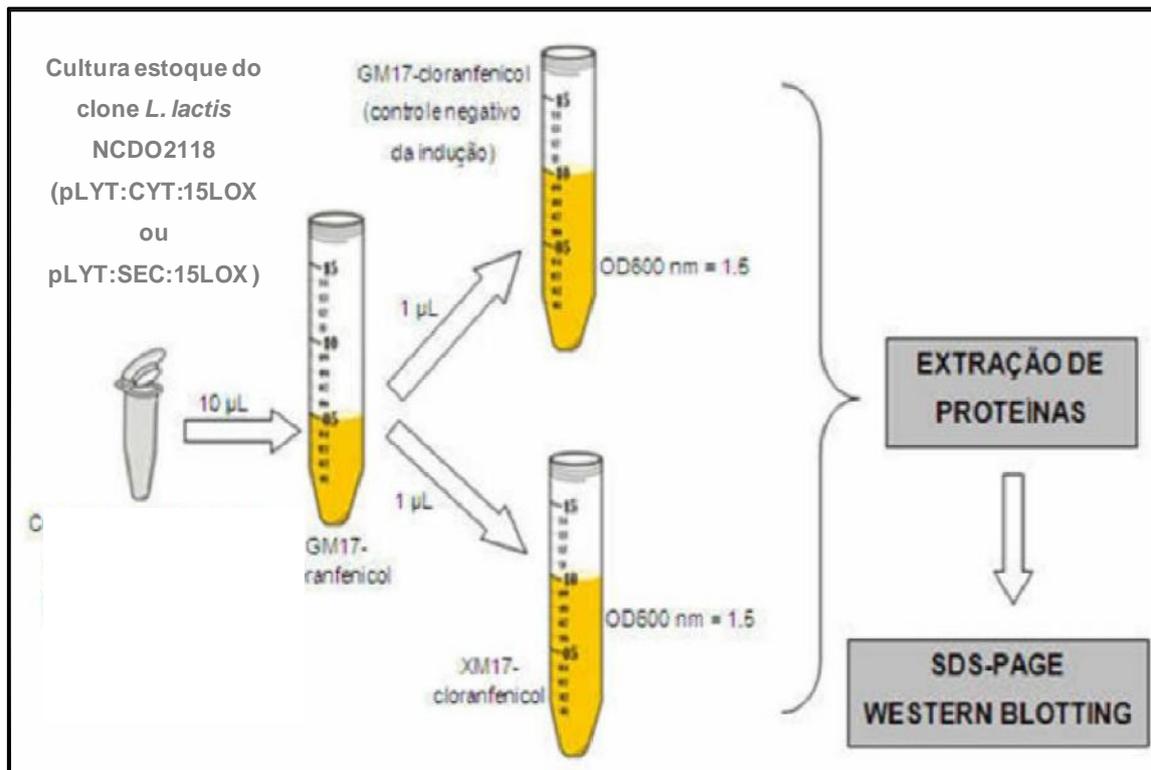


Figura 9: Representação esquemática do processo de indução da expressão gênica da r15-LOX-1 em *L. lactis* NCDO2118.

4.7.2. Extração das frações protéicas citoplasmática e secretada das linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118

Como descrito anteriormente, o sobrenadante gerado pela centrifugação das culturas recombinantes induzidas e não induzidas foi separado do precipitado celular e estes foram tratados separadamente.

O sobrenadante foi filtrado através de um filtro 0,22 µm (Corning) e a ele adicionou-se 100 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) 100% (p/v) gelado, 10mM de ditioneitol (DTT) (USB) e coquetel inibidor de proteases (Sigma). Os microtubos foram incubados em gelo durante uma hora e, após este período, foram centrifugados por 20 minutos, a 4°C e 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado protéico foi ressuspenso em ½ volume de NaOH 50 mM (USB).

O *pellet* celular foi ressuspenso em 120 µL de uma solução de TES-Lisozima. Foi adicionado também coquetel Inibidor de Protease (Sigma) e DTT (USB) 10 mM. Os microtubos foram incubados por 30 minutos a 37°C e, após esse

tempo 60 µL de SDS 20% foi adicionado à mistura. Ao final, as proteínas oriundas da fração celular e do sobrenadante das culturas foram estocadas a -20°C.

4.7.3 Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante

As proteínas extraídas de *L. lactis* (item 4.7.2) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE – “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”) de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *and* Russel (2001). Para isso foi utilizado gel de “separação” na concentração de 10% e gel de “empilhamento” na concentração de 4%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 100 V em tampão Tris- glicina (25 mM tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS). Foram aplicados 3µL do padrão *Page Ruler Protein Ladder* (Fermentas), 30 µl das amostras), e como controle positivo o,13µg/µL da 15 Lipoxigenase purificada (Novus Biologicals).

4.7.4. “Western Blotting”

Membranas de PVDF (Invitrogen) foram hidratadas com 100% de metanol durante 5 minutos. Posteriormente, a membrana juntamente com os géis e os papéis de filtro foram equilibrados na solução de transferência (40 mM glicina; 50 mM tris; 0,04% SDS; 20% metanol) durante 15 minutos. A transferência foi realizada no equipamento *The Panther™ Semidry Electroblotter* (Apogent) a 300 mA por 1 hora. Posteriormente, as membranas foram incubadas com soro de camundongo anti- lipoxigenase (1:100) (*Novus Biologicals*) durante 2 horas e em seguida foram reveladas utilizando o Kit *Western Breeze®Chromgenic Western Blot Immunodetection* (Invitrogen).

4.8. Avaliação do efeito terapêutico das linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da enzima 15-LOX-1 no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, em murinos utilizando Modelo DSS

4.8.1. Esquema experimental

Para verificar os efeitos terapêuticos das linhagens *L. lactis* pXyIT:CYT:15-lox-1 e *L. lactis* pXyIT:SEC:15-lox-1 foram usados camundongos C57/BL6 fêmeas (Melgar *et. al.*, 2007) com idades entre seis a oito semanas, previamente vermifugados, nos experimentos de colite induzida por DSS (dextran sulfato de sódio) na concentração de 2%. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Todos os procedimentos com estes animais foram realizadas seguindo as normas do comitê de ética desta instituição de pesquisa (CETEA/UFMG). A padronização de parâmetros foi realizada seguindo o modelo proposto por Kang *et. al.* (2006).

4.8.2 Tratamento da colite induzida por DSS

Camundongos C57BL/6 fêmeas com peso corpóreo entre 18 e 20 gramas, previamente vermifugados, foram pesados e divididos em oito grupos experimentais de maneira homogênea contendo 5 animais cada um. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: Grupo Água (controle negativo), animais que só receberam água durante os 21 dias de experimento; o Grupo DSS (controle da colite), que recebeu DSS por 7 dias, com intervalo de 4 dias bebendo água e depois foi administrado novamente mais 7 dias de DSS. Os grupos com as linhagens: *L. lactis* NCDO2118 (controle selvagem WT); *L. lactis* + pXyIT:CYT (controle do vetor); *L. lactis* + pXyIT:CYT:15-LOX-1 (Grupo cyt) *L. lactis* + pXyIT:SEC:15-LOX-1 (Grupo sec) *L. lactis* + pXyIT, plasmídeo fechado sem o gene de interesse (Grupo NUC), o grupo que foi tratado com meio de cultura M17 + xilose (Grupo Meio) receberam 7 dias de DSS, esperou-se dois dias em que os animais tomaram água para posteriormente receberem o meio contendo as linhagens descritas anteriormente. Esperou-se um dia em que os animais tomaram água e foi administrado mais 7 dias de DSS a 1,5%. Todos os animais receberam ração convencional. A dieta normocalórica consistiu de ração comercial para ratos (Nuvilab[®]). Esta ração corresponde a uma dieta normocalórica contendo por peso: 23,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais (Ferro 40 mg, zinco 60 mg, cobre 6 mg, , iodo 0,3 mg, manganês 40 mg, selênio 0,1 mg, cobalto 1 mg), totalizando 17,03kJ/g.

A colite foi induzida com dois ciclos de 7 dias com DSS a 1,5%, ofertado na mamadeira (5 mL por animal por dia), como única fonte líquida

A administração das diferentes linhagens bacterianas, *L. lactis* selvagem e *L. lactis* mutantes, foram feitas também administrada *ad libitum* durante todo o período de tratamento. As culturas bacterianas eram crescidas e induzidas (4.7.1) todos os dias, durante o período de tratamento (Figura 10).

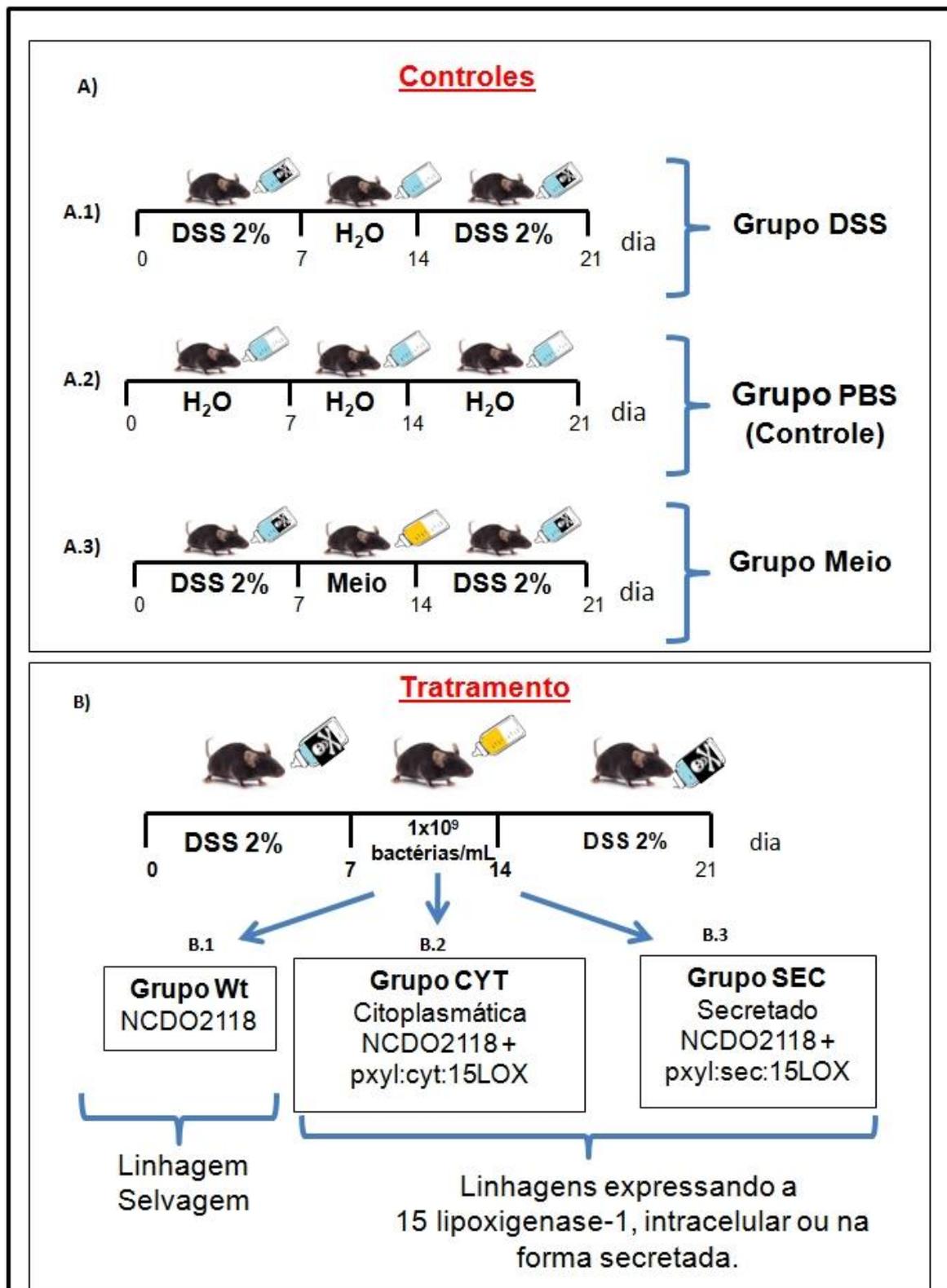


Figura 10: Grupos Experimentais: Grupos A representam os controles. A.1 Grupo DSS; A.2: Grupo Controle Negativo (recebeu água durante 21 dias); A.3: Grupo Meio; Grupos B representam os tratados com as linhagens selvagem e recombinantes de *L. lactis*. B.1 Grupo Wt *L. lactis* NCDO2118; B.2 Grupo *L. Lactis* p_{xyl}:cyt:15LOX; B.3 Grupo *L. Lactis* p_{xyl}:sec:15LOX.

Os animais foram sacrificados após finalização do experimento, para avaliação do efeito terapêutico das linhagens mutantes no tratamento da colite experimental. Para isso foram retirados cólon e fezes.

A avaliação do efeito terapêutico conferida pelo tratamento nos camundongos foi avaliada quando comparados os grupos não tratados com àqueles tratados com as linhagens recombinantes *L. lactis* pXyIT:CYT:15-lox-1 e *L. lactis* pXyIT:SEC:15-lox-1. Os animais foram observados diariamente quanto à presença ou ausência de sangue nas fezes, bem como o aspecto das fezes e perda de peso de cada camundongo para determinar o índice de atividade da doença.

Todos os grupos de animais foram pesados e as fezes foram coletas nos dias 0 e 21, estocado a -70°C até a dosagem de imunoglobulinas por ELISA. O cronograma de experimentação seguido neste trabalho está ilustrado na Figura 11.

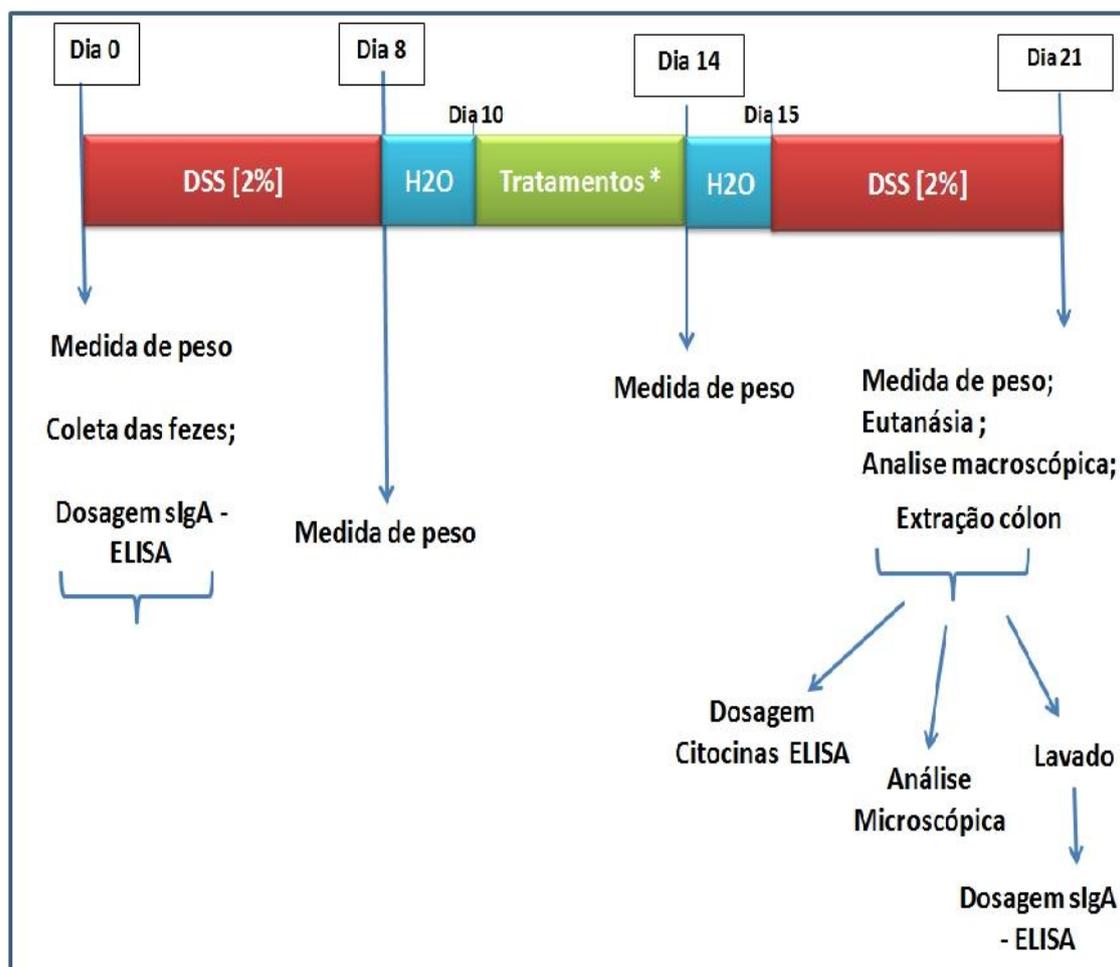


Figura 11: Representação do esquema experimental de administração com o DSS e do tratamento com as linhagens recombinantes de *L. lactis* para avaliação terapêutica.

4.8.3 Cinética de peso corpóreo dos animais tratados ou não com *L. lactis*

Uma vez que um dos efeitos da colite é a perda de peso (Ito *et. al.*, 2006), foi realizado uma cinética de peso corpóreo dos animais durante o experimento. Os animais foram pesados nos dias 0, 7, 14 e 21.

4.8.4. Análise macroscópica

Os parâmetros macroscópicos para avaliação da gravidade da colite induzida por DSS estão listados na Tabela 4. O índice macroscópico representa a soma de cada parâmetro ranqueado (% de perda de peso, diarréia e sangramento). O índice máximo possível é igual a 12 (Kang *et. al.*, 2006).

Tabela 4 - 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 |

4.8.5. Análise histológica

Amostras do cólon descendente de camundongos C57BL/6 de todos os grupos foram fixados em formalina e processados para análise histológica. Cortes corados com hematoxilina e eosina foram categorizados, 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 (Tabela 5). Os índices para cada característica foram somados com o índice máximo possível de 11.

Tabela 5 - 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 |

4.8.6. Preparação de extratos de tecidos

Amostras do intestino delgado, jejuno proximal, jejuno distal, íleo e cólon foram pesadas e homogeneizadas com 1mL de solução tampão (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. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.600 rpm durante 10 minutos a 4°C e mantidas a – 20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

4.8.7. Medida da produção de citocinas por ELISA

Os níveis de IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-17A foram determinados nos extratos dos tecidos por ELISA (Maron *et. al.*, 1999). Para tanto, anticorpos monoclonais anti-IL-6, anti-IL10, anti- IFN- γ ou anti-IL-17 murinos (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) foram distribuídos em placas de poliestireno (NUNC). Após 18 horas de incubação a 4°C, as mesmas foram lavadas com tampão de lavagem (salina contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueadas com tampão bloqueio (PBS acrescido de 0,5% de caseína). Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, os extratos dos tecidos foram adicionados, as placas incubadas overnight a 37°C e, após esse período, lavadas novamente com tampão de lavagem. Posteriormente, adicionou-se anticorpos monoclonais (*Pharmingen*) conjugados com biotina

específicos para as citocinas descritas acima. 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, adicionou-se citrato de sódio pH 4,5 acrescida de orto fenilenediamina (OPD) e H₂O₂ 30 volumes como substrato para revelação das placas. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N e a leitura foi realizada em leitor de ELISA automático a 492nm. A concentração de citocinas nas amostras foram determinada com base na confecção da curva padrão.

4.8.8. Determinação IgA secretória

Os títulos de anticorpos nas fezes foram medidos por ELISA. As placas de poliestireno (NUNC) 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 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com PBS-0,5% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween. 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-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.

4.9. Análises estatísticas

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.

Os resultados estatísticos obtidos para resposta imune celular e humoral foram à partir da análise dos dados de 10 animais independentemente e foram representados nos gráficos como média e erro padrão da média (SEM).

Os resultados foram primeiramente analisados pelo programa online GraphPad QuickCalcs Outlier Calculator para exclusão das leituras estatisticamente fora da média ($p < 0,05$). <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção de linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de 15-LOX-1.

5.1.1. Amplificação da ORF 15-*lox-1*

O primeiro passo deste trabalho de dissertação consistiu na amplificação, por PCR, da ORF 15-*LOX-1* a partir do DNA molde presente no plasmídeo pcDNA3:15-*LOX-1* (Figura 9).

Os pares de iniciadores utilizados (Tabela 3) foram desenhados de forma complementar à seqüência codificadora do gene 15-*LOX-1* depositada no NCBI (número de acesso no “GenBank” [M23892](#)). A presença de sítios artificiais de restrição (*Nsil* e *EcoRI*) e adaptadores nos mesmos, foram utilizados para que a ORF 15-*LOX-1* pudesse ser clonada de forma direcional e na fase de leitura correta nos vetores de expressão de *L. lactis*.

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima Accuprime™ Pfx DNA polimerase (Invitrogen); cuja atividade é altamente estável e de alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas de mutações (inserções, deleções, ou trocas) durante a incorporação de nucleotídeos.

Dessa forma, foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1989 pb, assim como esperado para a ORF 15-*lox-1*. Os fragmentos amplificados, quando visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentaram forte intensidade, demonstrando uma alta eficiência de amplificação (Figura 12). Além disso, não foi observada a presença de produtos inespecíficos de amplificação. Como controle negativo das reações, foram utilizados os três iniciadores (iniciador “*forward*” da forma citoplasmática, iniciador “*forward*” da forma secretada e iniciador “*reverse*” comum a ambas as formas), e água milliQ estéril ao invés do plasmídeo pcDNA3: 15-*LOX-1*. Como esperado, o controle negativo não apresentou nenhum sinal de amplificação (Figura 12).

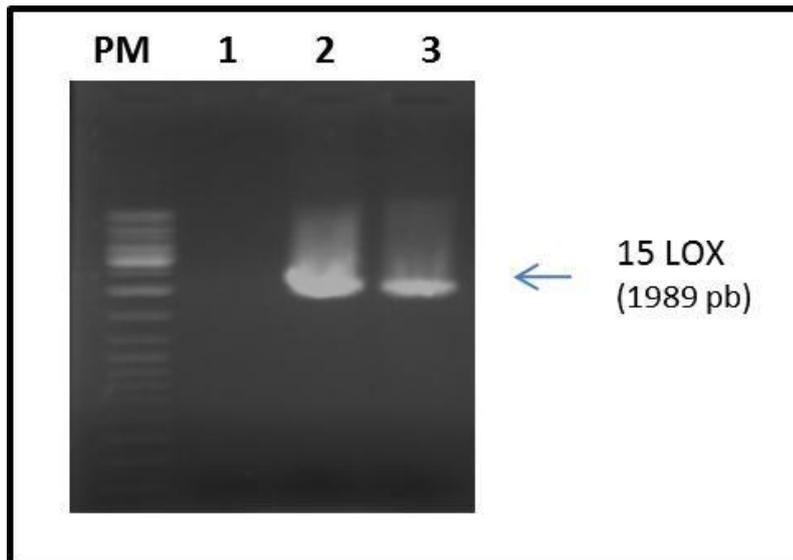


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de amplificações por PCR da ORF 15-LOX-1 humana a partir do plasmídeo pcDNA3. PM: Padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. Canaleta 1: Controle negativo da reação. Canaletas 2 e 3: Produtos de amplificação da ORF 15-*lox-1* utilizando os iniciadores “forward” e “reverse”.

5.1.2. Clonagem da ORF 15-*lox-1*, no sistema TOPO

Os dois fragmentos amplificados, correspondentes às sequências codificadoras da forma citoplasmática e secretada de 15-LOX-1, foram clonados no vetor pCR®-Blunt II-TOPO®, gerando assim os plasmídeos intermediários denominados pTP:c15-LOX-1, (citoplasmático e pTP:s15-LOX-1, (A geração desses “plasmídeos intermediários” é importante, visto que a digestão enzimática destes plasmídeos liberará inserto com extremidades coesivas que permitirão com que os mesmos sejam clonados de forma direcional e em fase de leitura correta nos vetores de expressão de *L. lactis*.

Estes plasmídeos foram então utilizados para transformar células de *E. coli* TG1 eletrocompetentes. A seleção de colônias de *E. coli* recombinantes foi realizada em meio LB ágar contendo Ampicilina. Aproximadamente 24 horas após a transformação, foi possível a visualização de inúmeras colônias recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Cinco colônias transformadas com cada construção (citoplasmática ou secretada) foram escolhidas aleatoriamente, inoculadas em meio seletivo líquido e incubadas à 37° C por 18 horas. Essas culturas foram então utilizadas para fazer

uma cultura estoque, em glicerol, de cada possível clone e para a realização da extração dos plasmídeos recombinantes.

5.1.3. Confirmação da clonagem da ORF 15-LOX-1 no sistema TOPO através da técnica de PCR e digestão enzimática

Os plasmídeos extraídos de cada colônia foram utilizados em reações de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF 15-LOX-1. Todos os clones obtidos foram confirmados como sendo portadores da ORFs 15-LOX-1 (1989 pb), denominados ORFs c15-LOX-1 e s15-LOX-1, citoplasmático e secretado, respectivamente. A Figura 13 mostra os produtos de amplificação dos insertos citoplasmático e secretado, respectivamente provenientes de dois clones escolhidos aleatoriamente. Subsequentemente, estes dois clones receberam a denominação de pTP:c15-lox-1 e pTP:s15-LOX-1. O controle negativo da reação, no qual foram utilizados os três iniciadores já descritos e água milliQ estéril, não demonstrou qualquer sinal de amplificação.

Após a confirmação da presença dos insertos nos vetores através da técnica de PCR, os DNAs plasmídeos extraídos dos clones pTP:c15-lox-1 e pTP:s15-lox-1 foram então submetidos a uma reação de digestão enzimática com as enzimas Nsil e EcoRI o que confirmou os dados anteriores e permitiu purificar os fragmentos correspondentes aos insertos 15-LOX-1 citoplasmático (c15-LOX-1) e 15-LOX-1 secretado (s15-LOX-1) para serem subclonados nos vetores de expressão de *L. lactis* (Figura 14).

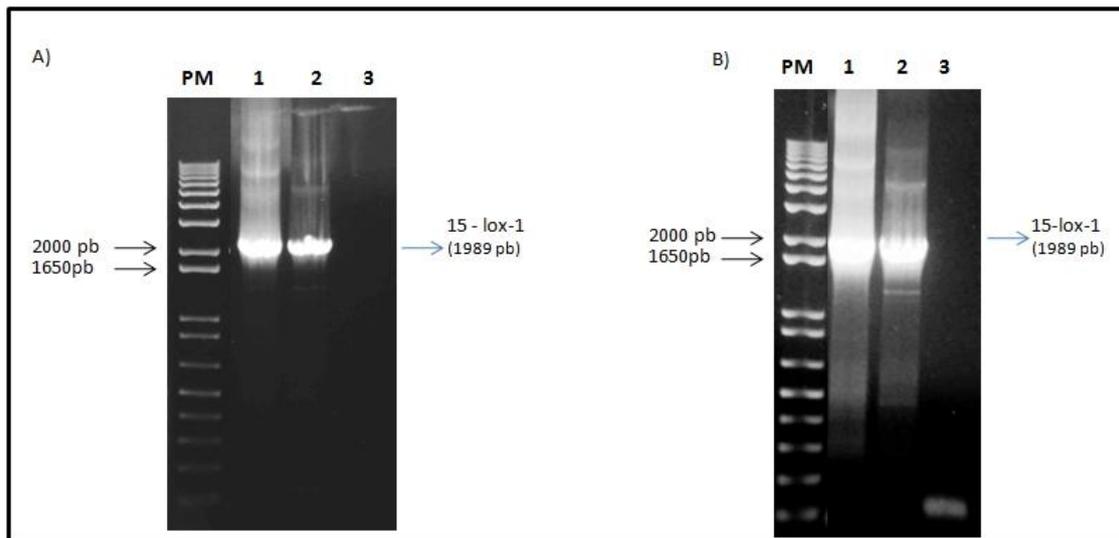


Figura 13: (A): Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de ampliações por PCR da ORF 15-LOX-1 humana clonada no vetor PCRII-TOPO. A) PM: 1 Kb Plus DNA Ladder. Canaleta 1: inserto 15-lox-1 amplificado a partir do plasmídeo pTP:c15/ox1. Canaleta 2: pCDNA3: 15-LOX. Canaleta 3: controle negativo da reação.. (B): PM: 1 Kb Plus DNA Ladder .Canaleta 1 : inserto 15-lox-1 amplificado a partir do plasmídeo pTP:s15/ox1.- Canaleta 2: pCDNA3: 15-LOX. Canaleta 3: controle negativo da reação.

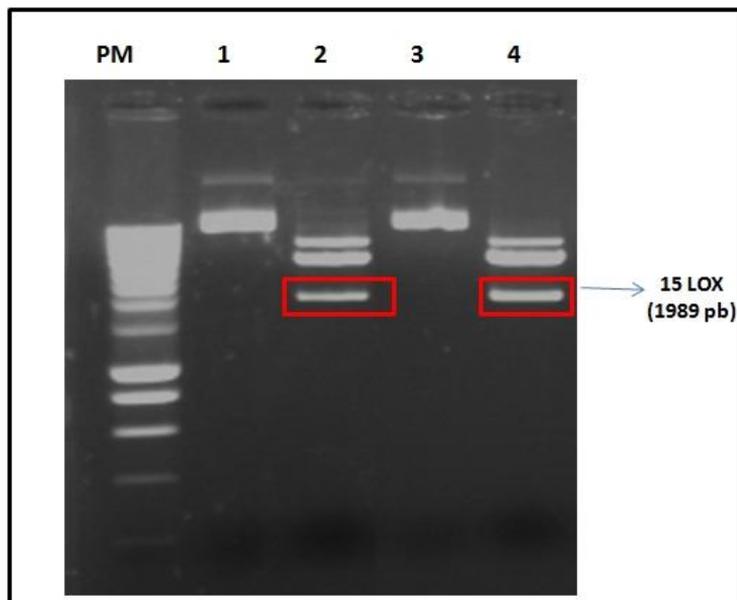


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de digestões com enzimas de restrição Nsil e EcoRI para liberação da ORF15-lox-1 humana clonada no vetor PCRII-TOPO. PM: Peso Molecular ;Canaletas 1 e 2 = clone 1 (DNA não digerido e digerido); Canaletas 3 e 4= clone 2 (DNA não digerido e digerido) respectivamente.

5.1.4. Clonagem da ORF 15-LOX-1 no sistema de expressão XIES (*Xylose-Inducible- Expression-System*)

A escolha pelo sistema de expressão XIES baseou-se em algumas características vantajosas, apresentadas por este, em relação a outros sistemas de expressão já desenvolvidos para *L. lactis*. Esse sistema permite endereçar corretamente proteínas heterólogas tanto para o citoplasma quanto para o meio extracelular, e é menos dispendioso e mais seguro para o uso humano e animal, visto que o mesmo é induzido por um açúcar.

Paralelamente à digestão enzimática dos clones pTP:c15-lox-1 e pTP:s15-lox-1 e a purificação dos fragmentos correspondentes aos insertos 15-LOX-1 citoplasmático e 15-LOX-1 secretado, os vetores de expressão pXyIT:CYT:nuc (citoplasmático) e pXyIT:SEC:nuc (secretado) (Tabela 2) foram também digeridos com as enzimas NsiI e EcoRI para liberação da ORF nuc e posterior purificação dos fragmentos pXyIT:CYT e pXyIT:SEC. Os fragmentos purificados (vetores e insertos) foram então submetidos a uma reação de ligação.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol. A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 48 horas após a transformação. Foram isoladas sete colônias transformadas com o plasmídeo pXyIT:CYT:15-lox-1 e 10 com o plasmídeo pXyIT:sec:15 LOX1. Todas as colônias foram inoculadas em meio líquido seletivo incubadas à 30⁰C por aproximadamente 24 horas. Essas culturas foram então utilizadas para fazer uma cultura estoque em glicerol de cada possível clone e para a realização da extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

5.1.5. Confirmação da clonagem da ORF 15-LOX-1 nos vetores de expressão XIES de *L. lactis* através da técnica de PCR e digestão enzimática

Os plasmídeos extraídos de cada colônia foram utilizados em reações de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF 15-LOX-1. Todos os clones obtidos foram confirmados como sendo portadores das ORFs c15-LOX-1 e s15-LOX-1. A Figura 15 mostra os produtos de amplificação dos insertos citoplasmático

e secretado, respectivamente, provenientes de dois clones escolhidos aleatoriamente. O controle negativo da reação, no qual foram utilizados os três iniciadores já descritos e água milliQ estéril, não demonstrou qualquer sinal de amplificação.

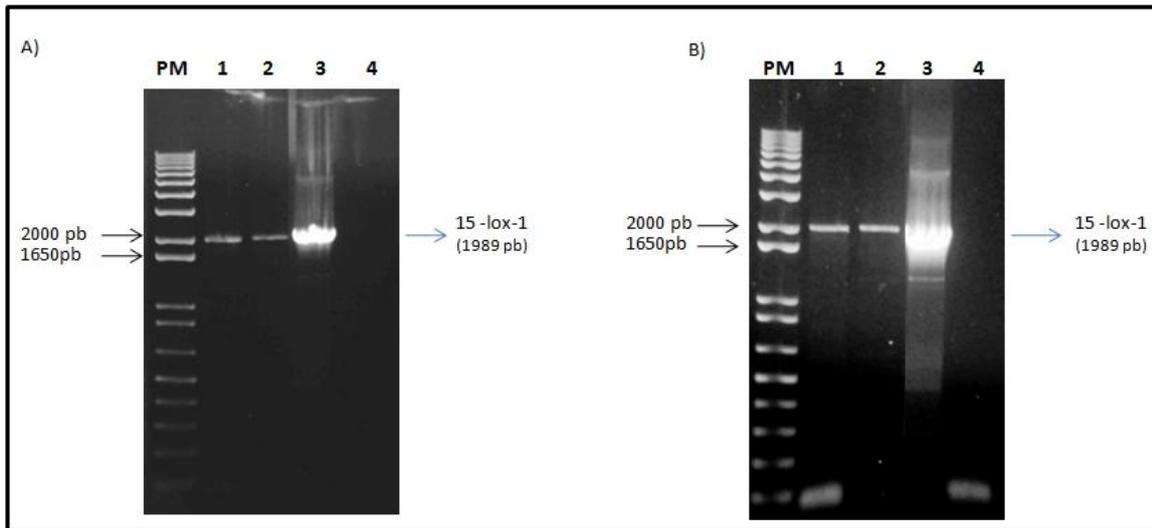


Figura 15 : Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de amplificações de PCR da ORF 15-lox-1 humana clonada nos vetores XIES. A) *pXylT:CYT:15-lox-1*. PM: Padrão de Peso Molecular . Canaletas 1 e 2: insertos 15-LOX -1 amplificado a partir do plasmídeo *pXylT:CYT:15-lox-1*, clones 1 e 2, respectivamente. Canaleta 3: pCDNA3: 15-LOX. Canaleta 4: controle negativo da reação. B) *pXylT:SEC:15lox-1*:Canaletas 1 e 2 inserto 15-LOX amplificado a partir do plasmídeo *pXylT:SEC:15lox-1*; clones 1 e 2, respectivamente. Canaleta 3: pCDNA3: 15-LOX. Canaleta 4: controle negativo da reação.

A Figura 16 mostra a reação de digestão enzimática utilizando as enzimas *NsiI* e *EcoRI* desses mesmos clones, confirmando assim a presença dos insertos nos plasmídeos *pXylT:CYT: 15-LOX-1* e *pXylT:SEC: 15-LOX-1*

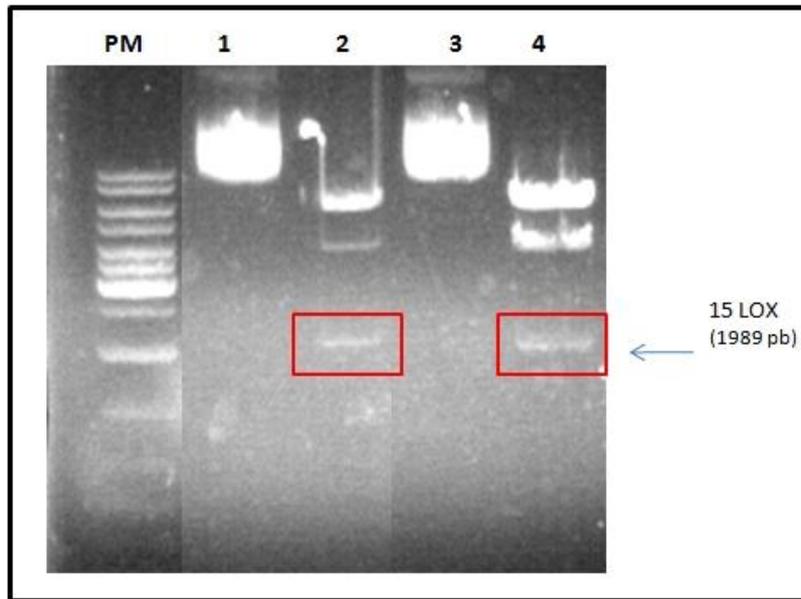


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio de digestões com enzimas de restrição NsiI e EcoRI para liberação da ORF15-lox-1 humana clonada nos vetores *XIES*. PM: Padrão de Peso Molecular. Canaleta 1: Plasmídeo pXylT:sec:15-LOX-1 não digerido, clone 1. Canaleta 2: produto da reação de digestão do plasmídeo pXylT:sec:15-LOX-1, clone1. Canaleta 3: Plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1 não digerido, clone 2. Canaleta 4: produto da reação de digestão do plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1,clone2.

5.1.6. Confirmação da integridade da seqüência nucleotídica da ORF 15-LOX-1 clonada nos vetores de expressão de *L. lactis* através da técnica de sequenciamento e análises *in silico*.

Os plasmídeos pXylT:CYT: 15-LOX-1 e pXylT:SEC: 15-LOX-1 foram extraídos dos clones de *E. coli* previamente confirmados por PCR e por digestão enzimática, e foram então submetidos a reações de sequenciamento de DNA.

A seqüência nucleotídica obtida através do sequenciamento do plasmídeo pXylT:CYT: 15-LOX-1 e pXylT:SEC: 15-LOX-1 permitiu confirmar que o inserto corresponde à seqüência codificadora do gene *15-LOX-1* humana e também encontra-se clonado em fase de leitura correta com o peptídeo sinal (PS) da proteína Usp45 de *L. lactis*, ou com sítio de ligação ao ribossomo (RBS) respectivamente (Figura 17 e Figura 18).



Figura 17: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1. Em amarelo, as regiões -35, -10 e cre box pertencentes ao promotor P_{xylT}. O cre box é um sítio de ligação para a proteína CcpA. RBS, em azul, corresponde ao sítio de ligação ao ribossomo da proteína Usp45 de *L. lactis*. Em verde, a seqüência correspondente ao inserto 15-lox-1 clonado no vetor.

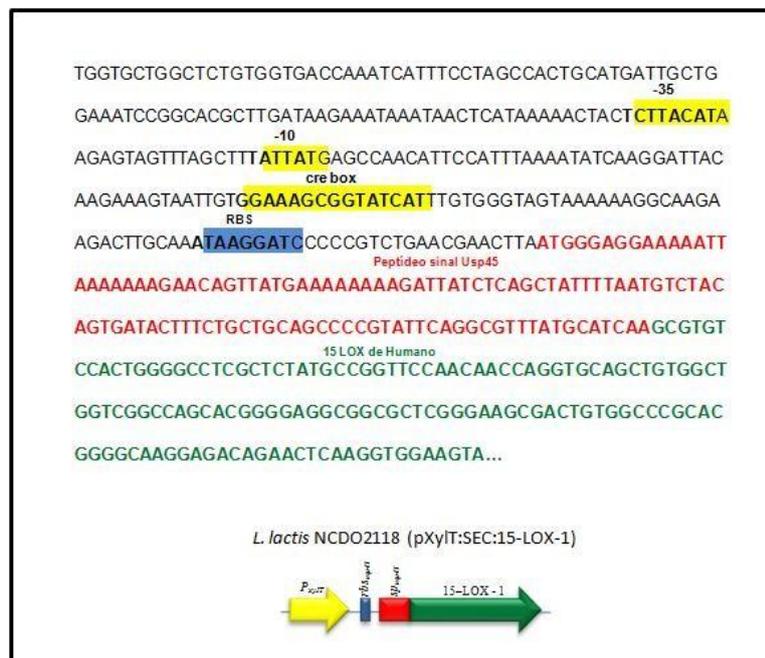


Figura 18: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do plasmídeo pXylT:SEC:15-lox-1. Em amarelo, as regiões -35, -10 e cre box pertencentes ao promotor P_{xylT}. O RBS, destacado em azul, e o peptídeo sinal, em vermelho, da proteína Usp45 de *L. lactis*. Em verde, a seqüência correspondente ao inserto 15-lox-1 clonado no veto.

5.1.7. Transformação de *L. lactis* NCDO2118 com os plasmídeos pXyIT:CYT:15-LOX-1; XyIT:SEC:lox-1

De todos os clones de *E. coli* transformados com os plasmídeos pXyIT:CYT:15-*lox-1* e pXyIT:SEC:15-*lox-1* e previamente confirmados por PCR, digestão enzimática e sequenciamento, dois plasmídeos de cada clone foram escolhidos aleatoriamente para prosseguir com os processos de transformação de *L. lactis*.

Estes clones foram inoculados em meio líquido seletivo e incubados à 37°C por aproximadamente 24 horas. O DNA plasmideano de cada clone foi então extraído e usado para transformar células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118.

A seleção de colônias recombinantes foi feita em meio M17Gluc-Sac suplementado com 10µg/mL de cloranfenicol. Foram recuperadas quatro e três colônias referentes à transformação com os plasmídeos pXyIT:CYT:15-*lox-1* e pXyIT:SEC:15-*lox-1*, respectivamente. Estas foram inoculadas em meio líquido seletivo e as culturas de cada possível clone foram congeladas e submetidas aos processos de extração do DNA plasmideano.

Os plasmídeos extraídos de cada colônia foram utilizados em uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos do gene 15-LOX-1. Foram confirmados um clone portador do plasmídeo pXyIT:CYT:15-*lox-1* e dois do plasmídeo pXyIT:SEC:15-*lox-1*. Os clones confirmados por PCR foram denominados de pCYT:15-*lox-1* e pSEC:15-*lox-1* (clones 1,2,3) (Figura 19).

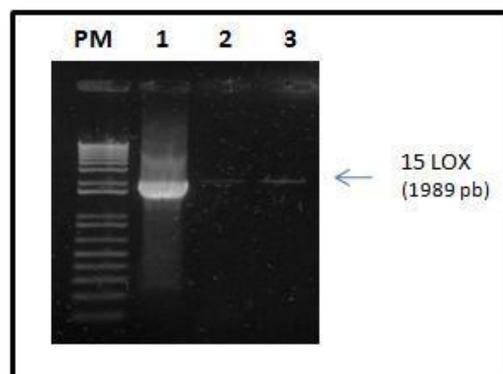


Figura 19 Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio de amplificação por PCR da ORF 15-LOX-1 humana a partir do DNA plasmideano extraído de células de *L. lactis* transformadas com os plasmídeos pXyIT:CYT:15-*lox-1* e pXyIT:SEC:15-*lox-1*. PM: padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 1: inserto 15-*lox-1* amplificado a partir do clone pCYT:15-*lox-1* (clone 1). Canaletas 2 e 3: inserto 15-*lox-1* amplificado a partir do clone pSEC:15-*lox-1*

O baixo número de clones de *L. lactis* recuperados após os procedimentos de transformação refletem a baixa eficiência de transformação já relatada para este microrganismo. Assim como em outras bactérias Gram-positivas, a transformação de células de *L. lactis* é dificultada devido à rígida camada de peptidoglicano presente na parede celular, a qual age como uma barreira física dificultando a entrada de DNA na célula (Beveridge 1981). A eficiência de transformação de *L. lactis* através da eletroporação varia substancialmente com a linhagem e o método de transformação utilizado. Já foram relatadas taxas de eficiência variando entre 10^2 e 10^8 UFC/ μ g de DNA (Luchansky *et al.*, 1988; Gerber & Solioz, 2007).

5.1.8. Análise da expressão da r15LOX produzida em *L. lactis*

Dentre os clones de *L. lactis* transformados com os plasmídeos pXylT:CYT:15-lox-1 e pXylT:sec:15-lox-1, um de cada foi escolhido para as análises de expressão da r15-LOX-1. Estes foram então submetidos ao processo de indução gênica da proteína recombinante. Quando as culturas atingiram uma densidade óptica (DO600nm) em torno de 1.5 (aproximadamente 16 horas após a indução com xilose), estas foram submetidas ao processo de extração proteica. Como controle negativo, foram realizadas extrações proteicas de culturas não induzidas. O controle negativo da indução consistiu em adicionar glicose ao meio de cultura, uma vez que a indução da expressão de proteínas pelo promotor PxyIT é completamente reprimida na presença desse açúcar (Miyoshi *et al.*, 2004).

5.1.9. SDS-PAGE / Western Blotting

Em um experimento piloto através de análises por SDS-PAGE, utilizando Comassie Blue para a visualização das proteínas no gel, um fragmento proteico apresentando o peso molecular esperado de aproximadamente 74,6 Kda foi visualizado na amostra originada da cultura induzida do clone de *L. lactis* pXylT:sec:15 LOX 1:, enquanto que a amostra originada da cultura não induzida não apresentou tal fragmento. Esses resultados demonstram que *L. lactis* foi capaz de produzir eficientemente o antígeno recombinante na forma citoplasmática. Na forma secretada, não foi possível visualizar a proteína na porção solúvel, apenas no pellet da extração da cultura (Figura 20). Um grande número de proteínas heterólogas produzidas em linhagens selvagens de *L. lactis* são degradadas pela principal

protease extracitoplasmática, a HtrA (Poquet *et al.*, 2000).

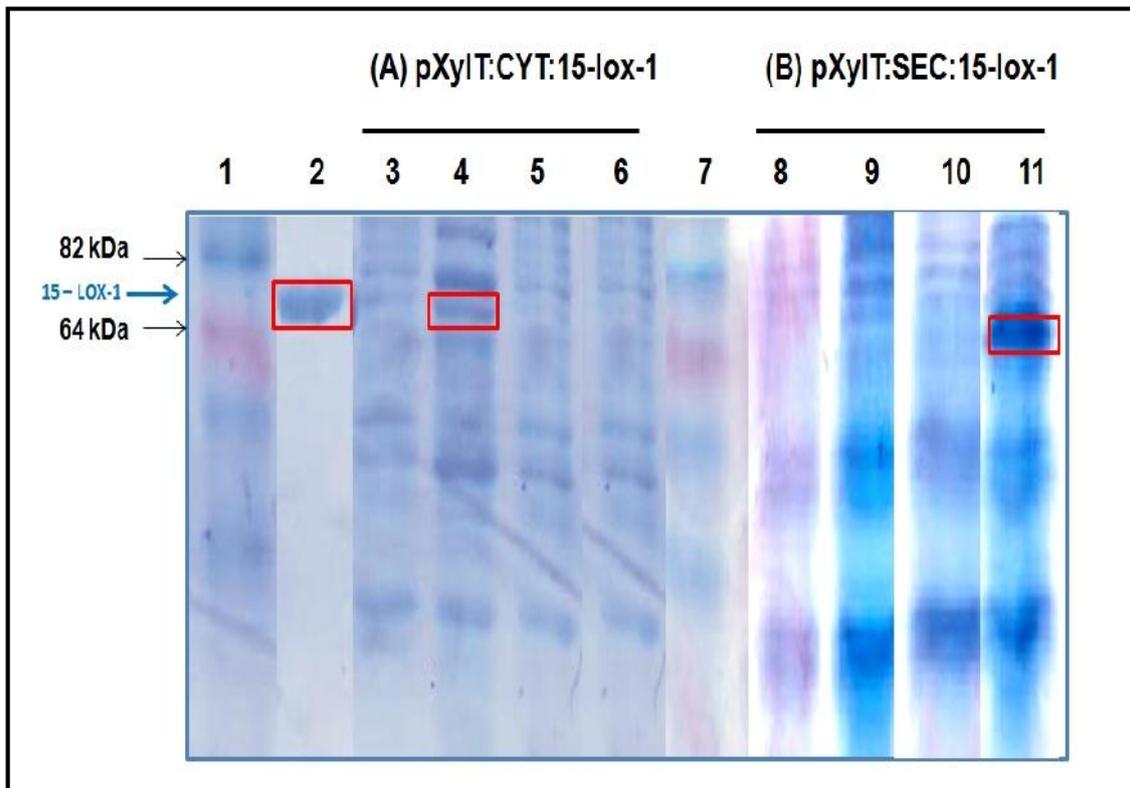


Figura 20: SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes das culturas induzidas e não induzidas dos clones de *L. lactis*. Canaleta 1: Padrão de Peso Molecular. Canaleta 2: Controle: Proteína 15-LOX-1 purificada comercial. (A) pCYT:15-LOX-1. Canaleta 3: Fração celular da cultura não induzida. Canaleta 4: Fração celular da cultura induzida. Canaleta 5: Sobrenadante da cultura não induzida. Canaleta 6: Sobrenadante da cultura induzida. 7: Padrão de Peso Molecular B) pSEC:15-LOX-1. Canaleta 8: Sobrenadante da cultura não induzida. Canaleta 9: Sobrenadante da cultura induzida. Canaleta 10: Fração celular da cultura não induzida. Canaleta 11: Fração celular da cultura induzida. Gel corado com Comassie Blue.

As análises de imunodeteção da r15-LOX-1 produzida pelos clones *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT:15-lox-1) e *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:SEC:15-lox-1) confirmaram a capacidade de produção da proteína recombinante por *L. lactis*. (Figura 20). Novamente, observou-se que a r15-LOX-1 produzida pelo clone (pXylT:cyt:15-LOX-1) ficou retida dentro da célula, como visualizado nos experimentos de SDS-PAGE. Na verdade, o vetor de expressão (pXylT:CYT:15-lox-1) não possui peptídeo sinal para a exportação da proteína logo esse resultado foi esperado. Nenhum sinal do antígeno recombinante foi detectado nos extratos das culturas não induzidas (Figura 20).

As análises de expressão do antígeno por *Western Blot* do pXylT:sec:15-lox-1 não demonstraram eficiência na secreção (isto é, a razão entre a quantidade de

proteína observada no meio extracelular e no conteúdo intracelular) pois a mesma não foi detectada. Verificou-se que a proteína recombinante estava presente no extrato celular, mas não no sobrenadante da cultura (Figura 21). O fragmento protéico observado na fração insolúvel corresponde ao precursor da proteína (PSUsp45:15-LOX-1) que provavelmente permaneceu associado ao envelope celular.

Em LAB, como em outras bactérias Gram-positivas, as proteínas secretadas são sintetizadas como um precursor contendo uma extensão N-terminal chamado de peptídeo de sinal e a porção madura da proteína. Precursores são reconhecidos pela maquinaria de secreção do hospedeiro e translocado através da membrana citoplasmática (etapas iniciais). O peptídeo de sinal é então clivado e degradado, e a proteína madura é libertada no sobrenadante da cultura (etapas tardias) (Le Loir *et al.*, 2005). Esse fato já foi observado anteriormente em trabalho descrito com linhagens recombinantes de *L. lactis* produtora da proteína GroEL na forma secretada, onde também a proteína na sua forma precursora foi produzida, mas não foi secretada (Pontes,2003).

A maioria dos trabalhos sobre expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis*, geralmente relatam uma produção eficiente em apenas uma localização celular (citoplasmática, extracelular ou ancorada). Na verdade, há poucos relatos sobre proteínas que foram produzidas com sucesso em diferentes localizações celulares de *L. lactis* utilizando as mesmas condições de indução e o mesmo promotor (Le Loir *et al.*, 2005).

Este trabalho demonstrou que a r15-LOX-1 foi produzida eficientemente na fração citoplasmática. Na linhagem carreando o vetor pXyIT:SEC:15-lox-1 não houve o correto endereçamento da proteína. Porém, apesar da proteína recombinante aparentemente não ter sido eficientemente secretada, ambas as linhagens foram utilizadas nos experimentos *in vivo* descritos nas seções subseqüentes deste manuscrito.

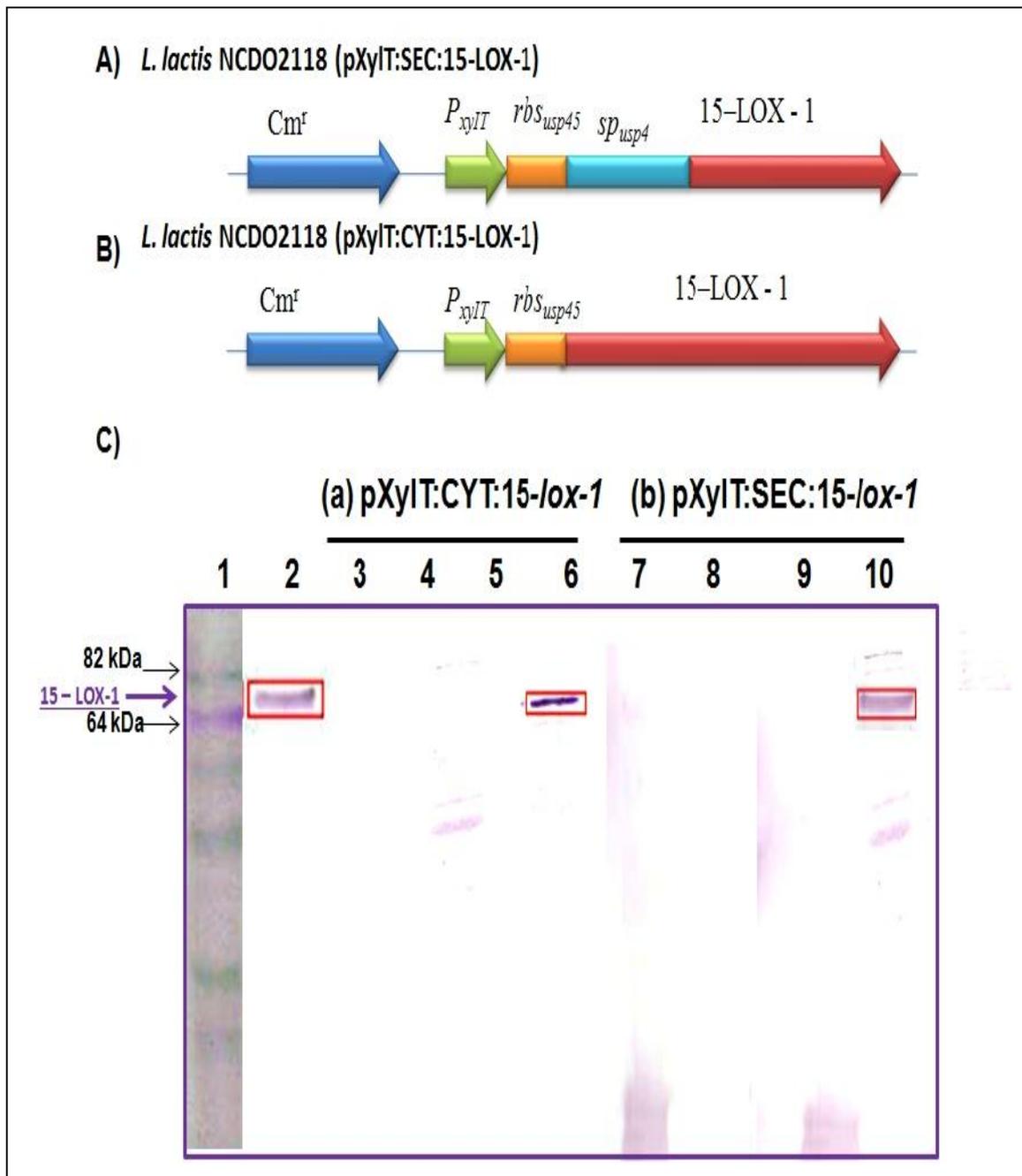


Figura 21: Imunodetecção da r15-LOX-1 das culturas induzidas e não induzidas dos clones de *L. lactis*. (A) e (B) Representação esquemática do vetor de expressão XIES para a produção de r15-LOX-1 intracelular e secretada, respectivamente. P_{xylT}: Promotor induzido por xilose. rbs_{Usp45}: Sítio de ligação do ribossomo da sequência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. sp_{Usp45}: Peptídeo sinal da proteína Usp45. 15-LOX-1: ORF de 15-LOX-1 humana. Cm^r: Gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. (C) (a) pCYT:15-LOX-1. Canaleta 3: Sobrenadante da cultura não induzida. Canaleta 4: Sobrenadante da cultura induzida. Canaleta 5: Fração celular da cultura não induzida. Canaleta 6: Fração celular da cultura induzida. (b) pSEC:15-LOX-1. Canaleta 7: Sobrenadante da cultura não induzida. Canaleta 8: Sobrenadante da cultura induzida. Canaleta 9: Fração celular da cultura não induzida. Canaleta 10: Fração celular da cultura induzida. O retângulo em vermelho destaca o fragmento protéico referente à r15-LOX-1.

5.2. Experimentos *in vivo*

5.2.1. Análises macroscópicas da colite inflamatória experimental induzida por DSS.

DSS é um modelo de inflamação da mucosa animal bem estabelecido que tem sido utilizado por mais de duas décadas no estudo da patogenia das IBDs. A administração de DSS na água potável induz uma inflamação aguda no intestino com sintomas e um perfil inflamatório que se assemelham aos de IBD humana, especialmente UC. Como tal, essa indução, reproduz os sinais da colite, refletindo seus aspectos importantes como: diarreia, sangramento retal, perda de peso e encurtamento do cólon (Okayasu, *et al*,1990). Camundongos C57BL / 6 machos foram usados para o estudo DSS porque estes animais são altamente susceptíveis a colite induzida por DSS e não recuperam naturalmente desta doença (Melgar S., *et.al.*, 2007).

Com o objetivo de analisar os efeitos antiinflamatórios no tratamento de camundongos com UC induzida por DSS, utilizamos a linhagem selvagem e a linhagem recombinante de *Lactococcus lactis* produtora da 15-LOX-1 na forma citoplasmática e secretada em comparação com camundongos que não receberam tratamento (Figura 22A)

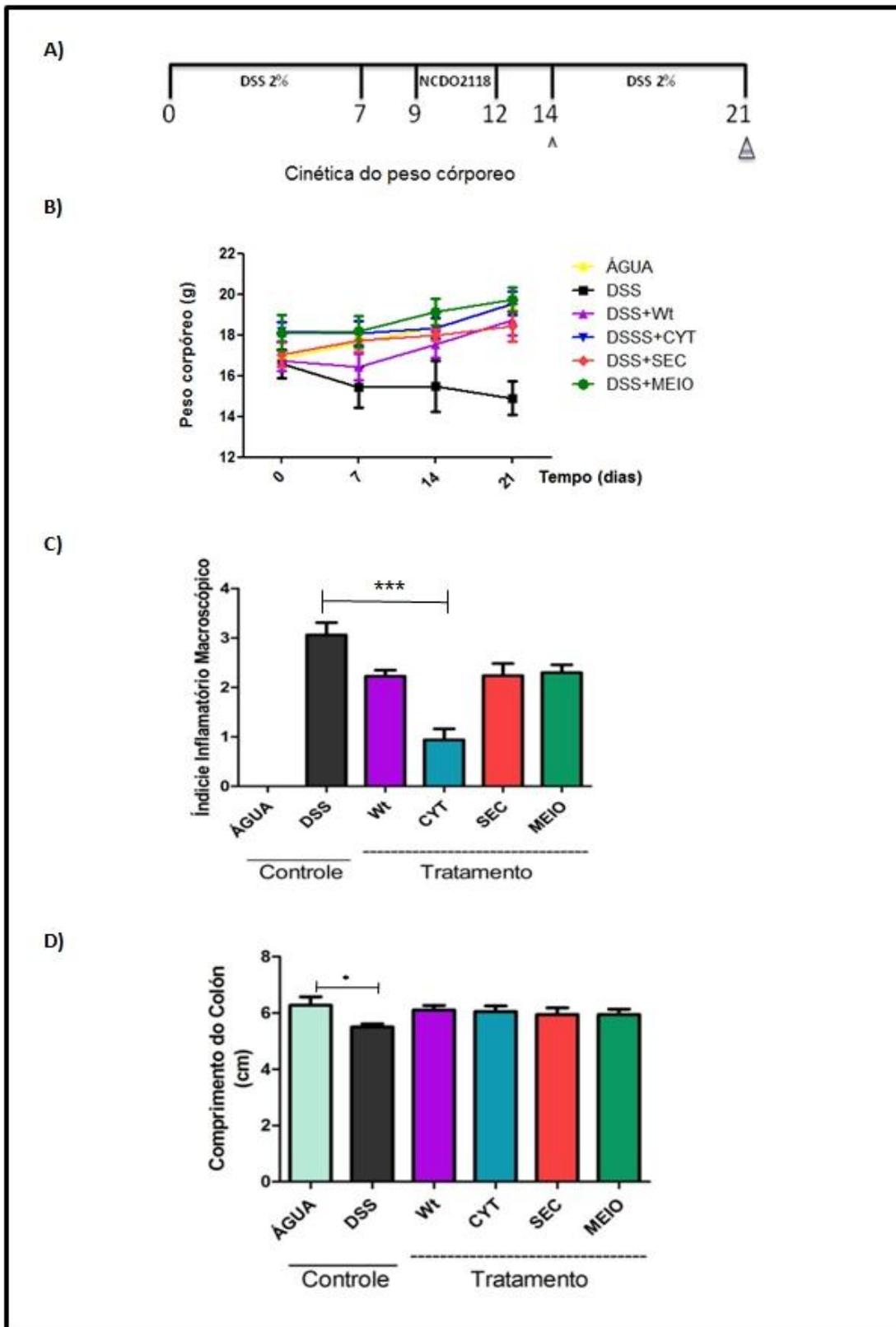


Figura 22: Efeitos macroscópicos da administração oral de *L. lactis* NCDO 2118 selvagem e recombinante em modelo de colite induzido por DSS (A) Esquema experimental. (B) Peso corpóreo (% de ganho ou de perda de peso); (C) DAI: Índice Atividade da doença. (D) Comprimento Colón. As barras representam a média de dois experimentos/10 camundongos.

O escore macroscópico foi realizado pelo ranqueamento da perda de peso corpóreo (Figura 22B) diarréia (leve, moderada e intensa) e sangramento retal (ausente sangramento oculto ou visível). Observou-se que tanto a linhagem selvagem quanto a linhagem recombinante carreando o plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1 foram capazes de diminuir a inflamação no modelo de camundongo, de colite induzida por DSS. Em geral, esses grupos mostraram um DAI mais baixo (Figura 22C) e, portanto, uma redução significativa da inflamação, quando comparado com o grupo de controle positivo da colite (Grupo DSS). O tratamento com a linhagem citoplásmica expressando a 15-lipoxigenase apresentou uma redução do score macroscópico da atividade inflamatória da doença mais significativa do que a linhagem selvagem (Figura 22 C). Em relação ao grupo tratado com a linhagem pXyl:sec:15-LOX-1 não observamos melhora nos parâmetros macroscópicos analisados.

O comprimento do cólon de cada animal foi medido desde o ceco até a porção terminal. Uma redução em seu comprimento é um indicativo de inflamação e dano da camada muscular (Okayasu, *et al*,1990). Como esperado, houve uma redução significativa do cólon induzida com DSS, no Grupo controle positivo (Grupo DSS), em comparação com o Grupo controle negativo (Grupo Água). Porém os grupos tratados com as linhagens tanto selvagens, quanto as recombinantes não apresentaram uma melhoria significativa no comprimento do cólon, quando comparado com o grupo induzidos com DSS (Figura 22 D).

Foi medido também o tamanho do animal (da cabeça até a cauda) para comparar com o tamanho do cólon do mesmo animal, com o objetivo de averiguar se a diferença no encurtamento do cólon seria devido a colite ou se era apenas proporcional ao tamanho do animal. Constatamos apenas encurtamento do cólon no grupo controle da colite (Grupo DSS) decorrente exclusivamente dos sintomas da própria doença.

5.2.2. Análise microscópica da colite inflamatória experimental induzida por DSS.

O tecido do cólon foi processado e corado com H&E. e depois foram avaliadas lâminas histológicas de cólon de animais submetidos a indução de colite por DSS com diversos tratamentos.

Histologicamente, todas as amostras do cólon de camundongos saudáveis, (Grupo ÁGUA) apresentaram-se na maioria das amostras, quadro

histológico dentro dos padrões de normalidade, ou seja, com camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa íntegras. A camada mucosa de todas amostras apresentou-se com células caliciformes e ausência de abscessos nas criptas (Figura 23A).

Por outro lado, o grupo controle da colite (Grupo DSS) apresentou áreas com infiltrado inflamatório mais intenso, erosão da camada epitelial e ausência de células caliciformes. Esse quadro culminou em perda da arquitetura da mucosa nessas áreas. O mesmo padrão de lesão foi encontrado nas amostras dos grupos DSS MEIO e DSS NUC (grupos controle) (Figura 23B).

Os grupos selvagem (Wt) e os grupos das linhagens recombinantes (e pXylT:sec:15 LOX1(Figura 23C) pXylT:CYT:15-lox-1 (Figura 23D) apresentaram lesões mais reduzidas tanto com relação à extensão das áreas acometidas como com relação à intensidade da lesão das mesmas. Para uma avaliação semiquantitativa, considerou-se como grau 0, quando os aspectos morfológicos foram considerados dentro dos padrões de normalidade, seguido por grau 1 (lesões leves), grau 2 (lesões moderadas) e grau 3 (lesões graves). (Figura 23 A a 23 D).

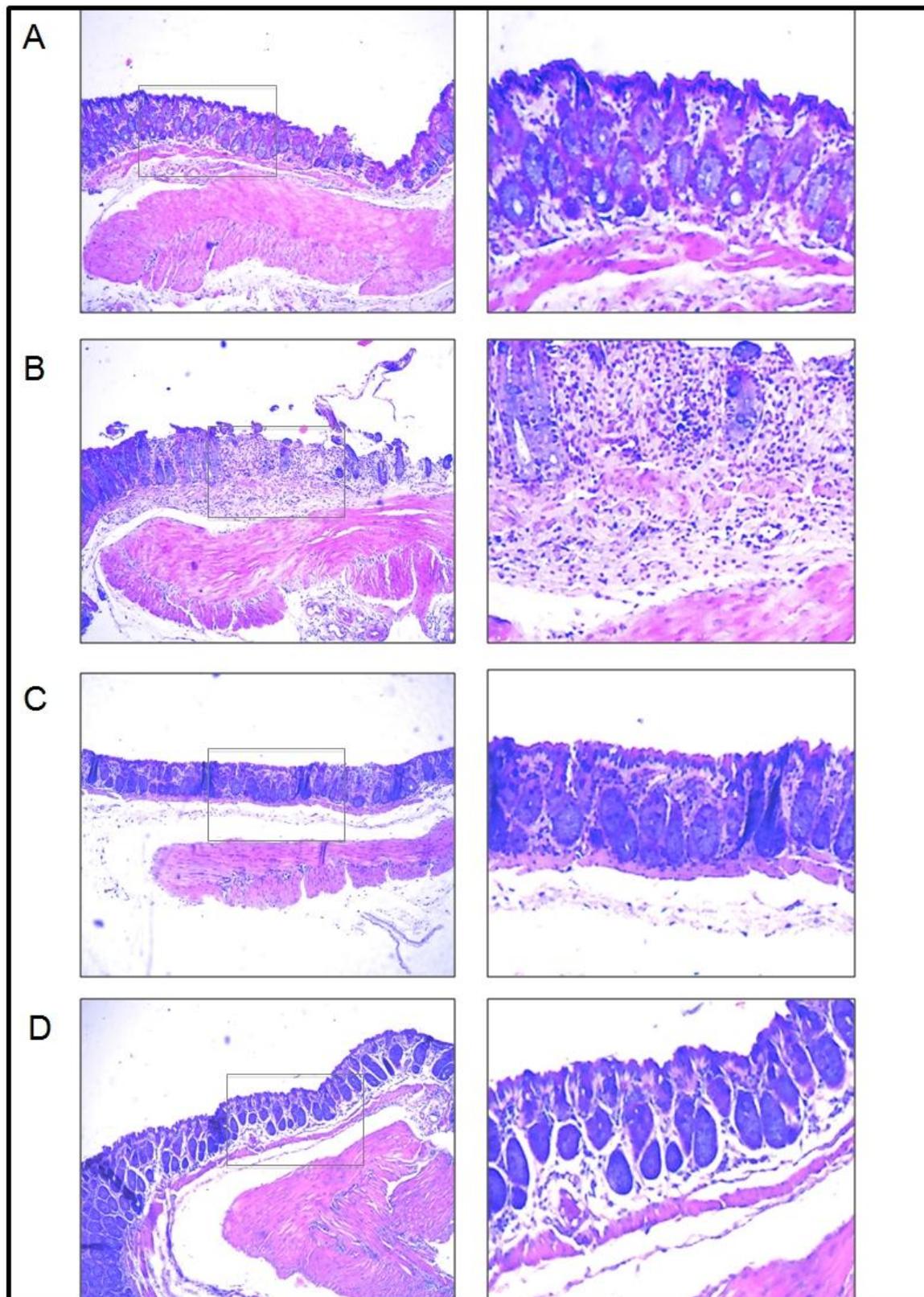


Figura 23: Histopatologia representativa (Fotografia (X400) de parafina em HE) de alterações intestinais do cólon de camundongos sem e com a administração oral de *L. lactis* selvagens e mutantes. (A) ÁGUA (B) DSS C) DSS + NCDO2118 *pXylT:sec:15 lox-1* (D) DSS + NCDO2118+*pXylT:CYT:15-lox-1*

A pontuação do índice microscópico inflamatório de colite experimental induzida por DSS foi calculado a partir da histopatologia representativa de alterações intestinais do cólon de camundongos sem e com a administração oral de *L. lactis* selvagens e mutantes, de acordo os parâmetros microscópicos listados na Tabela 4, sendo que Os camundongos tratados com *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT:15-lox-1), no modelo de colite induzido por DSS, apresentaram melhoras estatisticamente significativas no escore microscópico de inflamação (Figura 24).

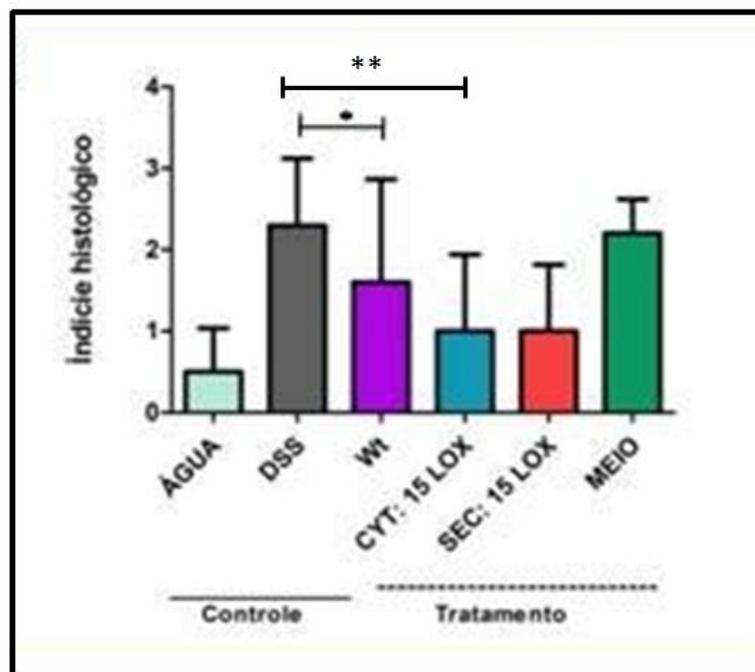


Figura 24: Índice de atividade histológica inflamatória de colite experimental induzida por DSS de alterações intestinais do cólon de camundongos sem e com a administração oral de *L. lactis* selvagens e mutantes.

O efeito tóxico causado pelo DSS nas células epiteliais, causa processos inflamatórios com aumento da permeabilidade da mucosa (Kitajima, *et al.*, 2002). Dessa forma, o DSS promove uma destruição massiva do epitélio intestinal com a subsequente filtração celular (Okuyasu *et al.*, 1990), principalmente de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Stevcev *et al.*, 2001).

No grupo dos animais doentes (Grupo DSS), houve perda da arquitetura da mucosa, infiltrado inflamatório e agregados linfóides. Já os animais tratados, com a linhagem selvagem e a recombinante carregando o plasmídeo pXylT:CYT:15-lox-1; após a reincidência da doença, foi observada a presença de criptas e de discreto infiltrado inflamatório, sugerindo que tanto a bactéria selvagem, com as linhagens

recombinantes, mais uma vez foram capazes de fornecer efeito protetor à mucosa dos animais doentes.

Segundo a OMS, o significado mais aceito para probióticos é que estes são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Neste estudo foi confirmado a atividade probiótica da linhagem de *Lactococcus lactis* NCDO2118, dados estes que condizem com outros experimentos recentes realizados onde foi observado melhora dos sinais macroscópicos e microscópicos dos animais tratados, demonstrando que a bactéria foi capaz de estabelecer um efeito protetor nos períodos de reincidência da doença. (Saraiva, 2013; Gomes-Santos, 2011),

Além disso, no grupo tratado com a linhagem recombinante produtora da proteína recombinante 15-LOX-1, na forma citoplasmática, foi possível observar um efeito acentuador na resolução do processo inflamatório desta linhagem quando comparado com o efeito probiótico da linhagem selvagem.

Neste trabalho, também colocamos mais dois grupos controle, um grupo onde camundongos foram tratados apenas com meio de cultura, com o objetivo de averiguar a interferência dos componentes do meio no processo de resolução da inflamação e outro grupo onde foram administrados linhagem de *L.lactis* com o plasmídeo sem o gene de interesse (NCDO2118 *pXyIT:CYT*) Em ambos os grupos houve perda da arquitetura da mucosa, infiltrado inflamatório e agregados linfóides, portanto não havendo nenhum efeito benéfico desses tratamentos no reparo da lesão e do processo inflamatório.

5.3 Avaliações da imunogenicidade de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada da enzima 15-LOX-1 usando modelo de inflamação DSS e avaliação do seu papel no tratamento das DICI.

5.3.1. Produção de imunoglobulinas A secretadas durante o tratamento da colite

A sIgA é produzida fisiologicamente em resposta às bactérias comensais e proteínas da dieta que penetram no enterócito. A sIgA produzida pelos plasmócitos na lâmina própria contribui para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que estas reduzem a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal (Suzuki e Fagarasan, 2009). Além disso, a ingestão de bactérias probióticas pode alterar os níveis de IgA na mucosa intestinal de camundongos (Perdigon *et al.*, 1995). Os

níveis dessa imunoglobulina foram mensurados no dia 0 (zero) e no último dia do experimento (dia 21). Contudo, os níveis de sIgA foram mensurados tanto nas fezes dos camundongos (nos dias 0 e 21) como também no lavado intestinal (dia 21). A maior parte da IgA secretória é produzida no intestino delgado (Brandtzaeg, 1998), por esse motivo o lavado intestinal foi também incluído na análise (Figura 25).

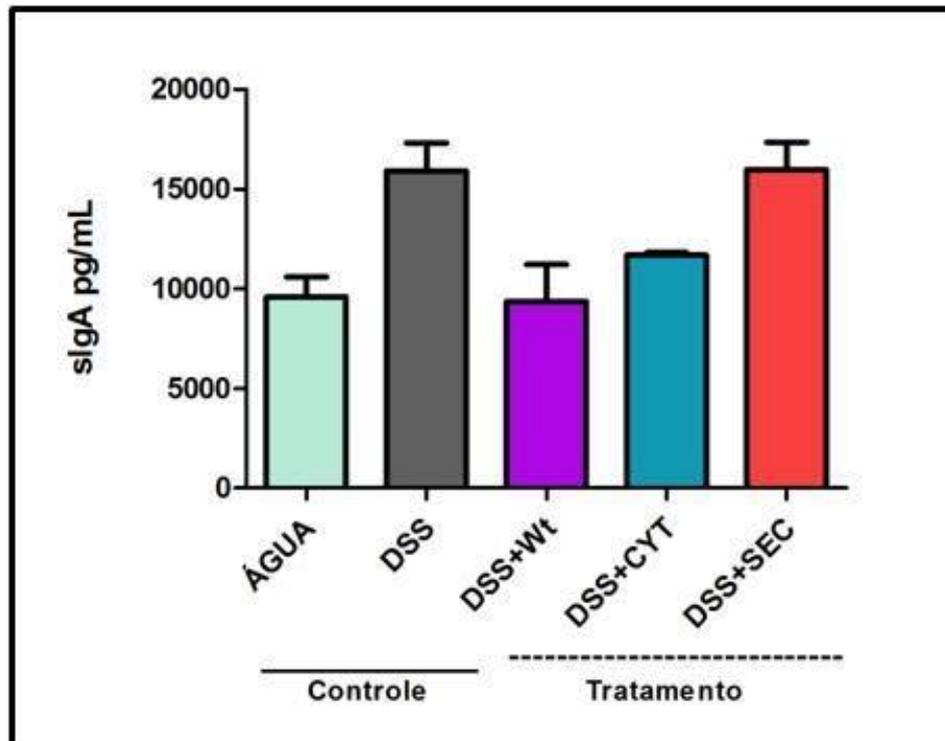


Figura 25: Níveis de sIgA detectados em amostras do lavado intestinal dos animais com colite experimental induzida por DSS sem e com a administração oral de *L. lactis* selvagens e mutantes.

Os níveis de sIgA aumentaram com a indução da colite por DSS. O DSS é um agente irritante que causa uma erosão da camada mucosa (Okayasu *et al.*, 1990). O papel protetor da sIgA já foi evidenciado no modelo de colite por DSS (Murthy *et al.*, 2006). Esse resultado já foi encontrado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Diniz-Luerce, 2013). A bactéria *L. lactis* NCDO2118 foi capaz de manter os níveis de sIgA similares aos do grupo controle (camundongos saudáveis). Já a linhagem NCDO2118+*pxy:cyt:15-LOX-1* não alterou os níveis de sIgA. Especulamos que os níveis de sIgA aumentaram com a exacerbação do processo inflamatório, uma vez que esse é um mecanismo imunorregulador da mucosa intestinal. Dessa forma, a linhagem NCDO 2118 apresenta efeito anti-inflamatório que também foi evidenciado por meio da análise histológica (Figura

25). No entanto, a melhora da colite pela linhagem NCDO2118+*pxy:cyt:15-LOX-1* não está relacionada às alterações na produção de sIgA, descartando a possibilidade de modulação da IgA como um mecanismo regulador da linhagem de *L. lactis* NCDO+*pxy:cyt:15-LOX-1*.

Uma vez que a linhagem NCDO2118 + *pxy:sec:15-LOX-1* não apresentou resultados consistentes (os aspectos macroscópicos foram divergentes dos microscópicos), provavelmente porque a melhora no quadro da colite foi pouco eficiente, sendo perceptível apenas a nível histológico. Assim, dosamos as citocinas apenas do extrato de tecidos do cólon de animais tratados com a linhagem *L. lactis* NCDO+*pxy:cyt:15-LOX-1*.

5.3.2. Perfil de citocinas no tratamento com linhagens de *Lactococcus lactis* selvagem e recombinante.

A linhagem selvagem de *L. lactis* NCDO 2118 apresenta atividade anti-inflamatória e potencial para ser usada como um probiótico na terapia de IBDs (Diniz- Luerce, 2013). Assim, experimentos *in vivo* foram realizados utilizando a linhagem selvagem e a linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118+(*pxy:cyt:15-LOX-1*). Hipotetizamos que a 15-LOX-1 poderia potencializar os efeitos anti-inflamatórios já demonstrados para a linhagem *L. lactis* NCDO2118.

Uma vez que a melhora da colite pela bactéria NCDO2118 + *pxy:cyt:15-LOX-1* não está correlacionado com alterações nos níveis de sIgA, partimos para avaliação das citocinas no extrato de cólon dos camundongos.

Citocinas pró e anti-inflamatórias são mediadores críticos durante as respostas imunes e atuam determinando a qualidade (inflamatória ou anti-inflamatória) e a natureza (humoral, celular) das respostas imunes (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). Várias citocinas são produzidas durante a inflamação intestinal e estão envolvidas no desenvolvimento e progressão da doença inflamatória intestinal. Entre elas, destacam-se o IFN- γ , TNF- α e IL-6 que estão elevadas na mucosa inflamada e contribuem para o desequilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias (Horino *et al.*, 2008; Alex *et al.*, 2009). As citocinas TNF- α , IL-6, IL-12, INF- γ , IL-17, IL-4 e IL-10 foram avaliadas ao final do segundo ciclo de DSS (dia 21).

5.3.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , TNF- α e IL-6, IL-12, IL-17 nos tecidos do cólon dos animais tratados e não tratados.

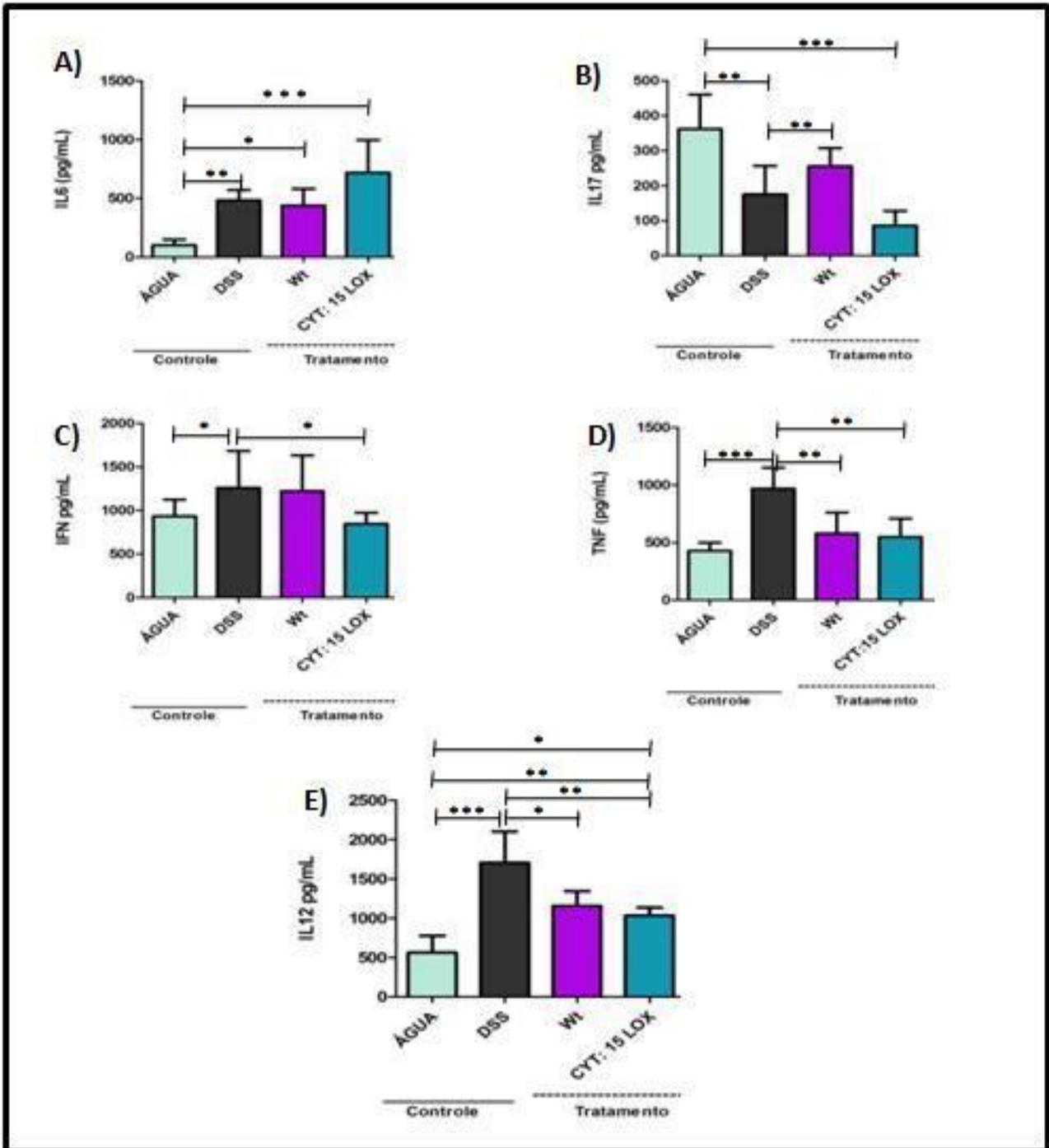


Figura 26: O efeito de *L. lactis* NCDO 2118 pxy:cyt:15-LOX-1, na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido do cólon. IL-6 (A), IL-17 (B), o IFN- γ (C), a TNF (D), IL-12 (E).

A citocina TNF- α atua como um importante mediador inflamatório na colite ulcerativa (Bento, 2012), sendo uma das principais citocinas inflamatórias elevadas no modelo de colite induzida por DSS. De fato, houve aumento de TNF- α após a indução da colite (Figura 26d). Contudo, a linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 manteve os níveis de TNF- α similares ao do grupo controle (camundongos saudáveis) assim como a linhagem NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1.

A citocina IL-6 também apresenta papel crucial na patogênese da inflamação intestinal (Neurath e Finotto, 2011). Observamos aumento de IL-6 no cólon dos camundongos do grupo DSS. Esse aumento também foi observado nos grupos tratados com *L. lactis* NCDO2118 ou com NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1). Porém, o papel protetor da IL-6 na colite induzida por DSS também já foi demonstrado. Camundongos knockout (IL-6 $^{-/-}$) apresentam uma resolução da inflamação mais ineficiente do cólon após a colite aguda (Tebbutt *et al.*, 2002). Sendo assim, o aumento da IL-6 observada com a indução da colite também pode estar associado à sua ação protetora ao promover aumento do reparo da mucosa pela restituição do epitélio, decorrente da própria doença (Podolsky, 1999; Grivennikov, *et al.*, 2009; Dann, *et al.*, 2008; Chalaris, *et al.*, 2010; Scheller, *et al.*, 2011) (Figura 26a).

A IL-12 é uma citocina que atua como um mediador na promoção de respostas Th1. A expressão de IL-12 é aumentada na DC e UC ativas e correlaciona-se com o índice de atividade dessas doenças (Nielsen *et al.*, 2003). Os níveis de IL-12 aumentaram na colite induzida por DSS e as linhagens *L. lactis* NCDO 2118 e NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1 mantiveram os níveis similares a do grupo controle (Figura 26e). Portanto, a linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 e a linhagem NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1 apresentaram atividade anti-inflamatória reduzindo os níveis de importantes citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL12.

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória com funções variadas que incluem aumento da expressão de MHC e estimulação de células T e células NK. Já foi demonstrado que essa citocina está envolvida na iniciação da colite induzida por DSS (Ito *et al.*, 2006b). Em nosso trabalho, foi observado um aumento dos níveis de IFN- γ nos camundongos do grupo DSS (Figura 26c). Enquanto a linhagem NCDO 2118 não alterou os níveis de IFN- γ , uma redução foi observada em camundongos tratados com NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1.

A IL-17 é uma citocina secretada por um conjunto particular de linfócitos T nomeados Th17, além de monócitos e macrófagos (Korn *et al.*, 2007). Dependendo do contexto, a IL-17 pode apresentar funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias.

O papel da IL-17 nas IBDs ainda não está totalmente esclarecido (Ito *et al.*, 2008), mas no modelo experimental de colite induzida por DSS, essa citocina parece desempenhar papel protetor (Ogawa *et al.*, 2004). Nesse estudo, foi observado (Figura 26b) baixos níveis de IL-17 no grupo DSS. A linhagem NCDO2118 não alterou os níveis de IL-17. Porém camundongos tratados com a linhagem NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1 também apresentaram reduzidos níveis de IL-17 .

5.3.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 no dos animais imunizados.

Também foram avaliadas as concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10. Essa citocina apresenta papel fundamental na homeostase intestinal e defeitos em sua função já foram relatadas em modelos experimentais de IBDs e em humanos (Kuhn *et al.*, 1993; Hedrich e Bream, 2010; Gomes-Santos *et al.*, 2012). Além disso, diversas pesquisas utilizando modelos *in vivo* de colite ulcerativa demonstraram que a ingestão diária de determinadas cepas probióticas resultam em um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (CUI *et al.*, 2004; PERAN *et al.*, 2006; GIRISHKUMAR *et al.*, 2012; ÓCON *et al.*, 2013). No presente trabalho, a citocina anti-inflamatória IL-10 foi significativamente reduzida no grupo DSS (Figura 27a.). Nos grupos tratados com as linhagens selvagem e com a linhagem recombinante *DSS+NCDO2118+ LOX* não houve redução de IL-10.

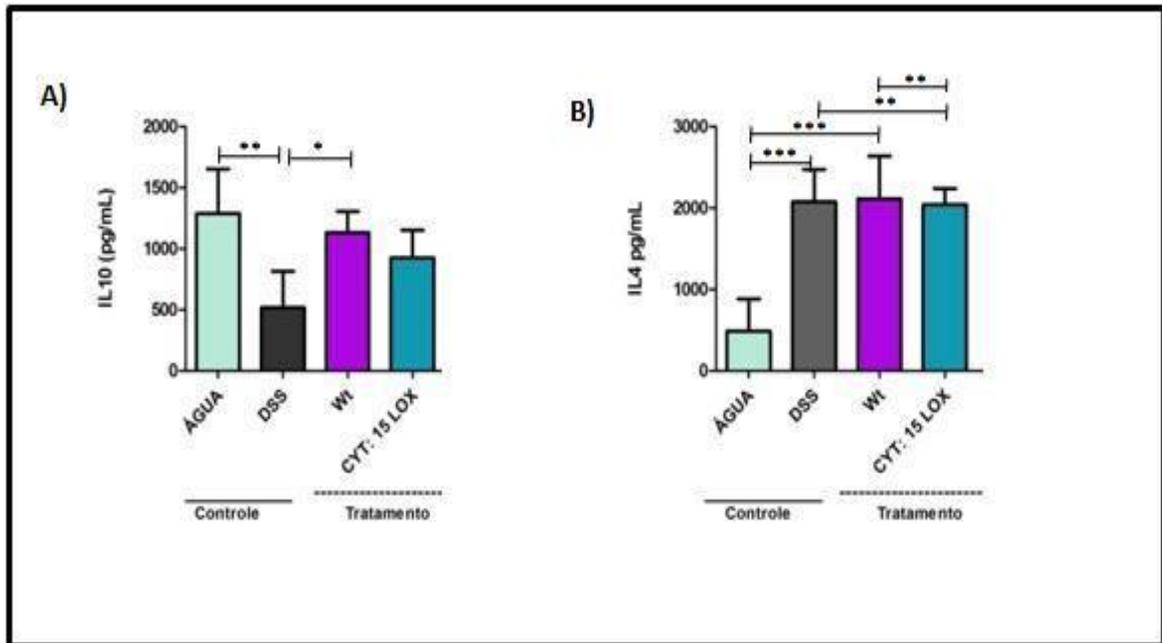


Figura 27: O efeito de *L. lactis* NCDO 2118 + pxy:cyt:15-LOX-1, na produção de citocinas antiinflamatórias no tecido do cólon. IL-10 (A), IL- 4 (B)

Também foram avaliadas as concentrações de IL-4. Essa é uma citocina com efeitos regulatórios na proliferação de células B, na proliferação e na função de células T, na troca de classe de imunoglobulinas, entre outras funções. Há evidências que suportam efeitos anti- e pro-inflamatórios dessa citocina em modelos experimentais de IBDs (Van Kampen *et al.*, 2005). No modelo de colite induzida por DSS, foi demonstrado que a IL-4 está envolvida na gravidade da inflamação (Stevceva *et al.*, 2001) e dessa forma, seus níveis foram avaliados. Observamos aumento de IL-4 nos camundongos dos grupos DSS e DSS+NCDO2118. Contudo a linhagem NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1 não alteraram os níveis de IL-4, mantendo as concentrações semelhantes a de camundongos doentes (Figura 27b).

Desta forma, podemos observar que a linhagem recombinante NCDO2118+pxy:cyt:15-LOX-1 foi capaz de manter os níveis de IFN- e de IL-4 similares aos níveis encontrados no grupo controle, além de reduzir os níveis de IL-17. Sendo todas essas citocinas predominantemente produzidas por linfócitos, especulamos que a enzima 15-lipoxigenase-1 contida em *L. lactis* poderia estar reduzindo a migração de linfócitos para o cólon de camundongos com colite ou aumentando a apoptose desses linfócitos, o que poderia justificar a redução da produção dessas citocinas.

Neste contexto, outro aspecto a ser considerado seria a possibilidade de uma diminuição do processo inflamatório estar relacionado à inibição da via NF- κ B, já

que este fator transcricional encontra-se superexpresso nas células de mucosas em pacientes com IBD (Neurath *et al.*, 1996), além de sua inibição resultar em melhora dos sintomas intestinais. Assim, é possível inferir o papel de um dos metabólitos da 15-LOX-1, o 13-HODE, na resolução do processo inflamatório. Foi demonstrado que esse metabólito induz a apoptose das células epiteliais do cólon *in vitro*, implicando na inibição do receptor nuclear PPAR- (Shureiqi *et al.*, 2003). PPAR- é um membro de uma família de receptores nucleares que tem sido proposto como um alvo terapêutico nas IBDs, devido a sua capacidade de inibir a via NF- κ B (Dubuquoy *et al.*, 2006).

Além disso, 15-LOX-1 é uma enzima cuja expressão está transcricionalmente silenciada em carcinoma colorectal (Shureiqi *et al.*, 2009). Estudos comprovam que a reintrodução do gene que codifica para 15-LOX-1, em linhagens celulares de carcinoma coloretal, é capaz de diminuir a proliferação e induzir a apoptose destas células. Estes estudos demonstraram ainda que a expressão ectópica do gene da 15-lox-1 nesta linhagem celular impede a degradação do inibidor de kappa B (I B) e conseqüentemente diminuiu a atividade de NF- κ B, não havendo portanto a ativação de genes codificadores das citocinas pró-inflamatórias (Cimen *et al.*, 2009).

Além disto, o efeito benéfico da 15-LOX-1 pode estar relacionado à ação de um outro metabólito, as lipoxinas (Janakiram *et al.*, 2009). Sabe-se que na doença de Crohn e na Colite ulcerativa ocorre uma produção elevada do leucotrieno (LTB₄) na mucosa acometida (Golan *et al.*, 2009). Elevadas concentrações de leucotrienos explicam a maior atividade quimiotática para neutrófilos locais, exacerbando a inflamação (Golan *et al.*, 2009; Shimizu, 2009). Já o aumento da produção de lipoxinas é importante na resolução da inflamação.

Sendo assim, a existência de um equilíbrio na homeostase entre a produção de lipoxinas e leucotrienos na mucosa intestinal pode contribuir substancialmente para a resolução do processo inflamatório.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1. As linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:15-lox-1) e *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:15-lox-1) foram construídas, confirmadas e capazes de produzir a enzima 15-LOX-1.
2. A linhagem de *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:SEC:15-lox-1) não foi capaz de secretar a 15-LOX-1 para o meio extracelular, ficando esta retida no citoplasma ou junto ao envelope celular.
3. Os camundongos tratados com *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:15-lox-1), no modelo de colite induzido por DSS, apresentaram melhoras estatisticamente significativas nos sinais clínicos da doença, mantendo o escore macroscópico equivalente ao grupo controle não inflamado.
4. Os camundongos tratados com *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:15-lox-1), no modelo de colite induzido por DSS, apresentaram melhoras estatisticamente significativas no escore microscópico de inflamação.
5. A linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:15-lox-1) não alterou os níveis de sIgA. Assim, a melhora da colite não está relacionada à alterações na produção de sIgA, descartando a possibilidade de modulação da IgA como um mecanismo regulador dos produtos da 15-LOX-1.
6. Os camundongos tratados com *L. lactis* NCDO2118 (pXyIT:CYT:15-lox-1), no modelo de colite induzido por DSS, mostraram-se capazes de manter o níveis de IFN- similares aos níveis encontrados no grupo controle não inflamado, além de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- , IL-12 e IL-17) e aumentar os níveis da citocina regulatória IL-10.
7. Em todos os parâmetros analisados, foi observado um efeito acentuador na resolução do processo inflamatório após o tratamento com *L. lactis* NCDO2118

(pXylT:CYT:15-lox-1), quando comparado ao efeito terapêutico da linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118.

8. A nova metodologia proposta neste trabalho, a administração terapêutica oral de *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT:15-lox-1), foi promissora no tratamento da colite induzida por DSS em modelo murino, apresentando-se como uma nova estratégia para o tratamento das IBDs.

7. PERSPECTIVAS

A inflamação crônica é um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento do câncer humano. Doenças inflamatórias intestinais, incluindo a colite ulcerativa e a doença de Crohn são doenças inflamatórias de longa duração típica do cólon, com um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma coloretal. Vários eventos moleculares envolvidos no processo inflamatório crônico podem contribuir para a progressão de vários estágios de desenvolvimento do câncer humano (Xu M, Zuo X, Shureiqi, 2012)

Muito dos progressos recentes na compreensão da imunidade de mucosas e das IBDs foi alcançado através de estudos utilizando modelos animais experimentais de inflamação intestinal. Diversos estudos já demonstraram a eficácia da administração oral de linhagens de *L. lactis* expressando moléculas para tratamento das IBDs (Del Carmem, 2013)

Neste contexto, a metodologia utilizada neste trabalho apresentou efeito terapêutico e imunomodulador nas inflamações do trato gastrointestinal, mostrando-se promissora para o tratamento das IBDs. Sendo assim, *L. lactis* produtoras de 15-LOX-1 seria uma interessante estratégia terapêutica a ser utilizada também no câncer coloretal.

REFERÊNCIAS

ALEX, P.; ZACHOS, N.C.; NGUYEN, T.; *et al.* LI 534 X. 2009. *Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS 535 and TNBS-induced Colitis*. *Inflammatory Bowel Disease*. 15(3):341–352.

ANVISA. Comissões Tecnocientíficas de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. [acesso em 28 ago. 2010].

ARTIS, D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of ASENSI, G.; DE SALES, N.; DUTRA, F. *et al.* (2013). *Oral immunization with Lactococcus lactis secreting attenuated recombinant staphylococcal enterotoxin B induces a protective immune response in a murine model*. *Microbial Cell Factories*, v. 12, p. 32, 2013.

ASSIMES, T.L.; KNOWLES, J.W.; PRIEST, J.R. *et al.* 2008. *A near null variant of 12/15-LOX encoded by a novel SNP in ALOX15 and the risk of coronary artery disease*. *Risch N., Quertermous T. Atherosclerosis* 198:136-144

AZEVEDO, M.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Avaliação da imunogenicidade de linhagens de lactococcus lactis produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de mycobacterium leprae*. 2009. 121 f., enc. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral..

BAHEY-EL-DIN, M.; GAHAN, C.G. (2010) *Lactococcus lactis: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery*. *Discov Med.*, 9(48):455–61

BAHEY-EL-DIN, M.; GAHAN, C.G. 2010. *Lactococcus lactis: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery*. *Discov Med.*, 9(48):455–61.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; CORTIER, G.; LANGELLA, P.R. (2004) *Recent advances in the use of Lactococcus lactis as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines*. *Recent Res. Devel. Microbiology*. 8:147–160.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; CORTIER, G.; LANGELLA, P.R. 2004. *Recent advances in the use of Lactococcus lactis as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines*. *Recent Res. Devel. Microbiology*. 8:147–160.

BERNASCONI E, GERMOND J-E, DELLEY M, *et al.* (2002) *Lactobacillus bulgaricus proteinase expressed in Lactococcus lactis is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine -lactoglobulin fusion proteins*; *Applied and Environmental Microbiology* 68:6; 2917-2923

BIENENSTOCK, J. E BEFUS, A. D. (1980) *Mucosal immunology*. *Immunology*, 41(2):249 70

BLAUT, M.; CLAVEL, T. 2007. *Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease*. *J Nutr.* 137(3 Suppl 2):751S-5S.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; *et al.* (2001) *The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403*. Genome Res., 11:731–753.

BONACELLI, M.B.M.; SALLES-FILHO, S. L. M. 2004. *Institutos e Centros de P&D – Situação atual e avaliação do potencial inovativo*. Relatório Final, IPEA/PNUD - DPCT, 112p. mimeo. Campinas, São Paulo, Brazil

BRAAT, H.; ROTTIERS, P.; HOMMES, D.W. (2006) *A phase I Trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 4(6):754–759.

BRANDTZAEG, P. (1998). *Development and basic mechanisms of human gut immunity*. Nutr Rev 56(1 Pt 2): S5-18.

CALDER PC. *n-3 fatty acids, inflammation, and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients*. Lipids. 2004;39:1147-61.

CALDER PC. *n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients*. Lipids. 2004;39:1147-61.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. (2002) *The Lactic Acid Bacteria: A literature survey*. Critical Reviews in Microbiology, 28(4):281–370.

CHO, J.H. (2008) *Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations*. World J Gastroenterol., 14(3):338–47.

CHOPIN, A.; CHOPIN, M.C.; MOILLO-BATT, A.; LANGELLA, P. (1984) *Two plasmid- determined restriction and modification systems in Streptococcus lactis*. Plasmid, 11:260–263.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. *Gastrointestinal effects of prebiotics*. British Journal of Nutrition, v.87, n.2, p.145-51, 2002

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. *Prebiotic digestion and fermentation*. The American Journal of Clinical Nutrition, v.73, n.2, p. 415–420, 2001

DE MORENO DE LEBLANC A, DEL CARMEN S, ZURITA-TURK M, *et al.* *Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases*. ISRN Gastroenterol. 2011;2011:892971. doi: 10.5402/2011/892971. Epub 2011 Feb 8. PubMed PMID: 21991534; PubMed Central PMCID: PMC3168568.

DE RUYTER, P.G.; KUIPERS, O.P.; DE VOS, W.M. (1996) *Controlled gene expression systems for Lactococcus lactis with the food -grade inducer nisin*. Appl. Environ. Microbiol., 62:3662–3667.

DE VOS, W. M. AND GASSON, M. J. *Structure and expression of the Lactococcus lactis gene for phospho-beta-galactosidase (lacG) in Escherichia coli and L. lactis*. J. Gen. Microbiol.; 135: 1833-1846, 1989

DE VOS, W. M. *Gene expression systems for lactic acid bacteria*. Curr. Opin. Microbiol.;2: 289-295, 1999

DEL CARMEN S, ZURITA-TURK M, LIMA A, *et al.* 2013. Novel Interleukin-10 DNA Mucosal Delivery System Attenuates Intestinal Inflammation in a Mouse Model. *European Journal of Inflammation*.

DEL CARMEN, S.; DE MORENO; DE LEBLANC, A. *et al.* *Evaluation of the anti-inflammatory effect of Milk fermented by a strain of IL-10-producing Lactococcus lactis using a murine model of Crohn's disease.* *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2011;21(3- 4):138-46.

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.S.M.; BURINI, R.C. 2010. *Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon.* *Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo, v.47, n.1, p.93-98*

DIEYE, Y.; USAI, S.; CLIER, F.; GRUSS, A.; PIARD, J.C. (2001) *Design of a protein –targeting system for lactic acid bacteria.* *J Bacteriol.*, 183:4157–4166.
direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005. 54(2):p. 219-31

DOUGLAS, L.C.; SANDERS, M.E. 2008. *Probiotics and prebiotics in dietetics practice.* *J Am Diet Assoc.* 108(3):510-21

DROUAULT, S.; JUSTE, C.; MARTEAU, P.; *et al.* 2002. *Oral treatment with Lactococcus lactis expressing Staphylococcus hyicus lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency.* *Appl Environ Microbiol.* Jun;68(6):3166-8. PubMed PMID: 12039786; PubMed Central PMCID: PMC123933.

DUNHAM, S.P. (2002) *The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine.* *Res Vet Sci.*,73:9–16.

FAO/WHO, *Guidelines for evaluation of probiotics in food.*, in World Health Organization. 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World

FAO/WHO, Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria,” 2001.

FAO/WHO. *Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.* Ontario, Canada; 2002

FROSSARD, C.P.; STEIDLER, L.; EIGENMANN, P.A. 2007. *Oral administration of an IL-10-secreting Lactococcus lactis strain prevents food-induced IgE sensitization.* *Journal of Allergy Clinical Immunology*,19(4): 952-958).

GALLINA DA. *Leites fermentados funcionais: tendências e inovações.* *Rev Ingrid Tecnol* 2010;9:26-30.

GASSON, M.J. (1983) *Plasmid complements of Streptococcus lactis NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast -induced curing.* *J. Bacteriol.* , 154:1–9.

GEWIRTZ AT, MADARA JL. *Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine.* *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):288-90. PubMed PMID: 11276197.

GIBSON, R.A. *Australian fish- An excellent source of both arachidonic acid and w-3 polyunsaturated fatty acids*. *Lipids* (1983) 18: 743-752

GILL, S. R., POP, M. ; DEBOY, R.T.; ECKBURG, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I.; RELMAN, D.A.; FRASER-LIGGETT, C.M.; NELSON, K.E. (2006) *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. *Science*, 312:5778:1355–9.

GUERGOLETTTO, k. B.; MAGNANI, M. JUCA SAN MARTIN, J.S.; ANDRADE, C.G.T., GRACIA, S. *Survival of Lactobacillus casei(LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, n.2, p.415-421, 2010

HALL JA, VAN SAUN RJ, WANDER RC. *DIETARY (n-3) fatty acids from menhaden fish oil alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis in healthy horses*. *J Vet Intern Med*. 2004;18(6):871-9.

HILL, D.A. & ARTIS, D. (2010) *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis*. *Annual Reviews of Immunology*, 28:623-667.

HOOPER, L. V. E MACPHERSON, A. J. (2010) *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. *Nature Reviews Immunology*, 10 :159–169.

HUGENHOLTZ, J., SYBESMA, W., GROOT, M.N., *et al.* (2002) *Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals*. *Antonie Van Leeuwenhoek Aug*; 82(1-4):217–35.

HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; GROOT, M.N.; 2002. *Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals*. *Antonie Van Leeuwenhoek*.2002 Aug;82(1-4):217-35. Review.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. (2009) *Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation*. *Annual Reviews of Immunology*, 27:313–38.

IZUMI, T.; RAADMARK, O.; JOERNVALL H., SAMUELSSON B. *Purification of two forms of arachidonate 15-lipoxygenase from human leukocytes*. *Eur. J. Biochem*.202:1231-1238(1991)

JANAKIRAM NB, RAO CV. *Role of lipoxins and resolvins as anti-inflammatory and proresolving mediators in colon cancer*. *Curr Mol Med*. 2009 Jun;9(5):565-79. Review. PubMed PMID: 19601807.

KAMANAKA, M.; KIM, S.T.; WANETAL, Y.Y. (2006) *Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin -10 reporter knockin tiger mouse*. *Immunity*, 25(6):941–952.

KELAVKAR, U.; WANG, S.; MONTERO, A.; MURTAGH, J.; SHAH, K.; BADR, K. 1998. *Human 15-lipoxygenase gene promoter: analysis and identification of DNA binding sites for IL-13-induced regulatory factors in monocytes*. *Mol. Biol. Rep*. 25:173-182

KITAJIMA, S., MORIMOTO, M.; SAGARA, E.; SHIMIZU, C.; IKEDA, Y. (2001) *Dextran sodium sulfate -induced colitis in germ-free IQI/Jic mice*. *Exp Anim.*, 50(5):387–95.

KLAENHAMMER, T.R.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; AZCARATE-PERIL, M.A.; ALTERMANN, E. (2005) *Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health*. *FEMS Microbiol Rev.*, 29(3):393–409.

KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P.; BERNARD, E. *The extracellular biology of the lactobacilli*. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Mar;34(2):199-230. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00208.x. Epub 2010 Jan 19. Review.

KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. 2009. *Lactic acid bacteria*. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. (Eds.) H. König; G. Uden; J. Fröhlich, XVIII, 522 p.; pp. 3-29

KRITZIK, M.R.; ZIOBER, A.F.; DICHARRY, S.; CONRAD, D.J.; SIGAL, E. 1997. *Characterization and sequence of an additional 15-lipoxygenase transcript and of the human gene*. *Biochim. Biophys. Acta* 1352:267-281

LANGELLA, P. AND Y. LE LOIR. 1999. *Heterologous protein secretion in Lactococcus lactis: a novel antigen delivery system*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*32:191-198

LASTRES, H.M.M. & FERRAZ, J.C.. *Economia da Informação, do Conhecimento e do Aprendizado*. in LASTRES, H. M.M. *Informação e Globalização na Era do Conhecimento*. Rio de Janeiro: Campus, 1999, pp.37-57

LE LOIR, Y.; NOUAILLE, S.; COMMISSAIRE, J.; *et al.* (2001) *Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4119–4127.

LEHNINGER, ALBERTL. NELSON, DAVIDL. COX, MICHAEL. *Princípios da bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. (2005) *Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut*. *Science*, 307:1920–1925.

MAGALHAES, JG; TATTOLI, I.; GIRARDIN, SE (2007) *The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens*. *Semin Immunol.* 19(2):106-15.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. 1997. *Probiotics: a novel approach in the management of food allergy*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2:179–85

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. 2007. *Evolutionary genomics of Lactic Acid Bacteria*. *Journal of Bacteriology*, 189:1199–1208.

MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. (2007) *Evolutionary genomics of lactic acid bacteria*. *J Bacteriol.*, 189:1199–1208.

MAPA. Portaria no46, de 23 de novembro de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados; 2007.

MARINHO, F.A.V.; PACÍFICO, L.G.G.; MIYOSHI, A.; *et al.* (2010). *An intranasal administration of Lactococcus lactis strains expressing recombinant interleukin - 10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model.* Clinical and Experimental Allergy, 40(10):1541–1551.

MELGAR S, BJURSELL M, GERDIN AK, SVENSSON L, MICHAËLSSON E, BOHLOOLY-Y M. *Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Jan;292(1):G165-72. Epub 2006 Jul 13. PubMed PMID: 16844678.

MERCENIER, A. (2000) *Lactic Acid Bacteria as live vaccines.* In Probiotics: A critical review ed. Tannock, G. pp. 113-127. Wymondham: Horizon Scientific Press.

MIERAU, I.; KLEEREBEZEM, M. *10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis.* Appl Microbiol Biotechnol.;68(6):705-17, 2005

MITCHELL, J. *et al.* *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA v. 90, p. 11693-7, 1993.

MIYOSHI, A.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.; PACHECO DE AZEVEDO, M.; *et al.* (2010) *Lactic acid bacteria as live vectors: heterologous protein production and delivery systems,* in Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications, F. Mozzi, R. Raya, and G. Vignolo, Eds., p. 9, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

MIYOSHI, A.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.; PACHECO DE AZEVEDO, M.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. 2010. *Lactic acid bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems,* in Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications, F. Mozzi, R. Raya, and G. Vignolo, Eds., p. 9, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

MIYOSHI, A.; JAMET, E.; COMMISSAIRE, J.; *et al.* (2004) *A xylose-inducible expression system for Lactococcus lactis.* FEMS Microbiol. Lett., 239:205–212.

MOLLY, F; HAYES, F. R. *DNA and Biotechnology.* 3. ed. Elsevier Inc, 2010.

MOOG F. *The lining of the small intestine.* SCI AM. 1981 NOV;245(5):154-8, 160, 162 ET PASSIOM. PUBMED PMID: 7330657.

MOWAT, A.M. (2003) *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.* Nat Rev Immunol., 3(4):331–41.

NEISH AS. *Micróbios na saúde e na doença gastrointestinal.* Gastroenterologia.2009 Jan; 136 (1) :65-80. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080. Epub 2008 Nov 19. Comente. PubMed PMID: 19026645; PubMed Central PMCID: PMC2892787.

NELL S., SUERBAUM S., JOSENHANS C., (2010) *The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models.* Nature Reviews Microbiology, 8:564–577.

NI, J., CHEN, S.F.; HOLLANDER, D. (1996) *Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes*. Gut, 39(2):234–41.

NORTON, P.M.; LE PAGE, R.W.; WELLS, J.M. (1995) *Progress in the development of Lactococcus lactis as a recombinant mucosal vaccine delivery system*. Folia Microbiol., 40(3):225–30.

NOUAILLE S.; RIBEIRO, L.A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D.; LE LOIR, Y.; OLIVEIRA, S.C.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. (2003) *Heterologous protein production and delivery systems for Lactococcus lactis*. Genet Mol Res., 31;2(1):102–11

O'HARA AM.; SHANAHAN F (2006) *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep. 7(7):688-93.

OKAYASU, I., HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M. *et al.* (1990) *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 98(3):694–702

OTA, T.; SUZUKI, Y.; NISHIKAWA, T.; *et al.* 2004. *Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs*. Nat Genet. 2004 Jan;36(1):40-5. Epub 2003 Dec 21. PubMed PMID: 14702039.

OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. 2002. *Probiotics: an overview of beneficial effects*. Antonie Van Leeuwenhoek, 82:279–289

OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. (2002) *Proeffects*. Antonie Van Leeuwenhoek, 82:279–289.

PERDIGÓN, G.; FULLER, R.; RAYA, R. (2001) *Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System*. Curr. Issues Intest. Microbiol., 2(1):27–42

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. 2007. *The genomics of lactic acid bacteria*. Trends in Microbiology, 15(12).

PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. (2007) *The genomics of lactic acid bacteria*. Trends in Microbiology, 15(12).

PIARD, J.C.; HAUTEFORT, I.; FISCHETTI, V.A.; *et al.* (1997) *Cell wall anchoring of the Streptococcus pyogenes M6 protein in various lactic acid bacteria*. J. Bacteriol., 179:3068-3072.

PORITZ, L. S., GARVER, K.I.; GREEN, C.; *et al.* (2007) *Loss of the tight junction protein ZO -1 in dextran sulfate sodium induced colitis*. J Surg Res., 140(1):12–9.

REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M.T.; *et al.* (2003) *Potential uses of probiotics in clinical practice*. Clin Microbiol Rev., 16:658–672.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; *et al.* (2001) *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol., 2(4):361–7.

ROBERFROID, M. B. 2000. *Prebiotics and probiotics: are they functional foods?* American Journal of Clinical Nutrition, 71:1682–1687.

ROCHA, C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Propriedades imuno modulatórias de lactobacillus delbrueckii*. 2011. 181 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

ROTTIERS, P.; DE SMEDT, T., STEIDLER, L. (2009) *Modulation of Gut-Associated Lymphoid Tissue Functions with Genetically Modified Lactococcus lactis*. International Reviews of Immunology, 28:465–486

SALLES FILHO, S.(org). Ciência, tecnologia e inovação/Science, technology and innovation. *Campinas; Komedi Editorial; 2000. 416 p. guia*. Monografia em POR | Coleciona SUS (Brasil) | ID: sus-23031

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

SANDERS, M. E. 2003. *Probiotics: considerations for human health*. Nutrition Reviews, 61(3):91–9.

SANSONETTI, P.J. (2004) *War and peace at mucosal surfaces*. Nat Rev Immunol., 4(12):953–4.

SARAIVA, T.; AZEVEDO, V.; ROCHA, C. *Caracterização e avaliação das propriedades probióticas de lactococcus lactis NCDO 2118*. 2013. 160 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

SARTOR, R.B. (2006) *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol., 3:390–407.

SARTOR, R.B. (2008) *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 134:577–594.

SIGAL, E.; CRAIK, C.S.; HIGHLAND, E.; *et al.* 1988. *Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:457- 464(1988)

SIGAL, E.; GRUNBERGER, D.; CRAIK, C.S.; CAUGHEY, G.H.; NADEL, J.A. 1998. *Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases*. J. Biol. Chem.263:5328-5332

SLOANE, D.L.; LEUNG, R.; CRAIK, C.S.; SIGAL, E. 1991. *A primary determinant for lipoxygenase positional specificity*. Nature 354:149-152

STEIDLER L, HANS W, SCHOTTE L, *et al.* 2000. *Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10*. Science. 2000 Aug 25;289(5483):1352-5. PubMed PMID: 10958782.

STEIDLER, L.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.; *et al.* (1998) *Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of Lactococcus lactis coexpressing antigen and cytokine*. Infect Immun. , 66:3183–3189.

- STILES, M. E. (1996) *Biopreservation by lactic acid bacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:331–345.
- STILES, M. E. 1996. *Biopreservation by Lactic Acid Bacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:331–345.
- STROBER, W., FUSS, I.; MANNON, P. (2007) *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest.*, 117(3):514–21.
- THE MGC PROJECT TEAM. 2004. *The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)*. *Genome Res.* 14:2121-2127
- THIEMAN, A. J.; PALLADINO, M. A. *Introduction to Biotechnology*. 2^a ed. Pearson Benjamin Cummings, 2009.
- URBACH, G. (1995) *Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products*. *Int Dairy J.*, 5:877–903
- URBACH, G. 1995. *Contribution of Lactic Acid Bacteria to flavour compound formation in dairy products*. *International Dairy Journal*, 5:877–903.
- VAN ASSELDONK, M.; RUTTEN, G.; OTEMAN, M.; *et al.* (1990) *Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from Lactococcus lactis subsp. lactis MG1363*. *Gene*, 95:155–160.
- VAN DE GUCHTE, M., EHRLICH, S.D., MAGUIN, E. 2001. *Production of growth-inhibiting factors by Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol* 91:147-153.
- VAUGHAN, E.E.; DE VRIES, M.C.; ZOETENDAL, E.G.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M.; *The intestinal LABs*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 82:341-52.
- WANG M, AHRNÉ S, JEPSSON B, MOLIN G. *Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005. 54(2): p. 219-31
- WEIBEL, G.L.; JOSHI, M.R.; WEI, C.; BATES, S.R.; BLAIR, I.A.; ROTHBLAT, G.H. 2009. *15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism*. *J. Lipid Res.* 50:2371-2376
- WELLS JM, WILSON PW, NORTON PM, GASSON MJ, LE PAGE RW. *Lactococcus lactis: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge*. *Mol Microbiol.* 1993 Jun;8(6):1155-62. PubMed PMID: 8361360.
- WELLS, J.M.; MERCENIER, A. (2008) *Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria*. *Nature*, 1038:1–14.
- WINKLER, P., GHADIMI, D. SCHREZENMEIR, J.; KRAEHENBUHL, J.P. (2007) *Molecular and cellular basis of microflora-host interactions*. *J Nutr.*, 137(3 Suppl 2):756S–72S.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. (2007) *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nature Protocols, 2(3):541–546.

YOO H, JEON B, JEON MS, LEE H, KIM TY. *Reciprocal regulation of 12- and 15-lipoxygenases by UV-irradiation in human keratinocytes*. FEBS Lett. 2008 Sep 22;582(21-22):3249-53. doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.017. Epub 2008 Aug 26. PubMed PMID: 18755188.

ZHAO, J.; O'DONNELL, V.B.; BALZAR, S. *et al.* 2011. *15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108:14246-14251

ZHU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. (2009) *Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics*. Appl Microbiol Biotechnol., 83(4):597–610.

ZHU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. 2009. *Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics*. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(4):597-610.

ZODY, M.C.; GARBER, M.; ADAMS, D.J. *et al.* 2006. *DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage*. Nature. 2006 Apr 20;440(7087):1045-9. PubMed PMID: 16625196; PubMed Central PMCID: PMC2610434.

ANEXOS – A: Contribuição Científica

A.1. Introdução

A doença de Crohn (DC) é uma doença intestinal inflamatória crônica recidiva sistêmica (IBD) considerado um importante problema de saúde mundial. Esta doença afeta o trato gastrointestinal, caracterizada por inflamação extensa devido à desregulação do sistema imune inato e adaptativo dirigidos contra bactérias luminais ou os seus produtos, que normalmente não provocam uma resposta (Maloy e Powrie, 2011). Assim, a inflamação do intestino faz com que ocorram os sintomas clínicos de diarreia prolongada, fadiga e perda de peso. Opções de tratamento para CD incluem a nutrição, antibióticos, agentes imunossupressores (por exemplo, esteróides), imunomoduladores, modificadores da resposta biológica, como a anti-fator de necrose tumoral- (TNF-) e cirurgia (Däbritz, 2014). No entanto, os tratamentos de CD atuais não são totalmente eficazes, além de gerar efeitos colaterais adversos em pacientes. Assim, a utilização de moléculas capazes de controlar a inflamação associada com a aplicação de bactérias benéficas como uma ferramenta no tratamento e / ou prevenção de CD, sem os efeitos secundários negativos, muitas vezes associados com a terapia da droga convencional, é promissor para aliviar os sintomas da CD. As bactérias do ácido láctico (BAL) é um grupo de microrganismos Gram-positivos com sucesso em muitas aplicações biotecnológicas. *Lactococcus lactis* é o microorganismo modelo das LAB, é considerado seguro e portanto uma boa escolha para a produção de proteínas recombinantes de importância na saúde humana e animal, uma vez que é de fácil manipulação e que tem um grande número de ferramentas genéticas disponíveis para clonagem e expressão de heterólogas proteínas (Bolotin et al., 2001). Portanto, *L. Latis* têm sido amplamente utilizado para a produção e distribuição de antígenos, citocinas e outras moléculas importantes pela via da mucosa bucal (Wells e Mercenier, 2008).

Neste contexto, a 15-lipoxigenase-1 (15-LOX-1), é uma molécula que pode contribuir significativamente para a resolução da inflamação intestinal. Esta enzima encontra-se em células endoteliais e epiteliais e desempenha um papel fundamental no metabolismo oxidativo de ácido araquidônico, produção de de mediadores lipídicos com ações anti-inflamatórios potentes, como as lipoxinas, (Levy et al, 2001;. Serhan, 2005; Lee, Zuo e Shureiqi , 2011). A lipoxina A4 (LXA4) estimula a fagocitose dos leucócitos apoptóticos por macrófagos para atenuar inflamações (Godson *et al.*, 2000). Além disso, a LXA4 facilita a resolução de inflamação pela

inibição da superóxido e da formação de peroxinitrito e IL-8. Além disso, é capaz de inibir o ativador de proteína 1 (AP-1) e fator de ativação nuclear kB (NF-kB) em leucócitos humanos, que têm propriedades próinflamatórias e proliferativas (Levy *et al*, 1999; József. *et al*, 2002). Embora as lipoxinas são pequenas moléculas potentes que poderiam ser administradas *in vivo* para tratar uma série de doenças e condições, estas moléculas têm uma meia-vida curta *in vivo* (Naveena e Rao, 2009). Assim, uma nova metodologia é proposto com a linhagem recombinante de *L. lactis* capaz de produzir a enzima 15-LOX-1, obtido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, como uma terapia da mucosa oral viva para aumentar os níveis de 15-LOX-1 no local de inflamação. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antiinflamatório da administração de leites fermentados produzidos a partir de linhagens de *L. lactis* produtoras da 15-LOX-1, usando modelo CD induzido por ácido trinitrobenzenossulfí (TNBS) , em camundongos.

A.2. Objetivos

- Produção de um produto biotecnológico, Leite Fermentado, utilizando as linhagens recombinantes de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada da proteína 15-LOX-1.
- Avaliação do efeito terapêutico do Leite Fermentado em Modelo de Inflamação TNBS,
- Avaliação macroscópica e histológica da inflamação intestinal,
- Avaliação da translocação microbiana para o fígado.

A.3. Materiais E Métodos

A.3.1. Produção do Leite Fermentado

Três linhagens bacterianas foram utilizadas neste estudo: *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 linhagem selvagem - Wt), *L. lactis* NCDO2118 carreando o vetor pXIES:15LOX que codifica a 15-lipoxigenase humana para endereçamento intracelular (linhagem cyt) ou fusionada a um peptídeo sinal para endereçamento extracelular (linhagem Sec).

As linhagens foram crescidas por 18 horas a 30°C sem agitação em meio GM17 (Difco), contendo 0,5% de glicose. Para a seleção do plasmídeo (linhagens Cyt e Sec), 10 µg/ml cloranfenicol foi adicionado. Estas culturas foram lavadas duas vezes com solução salina (0,15 M NaCl), para a eliminação do antibiótico. Leite fermentado reconstituído estéril desnatado contendo 1% xilose foram inoculados como previamente descritos. As linhagens Wt, Cyt ou Sec foram inoculadas na concentração de 2% (v/v) e incubadas por 24 h à 30°C. O leite fermentado administrado fresco, sendo diariamente preparado durante o período de alimentação.

A.3.2. Efeito terapêutico do Leite Fermentado das linhagens produtoras da proteína 15-LOX-1 no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, utilizando modelo de inflamação TNBS

A.3.2.1 Animais experimentais

Camundongos fêmeas BALB/c de cinco semanas de idade, pesando entre 20–25 g foram obtidas de uma colônia do CERELA (Centro de Referencia para Lactobacilos, San Miguel de Tucumán, Argentina). A inflamação intestinal foi induzida por técnica previamente descrita [de Moreno de LeBlanc et al., 2009]. Assim, camundongos foram anestesiados intraperitonealmente utilizando uma mistura de hidrocloreto de ketamina (100 µg/g por massa corporal), e cloridrato de xilasina (Rompun; Bayer, Division Sanidad Animal, Buenos Aires, Argentina; 5 µg/g por massa corporal) após foram administrados 100 µl de uma solução de TNBS (Sigma, St. Louis, Mo., USA; 2 mg/mouse) dissolvida em tampão salina fosfato (solução PBS) 0,01 M, pH 7,4, e misturada com igual volume de etanol (50% etanol). O grupo controle recebeu PBS misturado com etanol (sem TNBS) usando a mesma técnica. Após a inoculação do TNBS, os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: (1) grupo inflamado (grupo TNBS) sem nenhuma alimentação especial; (2) grupo TNBS-Wt, recebeu leite fermentado com a linhagem selvagem (Wt); (3) grupo TNBS-Sec, recebeu leite fermentado contendo a linhagem Sec, e (4) grupo TNBS-Cyt, camundongos receberam leite fermentado com a linhagem Cyt. Os animais receberam o leite fermentado *ad libitum* desde a inoculação do TNBS até o dia do sacrifício (4 dias após a inoculação). Cada animal deste experimento ingeriu aproximadamente 3 ml de leite por dia. A administração intragástrica do leite fermentado não foi realizada devido ao estresse

desnecessário que causaria nos camundongos, principalmente nos animais inflamados. Todos animais receberam também uma dieta balanceada *ad libitum* e foram mantidos em um ambiente com 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Cada grupo experimental continha 7 animais. Massa corporal e mortalidade foram monitoradas diariamente. Todos os protocolos animais foram pré-aprovados pelo Comitê de Proteção Animal do CERELA e com as leis correntes da Argentina.

A.3.2.2. Avaliação macroscópica e histológica da inflamação intestinal

O intestino grosso foi removido, visualmente inspecionado para avaliação macroscópica, e preparado para a avaliação histológica usando método padrão [Sainte Marie, 1962]. Foram realizados cortes de parafinas de 3 μ m e marcados com hematoxilina e eosina para observação ao microscópio. As lesões macroscópicas foram analisadas com base no sistema de escore previamente descrito [Cenac et al., 2002]. A extensão do dano e inflamação do cólon foram mensuradas usando um sistema de classificação histopatológica (Ameho et al., 1997) como previamente descrito [LeBlanc et al., 2011]. Altos índices de escore macroscópicos ou histológicos indicam aumento do dano intestinal.

A.3.2.3. Translocação microbiana para o fígado

A translocação microbiana para o fígado foi determinada seguindo protocolos previamente descritos [LeBlanc et al., 2004]. O fígado foi removido asépticamente, pesado e homogeneizado em 5,0 ml de solução peptona 0,1% (w/v) estéril. Diluição seriada do homogenizado foi plaqueado em triplicata em meios: Mann-Rogosa-Sharp (MRS; Britania Laboratories, Buenos Aires, Argentina), MacConkey (Britania Laboratories) e GM17 contendo 0,5 % de glicose. O crescimento bacteriano foi avaliado após incubação à 37°C por 48–72 h.

A.4. 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.

A.5. Resultados Parciais

Foi demonstrado que no modelo induzido por TNBS, simulando a CD, camundongos que receberam leite fermentado com as linhagens de *L. lactis* produzindo a 15-LOX-1, na forma citoplasmática, apresentaram menores pontuações de danos no intestino grosso (tanto macroscópicos quanto microscópicos) e inferior translocação microbiana para o fígado (dados não demonstrados, sendo que outros experimentos ainda estão em andamento). Estes resultados demonstram a utilização de leites fermentados, como uma nova forma de administração de *L. lactis* produção de moléculas anti-inflamatórias na prevenção e / ou tratamento de CD em um modelo murino.

Referências:

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; *et al.* (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731–753.

DÄBRITZ, J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor and the intestinal innate immune cell homeostasis in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306: G455–G465, 2014.

DEL CARMEN, S; DE LEBLANC, A DE M; PERDIGON, G; *et al.*. Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of Milk Fermented by a Strain of IL-10-Producing *Lactococcus lactis* Using a Murine Model of Crohn's Disease. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;21:138–146. DOI: 10.1159/000333830

GODSON, C., MITCHELL, S., HARVEY, K., PETASIS, N.A., HOGG, N. BRADY, H.R. (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.*, 164, 1663-1667.

JÓZSEF, L., ZOUKI, C., PETASIS, N.A., SERHAN, C.N. FILEP, J.G. (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 13266-13271.

LEVY, B. D., CLISH, C. B., SCHMIDT, B., GRONERT, K., SERHAN, C. N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. *Nature Immunology*, 2, 612–619.

LEVY B D, FOKIN V V, CLARK J M, *et al.*. Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a 'stop' signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A4. *FASEB J.* 1999;13:903–911.

MALOY KJ, POWRIE F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 298 –306, 2011.

NAVEENA B.; CHINTHALAPALLY V. Role of Lipoxins and Resolvins as Anti-Inflammatory and Proresolving Mediators in Colon Cancer. *Current Molecular Medicine* 2009, 9, 565-579 565.

SERHAN, C. N. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epilipoxins are the first lipid mediators of endogenous antiinflammation and resolution. [Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids](#), 73, 141–162.

WELLS, J.M. MERCENIER, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature*. 1038:1-14.

ANEXO – B: Soluções e Meios de Culturas

Luria-Bertani (LB): 25 g em 1 L de água destilada q.s.p.. Para preparo de meio sólido, foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Himedia®). Autoclavação por 15 min à 121°C.

M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli): 21 g de meio de cultivo M17 (Fluka Analytical® Sigma) foram pesados e dissolvidos em água destilada, completando-se o volume para 250 mL, concentrando-se o meio duas vezes. 85,5g de sacarose foram dissolvidos em uma quantidade suficiente para (q.s.p) 250 mL de água destilada, resultando em uma solução 1Molar (M). O meio M17 e a solução de sacarose foram esterilizados separadamente por autoclavação à 121°C durante 15 minutos. A glicose 50% foi preparada dissolvendo-se 50g de glicose anidra em água destilada q.s.p 100 mL, sendo esterilizada utilizando-se um filtro de 0,22 µm. Em capela de fluxo laminar, o meio M17, a solução de sacarose e 5mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M e Glicose 0,5% (M17-Sac-Gli). Composição: triptona 2,5g/L, peptona de carne 2,5g/L; peptona de soja 5 g/L; extrato de levedura 2,5g/L; extrato de carne 5 g/L; glicerofosfato de sódio 19 g/L; sulfato de magnésio 0,25g/L; ácido ascórbico 0,5g/L; lactose 5 g/L; pH 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Cloranfenicol (10 mg/mL): 100 mg de cloranfenicol foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada com o auxílio de um filtro de 0,22 µm em capela de fluxo laminar.

Ampicilina (100 mg/mL): 1000 mg de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura e a solução foi esterilizada com auxílio de um filtro de 0,22 µm em capela de fluxo laminar.

Glicerol (80%): 80 mL de glicerina foram diluídos em 20 mL de água ultrapura e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

Brometo de etídio: Solução estoque a 5mg/mL; Utilizou-se a 0,5 µg/mL.

TBE (0,5X): 100 mL de TBE 5X (54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 - 8,5; água destilada q.s.p 1L) em água destilada q.s.p 1L.

Tampão de amostra: Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

Glicerol (10%): 100 mL de glicerina foram diluídos em 900 mL de água destilada e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos. *Solução I (Ressuspensão): 0,45 g de glicose anidra; 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8.0; 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0; água destilada q.s.p. 50 mL. Solução II (Lise): 200 µL de NaOH 5M; 250 µL de SDS 20%; água destilada q.s.p. 5 mL. Esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização. Solução III (Neutralização): 30 mL de acetato de potássio 5 M; 5,75 mL de ácido acético glacial; água destilada q.s.p. 50 mL.*

Glicogênio (20 mg/mL): 100 mg de glicogênio dissolvidos em 5 mL de água destilada.

Acetato de Sódio (3 M): 12,3 g de acetato de sódio; água destilada q.s.p 50 mL.

Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto; 30 mL de água destilada

Glicina: Solução estoque 20% foi preparada diluindo-se 10 g de glicina em água destilada q.s.p. 50 mL e esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Sacarose 0.5 M e glicerol 10%: 105 mL de glicerina e 179,5 g de sacarose foram diluídas em água destilada q.s.p. 1,05 L. A mistura foi esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

PEG3000 30% e glicerol 10%: 3 g de PEG3000, 1 mL de glicerol e água destilada q.s.p.10 mL.

TE-LYS: TE 0,5X (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl) e 10 mg/mL Lisozima.

Glicose (40% p/v): 40 g de Glicose (Merck) foi dissolvida em 100 mL de água pura. A solução foi então passada em um filtro de 0,22 µm (Corning), aliquotada, e acondicionada, na geladeira, a 4°C. O processo de filtração se deu dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane).

Xilose (25% p/v): 25 g de Xilose foi dissolvida em 100 mL de água pura. A solução foi então passada em um filtro de 0,22 µm (Corning), aliquotada, e acondicionada, em freezer, a - 20°C. O processo de filtração se deu dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane).

M17 + Glicose (GM17): Meio M17 acrescido de Glicose 0,5% estéril.

M17 + Xilose (XM17): Meio M17 acrescido de Xilose 1% estéril.

TCA 100% (p/v): 100 g de TCA foram dissolvidos em 100 mL de água pura, com o auxílio de um aparelho do tipo vórtex. A solução foi estocada a 4°C.

DTT 1M: 1,553 g de DTT foram dissolvidos em 10 mL de Acetato de sódio 0,01M. A solução foi estocada a -20°C.

TES-Lisozima: Uma solução de Sacarose 20% (Merck), Tris 50 mM pH 7.5 (USB), EDTA 5 mM (USB) e Lisozima 10 mg/mL (Sigma) foi preparada dissolvendo os reagentes em 50 mL de água pura e estocada a - 20°C.

Coquetel inibidor de proteases: (Mistura de inibidores de proteases solúveis): 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA. O reagente foi diluído em 10 mL de água miliQ estéril e estocado a - 20°C.

NaOH 1M: 40g de NaOH foram dissolvidos em 1L de água pura. A solução foi acondicionada em um frasco escuro e estocada à temperatura ambiente.

DTT-LB: 50mM Tris-HCl pH 6.8; SDS 4%; Glicerol 20%; Azul debromofenol;0,2%; 10mM de ditioneitol (DTT)

Acrilamida/Bisacrilamida: 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Gel de Poliacrilamida 8% (separação): 5 mL de acrilamida/bisacrilamida; 2,5 mL de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 2,34 mL de água milli-Q; 70 µL de PSA 10% e 14 µL de TEMED.

Gel de Poliacrilamida 4% (concentração): 650 µL de acrilamida/bisacrilamida, 1,25 mL de Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 3,05 mL de água milli-Q, 35 µL de PSA 10% e 7 µL de TEMED.

Tampão de corrida Tris-glicina (10X): 30 g de Tris-base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS e água milli-Q q.s.p. 1 L (concentração de uso: 25 mM tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

Tampão da Amostra: 1 mL Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 800 µL de glicerol, 1,6 mL de SDS 10%, 200 µL de azul de bromofenol 2% e 4,6 mL de água milli-Q.

Tampão de Transferência (pH 8,3): 3,03 g de Tris (25 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol (20%) e água destilada q.s.p. 1 L.

PBS 0,15 M: 137 mM de NaCl (8 g), 2,7 mM de KCl (0,2 g), 10 mM de Na₂HPO₄ (1,44 g), 1,8 mM de KH₂PO₄ (0,24 g), água destilada q.s.p. 1L; pH 7,4. A solução foi esterelizada por autoclavação.

PBS 0,15M e 0,1% de Tween-20: 500 µL de Tween-20 em 500 mL de PBS 0,15 M. Corante Ponceau 0,1% em ácido acético a 1%: 0,5 g de Ponceau em 400 mL de água, 5 mL de ácido acético glacial e água destilada q.s.p. 500 mL.

Coating buffer (Tampão Carbonato): 1,86g de Na₂CO₃ e 2,93g de NaHCO₃, completar o volume com água bidestilada para 1000mL ajustando-se o pH para 9,6. Estocar a 4°C.

Salina-Tween (10X): 85g de NaCl, 5mL de Tween 20 e completar para 1000mL com água bidestilada (concentração de uso 1x).

PBS-caseína (Solução de Bloqueio): 1000mL de PBS 1x pH 7,2 e 2,5g de caseína. Acrescentar a caseína ao PBS aquecido e filtrar em gaze caso necessário. Estocar a -20°C.

Tampão citrato: 13,41g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,19g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ e completar para 1000mL com água bidestilada, acertando o pH para 5.0. Estocar a 4°C.

Solução de Revelação: 4mg de OPD, 10mL de tampão citrato e 2 μL de H_2O_2 . Preparar no momento do uso e proteger da luz.

Solução de Ácido sulfúrico: 53,24mL de H_2SO_4 em 1000 mL de água bidestilada.