

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

VANESSA PECINI DA CUNHA

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UMA LINHAGEM
INVASIVA DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DA FORMA CITOPLASMÁTICA
DO ANTÍGENO Hsp65 DE *Mycobacterium leprae***

BELO HORIZONTE

2016

VANESSA PECINI DA CUNHA

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UMA LINHAGEM
INVASIVA DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DA FORMA CITOPLASMÁTICA
DO ANTÍGENO Hsp65 DE *Mycobacterium leprae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi
Coorientadora: Dra. Vanessa Bastos Pereira

BELO HORIZONTE

2016

043 Cunha, Vanessa Pecini da.

Construção e avaliação funcional de uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* produtora da forma citoplasmática do antígeno hsp65 de *Mycobacterium leprae* [manuscrito] / Vanessa Pecini da Cunha. - 2016.

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi. Coorientadora: Dra. Vanessa Bastos Pereira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Doença de Crohn - Teses. 3. *Lactococcus lactis* - Teses. 4. Proteínas do choque térmico. 5. Genética - Teses. I. Miyoshi, Anderson. II. Pereira, Vanessa Bastos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Vanessa Pecini da Cunha

233/2016
entrada
2º/2014
CPF:
064.945.179-19

Às treze horas e trinta minutos do dia **06 de julho de 2016**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Construção e Avaliação Funcional de uma Linhagem Invasiva de Lactococcus lactis produtora da Forma Citoplasmática do Antígeno Hsp65 DE Mycobacterium leprae**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson Miyoshi**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Dr. Anderson Miyoshi	UFMG	03435703107	APROVADA
Dra. Vanessa Bastos	UFMG	04312909680	Aprovada
Dr. Frederico Marianetti Soriani	UFMG	091000000	APROVADA
Dra. Bárbara Bruna R. de O. Mendes	UFMG	08435647684	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 06 de julho de 2016.

Dr. Anderson Miyoshi - Orientador [Assinatura]
Dra. Vanessa Bastos - Co-Orientador Vanessa Bastos Pecini da Cunha
Dr. Frederico Marianetti Soriani [Assinatura]
Dra. Bárbara Bruna R. de O. Mendes [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais *José Alves da Cunha* e *Vera Lúcia Pecini da Cunha*, pelo amor e incentivo, para que eu siga minha jornada em Belo Horizonte e por se esforçarem em me dar o que não tiveram a oportunidade de ter.

A minha irmã *Viviane Pecini da Cunha*, pelo carinho e por cuidar dos meus pais, enquanto estou longe.

Aos meus “velhinhos” *Alpídio Pescini* e *Salete Benvenuto Pescini*, pelo incentivo e por serem exemplos a seguir.

Ao meu namorado *Daniel Conegundes da Silva*, por ser o meu amigo, parceiro em todos os momentos e sempre estar disposto a me ajudar. Obrigada pelo amor e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. *Anderson Miyoshi*, por ter aceitado me orientar e ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Agradeço imensamente ter um orientador paciente, educado e gentil em suas considerações.

A minha coorientadora Dra. *Vanessa Bastos Pereira*, pelos ensinamentos na bancada sobre bactérias lácticas e pelas correções dos manuscritos/apresentações durante essa jornada. Sou muito grata pelas suas contribuições.

Às *colegas* da equipe TecnoGen:

- Dra. *Bianca Mendes de Souza* pelos conselhos científicos, ajuda nos últimos experimentos deste trabalho e pelas valiosas dicas para a seleção de doutorado.

- Dra. *Camila Prósperi de Castro* pelas ajudas na bancada, companhia nos momentos em que estávamos sem laboratório, por me ajudar a entender as dúvidas bobas sobre o mundo da clonagem, das bactérias lácticas e até mesmo de imunologia (ainda temos muito para aprender!). Obrigada por toda atenção.

- Dra. *Meritxell Zurita Turk* pelos conselhos científicos e pela amizade.

- Biol. *Tatiane Melo Preisser* por me aturar de dia e de noite, excelente colega de trabalho e amiga de república. TatiEnE você é demais.

Aos professores Dr. *Evanguedes Kalapothakis* e Dr. *Frederico Marianetti Soriani*, por cederem gentilmente seus laboratórios para que pudéssemos desenvolver nossos trabalhos, enquanto o TecnoGen estava em construção.

À professora Dra. *Adriana Abalen Martins Dias* por ceder à linhagem Caco-2 e a Msc. *Priscila Fabiana Rodrigues* por cultivá-las lindamente, para todos os experimentos deste trabalho.

Ao professor Dr. *Gustavo Batista de Menezes* por ceder o microscópio confocal e a Dra. *Mônica Moraes Santos* por ter se prontificado a fotografar todas as imagens do meu experimento.

À colega e companheira de república *Fúlvia Oliveira*, pelos momentos de “tititi”, incertezas da vida, conselhos e por assistir os ensaios dos meus seminários e pelas contribuições.

Aos amigos belorizontinos, *Daniela Camargos Costa*, *Carolina Batista Nunes*, *Alan Fábio Silva*, *Cassiana Severiano de Sousa*, *Higgor Gonçalves Dornelas*, *Valéria Rosalina Dias e Santos*, *Michelle Teodoro Alves* e *Glênio Araújo Vilela* por todo o apoio, vocês foram fundamentais para eu chegar até aqui.

Aos amigos blumenauenses, *Sheila Hempkmeyer*, *Karina Reinicke*, *Daiane Luchetta Ronchi*, *Fernanda Piazza*, *Camila Grimes*, *Adria Loube Moritz*, *Eduardo Lana*, *Keila Zaniboni Siqueira Batista*, *Julio César de Souza Junior*, *Katy Danielle Mafra Silva* e *Karine Ferreira* pela amizade a quilômetros de distância.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliarem este trabalho de dissertação.

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.

Ao *CNPq* pela concessão da bolsa de estudo e a *CAPES* e *FAPEMIG* pelo apoio financeiro.

Finalmente, obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa vitória e desculpa àqueles que porventura eu tenha deixado de citar.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

A mucosa intestinal possui um complexo sistema imune que está em homeostase com a microbiota. Entretanto, a quebra desse equilíbrio pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (IBDs), como a Doença de Crohn (CD). A CD é uma doença multifatorial, caracterizada por uma inflamação crônica e descontrolada da mucosa intestinal, e sua ocorrência vem crescendo no mundo todo, principalmente em países desenvolvidos. O tratamento é realizado com esteróides, imunomoduladores e cirurgia, contudo, estão atrelados a sérios efeitos colaterais. Assim, diante dessa problemática, há necessidade de desenvolvimento de tratamentos mais eficazes aos portadores dessa enfermidade. Neste contexto, as proteínas do choque térmico, também conhecidas como HSPs, poderiam ser uma interessante alternativa. As HSPs são chaperonas importantes para a sobrevivência das células e são encontradas em todas as formas de vida. Além disso, as HSP60 são consideradas antígenos imunodominantes importantes na regulação das células T efectoras, com grande potencial na diminuição das respostas T_H1 e aumento das respostas T_H2 e T_{reg} , respostas essas necessárias para o controle da CD. Sendo assim, a utilização de bactérias lácticas, como *Lactococcus lactis*, para a produção e a entrega de proteínas terapêuticas, como Hsp65, diretamente no interior das células da mucosa intestinal do hospedeiro, pode representar uma nova estratégia para o tratamento da CD. No presente trabalho, foi construída a linhagem invasiva (*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺) e a linhagem invasiva e produtora de Hp65 de *Mycobacterium leprae* [*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)]. Ambas as linhagens foram capazes de invadir células eucarióticas mais eficientemente que a linhagem selvagem (*L. lactis* NCDO2118), e, além disso, a linhagem produtora de Hsp65 foi capaz de produzir a proteína citoplasmática recombinante. Com relação à segurança, após a administração intragástrica das linhagens invasivas em camundongos Balb/C imunossuprimidos, essas não foram capazes de translocar através do lúmen intestinal para outros órgãos. Dessa forma, *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) apresenta um grande potencial para a realização de ensaios terapêuticos para a CD experimental.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais. Doença de Crohn. *Lactococcus lactis*. Proteínas do choque térmico.

ABSTRACT

The intestinal mucosa has a complex immune system that is in homeostasis with the microbiota. However, the breaking of this balance may contribute to the development of inflammatory bowel diseases (IBDs), such as Crohn's disease (CD). CD is a multifactorial disease characterized by chronic, uncontrolled inflammation of the intestinal mucosa, and its occurrence is increasing worldwide, especially in developed countries. Its treatment is performed with steroids, immunomodulators and surgery, however, these are linked to serious side effects. Thus, there is a need to develop more effective treatments for patients that suffer from this disease. In this context, heat shock proteins, also known as HSPs, could be an interesting alternative. HSPs are chaperones important for the survival of cells and found in all forms of life. Additionally, HSP60 is an immunodominant antigen considered important in the regulation of effector T cells, with great potential in reducing T_h1 and increasing T_h2 and T_{reg} responses, with such responses required for CD control. Therefore, the use of lactic acid bacteria, such as *Lactococcus lactis*, for the production and delivery of proteins with therapeutic potential, such as Hsp65, directly into the intestinal mucosa of the host cells may represent a novel strategy for the treatment of CD. In this study, it was built a novel invasive strain (*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺) and an invasive strain capable of producing *Mycobacterium leprae* Hsp65 [*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)]. Both strains were able to invade eukaryotic cells more efficiently than the wild type strain (*L. lactis* NCDO2118). Moreover, the strain producing Hsp65 was able to satisfactorily produce the recombinant cytoplasmic protein. With respect to security, after intragastric administration of the invasive strains in Balb/C mice, they were not able to translocate through the intestinal lumen to other organs. Accordingly, *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) has great potential for the realization of therapeutic trials for the experimental CD.

Keywords: Inflammatory bowel diseases. Crohn's disease. *Lactococcus lactis*. Heat shock proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da mucosa intestinal e o aparato imunológico. O intestino possui ao longo de sua extensão diferentes segmentos, aparências e funções. Na imagem A está representado, o jejuno, no intestino delgado superior, com suas vilosidades longas e finas, na qual possuem enzimas digestivas. Ainda, células-tronco que dão origem a células, como: as epiteliais intestinais (IECs), as caliciformes secretoras de muco e as de Paneth. Na LP, reside à maioria das células imunes intestinais e os linfócitos intraepiteliais (IELs). E na imagem B, o íleo, localizado no intestino delgado inferior, que possui vilosidades mais curtas, refletindo nas baixas taxas de digestão e absorção local. Além disso, células caliciformes e de Paneth tornam-se mais numerosas e os IELs menos frequentes. 25

Figura 2 – Sistema imune da mucosa intestinal. Os antígenos podem atravessar o epitélio através das células M ou das DCs. A cúpula subepitelial (SED) é ocupada por linfócitos, incluindo células T_H0 , que, no âmbito das citocinas específicas, diferenciam-se em T_H1 , T_H2 , T_H17 ou T_{reg} . Populações adicionais de linfócitos incluem os IELs que residem justapostos as IECs. Outras células residentes na LP provavelmente participam na reposta imune, como os MC e os EOS. 29

Figura 3 – O rompimento da homeostase imune intestinal. Em circunstâncias normais, os mecanismos regulatórios intestinais superam os sinais inflamatórios induzidos pelo sistema imune em reação aos estímulos da microbiota intestinal (*status* basal). Entretanto, esse *status* pode ser alterado por diversas razões. Embora em muitos casos, o resultado final seja uma acumulação de mediadores inflamatórios, as causas podem ser diferentes. a) No caso de uma regulação deficiente, a reação normal do sistema imune para o estímulo intestinal pode resultar numa inflamação crônica. b) A ruptura da barreira intestinal expõe o sistema imune a uma grande quantidade de estímulos pró-inflamatórios que podem descontrolar a regulação intestinal. c) Uma atividade imunológica aumentada também pode levar a inflamação, mesmo se os níveis de regulação e os estímulos pró-inflamatórios permanecerem basais. d) Uma atividade imunológica diminuída também pode aumentar a inflamação. Respostas imunes reduzidas não são suficientes para controlar patógenos oportunistas, de modo que os estímulos pró-inflamatórios microbianos se acumulam e pendem o balanço, causando uma inflamação crônica, apesar de uma redução na reatividade imune basal. 32

Figura 4 – Possíveis mecanismos de indução da CD causada por mutações em NOD2. a) A função defeituosa dos macrófagos leva a ativação intracelular persistente de macrófagos e estimulação crônica de células T. b) A resposta defeituosa das células epiteliais levam a perda da função da barreira epitelial e aumento da exposição à microbiota presente na mucosa. c) Um condicionamento defeituoso de antígenos nas APCs, leva a ativação inadequada de APCs e a uma ruptura do balanço homeostático de células efetoras e reguladoras. 37

Figura 5 – Interações celulares induzem o modo de regulação em células T HSPs-específicas. a) Células T HSPs-específicas podem ser ativadas ou clonalmente expandidas pela exposição artificial através de imunização com HSPs, ou naturalmente, durante uma infecção bacteriana ou pela microbiota comensal. É possível que a exposição de células T às HSPs da microbiota intestinal no MALT defina o modo de regulação através de mecanismos de tolerância à mucosa. b) Na periferia, a manutenção e a modulação desse repertório pode ocorrer após a exposição de células T ao *stress* ou pela expressão de HSPs-próprias por APCs na ausência de

co-estimulação, ou ainda, ocorrer por meio da ligação a peptídeos alterados das HSPs-próprias nas células T HSPs-específicas bacterianas. c) As células T HSPs-específicas exercem o seu efeito regulador quando exposto a HSPs que são expressas no sítio da inflamação. 43

Figura 6 – Produto da amplificação da ORF Hsp65 a partir do plasmídeo pXYCYT:Hsp65. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium[®]. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação; C-: controle negativo. 67

Figura 7 – Produto da digestão enzimática do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 com as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRI* (Promega[®]). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red - Biotium[®]. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]); canaleta 1: vetor não digerido; canaleta 2: produto da digestão. 68

Figura 8 – Produto da amplificação da ORF FnBPA a partir do vetor pOri23–fnbA (FnBPA⁺). Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium[®]. PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação; C-: controle negativo. 69

Figura 9 – Produto da amplificação das ORF FnBPA e Hsp65 a partir dos vetores pOri23–fnbA (FnBPA⁺) e pXYCYT:Hsp65, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium[®]. FnBPA - PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação de FnBPA; C-: controle negativo; Hsp65 - PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação de Hsp65; C-: controle negativo. 70

Figura 10 – *Western blotting* do extrato proteico citoplasmático a partir de culturas de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzidas com xilose. PM: padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Scientific™); canaleta 1: Hsp65 recombinante com cauda de histidina (Farmacore Biotecnologia Ltda.); C-: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) não induzida com xilose; C+: *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) induzida com xilose; C18: clone 18 de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:HSP65) induzida com xilose. 71

Figura 11 – Capacidade invasiva das linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) após 1 hora de co-cultura com células Caco-2. N: *L. lactis* NCDO2118 selvagem; NF: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺; NFX: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) não induzida com xilose; NFXi: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzida com xilose. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$ 73

Figura 12 – Capacidade invasiva das linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzidas com xilose em diferentes tempos de invasão. Contagem bacteriana em placa: 1h (4562 UFC/mL); 1h30min (10553 UFC/mL) e 3h30min (5105 UFC/mL). Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$ 74

Figura 13 – Micrografia de células da linhagem Caco-2 após o ensaio de invasão com *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65). 1) Caco-2 marcadas com o corante nuclear DAPI, Ac primário e secundário; 2) NXi marcadas com o corante nuclear DAPI, Ac primário

e secundário; NFXi marcadas com o corante nuclear DAPI, Ac primário e secundário. Capturas representam a sobreposição dos fluorocromos utilizados. DAPI: Sigma-Aldrich[®]; Ac primário: anticorpo monoclonal IgG1 murino produzido contra Hsp65 de *Mycobacterium* sp. (MyBioSource); Ac secundário: anti-IgG conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate – Molecular Probes[®]). 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade das citocinas relacionadas na patogênese das IBDs.	39
Tabela 2 – Linhagens bacterianas.	51
Tabela 3 – Plasmídeos.	52
Tabela 4 – Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da ORF Hsp65.	54
Tabela 5 – Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da ORF FnBPA.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

Ac – Anticorpo

APC – “*Antigen Presenting Cell*”

BCIP/NBT – Substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato mais nitroazul de tetrazólio

BCR – “*B-Cell Receptor*”

BSA – “*Bovine Serum Albumin*”

C – Citosina

C18 – Clone 18 de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:HSP65) induzida com xilose

Caco-2 – Células de adenocarcinoma de cólon humano

CARD – “*Caspase Recruitment Domain*”

CARD15 – “*Caspase Recruitment Domain Family Member 15*”

CD – “*Crohn’s Disease*”

CD36 – “*Cluster of Differentiation 36*”

CD40 – “*Cluster of Differentiation 40*”

CD91 – “*Cluster of Differentiation 91*”

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIBio – Comissão Interna de Biossegurança da UFMG

Cm – Antibiótico cloranfenicol

CO₂ – Dióxido de carbono

CYT – Citoplasmático

DAPI – 4'-6-diamidino-2-fenil-indol

DC – “*Dendritic Cells*”

DC CD103⁺ – “*Dendritic Cells CD103⁺*”

DMEM – “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

DO – Densidade óptica

DSS – Dextran sulfato de sódio

DTT – Ditioneitol

EcoRI – Endonuclease de restrição isolada de *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilendiaminotetracético

EOS – Eosinófilo

FAE – “*Follicle Associated Epithelium*”

FDA – “*American Food and Drug Administration*”

FnBPA – “*Fibronectin Binding Protein A*”

Foxp3 – “*Forkhead Box P3*”

g – Grama

G – Guanina

GALT – “*Gut Associated Lymphoid Tissue*”

GATA-3 – “*Trans-Acting T-Cell-Specific Transcription Factor*”

GRAS – “*Generally Recognized as Safe*”

HEPES – Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietyl Piperazina-1

HSE – Elemento de choque térmico

HSF – Fator de choque térmico

HSF1 – Fator de choque térmico 1

HSP – Proteína do choque térmico

HSP10 – Proteína do choque térmico 10

HSP40 – Proteína do choque térmico 40

HSP60 – Proteína do choque térmico 60

Hsp65 – Proteína do choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae*

HSP70 – Proteínas do choque térmico 70

HSP90 – Proteína do choque térmico 90

HSP100 – Proteína do choque térmico 100

IBD – “*Inflammatory Bowel Disease*”

IEC – “*Intestinal Epithelial Cells*”

IEL – “*Intraepithelial Lymphocytes*”

IFN- γ – Interferon- γ

IgA – Imunoglobulina A

IgA1 – Imunoglobulina A tipo 1

IgA2 – Imunoglobulina A tipo 2

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G tipo 1
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-1 – Interleucina 1
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
IL-17 – Interleucina 17
IL-17A – Interleucina 17 tipo A
IL-17B – Interleucina 17 tipo B
IL-18 – Interleucina 18
IL-21 – Interleucina 21
IL-22 – Interleucina 22
IL-23 – Interleucina 23
IL-27 – Interleucina 27
IL-33 – Interleucina 33
IL-35 – Interleucina 35
IL-37 – Interleucina 37
ILC – “*Innate Lymphoid Cells*”
ILF – “*Isolated Lymphoid Follicles*”
iNKT – “*Invariant natural killer T*”
Kb – Quilobase
KCl – Cloreto de potássio
kDa – QuiloDalton
Kg – Quilograma
KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
L – Litro
LAB – “*Lactic Acid Bacteria*”
LGEX – Laboratório de Genética Experimental
LOX-1 – “*Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1*”

LP – Lâmina própria

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – “*Leucine-Rich Repeat*”

M17 – Meio M17

M17–Sac–Glu – Meio M17 suplementado com sacarose e glicose

MALT – “*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*”

MAMP – “*Microbe Associated Molecular Patterns*”

MC – Mastócito

mg – Miligrama

MG1363 – *L. lactis* subsp. *cremoris*

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MHC II – “*Major Histocompatibility Complex*”

mL – Mililitro

MLN – “*Mesenteric Lymph Node*”

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MOI – “*Multiplicity of Infection*”

N – Linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NCDO2118 – *L. lactis* subsp. *lactis*

NF – Linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺

NFATp – “*Nuclear Factor of Activated T cells*”

NFX – Linhagem invasiva e produtora de Hsp65 *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺
(pXYCYT:Hsp65)

NFXi – Linhagem invasiva e produtora de Hsp65 induzida com xilose *L. lactis* NCDO2118
FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

NF-κB – “*Nuclear Factor Kappa B*”

ng - Nanogramas

NICE – “*Nisin-Controlled Expression System*”

NK – “*Natural Killer Cell*”

NLR – “*NOD-Like Receptors*”

nm – Nanômetro

NOD – “*Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor*”

NOD2 – “*Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptor 2*”

NsiI – Endonulcease de restrição isolada de *Neisseria sicca*

Nuc – Nuclease de *Staphylococcus aureus*

NX – Linhagem produtora de Hsp65 *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

NXi – Linhagem produtora de Hsp65 induzida com xilose *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

ORF – “*Open Reading Frame*”

pb – Pares de bases

PBS 1X– Tampão fosfato salina 1X

PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”

PEG3000 – “*Polyethylene Glycol 3000*”

pH – Potencial de hidrogênio

pIgR – “*Polymeric Ig Receptor*”

pMoles – Picomoles

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PP – “*Peyer's Patches*”

PRR – “*Pattern Recognition Receptors*”

pValac – Plasmídeo “*Vaccination Using Lactic Acid Bacteria*”

pValac::dts::IL-4 – Plasmídeo codificando a sequência de endereçamento nuclear e a Interleucina 4

pValac:gfp – Plasmídeo codificando a proteína verde fluorescente

pValac:IL-10 – Plasmídeo codificando a Interleucina 10

PVDF – Membrana de fluoreto polivinidileno

PxyIT – Promotor induzido por xilose

q.s.p – Quantidade suficiente para

RBS – “*Ribosome-Binding Site*”

repA – Origem de replicação de *L. lactis*

repC – Origem de replicação de *Escherichia coli*

RNase A – Ribonuclease A

RORyt – “*RAR-Related Orphan Receptor γ t*”

rpm – Rotações por minuto

SBF – Soro fetal bovino

SDS – Sodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

SEC – Secretado

SED – “*Subepithelial Dome*”

SIgA – Imunoglobulina A secretória

SP – “*Signal Peptide*”

SR-A – “*Scavenger Receptors*”

STAT1 – “*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*”

STAT3 – “*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*”

STAT4 – “*Signal Transducer and Activator of Transcription 4*”

TBE – Tampão tris/borato/EDTA

T-bet – “*T-box Expressed in T cells*”

TE – Tampão Tris-EDTA

TecnoGen – Laboratório de Tecnologia Genética

TGF- β – “*Transforming Growth Factor β* ”

TGI – Trato gastrointestinal

Th – “*T Helper*”

T_h1 – “*T Helper 1*”

T_h2 – “*T Helper 2*”

T_h17 – “*T Helper 17*”

TLR – “*Toll-like Receptor*”

TLR-2 – “*Toll-like Receptor 2*”

TLR-4 – “*Toll-like Receptor 4*”

TNBS – Ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno

TNF – “*Tumor Necrosis Fator*”

TNF- α – “*Tumor Necrosis Fator α* ”

T_{reg} – “*Regulatory T*”

T_{reg} Foxp3⁺ – “*Regulatory T Foxp3⁺*”

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

U – Unidades

UC – “*Ulcerative Colitis*”

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Usp45 – Proteína de 45 kDa de *Lactococcus lactis*

UV – Ultravioleta

V – Volts

Wt – “*Wild Type*”

X – Vezes

XIES – “*Xylose Inducible Expression System*”

μF – Microfarads

μL – Microlitro

Ω – Ohm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 A MUCOSA INTESTINAL.....	24
1.1.1 Anatomia da mucosa	24
1.1.2 Sistema imune de mucosa	26
1.1.2.1 Resposta imune inata	26
1.1.2.2 Resposta imune adaptativa.....	28
1.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	33
1.2.1 Doença de Crohn	35
1.2.2 Modelo murino de inflamação intestinal	38
1.2.3 Moléculas terapêuticas para o tratamento da Doença de Crohn	39
1.3 PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO – HSPs.....	41
1.3.1 HSP60: Imunodominância e a inflamação	42
1.3.2 Hsp65 e suas aplicações	44
1.4 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO	45
1.4.1 <i>Lactococcus lactis</i> – A bactéria láctica modelo	46
1.4.2 <i>Lactococcus lactis</i> e a expressão de proteínas heterólogas	47
1.4.3 <i>Lactococcus lactis</i> e a entrega de vacinas de DNA	48
1.4.4 Linhagem invasiva de <i>Lactococcus lactis</i> para a entrega de Hsp65 diretamente no interior e células da mucosa intestinal	49
2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM.....	51
3.2 MANIPULAÇÃO DO DNA	52
3.3 RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA	52
3.4 RECONFIRMAÇÃO DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)	53
3.4.1 Extração de DNA plasmideano pXYCYT:Hsp65	53
3.4.2 Amplificação da ORF Hsp65 de <i>M. leprae</i>	54
3.4.3 Digestão enzimática do vetor pXYCYT:Hsp65	54

3.5 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ E <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65)	55
3.5.1 Extração de DNA plasmideano pOri23–fnbA (FnBPA⁺).....	55
3.5.2 Obtenção de células eletrocompetentes <i>L. lactis</i> NCDO2118 e <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)	55
3.5.3 Eficiência de transformação das células eletrocompetentes <i>L. lactis</i> NCDO2118 e <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)	56
3.5.4 Transformação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 e <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) com o plasmídeo pOri23–fnbA (FnBPA⁺)	56
3.5.5 Confirmação da transformação com o plasmídeo pOri23–fnbA (FnBPA⁺).....	57
3.6 INDUÇÃO DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hsp65	58
3.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65).....	58
3.7.1 Extração da proteína Hsp65.....	58
3.7.2 Eletroforese em gel de poliácridamida da proteína Hsp65	59
3.7.3 Western blot.....	59
3.7.4 Imunodeteção da proteína Hsp65.....	60
3.8 ANÁLISE DA CAPACIDADE INVASIVA DE <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CULTURA DE CÉLULAS CACO-2.....	60
3.8.1 Cultura de células da linhagem Caco-2	60
3.8.1.1 Descongelamento das células Caco-2.....	60
3.8.1.2 Cultivo das células Caco-2	61
3.8.2 Ensaio de invasão <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)	61
3.9 DETECÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	62
3.9.1 Padronização do tempo de invasão para a marcação da proteína Hsp65	62
3.9.2 Imunocitoquímica da proteína Hsp65 para microscopia confocal	63
3.10 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE TRANSLOCAÇÃO DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CAMUNDONGOS Balb/C SAUDÁVEIS E IMUNOSSUPRIMIDOS	64
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
3.12 ASPECTOS BIOÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	66
3.12.1 Bioética.....	66
3.12.2 Biossegurança.....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67

4.1 VERIFICAÇÃO DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)	67
4.1.1 Amplificação da ORF Hsp65 de <i>M. leprae</i> a partir do plasmídeo pXYCYT:Hsp65...	67
4.1.2 Digestão enzimática do plasmídeo pXYCYT:Hsp65	68
4.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS INVASIVAS <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ E <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65)	68
4.2.1 Confirmação da obtenção da linhagem invasiva <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA⁺.....	69
4.2.2 Confirmação da obtenção da linhagem invasiva <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)	70
4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 PELA LINHAGEM INVASIVA <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65)	71
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA DAS LINHAGENS <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ E <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) <i>IN VITRO</i>	72
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 PELA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) POR DE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	73
4.5.1 Padronização do tempo de invasão para a marcação da proteína Hsp65	74
4.5.2 Imunocitoquímica da proteína Hsp65 para análise em microscopia confocal.....	75
4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSLOCAÇÃO DA LINHAGEM <i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CAMUNDONGOS Balb/C SAUDÁVEIS E IMUNOSSUPRIMIDOS	76
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
5.1 CONCLUSÕES	78
5.2 PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MUCOSA INTESTINAL

A mucosa intestinal localiza-se no trato gastrointestinal (TGI), um tubo longo e sinuoso, que se estende desde a cavidade bucal até a anal. No TGI inferior, que compreende os intestinos delgado e grosso, encontra-se o epitélio da mucosa intestinal, uma barreira fina e permeável, que tem por função principal isolar o ambiente interno do lúmen (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

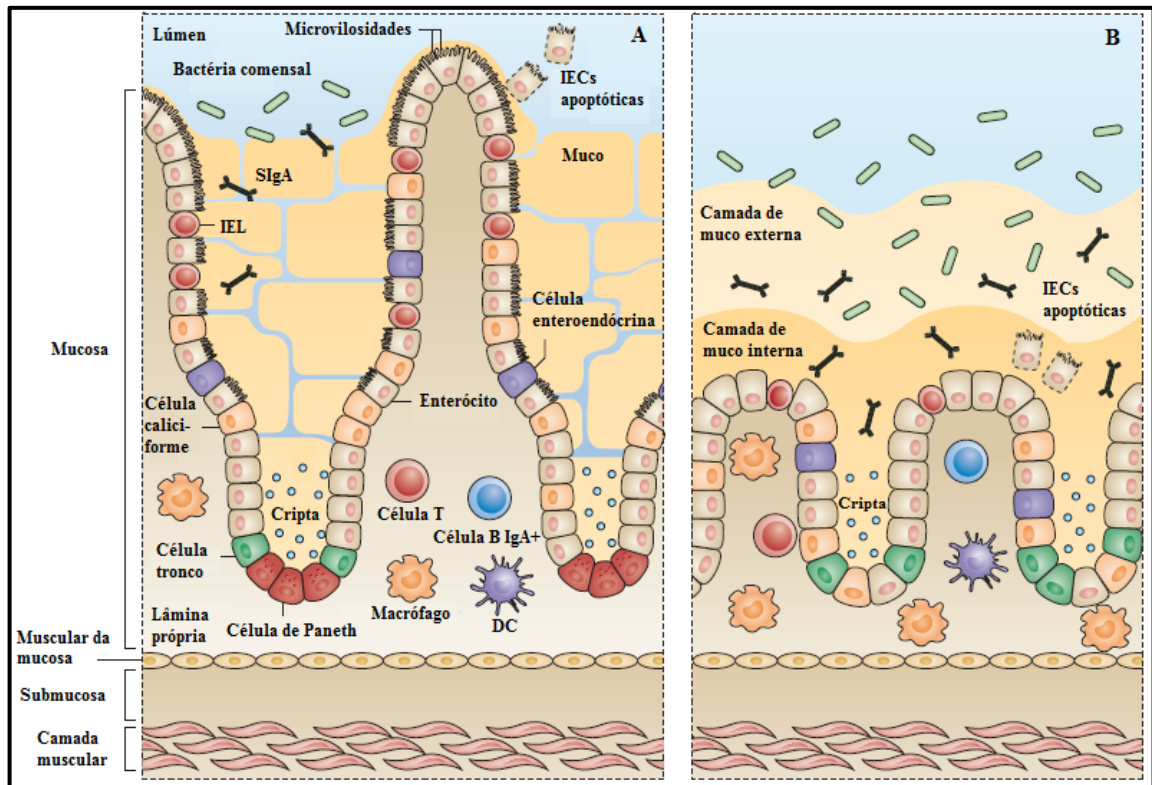
Essa mucosa é também o *habitat* de diferentes espécies de bactérias, fungos, vírus, protozoários e parasitos (GILL et al., 2006; ELINAV; HENAO-MEJIA; FLAVELL, 2013; KAMADA et al., 2013) e um dos maiores sítios de exposição antigênica, sendo assim o local onde ocorre a maioria dos processos imunológicos (MACPHERSON; HARRIS, 2004; MOWAT; AGACE, 2014; BECKER; NEURATH; WIRTZ, 2015).

Nesta primeira parte da introdução, será apresentada a estrutura anatômica da mucosa, bem como suas relações com a microbiota intestinal, e o sistema imune de mucosas, que desempenha funções protetoras ao hospedeiro.

1.1.1 Anatomia da mucosa

A anatomia da mucosa intestinal compreende: a mucosa, a muscular da mucosa, a submucosa, a camada muscular e a camada serosa. A mucosa é formada ainda pelo epitélio e lâmina própria (LP), conforme apresentado na Figura 1 (MOWAT; AGACE, 2014).

Figura 1 – Anatomia da mucosa intestinal e o aparato imunológico. O intestino possui ao longo de sua extensão diferentes segmentos, aparências e funções. Na imagem A, está representado o jejuno, no intestino delgado superior, com suas vilosidades longas e finas contendo enzimas digestivas. Ainda, células-tronco que dão origem a células, como: as epiteliais intestinais (IECs), as calciformes secretoras de muco e as de Paneth. Na LP, reside à maioria das células imunes intestinais e os linfócitos intraepiteliais (IELs). Na imagem B, o íleo, localizado no intestino delgado inferior, que possui vilosidades mais curtas, refletindo nas baixas taxas de digestão e absorção local. Além disso, células calciformes e de Paneth tornam-se mais numerosas e os IELs menos frequentes.



Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (MOWAT; AGACE, 2014).

O epitélio é simples, sendo composto por uma única camada de células que atuam como barreira entre o hospedeiro e o meio externo. Além disso, no epitélio são encontrados os linfócitos intraepiteliais (IELs, do inglês, *Intraepithelial Lymphocytes*) células caliciformes, células-tronco, células de Paneth, enterócitos, células enteroendócrinas e células M, que estão separados por uma fina membrana da LP (Figura 1) (WERSHIL; FURUTA, 2007; MOWAT; AGACE, 2014).

A LP é composta por um tecido conjuntivo frouxo, não só formando a base para as microvilosidades, mas também fornecendo auxílio para a mucosa, como sangue, drenagem linfática e suprimento nervoso. Essa estrutura contém muitas células do sistema imune inato e adaptativo, tais como, células dendríticas (DCs, do inglês, *Dendritic Cells*), macrófagos, linfócitos (células T e B), células NK (do inglês, *Natural Killer Cell*), eosinófilos (EOS), mastócitos (MC), dentre outras (WERSHIL; FURUTA, 2007; MOWAT; AGACE, 2014).

A muscular da mucosa promove o movimento da camada mucosa e é constituída por uma subcamada de células musculares lisas, dispostas circularmente, e outra subcamada de células musculares lisas, dispostas longitudinalmente. A camada submucosa está localizada abaixo, uma região de tecido conjuntivo denso, rico em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e um plexo nervoso parassintético. A submucosa tem como função dar suporte ao TGI. Em

seguida, existe outra camada muscular, responsável por promover o movimento do TGI, formada por células musculares lisas, dispostas circularmente, um plexo nervoso mioentérico, tecido conjuntivo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, e uma subcamada de células musculares lisas, dispostas longitudinalmente. Finalmente, a camada serosa, uma camada fibrosa espessa que separa o intestino da cavidade peritoneal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOWAT; AGACE, 2014).

1.1.2 Sistema imune de mucosa

Devido ao fato da superfície mucosa ser exposta a uma grande quantidade de antígenos, seu sistema imune precisa atuar de forma eficiente para manter a homeostase intestinal (HOOPER; MACPHERSON, 2010; MALOY; POWRIE, 2011; MORTHA et al., 2014). Nesse aspecto, o sistema imune da mucosa intestinal possui a difícil tarefa de montar repostas protetoras ao hospedeiro, contra a invasão de patógenos, ao mesmo tempo em que precisa manter um estado de ausência de resposta às bactérias comensais e aos antígenos alimentares. Essa característica é conhecida como tolerância oral (WERSHIL; FURUTA, 2007). As funções do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo das mucosas, desde suas barreiras físicas e químicas até as repostas de defesa mais sofisticadas, serão discutidas a seguir.

1.1.2.1 Resposta imune inata

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa de um organismo e é aquela que está prontamente disponível para combater uma gama de patógenos, porém, não conduz uma imunidade duradoura ou específica (GEREMIA et al., 2014). Dessa forma, um dos primeiros mecanismos de defesa de um indivíduo são as barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antimicrobianas na superfície das células epiteliais intestinais (IECs, do inglês, *Intestinal Epithelial Cells*), células fagocíticas, como os macrófagos e as DCs, células NK e também por outras células inatas.

Assim, a mucosa intestinal está protegida do ambiente externo por uma camada de células composta, principalmente, por IECs conectadas por fortes junções, também conhecidas como *tight junctions*, que protegem o organismo dos microrganismos do lúmen devido a sua impermeabilidade (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009; TURNER, 2009). As

IECs também são responsáveis pela importação de nutrientes e pela liberação de imunoglobulina A (IgA) para o lúmen. Além disso, desempenham um papel ativo na imunidade, pois produzem peptídeos antimicrobianos, tais como defensinas, catelicidinas e calprotectina, além de citocinas pró-inflamatórias em resposta à ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) por patógenos, como os receptores *Toll-like* (TLR, do inglês, *Toll-Like Receptors*) e os *NOD-Like* (NLR, do inglês, *NOD-Like Receptors*) (ARTIS, 2008; RESCIGNO, 2011). Esses atributos permitem que as IECs possuam uma dupla função contra os patógenos, desempenhando uma função direta antimicrobiana e uma função sentinela para alertar o sistema imune (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

Em relação às barreiras químicas, as células de Paneth, localizadas na base das criptas de Lieberkühn, abaixo das células-tronco epiteliais no intestino delgado, possuem um papel crucial produzindo peptídeos antimicrobianos, em especial as α -defensinas (HOOPER; MACPHERSON, 2010; CLEVERS; BEVINS 2013). Elas secretam seus grânulos por exocitose em resposta a agonistas de acetilcolina e a certos ligantes microbianos (Figura 1) (CLEVERS; BEVINS 2013).

Em paralelo, as células caliciformes atuam tanto como barreiras físicas quanto químicas, pois secretam o glicocálice, uma camada de muco que reveste a mucosa. Esse muco é composto por uma camada interna, densa e ligada ao epitélio superficial, e uma camada externa solta. Assim, essas células possuem funções antimicrobianas devido à produção da glicoproteína mucina, que é tóxica para muitas bactérias (Figura 1 B) (MOWAT; AGACE, 2014).

Dentre as células fagocíticas, os macrófagos intestinais são os leucócitos mais abundantes na LP. Eles têm importantes funções na homeostase intestinal, incluindo a fagocitose e a degradação de microrganismos e células mortas, bem como a produção de mediadores que conduzem a renovação celular epitelial. Dentre as diversas funções dos macrófagos, uma delas está em produzir grandes quantidades de interleucina 10 (IL-10), que não somente evita a inflamação, pelo bloqueio de resposta pró-inflamatória por TLR (UEDA et al., 2010), mas também promovem a sobrevivência e a função local de células T regulatórias Foxp3^+ (T_{reg}) na mucosa (do inglês, *Forkhead Box P3*) (MURAI et al., 2009).

As DCs são células que reconhecem e fagocitam antígenos microbianos e providenciam uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa, já que após a sua ativação, migram para os linfonodos mesentéricos para interagir com células T e B (FOERSCH; WALDNER; NEURATH, 2013). Elas também expressam PPRs, os quais reconhecem

componentes microbianos (MAMPs, do inglês, *Microbe Associated Molecular Patterns*), e são essenciais para defesa inata contra patógenos (ARTIS, 2008; WINKLER, 2007).

As células NK medeiam respostas imunes contra vírus e estão envolvidas em respostas imunes contra as células cancerosas (SPITS et al., 2013; ZEISSIG; BLUMBERG, 2013). As células iNKT (do inglês, *Invariant Natural Killer T*) são células importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas, sendo caracterizadas pela sua capacidade de auto-reconhecimento e rápida liberação de citocinas, como o interferons- γ (IFN- γ) (KAMADA et al., 2013).

Dentre as outras células inatas, pode-se citar, como exemplo, as células linfóides inatas (ILCs, do inglês, *Innate Lymphoid Cells*), os MCs e os EOS. As ILCs são células que se desenvolvem a partir de um progenitor linfóide comum, mas não expressam marcadores associados com outros linfócitos. Acredita-se que possuem um papel importante na imunidade intestinal, na inflamação e no desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês, *Gut Associated Lymphoid Tissue*) (SPITS et al., 2013). As ILCs secretam, rapidamente, citocinas efetoras em resposta a sua ativação e são divididas em células T auxiliares (T_h , do inglês, *T Helper Cells*), como T_{h1} , T_{h2} e T_{h17} (NEURATH, 2014; MOWAT; AGACE, 2014).

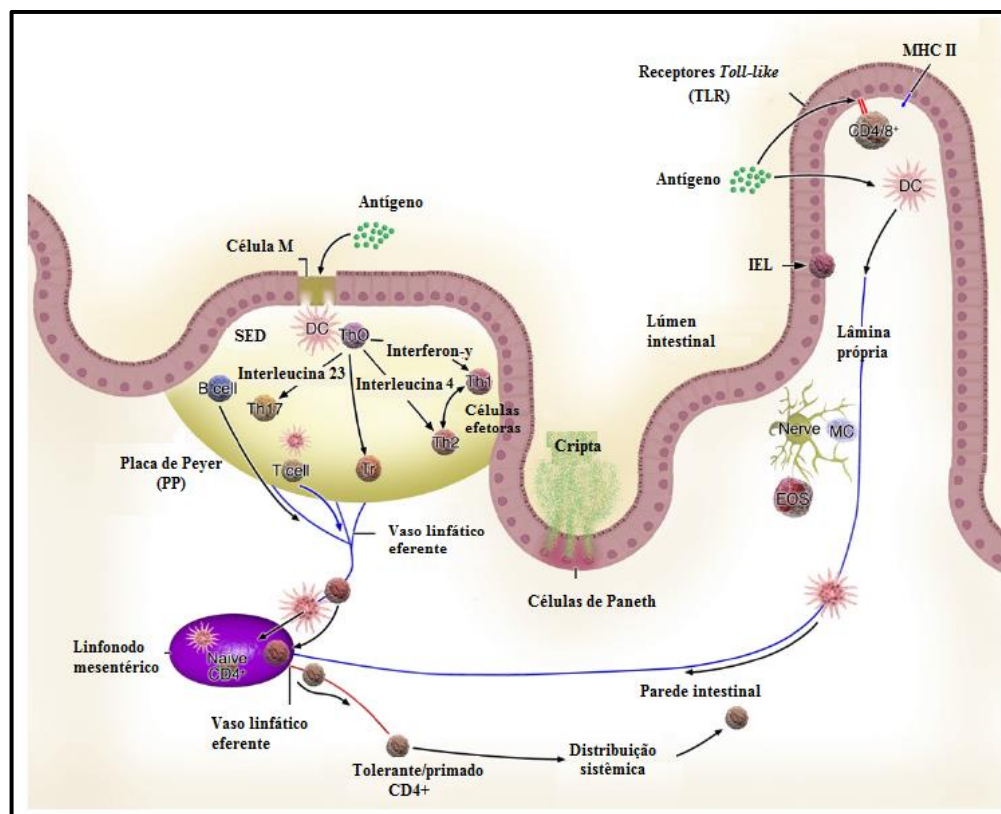
Os MCs são células abundantes na mucosa intestinal de muitas espécies e estão, geralmente, envolvidos em reações alérgicas e nas respostas contra parasitas; o que indica que possuem funções fisiológicas importantes (MARSHALL, 2004). Os MCs podem ser encontrados em todas as camadas do TGI, principalmente na LP e na submucosa, podendo detectar microrganismos usando TLRs. Além disso, os MCs possuem funcionalidades distintas ao longo do intestino como, por exemplo, estarem envolvidos na remodelação do tecido no intestino delgado e estarem envolvidos nas funções inflamatórias no intestino grosso (MOWAT; AGACE, 2014).

Por fim, os EOS possuem função na reparação tecidual e na inflamação, tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso (ROTHENBERG et al., 2001). Os EOS das mucosas também são importantes para a mudança de classe de IgA nas placas de Peyer (PPs, do inglês, *Peyer's Patches*) e para manter o número de células plasmáticas IgA⁺, DCs CD103⁺ e células T_{reg} Foxp3⁺ na LP do intestino delgado. Esses efeitos homeostáticos parecem refletir a habilidade dos EOS em produzir o fator de crescimento TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor*) (CHU et al., 2014).

1.1.2.2 Resposta imune adaptativa

Uma vez ultrapassada as barreiras inatas, o hospedeiro desencadeia respostas imunes adaptativas para continuar no combate ao invasor. O tecido linfóide associado à mucosa (MALT, do inglês, *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) forma o maior órgão imune do corpo, incluindo o GALT. No GALT, os componentes celulares estão localizados em microambientes, como as PPs e os folículos linfóides isolados (ILFs, do inglês, *Isolated Lymphoid Follicles*), na própria mucosa, e os linfonodos mesentéricos (MLNs, do inglês, *Mesenteric Lymph Node*). Suas células consistem em células T e B, células M, DCs, IELs, células de Paneth, dentre outras (Figura 2) (WERSHIL; FURUTA, 2007; MOWAT; AGACE, 2014).

Figura 2 – Sistema imune da mucosa intestinal. Os antígenos podem atravessar o epitélio através das células M ou das DCs. A cúpula subepitelial (SED) é ocupada por linfócitos, incluindo células T_H0 , que, no microambiente de citocinas específicas, diferenciam-se em T_H1 , T_H2 , T_H17 ou T_{reg} . Populações adicionais de linfócitos incluem os IELs que residem justapostos as IECs. Outras células residentes na LP provavelmente participam na resposta imune, como os MC e os EOS.



Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (WERSHIL; FURUTA, 2007).

A Figura 2 apresenta a relação entre a estrutura e a função do GALT. A fase indutiva do sistema imune é compartimentada nas PPs, ILFs e nos MLNs, enquanto o sistema efetor

ocorre ao longo da LP e do epitélio (WERSHIL; FURUTA, 2007; IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

As PPs são órgãos linfóides secundários, presentes no intestino delgado na região do íleo, que consistem em numerosos folículos linfóides de células B, flanqueados por pequenas áreas de células T, e células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *Antigen Presenting Cell*), como os macrófagos e as DCs (WERSHIL; FURUTA, 2007; MOWAT; AGACE, 2014). Já os ILFs consistem em agregados linfóides maduros na mucosa, compostos por células B, DCs e ILCs. Esses folículos linfóides são encontrados por todo o intestino delgado e grosso, desempenhando papel na iniciação de repostas locais mediadas por IgA. Já nos MLNs, ocorre a apresentação de antígenos aos linfócitos T (MOWAT; AGACE, 2014).

As células M diferem das demais células epiteliais pela ausência de microvilosidades e de enzimas hidrolíticas associadas à membrana, apresentando um glicocálice reduzido. Elas expressam E-catepsina e TLR, sendo capazes também de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, as células M estão localizadas, exclusivamente, nos folículos linfóides e são responsáveis, principalmente, pelo transporte vesicular transepitelial dos antígenos do lúmen para os tecidos linfóides subepiteliais (MILLER et al., 2007). É através das células M que ocorre a entrada da maioria dos patógenos intestinais (MABBOTT et al., 2013).

Sob as células M e o epitélio associado ao folículo (FAE, do inglês, *Follicle Associated Epithelium*), existe a camada subepitelial (SED, do inglês, *Subepithelial Dome*), uma área rica em células T, B e DCs. As DCs na SED são capazes de migrar dentro da PPs, adquirindo antígenos na superfície basolateral da célula M e, em seguida, mover-se para área de células T na zona interfolicular, para apresentação de antígenos. Em adição, as DCs migram para locais distantes, incluindo os MLNs, onde podem interagir com células T virgens e, até mesmo, migrar para a LP para administrar respostas imunes (NEWBERRY; LORENZ, 2005; WERSHIL; FURUTA, 2007).

As células B desempenham um importante papel nas respostas imunes através da produção de anticorpos, função de APC e liberação de citocinas, tais como TGF- β e IL-10 (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009). A IgA é o isotipo de imunoglobulina mais abundante nas secreções mucosas (FAGARASAN; HOJON, 2003) e sua produção secretada (SIgA) é dependente da presença de microbiota e do receptor Ig polimérico (pIgR), já que pIgR é necessário para o transporte de IgA para o lúmen (MOWAT; AGACE, 2014). A SIgA é de extrema importância na proteção das mucosas, sendo capaz de neutralizar toxinas, aprisionar antígenos e demais microrganismos presentes no muco, impedindo a invasão das células

epiteliais, ou ainda, transportando de volta para o lúmen antígenos que atravessarem as barreiras inatas (WELLS; MERCENIER, 2008). Em humanos, os anticorpos IgA são divididos em duas classes, o IgA1 e o IgA2, e suas proporções variam ao longo do intestino, sendo o IgA2 a forma predominante na superfície de mucosas (WERSHIL; FURUTA, 2007).

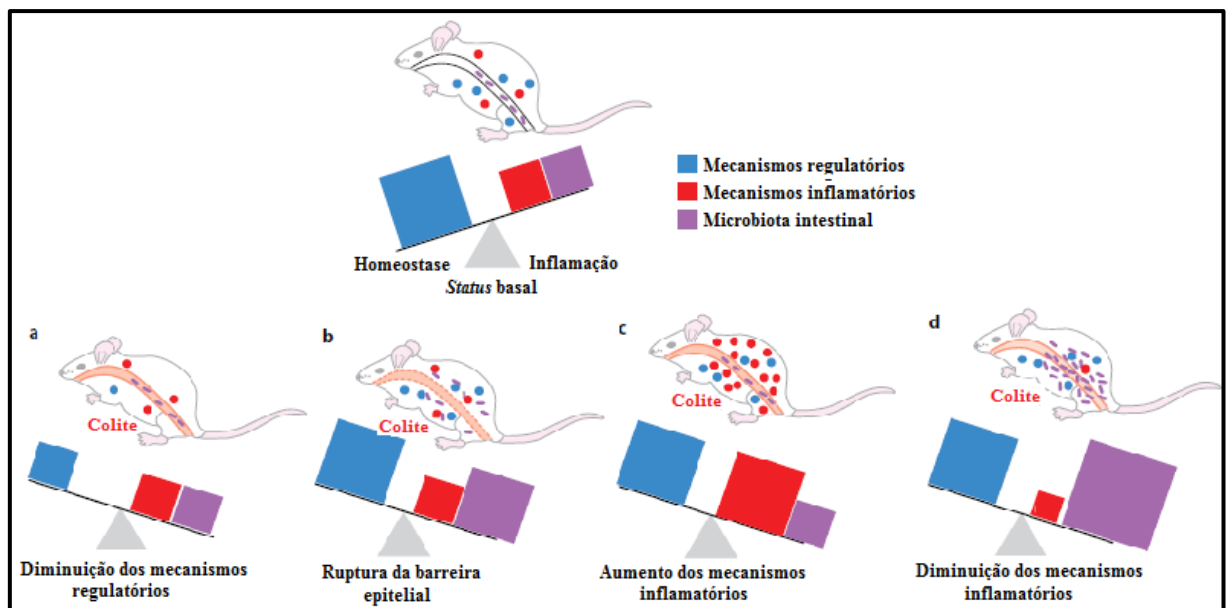
Os linfócitos, tanto T CD4⁺ quanto T CD8⁺, são encontrados em toda LP, sendo os T CD8⁺, preferencialmente encontradas no epitélio. Os T CD4⁺ podem ser divididos em células T_h1, T_h2, T_h17 e células T_{reg}. As células T_h1 produzem citocinas relacionadas, principalmente, com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, como IFN- γ , fatores de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês, *Tumor Necrosis Fator α*) e IL-2, enquanto as células T_h2 secretam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por EOS e MCs. As células T_h17 desempenham um papel crítico na defesa contra uma variedade de bactérias e fungos (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON et al., 2012) e, em condições patológicas, tais como autoimunidade, as células T_h17 acentuam a inflamação (STEINMAN, 2008). Finalmente, as T_{reg} suprimem a função efetora de células T e são essenciais em contra-atacar respostas inflamatórias (POWRIE et al., 2003).

Os IELs localizados na membrana basal, entre os enterócitos, possuem uma ampla variedade de atividades regulatórias e efectoras (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010; CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Sua densidade e composição variam de acordo com a idade, exposição a antígenos, espécie, bem como ao longo do comprimento do intestino (MOWAT; AGACE, 2014).

Resumidamente, os sistemas inato e adaptativo estão intimamente relacionados, já que o sistema adaptativo precisa ser ativado pelo inato para o desempenho de suas funções. Como exemplo, bactérias que conseguem atravessar as barreiras do hospedeiro, seja através do epitélio intestinal íntegro ou lesionado, pelas células M ou ainda pelas DCs, começam induzir repostas imunes. Em um primeiro momento, estas bactérias podem ser capturadas por fagócitos, como os macrófagos, que irão fagocitar e destruí-las, ou pelas APCs, como as DCs, que irão capturar e transportá-las para os linfonodos mesentéricos para apresentação aos linfócitos T. Após essa interação dos linfócitos com as APCs, as células T tornam-se efectoras e irão atuar influenciando as células B a diferenciarem-se em plasmócitos, para produzir e secretar anticorpos, como a IgA. Os macrófagos tornam-se mais eficientes em destruir patógenos em seus fagossomos ou ainda em ativar outras células T a eliminar alvos infectados. Por fim, as células T e B são capazes de criar uma poderosa linha de defesa contra os agentes infecciosos na mucosa intestinal.

Desse modo, percebeu-se em modelos animais que, em um primeiro momento, ocorre inflamação quando os estímulos pró-inflamatórios são aumentados, devido, por exemplo, a uma infecção patogênica. Da mesma maneira, a ruptura da barreira intestinal também pode desencadear uma inflamação intestinal pelo aumento dos estímulos pró-inflamatórios em contato com o sistema imune. Por último, a inflamação também pode resultar do defeito de mecanismos imunorreguladores ou por respostas imunes efectoras excessivas (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002). Corroborando com essa idéia, Izcue; Coombes; Powrie (2009), afirmam que várias razões podem levar a uma inflamação intestinal, conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 – O rompimento da homeostase imune intestinal. Em circunstâncias normais, os mecanismos regulatórios intestinais superam os sinais inflamatórios induzidos pelo sistema imune em reação aos estímulos da microbiota intestinal (*status* basal). Entretanto, esse *status* pode ser alterado por diversas razões. Embora em muitos casos, o resultado final seja uma acumulação de mediadores inflamatórios, as causas podem ser diferentes. a) No caso de uma regulação deficiente, a reação normal do sistema imune para o estímulo intestinal pode resultar numa inflamação crônica. b) A ruptura da barreira intestinal expõe o sistema imune a uma grande quantidade de estímulos pró-inflamatórios que podem descontrolar a regulação intestinal. c) Uma atividade imunológica aumentada também pode levar a inflamação, mesmo se os níveis de regulação e os estímulos pró-inflamatórios permanecerem basais. d) Uma atividade imunológica diminuída também pode aumentar a inflamação. Respostas imunes reduzidas não são suficientes para controlar patógenos oportunistas, de modo que os estímulos pró-inflamatórios microbianos se acumulam e pendem o balanço, causando uma inflamação crônica, apesar de uma redução na reatividade imune basal.



Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

Sendo assim, a perturbação do equilíbrio/homeostase entre a microbiota intestinal, as células epiteliais e o sistema imune do hospedeiro podem contribuir para condições

inflamatórias, tais como as doenças inflamatórias intestinais (IBDs, do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*) (ARTIS, 2008; MALOY; POWRIE, 2011). As IBDs serão o tema de discussão da segunda parte desta introdução.

1.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As doenças inflamatórias intestinais, comumente conhecidas como IBDs, referem-se, principalmente, a duas desordens, a Colite Ulcerativa (UC, do inglês, *Ulcerative Colitis*) e a Doença de Crohn (CD, do inglês, *Crohn's Disease*). Uma das características mais relevantes dessa patologia é a inflamação crônica e descontrolada da mucosa intestinal, que pode afetar qualquer parte do TGI (KHOR; GARDET; XAVIER, 2011; KNIGHTS; LASSEN; XAVIER, 2013; GEMM et al., 2015).

O diagnóstico das IBDs geralmente é baseado nas alterações anatômicas (infiltrado transmural ou superficial granulomatoso) e/ou pela presença de células inflamatórias agudas. Na verdade, o que ocorre nas IBDs é a incapacidade de regular as respostas inflamatórias no intestino. Em um indivíduo saudável, o intestino inflamado, devido a um patógeno, retorna ao seu estado homeostático rapidamente após o agente patogênico ser eliminado. Já em um indivíduo com IBD, a inflamação não é diminuída e o sistema imune da mucosa permanece ativado e o intestino inflamado cronicamente (HANAUER, 2006).

Apesar das IBDs serem doenças idiopáticas, existe o consenso entre os pesquisadores de que ocorrem, basicamente, quatro fatores que contribuem para a inflamação da mucosa. Dentre eles estão as causas ambientais, os fatores genéticos, os defeitos imunorreguladores e a microbiota (HANAUER, 2006; MOLODECKY; KAPLAN, 2010; KHOR; GARDET; XAVIER, 2011; KNIGHTS; LASSEN; XAVIER, 2013; GEMM et al., 2015).

Os fatores ambientais, embora não sejam, exclusivamente, os desencadeadores da doença, podem contribuir para o seu desenvolvimento ou até mesmo servir para agravar os sintomas. Esses fatores incluem: tabagismo, geografia e *status* social, apendicectomia, uso de contraceptivos orais, dieta, uso de antibióticos, hábitos de higiene na infância e até mesmo o *stress* diário (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004; MOLODECKY; KAPLAN, 2010; PONDER; LONG, 2013).

Em relação aos fatores genéticos, a doença possui uma base complexa com muitos genes relacionados, apesar da predisposição genética também não ser a única responsável pelo desenvolvimento da doença (BOUMA; STROBER, 2003). Atualmente, por meio de estudos

de associação genômica, foram identificados muitos *loci* genéticos associados com as IBDs (KHOR; GARDET; XAVIER, 2011; JOSTINS et al. 2012).

Já em referência às alterações imunológicas, a produção excessiva de citocinas, tanto do perfil T_H1 como de citocinas do perfil T_H2 , pode resultar em processos inflamatórios crônicos (HANAUER, 2006; HEILMANN; SUCHODOLSKI, 2015). Assim, a iniciação do processo inflamatório nas IBDs ocorre pela resposta T_H1 , mediada pela secreção de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$, enquanto a inflamação crônica é suportada pela secreção das interleucinas IL-5 e IL-13 pelas células T_H2 (TOMASELLO et al., 2014).

Em condições normais, a microbiota intestinal vive em uma relação simbiótica com o hospedeiro (NEISH, 2009). Entretanto, em casos de disbiose, o desenvolvimento das IBDs está frequentemente associado com distúrbios quantitativos e qualitativos da microbiota intestinal, que possui um papel fundamental na saúde e na progressão dessa enfermidade (TOMASELLO et al., 2014).

De uma forma geral, existem princípios baseados em modelos animais que relacionam os quatro fatores mencionados acima para o desenvolvimento das IBDs. Esses princípios baseiam-se na premissa de que animais com defeitos genéticos diferentes desenvolvem espontaneamente inflamação nas mucosas. Os sete princípios são: 1) anormalidades genéticas diferentes podem levar a características clínicas semelhantes de inflamação intestinal; 2) a genética do hospedeiro determina a susceptibilidade à inflamação intestinal; 3) a microbiota normal é necessária para iniciar ou manter o processo inflamatório intestinal, fornecendo, dessa forma, um ou mais antígenos co-estimuladores que conduzem respostas imunes em hospedeiros geneticamente susceptíveis; 4) a inflamação experimental ocorre como o resultado da função excessiva das células T efectoras ou deficiência de funções de células T_{reg} ; 5) a inflamação da mucosa é quase sempre mediada por duas vias, uma T_H1 excessiva, associada ao aumento na secreção de IL-12, $IFN-\gamma$ e/ou $TNF-\alpha$, ou por uma resposta T_H2 excessiva que está associada com um aumento na secreção de IL-4, IL-5 e/ou IL-13; 6) o epitélio da mucosa tem um papel essencial na separação física da microbiota e as células reativas do sistema imune da mucosa; 7) a patogênese das IBDs pode surgir devido a anormalidades genéticas da imunidade inata que envolve a função das APCs (BOUMA; STROBER, 2003).

Enfim, é provável que cada um desses princípios desempenhe um papel chave na etiologia e na patogênese das IBDs, como na Doença de Crohn.

1.2.1 Doença de Crohn

A Doença de Crohn (CD) tem uma incidência aproximada de 12,7 na Europa, 5,0 na Ásia e no Oriente Médio e 20,2 na América do Norte por 100.000 habitantes/ano, enquanto a sua prevalência é de 322 na Europa e 219 na América do Norte por 100.000 habitantes/ano (MOLODECKY et al., 2012). O Brasil, infelizmente, não dispõe de dados epidemiológicos consistentes, devido à dificuldade do diagnóstico e da carência de informações, mas sabe-se que a CD é mais incidente em brancos e pardos do que em negros e amarelos (SCHOFFEN; PRADO, 2011). Sua ocorrência tem aumentado nas últimas quatro décadas, sendo mais prevalente em países desenvolvidos e urbanizados (MOLODECKY; KAPLAN, 2010; PONDER; LONG, 2013).

O aparecimento da CD ocorre, geralmente, na faixa etária entre 15 e 40 anos, acometendo dessa forma, adolescentes e adultos (NEURATH, 2014). No entanto, já foram relatados casos em crianças (SILVEIRA et al., 2008; SCHOFFEN; PRADO, 2011). Os pacientes acometidos por essa doença tem uma expectativa de vida, ligeiramente, reduzida (BAUMGART; SANDBORN, 2012). De acordo com o trabalho realizado por Peyrin-Biroulet et al. (2010), baseado em dados de base populacional entre 1935 e 2008, os autores obtiveram as seguintes informações: 50% dos pacientes com Crohn tiveram seu diagnóstico entre os 20 anos de idade, 10% tiveram remissão clínica, 20% foi a incidência anual de internações, 50% dos pacientes requereram cirurgia dentro dos 10 anos após o diagnóstico, 44-55% tiveram risco de recorrência pós-operatório após 10 anos.

Essa doença pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, contudo, as regiões do íleo terminal, o ceco, a região perianal e o cólon são as mais afetadas. A inflamação é salteada, caracterizando-se pela presença de segmentos de intestino normal com regiões afetadas e sua histologia é transmural, ou seja, afeta todas as camadas da parede do intestino. Em adição, sua histologia também apresenta densa infiltração de linfócitos e macrófagos, a presença de granulomas em até 60% dos pacientes, ulcerações e fibrose na submucosa (BOUMA; STROBER, 2003).

Os sintomas são caracterizados por diarreia, cólicas abdominais, febre, anemia, perda de peso e fadiga. Além disso, o indivíduo acometido pode apresentar complicações, como por exemplo, estenose, formação de abscessos, fístulas e câncer de cólon (NEURATH, 2014). O tratamento da doença, geralmente, é realizado com a administração de elevadas doses de esteróides, imunomoduladores, como azatioprina e 6-mercaptopurina, e até mesmo cirurgia em casos mais severos da doença (HANAUER, 2006). Esses tratamentos objetivam controlar

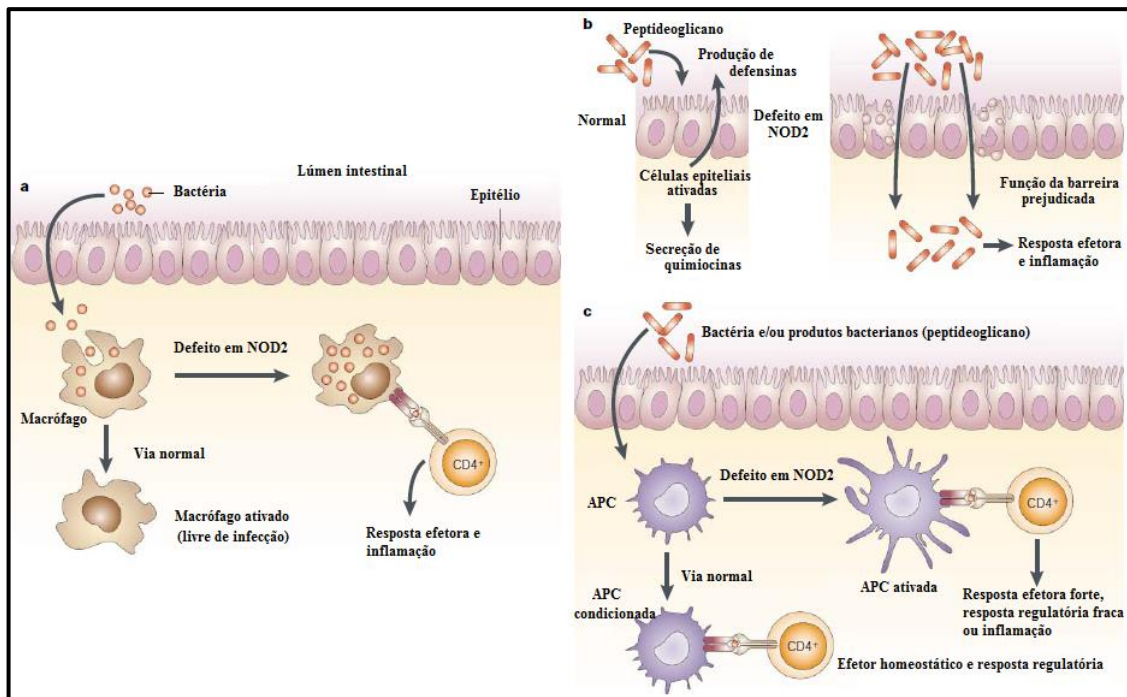
a inflamação nos pacientes, contudo, estão associados com sérios efeitos colaterais, como febre, náuseas, vômitos, diarreia e problemas no fígado (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

A CD pode ser ocasionada por múltiplos fatores, contudo, mesmo não conhecendo ao certo seu agente etiológico, é possível sugerir alguns mecanismos associados ao seu desenvolvimento como, por exemplo, as mutações atreladas à proteína NOD2 (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing 2*) e aos mecanismos imunológicos (BOUMA; STROBER, 2003; FOERSCH; WALDNER; NEURATH, 2013; GEREMIA et al., 2014).

NOD2 foi o primeiro gene de susceptibilidade para CD descrito (OGURA, 2001). Esse gene é expresso em monócitos e macrófagos, onde desempenham importante papel em vias de sinalização hospedeira (PODOLSKY, 2002). NOD2, também conhecida como CARD15 (do inglês, *Caspase Recruitment Domain Family Member 15*), compreende estruturalmente dois domínios efetores amino-terminal (CARDs, do inglês, *Caspase Recruitment Domain*), um domínio central (NOD) e múltiplas repetições leucina na porção carboxi-terminal (LRR, do inglês, *Leucine-Rich Repeat*); a qual é responsável pelo reconhecimento bacteriano (INOHARA; OGURA; NUÑEZ, 2002). O sequenciamento do gene NOD2, em pacientes com CD, indicou a inserção de uma citosina na posição 3.020 no éxon 11, dando origem a um *stop* códon e, conseqüentemente, uma proteína NOD2 truncada (HUGOT et al., 2001). Uma NOD2 truncada está associada com a susceptibilidade a doença, pois é deficiente em induzir a ativação do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B, do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) mediada por lipopolissacarídeos (LPS) (OGURA, 2001). Outros polimorfismos também foram identificados, incluindo duas mutações *missense* – 2.722G→C [Gly908Arg] e 2.104C→T [Arg702Trp] (HUGOT et al., 2001).

Concomitantemente ao mencionado anteriormente, há ainda três possíveis explicações para a patogênese da CD devido a mutações em NOD2 (Figura 4). A primeira hipótese, é que na ausência de NOD2, ocorre uma ativação defeituosa dos macrófagos e, conseqüentemente, sua ativação persistente, devido a uma resposta controlada por células T efectoras, independentemente de NOD2. A segunda hipótese é que, na ausência de expressão de NOD2 pelas células epiteliais, não há secreção de quimiocinas e defensinas, levando a proliferação de bactérias nas criptas e a perda da função da barreira intestinal, permitindo a estimulação acentuada de células da mucosa por antígenos. E a terceira hipótese é que o reconhecimento de peptídeos microbianos por NOD2, nas APCs, leva à indução de repostas mediadas por células T efectoras e reguladoras; a falha desse mecanismo pode perturbar a homeostase intestinal (BOUMA; STROBER, 2003).

Figura 4 – Possíveis mecanismos de indução da CD causada por mutações em NOD2. a) A função defeituosa dos macrófagos leva a sua ativação intracelular persistente e estimulação crônica de células T. b) A resposta defeituosa das células epiteliais levam a perda da função da barreira e aumento da exposição à microbiota presente na mucosa. c) Um acondicionamento defeituoso de antígenos nas APCs leva a sua ativação inadequada e a uma ruptura do balanço homeostático de células efetoras e reguladoras.



Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (BOUMA; STROBER, 2003).

A respeito dos aspectos imunológicos, sabe-se que a CD é caracterizada por uma resposta imune T_H1 (FOERSCH; WALDNER; NEURATH, 2013; GEREMIA et al., 2014) que se inicia com a ativação de STAT1 e STAT4 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) por IL-12 e IFN- γ (MURPHY et al., 2000). Uma resposta T_H1 anormal, desencadeada pelo aumento dos níveis da IL-12, ocasiona inflamações (RIMOLDI, 2005). Além disso, as células T_H17 também têm sido associadas com a CD. Uma resposta T_H17 é ativada logo após a detecção extracelular de bactérias e fungos, e sua diferenciação é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6, IL-23 e TGF- β , por meio de STAT3 e ROR γ t (do inglês, *Related Orphan Receptor*) (SCHRAMML et al., 2009).

Por fim, levando-se em consideração que, até o presente momento, não se tem o conhecimento completo do agente causal da CD e também da necessidade de desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para os pacientes, faz-se necessário o estudo e a busca por novas estratégias terapêuticas para essa IBD. Dessa forma, os modelos animais

são ferramentas indispensáveis para a compreensão adequada das alterações histopatológicas e morfológicas do intestino, do mesmo modo que desempenham um importante papel no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas para a CD.

1.2.2 Modelo murino de inflamação intestinal

Os modelos animais de inflamação intestinal são indispensáveis para compreensão de vários aspectos da patogênese das IBDs e das condições inflamatórias agudas. Esses modelos têm importantes aplicações, que incluem análises dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução e regulação da inflamação intestinal, assim como as contribuições dos microrganismos e seus fatores de virulência na inflamação aguda e crônica (NELL; SUERBAUM; JOSENHANS, 2010).

Existem vários modelos estabelecidos para se estudar a inflamação intestinal, como o modelo de colite induzido por substância química, como o TNBS (do inglês, 2, 4, 6-*Trinitrobenzene Sulfonic Acid*) e o DSS (do inglês, *Dextran Sodium Sulphate*), o modelo de transferência adoptiva, o modelo de colite espontânea e o modelo animal transgênico/geneticamente modificado (RANDHAWA et al., 2014). Dentre os modelos citados, os induzidos quimicamente são os mais comumente usados para o estudo das IBDs, visto que o início da inflamação é imediato, o procedimento é, relativamente, simples e se assemelha a importantes aspectos imunológicos e histopatológicos das IBDs humanas (WIRTZ et al., 2007).

O modelo murino induzido por TNBS esclarece respostas imunes e induz uma inflamação transmural no intestino com características morfológicas e histopatológicas semelhante às IBDs humanas (DE ALMEIDA et al., 2013; CHEON, 2012). Além disso, o TNBS induz uma inflamação difusa no cólon, caracterizada por um aumento da infiltração de leucócitos, edema e ulceração (ISIK, 2011). Também foi relatado que a administração de TNBS está associada com a ativação de resposta imune mediada por células T_{h1} , manifestada pela infiltração local de células $T CD4^+$. Sendo assim, devido a uma resposta imune T_{h1} envolvendo as citocinas efetoras IL-12 e TNF- α , esse modelo foi, especificamente, relacionado com a CD em humanos (ELSON et al., 1995; NEURATH et al., 1995).

Sendo assim, o modelo murino induzido por TNBS é muito útil e frequentemente utilizado no estudo de diversos aspectos da inflamação do intestino, incluindo padrão de secreção de citocinas, adesão celular e a imunoterapia (RANDHAWA et al., 2014; KIESLER;

FUSS; STROBER, 2015). Além do mais, esse modelo murino já foi padronizado e utilizado com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa (DEL CARMEN et al., 2013; SOUZA, 2015).

1.2.3 Moléculas terapêuticas para o tratamento da Doença de Crohn

Como a CD possui uma condição crônica, sem cura e que requer cuidados por toda a vida, faz-se necessário a busca por novos tratamentos, uma vez que os existentes geram resultados clínicos insatisfatórios e muitos efeitos colaterais. Algumas abordagens terapêuticas visam a utilização de citocinas para o tratamento dessa enfermidade, já que estas possuem um papel importante na indução da inflamação intestinal, complicações locais (câncer colorretal) e, até mesmo, manifestações em pacientes com IBDs (Tabela 1) (NEURATH, 2014).

Tabela 1 – Atividade das citocinas relacionadas na patogênese das IBDs.

Citocina	Fonte na mucosa	Potencial função na patogênese da inflamação intestinal crônica
IFN- α e IFN- β	DCs	Promove a regeneração epitelial e induz a proliferação celular de IL-10
IFN- γ	Células T e ILCs	Ativa macrófagos, aumenta o processamento de antígenos e induz a morte das células epiteliais
TNF	Macrófagos, DCs e células T	Ativa fibroblastos, estimula a produção de citocina pró-inflamatórias e a angiogênese, induz a morte de células epiteliais, medeia a resistência de células T contra a apoptose e induz caquexia
IL-1	Neutrófilos e macrófagos	Aumenta o recrutamento de neutrófilos, estimula a produção de IL-6 por macrófagos, ativa ILCs e promove o desenvolvimento de tumores
IL-6	Macrófagos, fibroblastos e células T	Ativa as células T e previne a apoptose, induz a ativação dos macrófagos, recruta células imunes, ativa proteínas de fase aguda, induz a proliferação de células epiteliais e favorece crescimento tumoral
IL-10	Células T	Suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias por APCs e células T e induz a sinalização de STAT3 nas células T reguladoras
IL-12	Macrófagos e DCs	Induz a diferenciação de células T _H 1 via STAT4, estimula a produção da citocina T _H 1 e ativa ILCs
IL-13	Células T e iNKT	Induz alterações de células epiteliais intestinais e a função de barreira
IL-17A e IL-17B	Células T e ILCs	Induz efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na mucosa e exerce funções pró-fibróticas
IL-18	Macrófagos, DCs e células epiteliais	Aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias
IL-21	Células T _H 1	Induz a produção de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 na mucosa, recruta neutrófilos, induz secreção de metaloproteinases de matriz por fibroblastos e

		favorece o desenvolvimento de tumores
IL-22	Células $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$, ILCs, neutrófilos e DCs	Ativa a produção de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais, induz a proliferação de células epiteliais e favorece o desenvolvimento de tumor via ativação de STAT3
IL-23	Macrófagos e DCs	Ativa as células imunes das mucosas, tais como as células T e macrófagos, aumenta a produção de TNF e estabiliza o fenótipo de células efectoras T_H17
IL-27	Macrófagos	Exerce efeitos pró-inflamatórios por meio da indução da ativação de células T e produção de citocinas do tipo T_H1 e exerce efeitos anti-inflamatórios por meio do bloqueio da expansão das células T e inibição da produção de citocinas por neutrófilos
IL-33	Células epiteliais e miofibroblastos	Suprime a produção de citocinas do tipo T_H1 e induz influxo de neutrófilos
IL-35	DCs	Bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes da mucosa
IL-37	Células epiteliais	Suprime as respostas imunes inatas da mucosa e reduz a produção de IL-1 β e TNF

Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (NEURATH, 2014).

Segundo Biondo-Simões et al. (2003), existem quatro meios pelos quais os efeitos de uma citocina podem ser reduzidos, sendo eles: o bloqueio da sua produção; a inibição do processo intracelular de produção da proteína ativa; a neutralização da citocina na circulação e o bloqueio do seu receptor. Nesse aspecto, como a CD resulta de uma inflamação mediada por uma resposta T_H1 , a inibição das interleucinas IL-12 e/ou IL-23 seria uma forma de controle dessa via (BOUMA; STROBER, 2003). Além disso, a utilização de anticorpo monoclonal específico para TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, teve efeito positivo no tratamento da CD em pacientes. Esse sucesso se deve ao fato de que o anticorpo induziu apoptose de células efectoras T_H1 , que expressavam TNF- α em sua superfície celular (TARGAN, 2000).

Outra abordagem para o tratamento da CD é a entrega de moléculas com potencial terapêutico nos sítios de inflamação. Nesse contexto, recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu duas estratégias utilizando as citocinas IL-10 e IL-4 (ZURITA-TURK et al., 2014; SOUZA, 2015). Zurita-Turk et al. (2014) desenvolveu linhagens carreadoras do plasmídeo pValac:IL-10 que foram capazes de atenuar e diminuir a inflamação nos animais tratados (modelo murino de TNBS e DSS), por meio da formação de um ambiente anti-inflamatório pela produção da IL-10. Além disso, pValac:IL-10 foi capaz de diminuir os índices macroscópicos e microscópicos nos animais tratados, assim como os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 no modelo TNBS e TNF- α , IL-6 e IL-17 no modelo DSS. Já SOUZA (2015) desenvolveu linhagens carreadoras do plasmídeo pValac::dts::IL-4 para o tratamento da CD, em modelo para TNBS. Em seus resultados foi possível observar

uma redução da severidade da colite, bem como reduzidos níveis de citocinas T_{h1} , como IL-12, TNF- α e IL-6, e níveis elevados de citocinas T_{h2} , como IL-4 e IL-10.

Apesar desses resultados promissores envolvendo as citocinas, ainda faz-se necessário a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento das IBDs. Dessa forma, as proteínas do choque térmico (HSPs), consideradas imunorreguladoras, poderiam ser uma nova alternativa para manter a homeostase intestinal em pacientes como a CD. As HSPs serão o tema de discussão a terceira parte desta introdução.

1.3 PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO – HSPs

As proteínas do choque térmico, também conhecidas como *Heat Shock Proteins* (HSPs), são chaperonas importantes para sobrevivência das células procarióticas e eucarióticas. Estas proteínas são essenciais para diversos processos celulares, tais como o dobramento de proteínas, a proteção das proteínas contra a desnaturação ou agregação e o transporte de proteínas através dos canais de membrana (WALLIN et al., 2002).

As HSPs são classificadas em famílias de acordo com seu peso molecular monomérico como, por exemplo: HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100. As famílias foram altamente conservadas ao longo do processo evolutivo e são encontradas em todas as formas de vida e em uma variedade de locais intracelulares, de modo que existem alguns membros de famílias de mamíferos que possuem homólogos microbianos altamente conservados; o que pode resultar em um reconhecimento imunológico cruzado entre elas (SRIVASTAVA, 2002; VAN EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKEN, 2005). Como exemplo, os anticorpos e células T contra HSP60 e HSP70, bacterianas, também reconhecem HSP60 e HSP70, mamíferas, respectivamente, devido à reatividade cruzada (TSAN; GAO, 2004).

Essas proteínas são expressas constitutivamente nas células em condições normais, entretanto, sobre condições de estresse, elas passam a ser superexpressas. Normalmente, as HSPs constituem 5% do total de proteínas intracelulares e sobre condições adversas elas passam a representar 15% ou mais (SRIVASTAVA, 2002). Dentre essas condições adversas, inclui-se o aumento da temperatura, a deficiência nutricional, a exposição a mediadores pró-inflamatórios (TNF e IFN- γ), o estresse oxidativo, o tratamento com drogas anti-inflamatórias não esteroides, a infecção viral, a radiação ultravioleta, os metais pesados e as neoplasias (TSAN; GAO, 2004; VAN EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKEN, 2005). Essas condições

citadas acarretam em dobramentos incorretos ou agregações proteicas que desencadeiam uma resposta ao *stress* e induzem a transcrição dos genes das HSPs (POCKLEY, 2001).

A regulação da transcrição dos genes das HSPs é mediada pela interação entre fatores de transcrição, como o fator de choque térmico (HSF, do inglês, *Heat Shock Factor*) e o elemento de choque térmico (HSE, do inglês, *Heat Shock Elements*). Assim, em condições normais, o HSF1, o principal fator em vertebrados, está presente no citoplasma como uma molécula monomérica latente que é incapaz de se ligar ao DNA. Porém, sobre condições estressantes e com o fluxo de proteínas não funcionais, HSF1 é fosforilado e trimerizado. Posteriormente, esses trímeros translocam-se do citoplasma para o núcleo e se ligam a regiões promotoras, mediando a transcrição dos genes de HSPs (POCKLEY, 2001).

Além das funções descritas anteriormente, e dado à versatilidade funcional das HSPs como importantes antígenos/proteínas imunogênicas (MOUDGIL et al., 2013), essas proteínas podem ser utilizadas como agentes terapêuticos para a geração de uma imunidade protetora ou ainda para a regulação das condições inflamatórias (POCKLEY, 2001; KEIJZER et al., 2012).

1.3.1 HSP60: Imunodominância e a inflamação

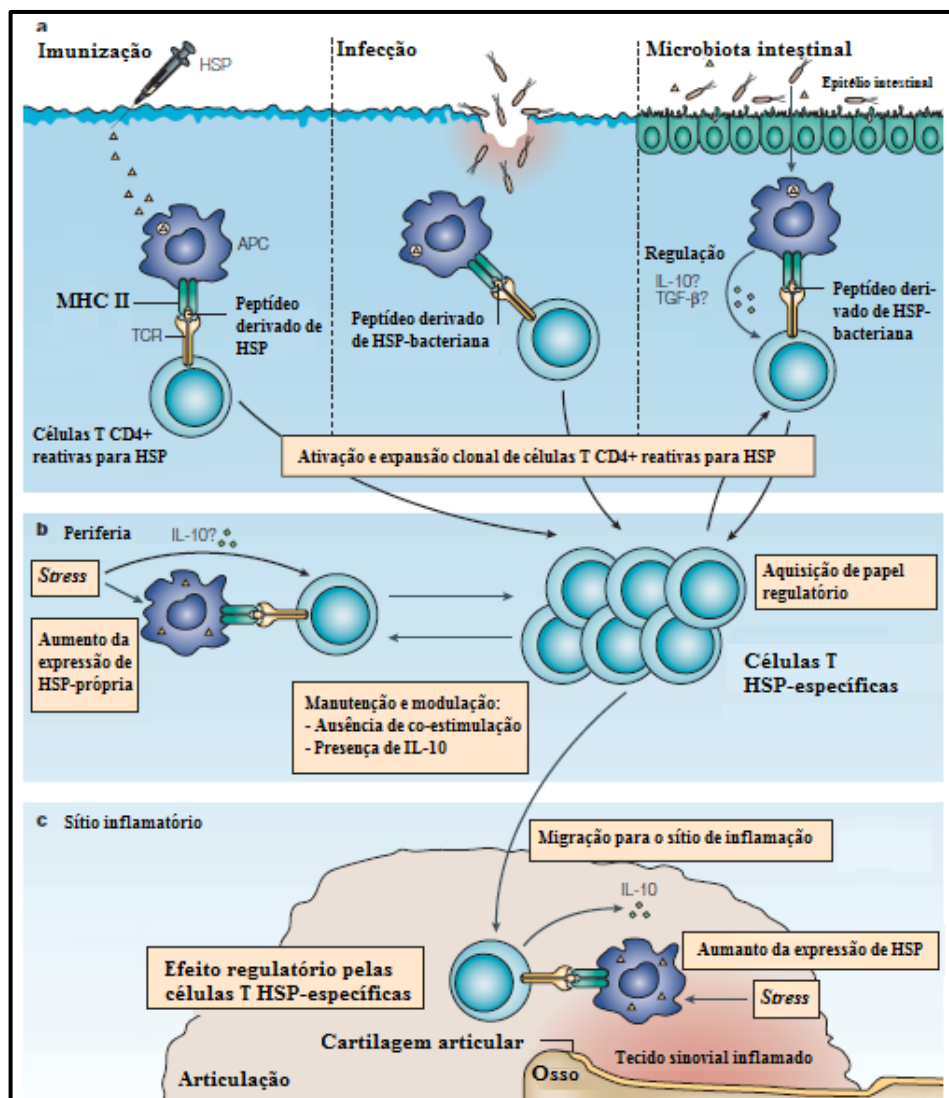
As HSP60 são consideradas antígenos imunodominantes. Dessa forma, as respostas geradas para essas proteínas, provavelmente, resultam de vários fatores que estão relacionados com suas funções.

De acordo com Van Eden; Van Der Zee; Prakken (2005), existem três fatores que, possivelmente, explicam essa característica: a) devido ao fato das HSPs serem moléculas conservadas, a resposta imunológica gerada é inicialmente direcionada para as regiões fortemente conservadas dessas proteínas para que sejam reconhecidas por células de memória, previamente, dirigidas contra bactérias não relacionadas; b) durante uma infecção, um microrganismo, em resposta ao *stress*, responde aumentando os níveis de expressão de suas próprias HSPs, as quais tornam-se disponíveis para o reconhecimento pelas células imunes do hospedeiro; e c) as HSPs, como resultado ao *stress*, podem associar-se com outras HSPs, com antígenos ou proteínas microbianas. Como consequência, as células B podem internalizar uma HSP associada a antígenos microbianos, através de BCRs (do inglês, *B-Cell Receptor*) específicos e, dessa forma, processar ambos e apresentar os peptídeos derivados via moléculas

de MHC de classe II (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) para reconhecimento pelas células T_h.

Nesse contexto, as HSP60 são proteínas imunogênicas importantes relacionadas à regulação do sistema imune por meio da ativação de células T (Figura 5).

Figura 5 – Interações celulares induzem o modo de regulação em células T HSPs-específicas. a) Células T HSPs-específicas podem ser ativadas ou clonalmente expandidas pela exposição artificial através de imunização com HSPs, ou naturalmente, durante uma infecção bacteriana ou pela microbiota comensal. É possível que a exposição de células T às HSPs da microbiota intestinal no MALT defina o modo de regulação através de mecanismos de tolerância à mucosa. b) Na periferia, a manutenção e a modulação desse repertório pode ocorrer após a exposição de células T ao *stress* ou pela expressão de HSPs-próprias por APCs na ausência de co-estimulação, ou ainda, ocorrer por meio da ligação a peptídeos alterados das HSPs-próprias nas células T HSPs-específicas bacterianas. c) As células T HSPs-específicas exercem o seu efeito regulador quando exposto a HSPs que são expressas no sítio da inflamação.



Fonte: Adaptado pela autora de acordo com a bibliografia estudada (VAN EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKEN, 2005).

A figura 5 apresenta como as HSPs bacterianas, pelo contato artificial ou natural, levam à ativação de células T HSPs-específicas e como essas, por sua vez, exercem suas atividades imunorreguladoras para expressão de mais HSPs-próprias no tecido inflamado. Assim, o complexo HSP-peptídeo interage com as APCs, como os macrófagos e as DCs, levando à apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esse complexo também leva a uma cascata de eventos antígenos não específicos que ativam as APCs para a ativação de respostas imunes (SRIVASTAVA, 2002). Essa ativação, provavelmente, ocorre pelos receptores de superfície celular, tais como: CD91, CD40, LOX-1, CD36, TLR-2, TLR-4 e SR-A (BINDER; VATNER; SRIVASTAVA, 2004).

Em específico, as HSP60, via TLR-2, são capazes de inibir a quimiotaxia de células T e, conseqüentemente, levar a uma diminuição da sua migração (ZANIN-ZHOROV et al., 2003; ZANIN-ZHOROV et al., 2005a). Além disso, as HSP60 funcionam como co-estimuladoras de células T regulatórias (T_{regs}) (ZANIN-ZHOROV et al., 2006) e também modulam a expressão de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células T (ZANIN-ZHOROV et al., 2005b), diminuindo a expressão dos fatores de T_h1, como T-bet, NF-κB e NFATp, e aumentando os de T_h2, como o GATA-3. Desse modo, células T ativadas por HSP60 diminuem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IFN-γ) e aumentam a secreção de citocinas regulatórias, como a IL-10 (ZANIN-ZHOROV et al., 2005b).

Assim, as HSP60s parecem ser interessantes antígenos para o tratamento de doenças inflamatórias pois, além dos efeitos referidos, a sua expressão pode ser regulada no local da inflamação. Estudos demonstraram o potencial imunorregulador dessas proteínas em diversos processos inflamatórios, tais como artrite reumatoide (VAN HERWIJNEN et al., 2013; ULMANSKY et al., 2015), diabetes tipo 1 (BRUGMAN et al., 2004; LU et al., 2016), aterosclerose (HARATS et al., 2002; MARON et al., 2002) e alergia nas vias aéreas (RHA et al., 2002).

Nesse contexto, dentre os membros da família das HSP60, encontram-se as proteínas Hsp65 que também possuem um grande potencial para utilização em processos inflamatórios.

1.3.2 Hsp65 e suas aplicações

Neste contexto, foi construído um sistema de expressão da proteína recombinante de 65 kDa de *Mycobacterium leprae*, utilizando-se *Lactococcus lactis* como célula hospedeira (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012). Desde então, Hsp65 tem sido aplicada com

sucesso na prevenção e/ou tratamento de alguns modelos experimentais de doenças inflamatórias como a colite ulcerativa (SANTOS, 2011) a encefalomielite (REZENDE et al., 2013) e a diabetes tipo 1 (OLIVEIRA, 2014).

No modelo de colite induzido por DSS, Santos (2011) constatou que após a administração oral de *L. lactis*, expressando Hsp65, houve uma redução da perda de peso, bem como diminuição da diarreia e do sangramento retal pelos camundongos tratados. Além disso, a proteção da mucosa foi acompanhada por níveis diminuídos de TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-5, aumento de IL-10 no cólon e de células T_{regs} no baço. Em camundongos IL-10^{-/-}, a administração dessa molécula reduziu os sinais da inflamação e aumentou a frequência de células T_{regs} CD4⁺LAP⁺ e os níveis de TGF- β no cólon.

Segundo Rezende et al. (2013), a administração oral de *L. lactis*, expressando Hsp65, foi capaz de impedir o desenvolvimento de encefalomielite auto-imune experimental. Esses dados foram corroborados pelo reduzido infiltrado celular inflamatório e ausência de sinais de lesão na medula espinhal. Além do mais, houve uma redução de IL-17 e aumento de IL-10 nos linfonodos mesentéricos e na cultura celular de baço. Os animais que receberam essa linhagem tiveram também um aumento de T_{regs} CD4⁺Foxp3⁺ e T_{regs} CD4⁺LAP⁺ no baço, linfonodo mesentérico e inguinal e na medula espinhal.

Ainda utilizando a mesma estratégia, agora para diabetes de tipo 1, Oliveira (2014) verificou que a administração de *L. lactis*, expressando Hsp65, levou a uma expansão de células T_{regs} CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ no baço e nos linfonodos mesentéricos dos animais imunizados.

Assim, esse sistema de expressão, baseado no uso de *L. lactis* como célula hospedeira, pode ser utilizado para a entrega de Hsp65 diretamente às células da mucosa intestinal, sendo uma estratégia promissora para imunorregulação local em modelos murinos de CD. *L. lactis*, por sua vez, é muito utilizada para a produção e entrega de diversas proteínas ao nível de mucosas e pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico; tema de discussão da quarta parte desta introdução.

1.4 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO

As bactérias lácticas (LAB, do inglês, *Lactic Acid Bacteria*) compõem um grupo diverso de microrganismos, que compartilham entre si um conjunto de características, tais como: microrganismos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não produtores de catalase,

não formadores de esporos, imóveis e capazes de converter açúcares em ácido láctico (AZEVEDO; MIYOSHI, 2004). A produção de ácido láctico é a característica que nomeia o grupo (MARTINEZ et al., 2013). As LAB incluem cocos e bastonetes que possuem em seu genoma uma porcentagem G+C inferior a 50% (MIYOSHI et al., 2010) e são representadas pelos gêneros: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dentre outros (WYSZYŃSKA et al., 2015).

As LAB possuem uma longa e segura relação com os seres humanos, dado que são utilizadas desde os tempos antigos para produção e conservação de alimentos, tais como fermentação do leite para produção de queijos e iogurtes (WELLS; MERCENIER, 2008). Dessa maneira, por serem consumidas há séculos e não terem sido associadas a efeitos patogênicos, muitas LABs possuem o *status* GRAS (do inglês, *Generally Regarded as Safe*) da FDA (do inglês, *American Food and Drug Administration*) (DANIEL et al., 2011).

Existem muitos relatos sobre os efeitos probióticos das LABs, com a função, principalmente, de impedir e/ou diminuir a colonização intestinal por microrganismos patogênicos ou interagir com o GALT, a fim de evitar respostas inflamatórias e promover um estado de tolerância. Assim, dentre as espécies conhecidas como probióticas, destacam-se: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *B. longum* e *B. breve* (QUINTO et al., 2014).

Além da importância econômica na indústria alimentícia e das funções probióticas das LAB, há também grande interesse em novas aplicações biotecnológicas para essas bactérias, como a produção de proteínas heterólogas, de importância econômica e biotecnológica, e também a construção de vacinas vivas de mucosas, para a entrega de proteínas ou vacinas de DNA, diretamente ao hospedeiro (AZEVEDO; MIYOSHI, 2004; PONTES et al., 2011).

1.4.1 *Lactococcus lactis* – A bactéria láctica modelo

L. lactis é uma espécie heterofermentativa facultativa e mesófila. Dentre as LAB, essa é a espécie melhor caracterizada, possuindo seu genoma sequenciado (BOLOTIN et al., 1999; WEGMANN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014) e configurando-se como um organismo modelo para o estudo das mesmas (MIYOSHI et al., 2004; PONTES et al., 2011).

Devido ao fato de *L. lactis* possuir *status* GRAS e ser de fácil manipulação laboratorial, um grande número de instrumentos genéticos (sistemas de expressão de proteínas heterólogas e linhagens, geneticamente modificadas, para a entrega de vacinas de DNA, diretamente no interior de células eucarióticas) foram desenvolvidas (MIYOSHI et al., 2010; BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2011). Além disso, *L. lactis* ainda apresenta outras características que favorecem sua utilização tanto para produção e a entrega de proteínas heterólogas quanto para a entrega de vacinas de DNA. Dentre essas características, pode-se citar: a) serem capazes de resistir ao ambiente ácido do estômago, o que permite que as células bacterianas cheguem íntegras ao sítio alvo, neste caso, a mucosa intestinal (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2011); b) não possuírem LPS em sua parede celular, eliminando, dessa maneira, os riscos de choque por endotoxinas (BAHEY-EL-DIN; GAHAN, 2011) e c) não imunogênicas, podendo ser utilizadas em programas de imunização (WELLS; MERCENIER, 2008).

1.4.2 *Lactococcus lactis* e a expressão de proteínas heterólogas

Dentre os mais promissores sistemas de expressão de proteínas heterólogas para uso em *L. lactis*, pode-se destacar o sistema XIES (do inglês, *Xylose Inducible Expression System*). Este sistema foi desenvolvido para expressão de proteínas heterólogas na linhagem *L. lactis* NCDO2118 (*L. lactis* subsp. *lactis*) e é composto por um plasmídeo contendo: a) o promotor induzido por xilose (P_{xyIT}); b) um sistema de endereçamento proteico (citoplasmático, CYT ou secretado, SEC), constituído pelo sítio de ligação ao ribossomo (RBS, do inglês, *Ribosome-Binding Site*) e o peptídeo sinal (SP, do inglês, *Signal Peptide*) da proteína Usp45 de *L. lactis*; c) duas origens de replicação, sendo repA de *L. lactis* e repC de *Escherichia coli*, e d) o gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (MIYOSHI et al., 2004).

Este sistema foi utilizado com sucesso, demonstrando ser capaz de: (i) produzir níveis elevados da proteína modelo nuclease de *Staphylococcus aureus* (NUC, do inglês, *Nuclease Gene*), comparáveis apenas aos níveis até hoje obtidos utilizando-se o sistema de expressão controlado por Nisina (NICE, do inglês, *Nisin-Controlled Expression System*); (ii) endereçar corretamente o produto final para o citoplasma ou meio extracelular; e (iii) permitir “ligar ou desligar” a expressão gênica pela simples adição de xilose ou glicose, respectivamente; o que o difere de todos os sistemas até hoje desenvolvidos. O sistema apresenta ainda outras

vantagens, como ser de fácil manipulação, menos dispendioso e, principalmente, mais seguro para uso humano e animal (MIYOSHI et al., 2004).

Outros trabalhos foram realizados utilizando-se *L. lactis* e o sistema XIES de produção proteica. O sistema XIES, codificando a proteína IL-10 (pXYCYT:IL-10 e pXYSEC:IL-10), foi utilizado para o tratamento da CD, no modelo murino induzido por TNBS. Os resultados mostraram-se bastante promissores na redução do *score* de danos no intestino grosso e na redução dos níveis de IFN- γ nos fluidos intestinais (MARINHO et al., 2010; DEL CARMEN et al., 2011).

Além do mais, em um estudo mais recente do nosso grupo de pesquisa, descobriu-se que a linhagem *L. lactis* NCDO2118 possui efeitos imunomoduladores. A administração de *L. lactis* NCDO2118 selvagem, em modelos animais para colite induzida por DSS, teve efeitos anti-inflamatórios interessantes, como o aumento de células T_{regs} CD4⁺ e a manutenção dos níveis de IL-10 (LUERCE et al., 2014).

1.4.3 *Lactococcus lactis* e a entrega de vacinas de DNA

Como pode-se constatar, a utilização de *L. lactis*, para a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico é hoje uma realidade e à medida que novas informações e novos instrumentos genéticos são gerados, novas possibilidades de uso são vislumbradas. Nesse contexto, a utilização de *L. lactis* como um veículo carreador de vacinas de DNA poderia ser considerada a próxima fronteira a ser quebrada na área.

Para tanto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova linhagem de *L. lactis*, [*L. lactis* MG1363 (*L. lactis* subsp. *cremoris*)] que, após ter sido transformado com o plasmídeo pOri23-fnbA (FnBPA⁺), passou a expressar, constitutivamente, a proteína A de ligação a Fibronectina (FnBPA, do inglês, *Fibronectin-Binding Protein A*) de *Staphylococcus aureus* (QUE et al., 2001). A proteína FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro, possibilitando sua entrada em células não fagocíticas (SINHA et al., 2000). Assim, foi demonstrado que *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ foi capaz de invadir células epiteliais humanas, da linhagem Caco-2, de maneira mais eficiente que a linhagem selvagem (INNOCENTIN et al., 2009).

1.4.4 Linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* para a entrega de Hsp65 diretamente no interior e células da mucosa intestinal

Diante do exposto, este trabalho, ainda em andamento, visa desenvolver uma estratégia terapêutica alternativa contra as IBDs. Assim, inicialmente, pretendeu-se aqui, construir uma linhagem invasiva de *L. lactis*, com propriedades imunomoduladoras intrínsecas, para a entrega de Hsp65, diretamente no interior de células da mucosa intestinal. Por fim, pretende-se, futuramente, avaliar o potencial terapêutico da linhagem [*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)] no modelo murino de CD quimicamente induzido por TNBS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Construção e avaliação da funcionalidade da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ produtora da forma citoplasmática do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺;
- Construção da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65);
- Verificação da produção da proteína Hsp65 pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) por *Western blotting*;
- Avaliação da capacidade invasiva das linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) em células Caco-2;
- Detecção da proteína Hsp65 produzida pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) por microscopia confocal;
- Avaliação da capacidade de translocação da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) em camundongos Balb/C saudáveis e imunossuprimidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM

As linhagens de *L. lactis* (Tabela 2) foram cultivadas em meio M17 (Fluka Analytical Sigma–Aldrich[®]) suplementado com 0,5% de glicose (Synth[®]), e, quando necessário, 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm/Sigma–Aldrich[®]) e/ou 5 µg/mL de eritromicina (Ery/Sigma–Aldrich[®]) foi adicionado, de acordo com o plasmídeo utilizado (Tabela 3). O crescimento ocorreu a 30°C sem agitação por 18–48 horas. Para as culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Kasvi[®]) foi adicionado ao meio.

A estocagem das culturas foi realizada em uma solução estéril de glicerol 80% (Synth[®]) e acondicionada em ultrafreezer a -80°C, numa combinação de 1:3 de glicerol 80% e cultura bacteriana, respectivamente.

Tabela 2 – Linhagens bacterianas.

Linhagem	Características	Fonte
<i>L. lactis</i> NCDO2118	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> – tipo selvagem (wt) ^b	TecnoGen
<i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA ⁺	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> portadora do plasmídeo pOri23–fnbA (Ery ^r) ^a	QUE et al., 2001
<i>L. lactis</i> NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)	<i>L. lactis</i> portadora do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 (Cm ^r) ^c	ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012
<i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺	<i>L. lactis</i> portadora do plasmídeo pOri23–fnbA (Ery ^r) ^d	Este trabalho
<i>L. lactis</i> NCDO2118 FnBPA ⁺ (pXYCYT:Hsp65)	<i>L. lactis</i> portadora dos plasmídeos pOri23–fnbA (Ery ^r) e pXYCYT:Hsp65 (Cm ^r) ^e	Este trabalho

^{a,b,c} Linhagens de *L. lactis* pertencentes ao Laboratório de Tecnologia Genética (TecnoGen) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

^{a,c,d,e} Cm^r: gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol e Ery^r: gene que confere resistência ao antibiótico erytromicina.

Tabela 3 – Plasmídeos.

Plasmídeos	Características	Fonte
pOri23–fnbA (FnBPA ⁺)	Shuttle vetor: (fnbA/ori ColE1/P23/Ery ^r) ^a	QUE et al., 2001
pXYCYT:Hsp65	Vetor de expressão citoplasmática pXylTT:Nuc na qual a ORF Nuc foi substituída pela ORF Hsp65 de <i>M. leprae</i> ^b	ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012

^a pOri23–fnbA (FnBPA⁺): plasmídeo contendo o gene codificador da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; origem de replicação: ori ColE1; promotor cromossômico de *L. lactis* 1363: P23 e gene que confere resistência a eritromicina: Ery^r.

^b pXYCYT:Hsp65: plasmídeo contendo o gene codificador da proteína Hsp65 de *M. leprae*; origem de replicação para *E. coli* e *L. lactis*, respectivamente: repC e repaA; promotor: PXylt e gene que confere resistência a cloranfenicol: Cm^r.

3.2 MANIPULAÇÃO DO DNA

Os ensaios de biologia molecular, como PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), digestão enzimática e extração de DNA plasmideano, foram realizados de acordo com métodos já publicados (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e/ou segundo as recomendações dos fabricantes, sendo modificados quando necessário.

3.3 RESOLUÇÃO ELETROFORÉTICA

Todas as amostras obtidas dos procedimentos de PCR, digestão enzimática e extração de DNA plasmideano foram avaliadas por meio da resolução eletroforética em gel de agarose a 1% (Kasvi[®]). Para isso, o DNA foi adicionado ao tampão de amostra 5X (glicerol 50%; azul de bromofenol 0,2% e TBE 2,5X) e Gel Red 1X (Nucleic Acid Gel Stain – Biotium[®]). A resolução se deu em tampão TBE 0,5X (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM pH 8,0–8,5 e água destilada q.s.p. 1 L) durante 50 minutos a 100 V em cuba horizontal Enduro[™] Gel XL.

Os géis foram posteriormente visualizados e fotografados, sobre transiluminador Benchtop UV (UVP) de luz ultravioleta a 320 nm, por meio do sistema de documentação fotográfica MultiDoc–It Digital Imaging System (UVP). O tamanho e a quantificação dos

fragmentos de DNA foram realizados utilizando-se os marcadores de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) e 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi[®]).

3.4 RECONFIRMAÇÃO DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

3.4.1 Extração de DNA plasmideano pXYCYT:Hsp65

Como um primeiro passo deste trabalho, e com o intuito de se reconfirmar a linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012), o plasmídeo pXYCYT:Hsp65 foi extraído para a realização de PCR e digestão enzimática da ORF Hsp65. Para isto, a linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) foi cultivada *overnight*, a partir de um pré-inóculo de 100 µL do estoque bacteriano, em meio M17 contendo 0,5% de glicose e Cm (10 µg/mL).

O DNA plasmideano foi extraído pelo método de lise alcalina, conforme descrito por Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989), com algumas modificações, conforme descrito a seguir. O *pellet* bacteriano foi obtido a partir de 3 mL da cultura bacteriana, por meio de centrifugação durante 7 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, para lise da parede celular, o *pellet* foi ressuspendido em 250 µL de TE–lisozima (Tris–HCl 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM e Lisozima 10 mg/mL) e a mistura incubada a 37°C em banho-maria por 1 hora. Logo após, foi adicionado 1,5 µL de RNase A (Invitrogen[®]) à amostra, e esta mantida por mais 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para lise bacteriana, foi adicionado 200 µL da solução II (200 µL de NaOH 5 M; 250 µL de SDS 20% e água destilada q.s.p 5 mL – preparo na hora) e a amostra homogeneizada 10 vezes por inversão. Em seguida, foram adicionados também 200 µL da solução III, de neutralização (30 mL de acetato de sódio 5M; 5,75 mL de ácido acético glacial e água destilada q.s.p 50 mL) e homogeneizado novamente 10 vezes por inversão. A amostra foi, então, centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, fase transparente, recuperado e armazenado em um novo tubo *ependorf*. Para precipitação do DNA plasmideano existente, 500 µL de isopropanol, a temperatura ambiente, foi adicionado ao sobrenadante, e este homogeneizado foi precipitado por 1 hora a -20°C. Transcorrido o tempo, essa mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado, o *pellet* de DNA lavado com 500 µL de etanol 70% (70 mL de etanol absoluto e 30 mL de água destilada) e centrifugado novamente por mais 15 minutos a 13.000 rpm. Assim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em estufa. Por fim, o DNA

foi ressuspendido em 20 µL de água milli-Q estéril e armazenado a -20°C. Uma alíquota de 4 µL do produto foi submetido à resolução eletroforética, vide seção 3.3.

3.4.2 Amplificação da ORF Hsp65 de *M. leprae*

Para reconfirmação do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012), foi realizado, primeiramente, uma reação de PCR, para se certificar da presença da ORF Hsp65. A sequência dos iniciadores (*primers*) encontra-se listadas na Tabela 4, sendo capazes de amplificar parte do vetor pXYCYT e a ORF Hsp65 completa.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da ORF Hsp65.

ORF Hsp65	
Iniciador <i>forward</i>	5' CTGGTAATGATTGTTGGCTTG 3'
Iniciador <i>reverse</i>	5' GGTATCGATAAGCTTGATATC 3'
Tamanho do fragmento amplificado	~2087 pb

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 5 µL tampão de amplificação 10X (Invitrogen[®]), 1,5 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen[®]), 2 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen[®]), 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *primer reverse*, ambos a 100 pMoles/µL, 0,5 µL do DNA plasmideano (100 ng/µL), 1 µL da enzima Taq DNA Polymerase 2,5 u/µL (Invitrogen[®]) e 39 µL de água milli-Q estéril.

A amplificação da ORF Hsp65 ocorreu sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C durante 5 minutos; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 2 minutos; e extensão final por 7 minutos a 72°C. As reações ocorreram no termociclador modelo S1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad).

Ao fim da reação, uma alíquota de 1 µL do produto da PCR foi submetido à resolução eletroforética, vide seção 3.3, para a visualização e confirmação do fragmento amplificado.

3.4.3 Digestão enzimática do vetor pXYCYT:Hsp65

Posteriormente, seguindo-se a reconfirmação do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012), foi realizada a digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Nsi*I e *Eco*RI (Promega[®]).

As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, sendo realizada em um volume final de 20 μL , contendo: 6,8 μL de água milli-Q estéril, 2 μL de tampão universal Multi-Core™ (Promega®), 1 μL da enzima *Nsi*I e 1 μL de *Eco*RI, 0,2 μL de BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) e 10 μL de DNA plasmidiano (100 ng/ μL). Após a homogeneização dos reagentes, a reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas.

Por fim, uma alíquota de 5 μL do produto de digestão foi submetida à resolução eletroforética, vide seção 3.3, para que os fragmentos correspondente ao vetor (pXYCYT) e ao inserto (Hsp65) pudessem ser visualizados e confirmados.

3.5 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ E *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

3.5.1 Extração de DNA plasmideano pOri23-fnbA (FnBPA⁺)

Para obtenção do plasmídeo pOri23-fnbA (FnBPA⁺), a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA⁺ foi cultivada *overnight*, a partir de um pré-inóculo de 100 μL do estoque bacteriano, em meio M17 contendo 0,5% de glicose e Ery (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O DNA plasmideano foi extraído pelo método de lise alcalina, conforme descrito por Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989), com algumas modificações, conforme seção 3.4.1.

3.5.2 Obtenção de células eletrocompetentes *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

Para obtenção das linhagens eletrocompetentes, tanto de *L. lactis* NCDO2118 como de *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65), foi realizado um pré-inóculo a partir de 100 μL do estoque bacteriano ou de um raspado de algumas colônias dessas linhagens. Os pré-inóculos foram realizados em 5 mL de meio M17 contendo sacarose a 0,5 M e glicose 0,5 % (M17-Sac-Glu), e as culturas cresceram *overnight* a 30°C sem agitação. A linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 cresceu sem a adição de antibióticos, ao passo que a linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) foi cultivada com a adição de Cm. No segundo dia, foi adicionado 2 mL desses pré-inóculos em 200 mL de meio M17-Sac-Glu suplementado com glicina 1%. A densidade óptica da cultura foi acompanhada em fotômetro BioPhotometer plus

(Eppendorf) a 600 nm (DO_{600nm}) até alcançar 0,4 a 0,6. Finalizado essa etapa, iniciou-se os processos de lavagem das células bacterianas, conduzidos em gelo durante todo o processo. Para as lavagens, em um primeiro momento, a cultura foi dividida em quatro tubos tipo *falcons* de 50 mL e centrifugada a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, o meio foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado 40 mL de uma solução gelada contendo sacarose 0,5 M e glicerol 10% estéril (171,1 g de sacarose; 100 mL de glicerina e água destilada q.s.p 1L). Essa solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado, sendo este procedimento repetido quatro vezes até concentração do *pellet* celular em somente um tubo *falcon*. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de uma solução contendo PEG3000 30% e Glicerol 10% (3 g de PEG3000; 1 mL de glicerol e água destilada q.s.p. 10 mL). Alíquotas de 100 µL foram estocadas em ultrafreezer a -80°C.

3.5.3 Eficiência de transformação das células eletrocompetentes *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota de 100 µL das células eletrocompetentes *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) foram descongeladas em gelo, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, adicionou-se às células eletrocompetentes 10 µL do plasmídeo pValac:*gfp* (10 ng – Cm^r), e essa mistura de DNA e células foi incubada por 10 minutos no gelo. Posteriormente, essa mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm–Bio–Rad), previamente resfriadas e esterilizadas. As amostras foram, então, submetidas a um pulso de 2.500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, utilizando-se o eletroporador GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio–Rad). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio M17 com 0,5% de glicose e estas foram incubadas a 30°C em banho-maria por três horas. Em seguida, diluições bacterianas de 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} foram plaqueadas em meio seletivo suplementado com Cm (10 µg/mL) e as bactérias mantidas a 30°C por até 48 horas.

3.5.4 Transformação de *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) com o plasmídeo pOri23–fnbA (FnBPA⁺)

Os processos de transformação das referidas linhagens ocorreram em paralelo. Dessa forma, foi realizada a transformação de *L. lactis* NCDO2118 com o plasmídeo pOri23–fnbA (FnBPA⁺), resultando na linhagem invasiva deste trabalho, *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺, assim como a transformação de *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) com o mesmo plasmídeo (pOri23–fnbA), resultando na linhagem invasiva e produtora de Hsp65 *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65).

Para as transformações, alíquotas de 100 µL de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118, assim como de *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65), previamente construídas (seção 3.5.2), foram descongeladas em gelo e, em seguida, 10 µL do plasmídeo pOri23–fnbA foi adicionado (100 ng de DNA). Essa mistura foi incubada em gelo por cerca de 10 minutos. Então, esta foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm/Bio–Rad), previamente refrigeradas na temperatura das células eletrocompetentes (4°C), e eletroporadas (250 V, 25 µF e 200 Ω), utilizando-se um eletroporador GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio–Rad). Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio M17 com 0,5 % de glicose, homogeneizado e incubado por 3 horas em banho-maria a 30°C. Transcorrido o tempo, as bactérias foram plaqueadas em meio seletivo, suplementando com Ery e/ou Cm, e mantidas a 30°C por até 48 horas.

3.5.5 Confirmação da transformação com o plasmídeo pOri23–fnbA (FnBPA⁺)

Após as transformações, foi realizada a extração de DNA plasmideano (seção 3.4.1) das construções *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) para confirmação da presença dos plasmídeos pOri23–fnbA e pXYCYT:Hsp65. A confirmação foi realizada através da amplificação, por PCR, dos fragmentos correspondentes a parte da ORF FnBPA e a parte da ORF FnBPA mais a ORF Hsp65, respectivamente.

A amplificação da ORF FnBPA foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos *primers* a 56°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto; e extensão final por 7 minutos a 72°C. A sequência dos *primers* para a amplificação desta ORF encontra-se listado na Tabela 5. Já as reações de PCR para amplificação da ORF Hsp65 foram realizadas conforme descrito na seção 3.4.1 e a sequência dos *primers* encontram-se listadas na Tabela 4. Ambas as reações foram realizadas em termociclador

modelo S1000TM Thermal Cycler (Bio–Rad), e ao término da reação, uma alíquota de 1 µL de cada produto foi submetido à resolução eletroforética, conforme descrito na seção 3.3.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na PCR para amplificação da ORF FnBPA.

ORF FnBPA	
Iniciador <i>forward</i>	5' CAACACTATTGTGTCCACCG 3'
Iniciador <i>reverse</i>	5' TCAGCTATTGATATCGATTA 3'
Tamanho do fragmento amplificado	~807 pb

3.6 INDUÇÃO DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Hsp65

A indução da expressão da proteína Hsp65, a partir da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65), foi realizada por meio da adição do açúcar xilose ao meio de cultivo. Para isso, *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) foi inoculada, a partir de colônias previamente crescidas em placa, em meio M17 contendo 0,5% de glicose, 10 µg/mL de Cm e 5 µg/mL de Ery, crescendo a 30°C sem agitação por 18 horas. No dia seguinte, uma alíquota deste pré-inóculo foi diluída (1:10) em 10 mL de meio M17 contendo agora 2% de xilose e 0,5% de galactose, além dos antibióticos Cm (10 µg/mL) e Ery (5 µg/mL). *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) cresceu a 30°C sem agitação por mais 18 horas, até alcançar uma DO_{600nm} em torno de 2. No terceiro e último dia, uma vez alcançada a DO desejada, estas culturas foram submetidas à extração proteica em sua fração citoplasmática.

3.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

3.7.1 Extração da proteína Hsp65

Para a extração proteica da fração citoplasmática da cultura de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65), 2 mL da cultura foi coletada e processada. Primeiramente, a cultura foi centrifugada por 7 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* celular foi ressuspenso em uma solução de TE–lisoizima, em uma concentração final

de 33% (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM e Lisozima 10 mg/mL) suplementado com 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 10 mM de ditioneitol (DTT). Logo após, os compostos foram homogeneizados e incubados por 1 hora a 37°C em banho-maria. Transcorrido esse tempo, foi adicionado SDS 20% (em uma concentração final de 16%), e a mistura vortexada, adicionando-se, em seguida, DTT-LB, em uma concentração final de 50% (Tris-HCl 50 mM e pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2% e DTT 10mM). Ao final do processo, a amostra, contendo as proteínas celulares, foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e estocada a -20°C.

3.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína Hsp65

Após a extração proteica, vide seção 3.7.1, as proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970). Para tanto, foi utilizado um gel de separação de 1,5 mm na concentração de 12% (3,4 mL de água destilada; 4 mL de bis acrilamida 30%; 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de tetrametiletilenodiamina-Temed[®]). A separação foi realizada em tampão de corrida Tris-glicina 1X (Tris 25 mM; glicina 192 mM e SDS 0,1%) durante duas horas a 100 V em cuba vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). O peso molecular das proteínas foi comparado ao marcador proteico PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Scientific™).

3.7.3 Western blot

Imediatamente após a resolução eletroforética, foi iniciado a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF, do inglês, *Polyvinylidene Fluoride*), utilizando o sistema semi-seco (Owl Semi Dry Electroblotting System). A transferência foi realizada com tampão de transferência pH 8,3 (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM e metanol 20%) e ocorreu em uma voltagem constante de 10V e 3A durante 2 horas. A membrana de PVDF foi preparada previamente, por 5 minutos em metanol, 5 minutos em água destilada e 15 minutos em tampão de transferência. Em seguida, como a transferência é ascendente, o “sanduiche” foi montado sobre a placa de aço do equipamento, composto por duas camadas de papel filtro, o gel de poliacrilamida, a

membrana de PVDF e mais duas camadas de papel filtro, ambos embebidos em tampão de transferência.

3.7.4 Imunodeteção da proteína Hsp65

Uma vez terminada a transferência proteica, foi iniciado a imunodeteção das proteínas Hsp65, utilizando o anticorpo primário anti-Hsp65 e o Kit WesternBreeze[®] – Chromogenic Western Blot Immunodetection (Novex[™]), conforme recomendações do fabricante. Primeiramente, a membrana de PVDF foi incubada por 30 minutos em agitador multifuncional TS-2000A tipo VDRL (Biomixer) com 10 mL da solução de bloqueio e posteriormente lavada com 20 mL de água destilada durante 1 minuto. Em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com 10 mL de uma solução contendo o anticorpo primário anti-Hsp65 policlonal (Farmacore Biotecnologia Ltda.), na diluição 1:500. Após esse período, a membrana foi lavada por 2 minutos com a solução de lavagem e em seguida, foram adicionados 10 mL de solução contendo o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina, e incubado por 30 minutos. Transcorrido o tempo, a membrana foi lavada com a solução de lavagem e com água destilada, e logo após, foi iniciado a revelação. A revelação foi realizada com a solução cromógena de BCIP/NBT presente no kit, durante, aproximadamente, 30 minutos. Por último, a membrana foi lavada com água destilada, seca e armazenada para análise. As bandas das proteínas foram comparadas ao marcador PageRuler[™] Prestained Protein (Thermo Scientific[™]).

3.8 ANÁLISE DA CAPACIDADE INVASIVA DE *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CULTURA DE CÉLULAS CACO-2

3.8.1 Cultura de células da linhagem Caco-2

3.8.1.1 Descongelamento das células Caco-2

Em um primeiro momento, células da linhagem Caco-2 (do inglês, *Human Colon Epithelial Cancer Cell Line*), criopreservadas em dimetilsulfóxido (DMSO), cedidas pelo Laboratório de Genética Experimental (LGEX) da UFMG, foram descongeladas,

movimentando lentamente o *criovial* em banho-maria a 37°C, por cerca de 2 minutos. Em seguida, as células foram transferidas lentamente para um tubo tipo *falcon* de 15 mL contendo 5 mL de meio de crescimento (meio DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado com soro fetal bovino/SBF 10%; L-glutamina 1% e 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) pré-aquecido a 37 °C. As células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi, então, ressuspensionado suavemente em 5 mL de meio e transferido para um frasco de cultura de 25 cm² (T25). As células Caco-2 foram incubadas *overnight* em estufa a 37 °C com condições atmosféricas de 5% de dióxido de carbono (CO₂). No dia seguinte, pela manhã, o meio de cultura foi trocado e assim iniciado o cultivo celular.

3.8.1.2 Cultivo das células Caco-2

Para o cultivo celular, primeiramente, as células foram visualizadas em microscópio invertido e, posteriormente, descartado o meio de cultura. Em seguida, para retirada de todo o SBF, antes da adição da tripsina, a monocamada de células foi lavada com 8 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; água destilada q.s.p. 1L e pH 7,4) a 37 °C. Para desprender a monocamada celular, 500 µL da solução contendo Tripsina 0,25% e EDTA 0,53 mM a 37°C foram adicionados. Após esse procedimento, a área de crescimento celular foi lavada com um pequeno volume de meio contendo SBF fresco, para inativar a tripsina, e as células foram ressuspensionadas várias vezes para eliminar os agregados celulares. Por fim, as células foram transferidas para um novo frasco contendo o meio de cultura pré-aquecido e incubadas em estufa a 37 °C com condições atmosféricas de 5% de CO₂. Após o estabelecimento do crescimento, as células Caco-2 foram transferidas para uma placa de 24 poços, sendo plaqueadas 2x10⁵ células/poço em um volume final de 500 µL de meio e aguardado atingirem uma confluência celular de aproximadamente 80%. Em seguida, foi realizado o ensaio de invasão.

3.8.2 Ensaio de invasão *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

Para o teste de invasão, a cultura bacteriana (DO_{600nm} 1,5) foi preparada, sendo centrifugada por 3 minutos a 12.000 rpm (2x10⁸ bactérias/mL) e o *pellet* celular lavado duas

vezes com 500 µL de PBS 1X. Ao fim, o *pellet* bacteriano foi ressuspenso em PBS 1X e estocado em gelo. Em paralelo, todos os poços contendo as células Caco-2 foram lavadas cinco vezes com 500 µL de PBS 1X, para a retirada dos antibióticos. Assim, às células Caco-2 foi adicionado 500 µL de meio contendo HEPES (ácido 4-2 hidroxietil piperazina-1-etanosulfônico/Sigma-Aldrich® em uma concentração final de 25 mM) e a solução bacteriana na multiplicidade de infecção (MOI) de 10^3 (1 célula Caco-2 : 1000 bactérias). Para isto, foram utilizadas as seguintes linhagens bacterianas: linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 (N); linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (NF); linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:HSP65) não induzida (NFX) e linhagem invasiva e produtora de Hsp65 *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:HSP65) induzida com xilose (NFXi).

A placa, contendo a co-cultura Caco-2 e *L. lactis*, foi mantida por 1 hora a 37°C em incubadora de bancada (Quimis). Transcorrido o tempo, as células Caco-2 foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS 1X para retirada do excesso de bactérias e, em seguida, adicionado 500 µL de meio com HEPES 25 mM contendo 20 µg/mL de gentamicina, sendo a placa incubada por mais 2 horas a 37°C em incubadora de bancada. Após o tratamento com gentamicina, as células Caco-2 foram novamente lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS 1X. Posteriormente, para lise das células Caco-2, foi adicionado, em cada poço, 500 µL de uma solução de Triton™ X-100 0,2% gelado (50 µL de Triton™ X-100/Sigma-Aldrich® e PBS 1X q.s.p. 25 mL) e incubado a 4°C por 10 minutos. Assim, o lisado celular foi coletado e armazenado em tubo *ependorf*, para posterior diluição seriada. Foram plaqueados 100 µL do lisado puro e 100 µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em meio seletivo M17 com glicose 0,5% e os respectivos antibióticos. Por fim, as placas foram incubadas a 30°C por até 48 horas e realizado a contagem das unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC). Todo o experimento foi realizado em triplicata, totalizando 9 amostras de cada linhagem bacteriana.

3.9 DETECÇÃO DA PROTEINA Hsp65 DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) POR MICROSCOPIA CONFOCAL

3.9.1 Padronização do tempo de invasão para a marcação da proteína Hsp65

Anteriormente à realização da marcação proteica de Hsp65 para análise em microscopia confocal, foi realizada a padronização do tempo de invasão da linhagem *L. lactis*

NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzida com xilose (NFXi). Para isto, a linhagem NFXi foi co-cultivada com células Caco-2 em três diferentes tempos, sendo eles: 1 hora, 1 hora e 30 minutos e 3 horas e 30 minutos, para verificação da viabilidade bacteriana. Após o período de incubação, seguiu-se o plaqueamento e contagem das UFC, conforme descrito na seção 3.8.2.

3.9.2 Imunocitoquímica da proteína Hsp65 para microscopia confocal

Com o intuito de verificar a produção da proteína recombinante Hsp65 por *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) por microscopia confocal, foi realizado, primeiramente, o cultivo das células Caco-2, conforme descrito na seção 3.8.1, com algumas modificações: utilizando-se uma placa de seis poços, foi adicionado uma lamínula/poço para crescimento e adesão da monocamada de células Caco-2. Com a placa previamente montada, foi realizado o processo de invasão por *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzido (seção 3.8.2) e, em seguida, iniciados os processos para fixação celular e marcação da proteína Hsp65 com anticorpos.

Em um primeiro momento, foi realizada a remoção do meio de cultura e lavagem das células duas vezes com 500 µL de PBS 1X a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 300 µL/poço da solução de paraformaldeído 2% (10 mL de PBS 1X; 0,2g de paraformaldeído em pó e 25 µL de NaOH 5M – preparada no dia), para fixação das células, e estas incubadas por 15 minutos. As células foram, então, lavadas duas vezes com 500 µL de PBS 1X a temperatura ambiente e depois foi adicionado 300 µL/poço da solução de Triton™ X-100 1% (500 µL de Triton™ X-100/Sigma–Aldrich® e PBS 1X q.s.p. 50 mL), para permeabilização celular, e aguardado 10 minutos. As células foram, então, lavadas mais cinco vezes com 500 µL de PBS 1X, agitando levemente a placa durante cada lavagem.

Neste experimento, foram utilizados os seguintes grupos: 1) Células Caco-2 marcadas somente com corante nuclear; corante nuclear + Ac primário + Ac secundário (controle negativo); 2) *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) induzida (NXi), marcadas com: somente corante nuclear; corante nuclear + Ac secundário; corante nuclear + Ac primário + Ac secundário; 3) *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzida (NFXi), marcados com: somente corante nuclear; corante nuclear + Ac secundário; corante nuclear + Ac primário + Ac secundário.

Em seguida, algumas das lamínulas foram incubadas, conforme descrito anteriormente, com 100 μL do anticorpo primário anti-Hsp65 (anticorpo monoclonal IgG1 murino produzido contra Hsp65 de *Mycobacterium* sp. – MyBioSource) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) diluído em BSA 1% (1 g BSA/USBiological e 100 mL PBS 1X) numa proporção de 1:1000 em câmara úmida a 4°C *overnight*. No dia seguinte, após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas cinco vezes com 500 μL de PBS 1X, agitando levemente a placa durante cada lavagem. Depois, algumas lamínulas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate – Molecular Probes[®]) (2mg/mL) diluído em BSA 1% numa proporção 1:500, em câmara úmida, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, por uma hora. Nesse momento, foi realizado também a marcação de todas as amostras como o corante nuclear DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol/Sigma-Aldrich[®]) (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) diluído em BSA 1% numa proporção de 1:150. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com 500 μL de PBS 1X. Para confecção da lâmina, foi adicionado 40 μL de glicerina tamponada pH 9 (9 mL de glicerina e 1 mL de tampão bicarbonato 0,5 M pH 8) e, por fim, a lamínula foi selada com esmalte incolor e esta mantida ao abrigo da luz, em geladeira até o próximo dia, para captura das imagens.

As imagens foram visualizadas com o auxílio do microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Nikon[®]), pertencente ao Laboratório de Imunobiofotónica da UFMG, por meio do uso da objetiva de 63X com óleo de imersão. Para a detecção do corante DAPI (Sigma-Aldrich[®]), cujos picos de excitação e emissão são a 358 e 461 nm, respectivamente, foi utilizado o laser 450/50 nm, do referido equipamento. Já para a detecção da fluorescência do fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes[®]), cujos picos de excitação e emissão são a 495 e 519 nm, respectivamente, foi utilizado o laser 515/30 nm. As imagens com dupla marcação foram obtidas através da sobreposição das imagens digitais de cada um dos fluorocromos. Todas as imagens foram visualizadas e editadas com o auxílio do programa Volocity 6.3 – Cellular Imaging – PerkinElmer.

3.10 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE TRANSLOCAÇÃO DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CAMUNDONGOS Balb/C SAUDÁVEIS E IMUNOSSUPRIMIDOS

Para iniciar o processo de verificação da segurança na utilização da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65), foi realizado um experimento para detecção dos níveis de translocação desta bactéria, através do intestino, para outros órgãos do animal. Para tanto, foram utilizados 10 de camundongos Balb/C fêmeas com 6–7 semanas de idade, sendo esses divididos em dois grandes grupos experimentais, sendo um grupo normal e um grupo imunossuprimido. Para imunossupressão, os animais receberam 3 mg/kg/dia de fosfato dissódico de dexametasona (Decadron–Ache[®]) (LALLO; SANTOS; BONDAN, 2002) através da via intraperitoneal. Os animais, saudáveis e imunossuprimidos, receberam 1x10⁹ UFC bacterianas em 100 µL de salina, através da via intragástrica (gavagem), com os seguintes tratamentos: i) solução salina 0,9% (controle negativo); ii) *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) (linhagem produtora de Hsp65 induzida) e iii) *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) (linhagem invasiva e produtora de Hsp65 induzida). O esquema experimental constituiu na administração de dexametasona durante quatro dias consecutivos (1° ao 4° dia), administração intragástrica das bactérias por três dias consecutivos (2° ao 4° dia) e a eutanásia dos animais no 5° dia de experimento, para retirada dos linfonodos mesentéricos, fígado e baço. A eutanásia foi realizada com a administração intraperitoneal de uma solução constituída de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Os referidos órgãos foram, individualmente, macerados em 1 mL de PBS 1X e, posteriormente, 100 µL de cada macerado foi plaqueado, sem diluição, em placa M17 com 0,5% de glicose, suplementado com Cm (10 µg/mL) e/ou Ery (5 µg/mL), para seleção bacteriana.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes ao ensaio de invasão e a padronização do tempo de invasão foram analisados, primeiramente, pelo programa computacional *online* GraphPad QuickCalcs Outlier Calculator (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) (GraphPad Software) com a finalidade de excluir as leituras estatisticamente fora da média ($p < 0,05$). Em seguida, com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), a análise de variância foi realizada por meio do uso do teste One-Way ANOVA e do pós-teste Tukey. Assim, os valores com intervalo de confiança menor que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

3.12 ASPECTOS BIOÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

3.12.1 Bioética

Os animais foram mantidos em micro-isoladores em estante ventilada, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz controlados, com livre acesso a água e ração. Todos os equipamentos, inclusive os alimentos, ração e água, foram autoclavados devido à condição de imunossupressão.

Os procedimentos e as manipulações dos animais foram realizados conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sendo o protocolo aprovado número 0066/11.

3.12.2 Biossegurança

As devidas precauções de biossegurança foram tomadas de acordo com normas e regulamentos de biossegurança estabelecidos pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da UFMG.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

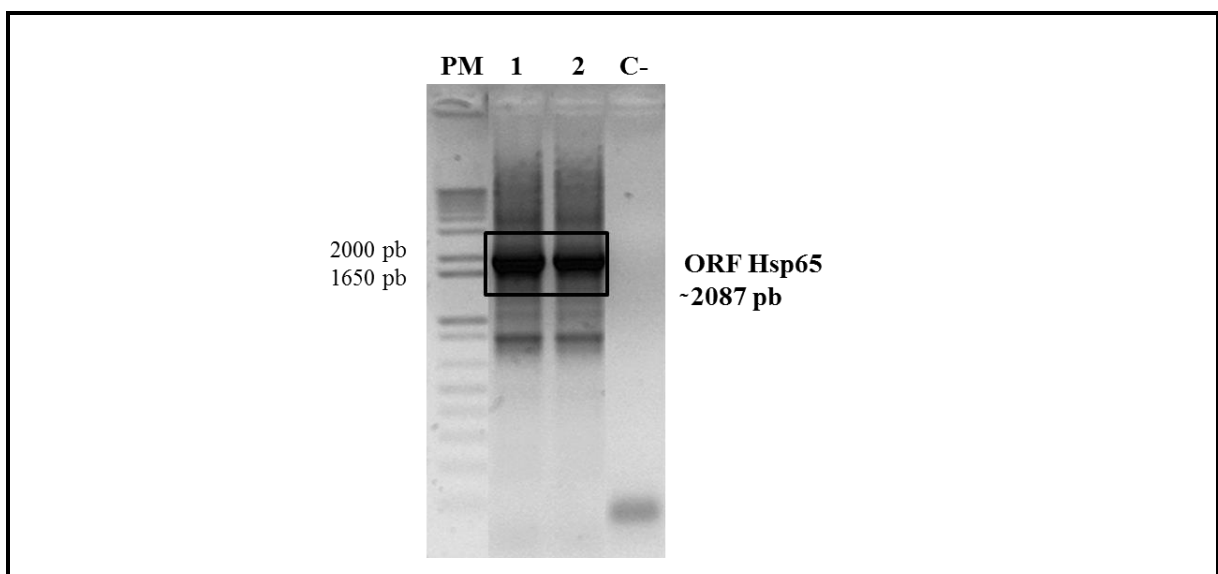
4.1 VERIFICAÇÃO DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)

O primeiro passo deste trabalho consistiu na reconfirmação da construção da linhagem de *L. lactis* produtora da proteína recombinante Hsp65 [*L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65)] (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012). A certificação foi realizada por meio de PCR e digestão enzimática do plasmídeo pXYCYT:Hsp65.

4.1.1 Amplificação da ORF Hsp65 de *M. leprae* a partir do plasmídeo pXYCYT:Hsp65

Para a amplificação da ORF Hsp65 foram utilizados pares de iniciadores específicos, conforme descrito na Tabela 5, que amplificaram parte do vetor pXYCYT e toda a sequência codificadora da proteína Hsp65 de *M. leprae*. Dessa forma, como esperado, foi verificada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 2.087 pb, correspondente a uma parte do vetor pXYCYT (461 pb) e a ORF Hsp65 em sua totalidade (1.626 pb) (Figura 6).

Figura 6 – Produto da amplificação da ORF Hsp65 a partir do plasmídeo pXYCYT:Hsp65. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium[®]. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação; C-: controle negativo.

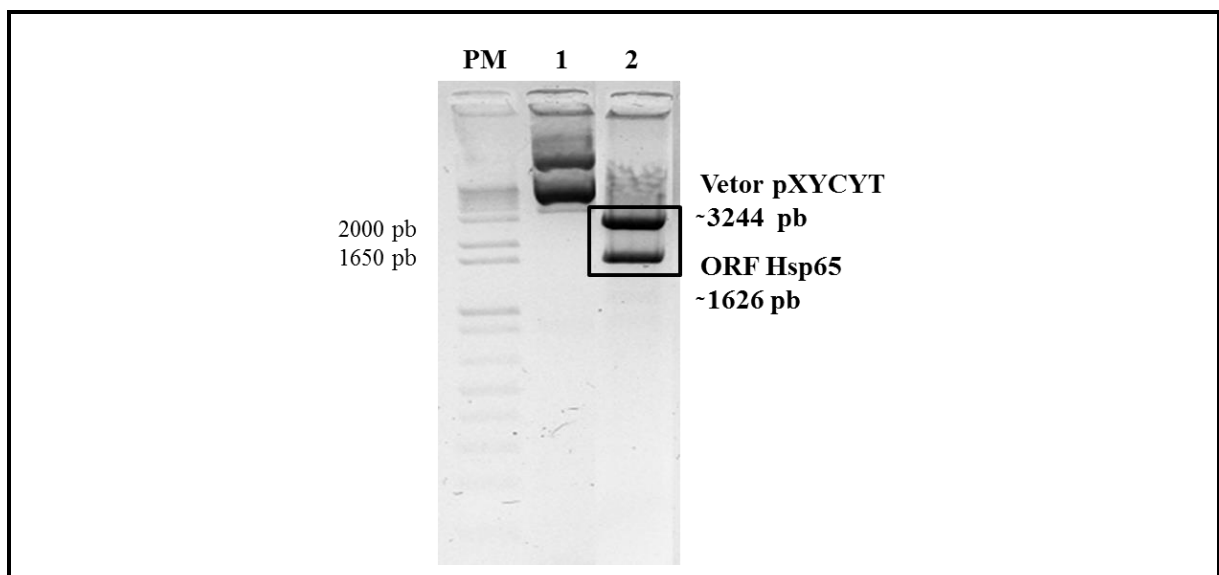


4.1.2 Digestão enzimática do plasmídeo pXYCYT:Hsp65

Ainda para reconfirmação de *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) (ROCHA, 2007; DE AZEVEDO et al., 2012), a partir do seu DNA plasmideano, foi realizado uma digestão enzimática com as enzimas *Nsi*I e *Eco*RI (Promega®), já que durante a construção do plasmídeo pXYCYT:Hsp65, foi inserida nas extremidades da ORF Hsp65 sítios artificiais de restrição para as referidas endonucleases (ROCHA, 2007). Assim, foi possível se verificar, por meio do produto de digestão, a existência do vetor pXYCYT com, aproximadamente, 3.244 pb e da ORF Hsp65 com, aproximadamente, 1.626 pb (Figura 7).

Assim, tanto por PCR como por digestão enzimática, foi possível reconfirmar a presença da ORF Hsp65 no vetor pXYCYT em *L. lactis* NCDO2118.

Figura 7 – Produto da digestão enzimática do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 com as enzimas de restrição *Nsi*I e *Eco*RI (Promega®). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red - Biotium®. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); canaleta 1: vetor não digerido; canaleta 2: produto da digestão.



4.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS INVASIVAS *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ E *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

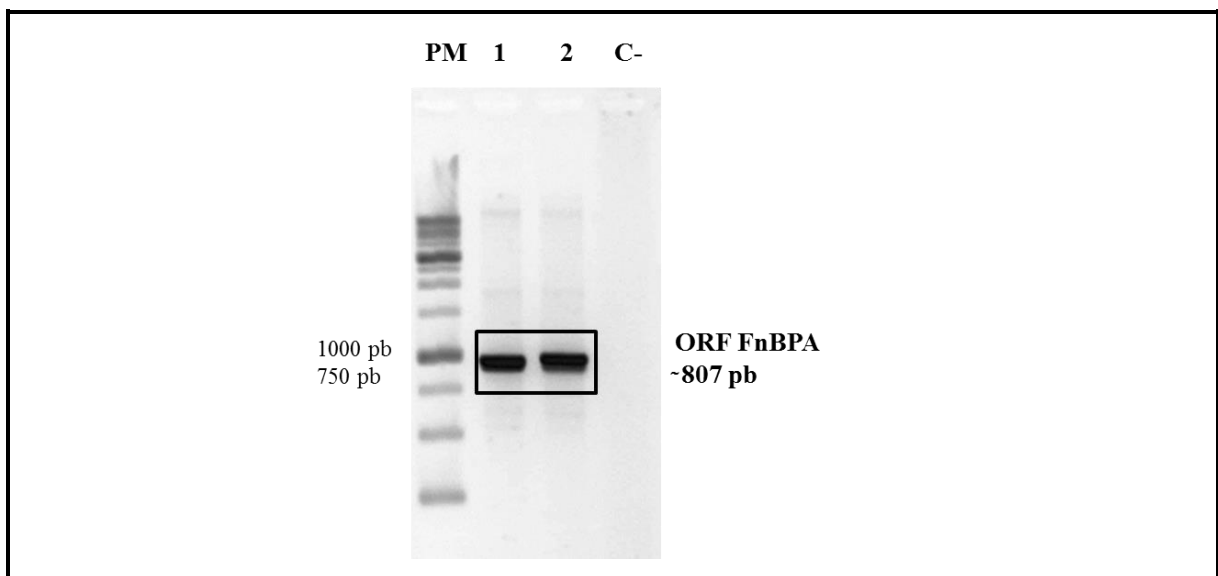
A obtenção das linhagens invasivas *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) foi realizada através de eletrotransformação com o

plasmídeo pOri23–fnbA (QUE et al., 2001). Ao término do processo, foi realizada a extração de DNA plasmideano das linhagens para as confirmações por PCR sendo os resultados apresentados a seguir.

4.2.1 Confirmação da obtenção da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺

Para a confirmação da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺, após a eletrotransformação com o plasmídeo pOri23–fnbA, foram obtidos um número incontável de colônia em placas. Destas, duas foram escolhidas, aleatoriamente, para a confirmação da ORF FnBPA por PCR. Na reação de amplificação foram utilizados pares de iniciadores específicos, conforme descrito na Tabela 6. Como esperado, houve a confirmação da presença da ORF FnBPA, com a amplificação de um fragmento de, aproximadamente, 807 pb (Figura 8).

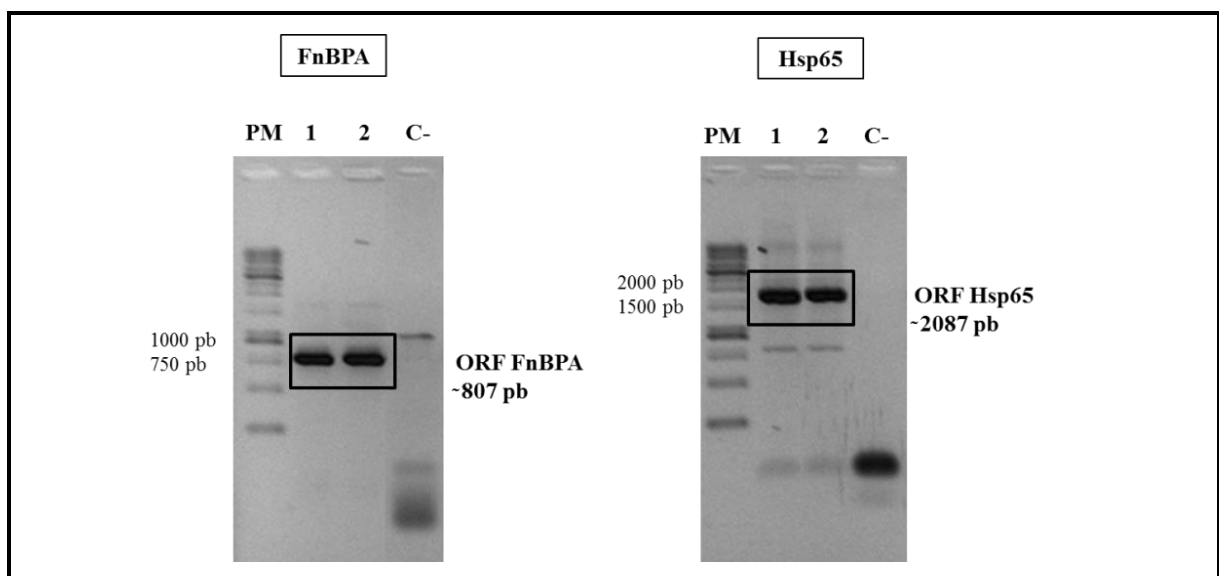
Figura 8 – Produto da amplificação da ORF FnBPA a partir do vetor pOri23–fnbA (FnBPA⁺). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium[®]. PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi[®]); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação; C-: controle negativo.



4.2.2 Confirmação da obtenção da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

Simultaneamente à obtenção da linhagem *L. lactis* NCDO2118 invasiva, a linhagem *L. lactis* NCDO2118 portadora do plasmídeo pXYCYT:Hsp65 também foi eletrotransformada com o plasmídeo pOri23-fnbA, a fim de se obter a linhagem invasiva e produtora de Hsp65. Após eletroporação, foram obtidas 23 colônias em placa, contendo tanto Cm quanto Ery. Estas foram utilizadas para extração plasmideana e confirmação, por PCR, das ORFs FnBPA e Hsp65, conforme demonstrado na Figura 9 para dois desses clones. Os iniciados específicos foram os mesmos utilizados nas reações anteriores, conforme descritos nas Tabelas 5 e 6. Como resultado, foi possível confirmar a amplificação de fragmentos de 807 pb e 2.087 pb em todos os clones, correspondente aos insertos dos plasmídeos pOri23-fnbA e pXYCYT:Hsp65, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 – Produto da amplificação das ORF FnBPA e Hsp65 a partir da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red – Biotium®. FnBPA - PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi®); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação de FnBPA; C-: controle negativo; Hsp65 - PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi®); canaletas 1 e 2: produtos da amplificação de Hsp65; C-: controle negativo.



Assim, foi possível confirmar a construção da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65). Como próximo passo deste trabalho, seguiu-se com a

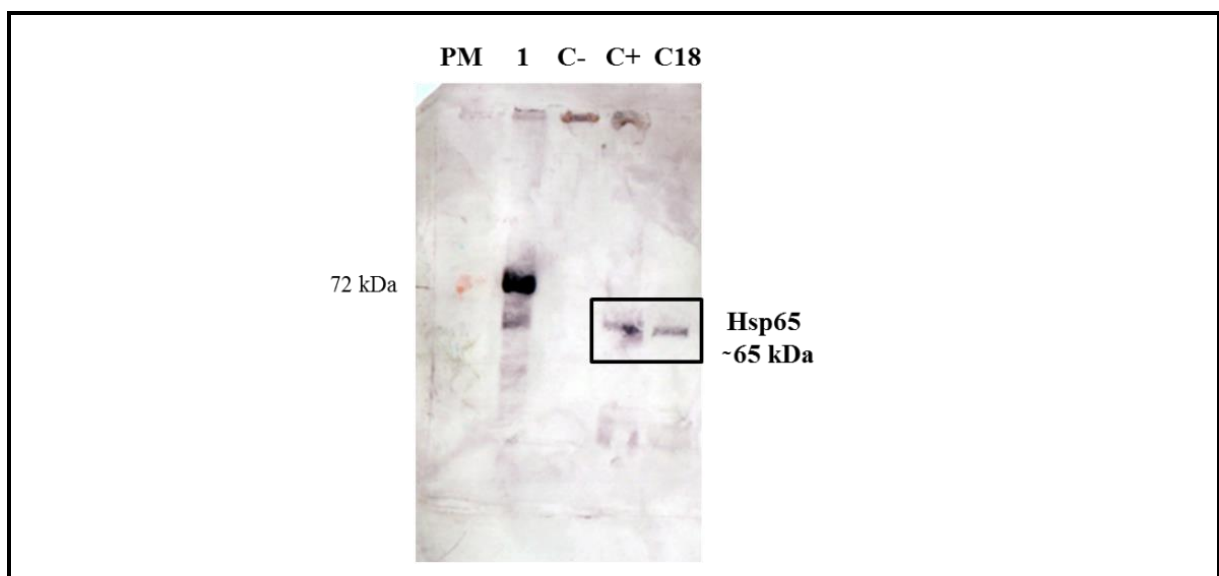
confirmação da funcionalidade dessas construções, por meio da verificação da produção da proteína Hsp65 e ensaios de invasão.

4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 PELA LINHAGEM INVASIVA *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)

Após a construção e a confirmação da linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65), todos os 23 clones foram submetidos à indução da expressão gênica com o açúcar xilose (MIYOSHI et al., 2004), conforme descrito na seção 3.6. Dentre os 23 clones, foi possível identificar a produção da proteína recombinante Hsp65 por 8 clones, através de *Western blotting* (Figura 10).

Devido ao fato da nova linhagem possuir agora dois plasmídeos e crescer em meio seletivo contendo dois antibióticos (Cm e Ery), levanta-se a hipótese de que isto pode estar interferindo na expressão da proteína recombinante Hsp65. Assim, após a análise das 23 amostras, o clone 18 foi escolhido para a utilização nos experimentos seguintes desta dissertação.

Figura 10 – *Western blotting* do extrato proteico citoplasmático a partir de culturas de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzidas com xilose. PM: padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Scientific™); canaleta 1: Hsp65 recombinante com cauda de histidina (Farmacore Biotecnologia Ltda.); C-: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) não induzida com xilose; C+: *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) induzida com xilose; C18: clone 18 de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:HSP65) induzido com xilose.

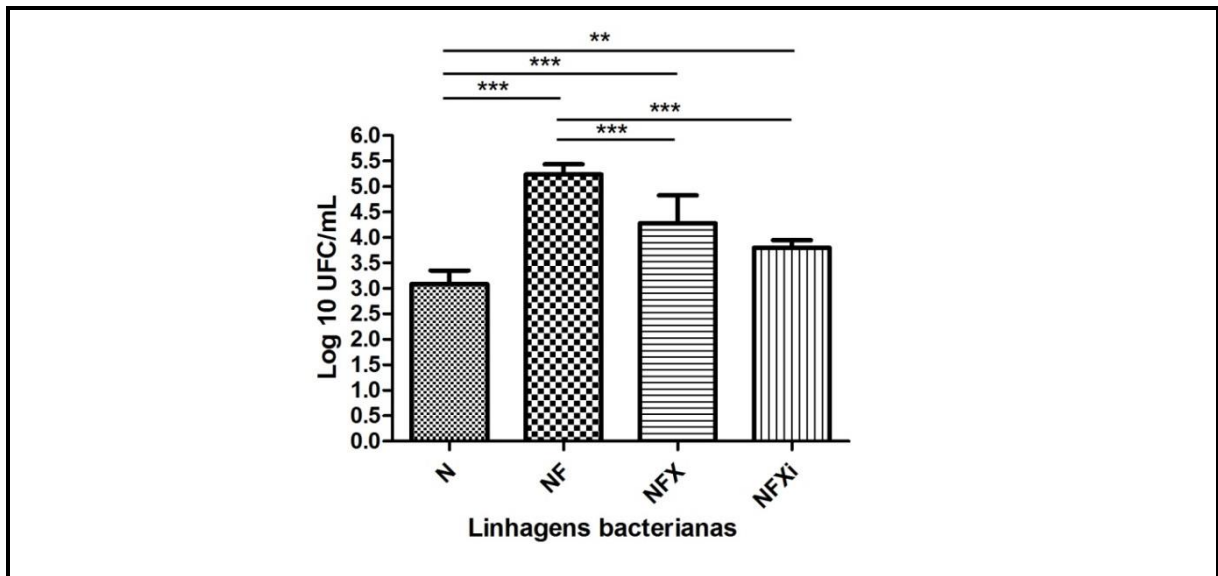


4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA DAS LINHAGENS *L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ E *L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ (pXYCYT:Hsp65) *IN VITRO*

Com intuito de avaliar a capacidade de invasão das novas linhagens obtidas [*L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ e *L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ (pXYCYT:Hsp65)], ensaios foram realizados, *in vitro*, utilizando células da linhagem Caco-2. Assim, foi possível observar que a linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ (NF) apresentou maiores níveis de invasão em relação à: 1- linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 (N) e 2- linhagem invasiva e produtora de Hsp65 [*L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺ (pXYCYT:Hsp65)] não induzida (NFX) ou induzida (NFXi), com xilose (Figura 11). Além disso, as linhagens NFX e NFXi invadiram, mais eficientemente, as células Caco-2, em comparação à linhagem selvagem N. Não houve diferença estatística, significativa, entre as linhagens NFX e NFXi.

Cabe ressaltar ainda que, comparado aos níveis de invasão obtidos por Innocentin et al. (2009) com *L. lactis* MG1363 Fnbpa⁺, a linhagem aqui obtida, *L. lactis* NCDO2118 Fnbpa⁺, apresentou capacidade invasiva semelhante. Sendo assim, foi possível confirmar a capacidade invasiva das novas linhagens obtidas no presente trabalho (NF e NFXi), haja vista que as mesmas apresentaram uma maior taxa de invasão frente à linhagem selvagem (*L. lactis* NCDO2118).

Figura 11 – Capacidade invasiva das linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) após 1 hora de co-cultura com células Caco-2. N: *L. lactis* NCDO2118 selvagem; NF: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺; NFX: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) não induzida com xilose; NFXi: *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzida com xilose. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.



4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA Hsp65 PELA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) POR DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Com a finalidade de detectar as proteínas Hsp65, citoplasmáticas, por microscopia confocal, foi realizado a co-cultura de células Caco-2 e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzidas (NFXi). Porém, para padronização do tempo de viabilidade bacteriana após invasão das células Caco-2, primeiramente, foi realizado um experimento piloto, onde o tempo de recuperação bacteriana foi acompanhado.

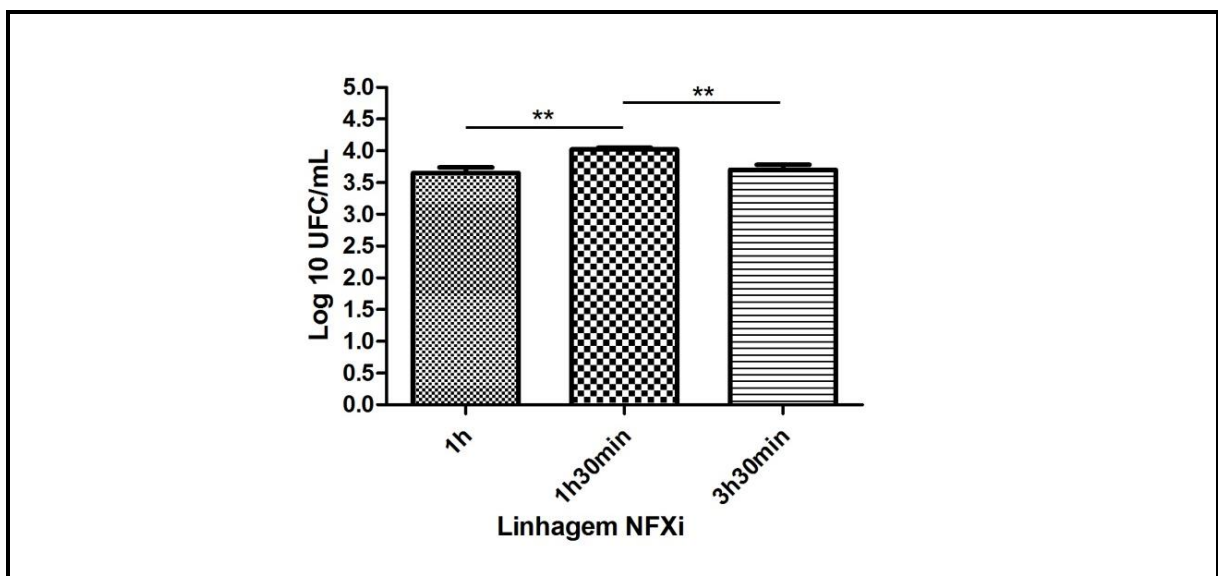
Com os resultados obtidos no experimento de invasão anterior (seção 4.4), sabe-se que com 1 hora de invasão as bactérias ainda permanecem viáveis no interior das células Caco-2, uma vez que foram recuperadas em meios seletivos. Dessa forma, acredita-se que com o aumento do tempo de co-cultivo, a lise das paredes celulares bacterianas poderiam expor as proteínas intracelulares, facilitando os processos de marcação intracelular da proteína Hsp65.

4.5.1 Padronização do tempo de invasão para a marcação da proteína Hsp65

Por meio do co-cultivo de *L. lactis* com as células Caco-2, foi possível observar que no tempo de 1 hora e 30 minutos houve uma maior recuperação bacteriana, estatisticamente significativa, em relação aos outros tempos experimentais testados (Figura 12). Assim, acredita-se que com 1 hora e 1 hora e 30 minutos de incubação, *L. lactis* ainda estava em processo de invasão, pois a contagem bacteriana em meio seletivo aumentou. Já com o tempo de 3 horas e 30 minutos, houve um decréscimo na quantidade de bactérias recuperadas, podendo esse decréscimo estar associado à lise bacteriana nos lisossomos das células Caco-2.

Assim, optou-se por utilizar o tempo de 3 horas e 30 minutos de invasão para os experimentos de marcação imunocitoquímica de Hsp65 e microscopia confocal. Vale ressaltar que *L. lactis* foi recuperada no interior das células Caco-2 até, aproximadamente, seis horas de co-cultivo.

Figura 12 – Capacidade invasiva das linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzidas com xilose em diferentes tempos de invasão. Contagem bacteriana em placa: 1h (4562 UFC/mL); 1h30min (10553 UFC/mL) e 3h30min (5105 UFC/mL). Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

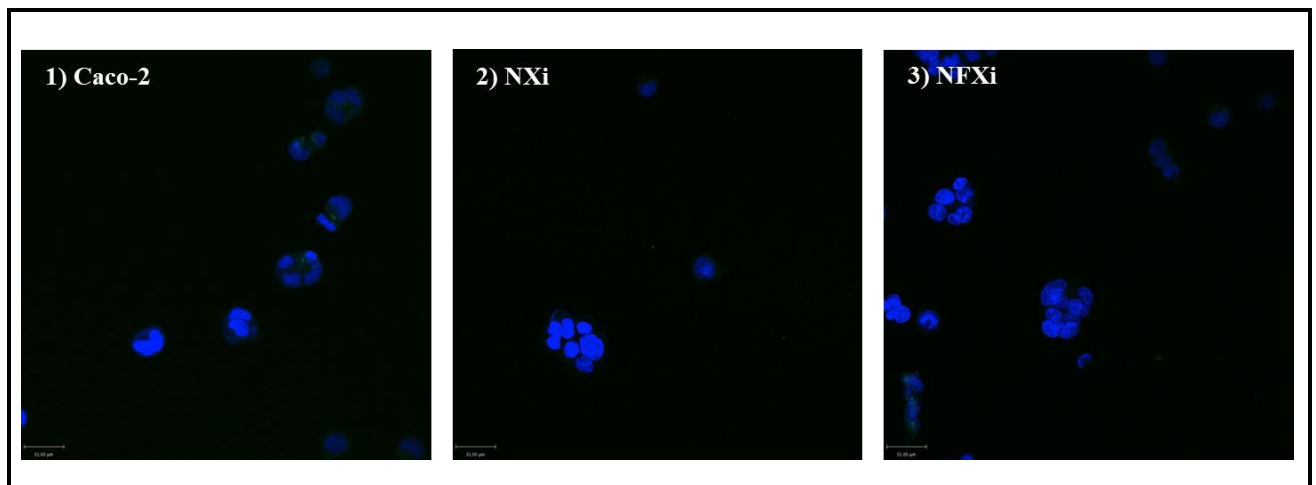


4.5.2 Imunocitoquímica da proteína Hsp65 para análise em microscopia confocal

Após a co-incubação de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) induzido (NFXi) com a cultura de células Caco-2 por 3 horas e 30 minutos, deu-se início aos procedimentos para a fixação celular e a marcação da proteína Hsp65, com anticorpos específicos. Como controle negativo do experimento, foram utilizadas células Caco-2 puras e coradas apenas com DAPI, ou com DAPI + Ac primário + Ac secundário, a fim de se identificar o núcleo celular e a inexistência de uma possível autofluorescência, além de se certificar da inexistência de marcação cruzada ou inespecífica dos anticorpos utilizados. Como controle positivo, foi utilizado a linhagem *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) (NXi; não invasiva, induzida e produtora de Hsp65), corada apenas com DAPI; ou com DAPI + Ac secundário; ou com DAPI + Ac primário + Ac secundário, a fim de detectar a proteína recombinante Hsp65. A linhagem foco de análise desse experimento, *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) (NFXi; invasiva, induzida e produtora de Hsp65), foi corada apenas com DAPI; ou com DAPI + Ac secundário; ou com DAPI + Ac primário + Ac secundário, a fim de detectar a proteína recombinante Hsp65.

Assim, após a análise em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Nikon[®]), foi possível detectar, somente, os núcleos das células Caco-2 corados em azul e a inexistência de qualquer outro tipo de fluorescência em todos os grupos testados (Figura 13). O DAPI, corante de ácidos nucleicos, pode se associar, preferencialmente, a regiões ricas em AT encontradas nos sulcos menores de moléculas de DNA de dupla fita (DAPI Nucleic Acid Stain User Manual, Molecular Probes[®]). Sendo assim, as micrografias de fluorescência representadas abaixo foram capturadas após sobreposição dos fluorocromos utilizados, sendo representado, somente, os grupos experimentais Caco-2, NXi e NFX1 marcadas com DAPI + Ac primário + Ac secundário (Figura 13).

Figura 13 – Micrografia de células da linhagem Caco-2 após o ensaio de invasão com *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) e imunocitoquímica. 1) Caco-2 marcadas com o corante nuclear DAPI, Ac primário e secundário; 2) NXi marcadas com DAPI, Ac primário e secundário; NFXi marcadas com DAPI, Ac primário e secundário. Capturas representam a sobreposição dos fluorocromos utilizados. DAPI: Sigma-Aldrich[®]; Ac primário: anticorpo monoclonal IgG1 murino produzido contra Hsp65 de *Mycobacterium* sp. (MyBioSource); Ac secundário: anti-IgG conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate – Molecular Probes[®]).



Acredita-se que a ausência de marcação das proteínas Hsp65 pode ser devido à ineficiência de permeabilização das bactérias no interior das células Caco-2. Assim, seria necessário à utilização de agentes químicos para o rompimento da parede celular de *L. lactis*, ou ainda a utilização de fagócitos profissionais, como os macrófagos, que pudessem lisar a parede gram-positiva desse microrganismo para marcação da proteína Hsp65 intracelular.

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSLOCAÇÃO DA LINHAGEM *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) EM CAMUNDONGOS Balb/C SAUDÁVEIS E IMUNOSSUPRIMIDOS

Com a finalidade de se avaliar a segurança na utilização da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65), que expressa constitutivamente a proteína A de ligação a fibronectina de *S. aureus* (QUE et al., 2001), foi realizado um experimento de translocação bacteriana em camundongos Balb/C saudáveis e imunossuprimidos.

Sabe-se que o processo de translocação bacteriana envolve complexas interações entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e também a habilidade de invasão bacteriana (RODRIGUEZ et al., 2001). Neste contexto, foi realizada a imunossupressão dos camundongos com dexametasona, com a finalidade de diminuir as defesas imunológicas desses animais e, assim, avaliar a capacidade de translocação da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ para outros órgãos além do intestino. A dexametasona é uma droga glicocorticóide com propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias, amplamente utilizada para imunossupressão em animais de laboratório (LALLO; SANTOS; BONDAN, 2002; MAHMOUD; AHMED; MOHAMMAD, 2015; RUANO et al., 2015). Esse medicamento apresenta, ainda, uma atividade linfopênica, podendo induzir apoptose em diferentes células do sistema imune, incluindo os precursores de linfócitos T e B (PERREIRA et al., 2008).

O processo de translocação bacteriana intestinal é definido como a migração de microrganismos viáveis, a partir do lúmen intestinal, para linfonodos mesentéricos e outros locais extra-intestinais. Essas bactérias podem, a partir dos linfonodos mesentéricos, atingir a circulação sistêmica e se disseminar para outros tecidos e órgãos, como o fígado e o baço (WONG et al., 2005; VAISHNAVI, 2013). Dessa forma, optou-se por avaliar alguns dos possíveis órgãos nos quais, possivelmente, *L. lactis* NCDO2118 (pXYCYT:Hsp65) e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) poderiam ser encontrados após a translocação, como, por exemplo, linfonodos mesentéricos, fígado e baço dos camundongos. Seguido da imunossupressão, administração das linhagens bacterianas e eutanásia dos animais, os referidos órgãos foram macerados e plaqueados em meios seletivos, conforme descrito na seção 3.10. Assim, como esperado, não foi observado nenhum crescimento bacteriano, indicando, dessa forma, a incapacidade de translocação dessas linhagens em animais tanto saudáveis quanto imunossuprimidos. Finalmente, com os resultados desse experimento, têm-se os primeiros indícios da segurança da linhagem invasiva e produtora da proteína recombinante Hsp65 [*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)].

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

Como conclusões desse trabalho têm-se:

- A linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ foi construída;
- A linhagem invasiva e produtora de Hsp65 [*L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65)] foi construída;
- Foi possível detectar a proteína recombinante de Hsp65 produzida pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) por *Western blotting*;
- As linhagens *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ e *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) foram capazes de invadir células eucarióticas mais eficientemente que a linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118;
- Não foi possível detectar a proteína recombinante Hsp65 produzida pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) por microscopia confocal;
- A linhagem *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) não foi capaz de se translocar do lúmen intestinal para outros órgãos (linfonodos mesentéricos, fígado e baço) em camundongos saudáveis e imunossuprimidos.

5.2 PERSPECTIVAS

Como perspectivas desse trabalho têm-se:

- Estabelecer um protocolo de permeabilização das paredes celulares de *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) com agentes químicos, a fim de identificar a proteína recombinante Hsp65 por microscopia confocal;
- Avaliar o potencial terapêutico da linhagem invasiva *L. lactis* NCDO2118 FnBPA⁺ (pXYCYT:Hsp65) no modelo murino de inflamação intestinal quimicamente induzida por TNBS (ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno), visando o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para a Doença de Crohn experimental.

REFERÊNCIAS

- ARTIS, David. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 411-420, 2008.
- AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. Novas utilizações Biotecnológicas e terapêuticas das Bactérias do Ácido Lático, cap. 40 (p. 801-818) In Genômica. **São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.)**, 2004.
- BAHEY-EL-DIN, Mohammed; GAHAN, Cormac GM. Lactococcus lactis-based vaccines: current status and future perspectives. **Human vaccines**, 2011, 7.1: 106-109.
- BAUMGART, Daniel C.; SANDBORN, William J. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1590-1605, 2012.
- BECKER, Christoph; NEURATH, Markus F.; WIRTZ, Stefan. The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 192-204, 2015.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G. et al. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.
- BINDER, R. J.; VATNER, R.; SRIVASTAVA, P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. **Tissue antigens**, v. 64, n. 4, p. 442-451, 2004.
- BIONDO-SIMÕES, Maria de Lourdes Pessole et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev Bras Coloproct**, v. 23, n. 3, p. 172-182, 2003.
- BOLOTIN, Alexander et al. Low-redundancy sequencing of the entire Lactococcus lactis IL1403 genome. In: **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. Springer Netherlands, 1999. p. 27-76.
- BOUMA, Gerd; STROBER, Warren. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-533, 2003.
- BRUGMAN, S. et al. Neonatal oral administration of DiaPep277, combined with hydrolysed casein diet, protects against Type 1 diabetes in BB-DP rats. An experimental study. **Diabetologia**, v. 47, n. 7, p. 1331-1333, 2004.
- CHEON, Gab Jin et al. Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic Acid-induced colonic inflammation in mice. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 16, n. 6, p. 437-446, 2012.
- CHEROUTRE, Hilde; LAMBOLEZ, Florence; MUCIDA, Daniel. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 7, p. 445-456, 2011.

CHU, Van Trung et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 582-593, 2014.

CLEVERS, Hans C.; BEVINS, Charles L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 289-311, 2013.

DANESE, Silvio; SANS, Miquel; FIOCCHI, Claudio. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity reviews**, v. 3, n. 5, p. 394-400, 2004.

DANIEL, Catherine et al. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 499-508, 2011.

DAPI Nucleic Acid Stain **User Manual**, Molecular Probes®. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01306.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

DE ALMEIDA, Ana Beatriz Albino et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L.(Asteraceae) in TNBS colitis model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 300-310, 2013.

DE AZEVEDO, M. S. P., et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. **Genet Mol Res**, 2012, 11.2: 1146-1157.

DEL CARMEN, S. et al. A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. **European Journal of Inflammation**, v. 11, n. 3, p. 641-654, 2013.

DEL CARMEN, Silvina 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. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 21, n. 3-4, p. 138-146, 2011.

ELINAV, E.; HENAO-MEJIA, J.; FLAVELL, R. A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 1, p. 4-13, 2013.

ELSON, Charles O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-1367, 1995.

FAGARASAN, Sidonia; HONJO, Tasuku. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2003.

FOERSCH, Sebastian; WALDNER, Maximilian J.; NEURATH, Markus F. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel diseases. **Digestive Diseases**, v. 31, n. 3-4, p. 317-320, 2013.

GEEM, Duke et al. Harnessing Regulatory T Cells for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 6, p. 1409, 2015.

GEREMIA, Alessandra et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 1, p. 3-10, 2014.

GILL, Steven R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2006.

HANAUER, Stephen B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 5, p. S3-S9, 2006.

HARATS, Dror et al. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 7, p. 1333-1338, 2002.

HEILMANN, Romy M.; SUCHODOLSKI, Jan S. Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with a Th1 or Th2 polarization?. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 168, n. 3, p. 131-134, 2015.

HOOPER, Lora V.; LITTMAN, Dan R.; MACPHERSON, Andrew J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-1273, 2012.

HOOPER, Lora V.; MACPHERSON, Andrew J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010.

HUGOT, Jean-Pierre et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 599-603, 2001.

INNOCENTIN, Silvia et al. Lactococcus lactis expressing either Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein A or Listeria monocytogenes internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4870-4878, 2009.

INOHARA, Naohiro; OGURA, Yasunori; NUÑEZ, Gabriel. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 76-80, 2002.

ISIK, F. et al. Protective effects of black cumin (Nigella sativa) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 3, p. 721-730, 2011.

IZCUE, Ana; COOMBES, Janine L.; POWRIE, Fiona. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 313-338, 2009.

JOSTINS, Luke et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 119-124, 2012.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004. Capítulo 15, O trato digestivo; p. 284-316.

KAMADA, Nobuhiko et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321-335, 2013.

KEIJZER, Chantal et al. Heat shock proteins are therapeutic targets in autoimmune diseases and other chronic inflammatory conditions. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, n. 9, p. 849-857, 2012.

KHOR, Bernard; GARDET, Agnès; XAVIER, Ramnik J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307-317, 2011.

KIESLER, Patricia; FUSS, Ivan J.; STROBER, Warren. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.

KNIGHTS, Dan; LASSEN, Kara G.; XAVIER, Ramnik J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**, v. 62, n. 10, p. 1505-1510, 2013.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALLO, Maria Anete; SANTOS, Maurício José dos; BONDAN, Eduardo Fernandes. Infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Rev Saúde pública**, v. 36, n. 5, p. 621-6, 2002.

LU, Shiping et al. Fusion protein His-Hsp65-6IA2P2 prevents type 1 diabetes through nasal immunization in NOD Mice. **International immunopharmacology**, v. 35, p. 235-242, 2016.

LUERCE, Tessalia Diniz et al. Anti-inflammatory effects of Lactococcus lactis NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut pathogens**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014.

MABBOTT, Neil A. et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 4, p. 666-677, 2013.

MACPHERSON, Andrew J.; HARRIS, Nicola L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.

MAHMOUD, Abobakr Mohamed; AHMED, Eman Farouk; MOHAMMAD, Doaa Safwat. The Role of Ketoprofen and Diclofenac in Dexamethasone-Immunosuppressed Mice. **The Egyptian Journal of Medical Microbiology (EJMM)**, v. 24, n. 3, 2015.

MALOY, Kevin J.; POWRIE, Fiona. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, 2011.

MARINHO, F. A. V. et al. An intranasal administration of Lactococcus lactis strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, n. 10, p. 1541-1551, 2010.

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

MARSHALL, Jean S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 10, p. 787-799, 2004.

MARTINEZ, Fabio Andres Castillo et al. Lactic acid properties, applications and production: a review. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MILLER, Harvey et al. Intestinal M cells: the fallible sentinels?. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 10, p. 1477, 2007.

MIYOSHI, Anderson et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. **FEMS microbiology letters**, v. 239, n. 2, p. 205-212, 2004.

MIYOSHI, Anderson et al. Lactic acid bacteria as live vectors: heterologous protein production and delivery systems. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications**, p. 9, 2010.

MOLODECKY, Natalie A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54. e42, 2012.

MOLODECKY, Natalie A.; KAPLAN, Gilaad G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 5, p. 339, 2010.

MORTHA, Arthur et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1249288, 2014.

MOUDGIL, Kamal D. et al. Heat-shock proteins in autoimmunity. **Autoimmune diseases**, v. 2013, 2013.

MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667-685, 2014.

MURAI, Masako, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nature immunology**, 2009, 10.11: 1178-1184.

MURPHY, Kenneth M. et al. Signaling and transcription in T helper development. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 451-494, 2000.

NEISH, Andrew S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 65-80, 2009.

NELL, Sandra; SUERBAUM, Sebastian; JOSENHANS, Christine. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 564-577, 2010.

NEURATH, Markus F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014.

NEURATH, Markus F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1281-1290, 1995.

NEWBERRY, Rodney D.; LORENZ, Robin G. Organizing a mucosal defense. **Immunological reviews**, v. 206, n. 1, p. 6-21, 2005.

OGURA, Yasunori et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 603-606, 2001.

OLIVEIRA, Letícia C. et al. Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, a GABA-Producing Strain. **Genome announcements**, v. 2, n. 5, p. e00980-14, 2014.

OLIVEIRA, R. P. **Hsp65 e a imunorregulação na mucosa intestinal em modelo experimental de diabetes tipo 1**. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PEREIRA, ADRIANO et al. Camundongos imunossuprimidos farmacologicamente como modelo para estudo de infecções parasitárias oportunistas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v. 17, n. Supl 1, p. 292-295, 2008.

PEYRIN-BIROULET, Laurent et al. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. **The American journal of gastroenterology**, v. 105, n. 2, p. 289-297, 2010.

POCKLEY, A. Graham. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 3, n. 23, p. 1-21, 2001.

PODOLSKY, Daniel K. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, vol. 347, n. 6, 2002.

PONDER, Alexis; LONG, Millie D. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical epidemiology**, v. 5, p. 237, 2013.

PONTES, Daniela Santos et al. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. **Protein expression and purification**, v. 79, n. 2, p. 165-175, 2011.

QUE, Yok-Ai et al. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 10, p. 6296-6302, 2001.

QUINTO, Emiliano J. et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 18, p. 1765, 2014.

RANDHAWA, Puneet Kaur et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279-288, 2014.

RESCIGNO, Maria. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in immunology**, v. 32, n. 6, p. 256-264, 2011.

REZENDE, Rafael M. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺ LAP⁺ regulatory T cells. **Journal of autoimmunity**, v. 40, p. 45-57, 2013.

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

SANTOS, A. C. G. **Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças inflamatórias intestinais**. 2011. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RHA, Yeong-Ho et al. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5300-5307, 2002.

RIMOLDI, Monica et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. **Nature immunology**, v. 6, n. 5, p. 507-514, 2005.

RODRIGUEZ, Ana V. et al. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. **FEMS microbiology letters**, v. 204, n. 1, p. 33-38, 2001.

ROTHENBERG, Marc E. et al. Gastrointestinal eosinophils. **Immunological reviews**, v. 179, n. 1, p. 139-155, 2001.

RUANO, Ana Lucía et al. Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by *Strongyloides venezuelensis* in mice treated with dexamethasone. **Acta tropica**, v. 152, p. 90-95, 2015.

SAMBROOK, Joseph et al. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SCHOFFEN, João Paulo Ferreira; PRADO, Isaura Maria Mesquita. Aspectos Epidemiológicos e Etiológicos da Doença de Crohn. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, 2011.

SCHRAML, Barbara U. et al. The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 405-409, 2009.

SHERIDAN, Brian S.; LEFRANÇOIS, Leo. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. **Current gastroenterology reports**, v. 12, n. 6, p. 513-521, 2010.

SILVEIRA, Rodrigo Cardoso et al. Doença de Crohn em recém-nascido. **Rev bras Coloproct**, v. 28, n. 3, 2008.

SINHA, Bhanu et al. Heterologously Expressed *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Proteins Are Sufficient for Invasion of Host Cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6871-6878, 2000.

SOUZA, B. M. **Desenvolvimento de uma nova estratégia para o tratamento da Doença de Crohn utilizando *Lactococcus lactis* para a entrega, em células mamíferas, de um plasmídeo terapêutico codificador da interleucina 4 (IL-4) de *Mus musculus***. 2015. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SPITS, Hergen et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 145-149, 2013.

SRIVASTAVA, Pramod. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 3, p. 185-194, 2002.

STEINMAN, Lawrence. A rush to judgment on Th17. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 7, p. 1517-1522, 2008.

STROBER, Warren; FUSS, Ivan J.; BLUMBERG, Richard S. The immunology of mucosal models of inflammation 1. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 495-549, 2002.

TARGAN, Stephan R. Biology of inflammation in Crohn's disease: mechanisms of action of anti-TNF- α therapy. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, 2000, 14: 13C-16C.

TOMASELLO, Giovanni et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: changes in response of colocytes. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18121-18130, 2014.

TSAN, Min-Fu; GAO, Baochong. Cytokine function of heat shock proteins. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, n. 4, p. C739-C744, 2004.

TURNER, Jerrold R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

UEDA, Yoshiyasu et al. Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. **International immunology**, v. 22, n. 12, p. 953-962, 2010.

ULMANSKY, Rina et al. A Humanized Monoclonal Antibody against Heat Shock Protein 60 Suppresses Murine Arthritis and Colitis and Skews the Cytokine Balance toward an Anti-Inflammatory Response. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 11, p. 5103-5109, 2015.

VAISHNAVI, C. et al. Translocation of gut flora and its role in sepsis. **Indian journal of medical microbiology**, v. 31, n. 4, p. 334, 2013.

VAN EDEN, Willem; VAN DER ZEE, Ruurd; PRAKKEN, Berent. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p. 318-330, 2005.

VAN HERWIJNEN, Martijn JC et al. Heat shock proteins can be targets of regulatory T cells for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 5, p. 448-454, 2013.

WALLIN, Robert PA et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in immunology**, v. 23, n. 3, p. 130-135, 2002.

WEGMANN, Udo et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3256-3270, 2007.

WELLS, Jerry M.; MERCENIER, Annick. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 349-362, 2008.

WERSHIL, Barry K.; FURUTA, Glenn T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. S380-S383, 2008.

WINKLER, Petra, et al. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. **The Journal of nutrition**, 2007, 137.3: 756S-772S.

WIRTZ, Stefan et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature protocols**, v. 2, n. 3, p. 541-546, 2007.

WONG, Florence et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 718-725, 2005.

WYSZYŃSKA, Agnieszka et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 2967-2977, 2015.

ZANIN-ZHOROV, Alexandra et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 276-285, 2005a.

ZANIN-ZHOROV, Alexandra et al. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 2022-2032, 2006.

ZANIN-ZHOROV, Alexandra et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3227-3236, 2005b.

ZANIN-ZHOROV, Alexandra et al. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1567-1569, 2003.

ZANIN-ZHOROV, Alexandra; COHEN, Irun R. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals. **Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance**, p. 53, 2016.

ZEISSIG, Sebastian; BLUMBERG, Richard S. Commensal microbiota and NKT cells in the control of inflammatory diseases at mucosal surfaces. **Current opinion in immunology**, v. 25, n. 6, p. 690-696, 2013.

ZURITA-TURK, Meritxell, et al. Lactococcus lactis carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC biotechnology**, 2014, 14.1: 1.