

## 1. INTRODUÇÃO

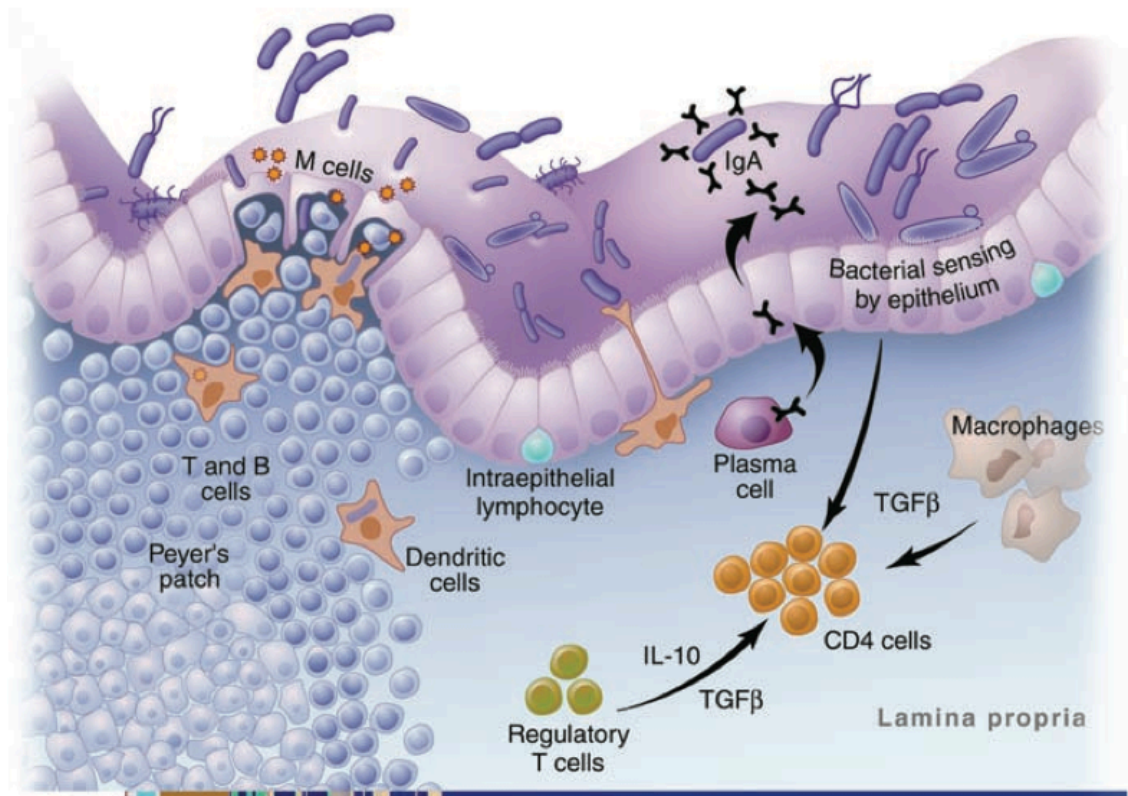
### 1.1 Trato Gastrointestinal.

Pensava-se que a maior área de superfície exposta do organismo ao ambiente externo seria a pele, mas, em seres humanos, a área da mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é bem maior, pois, apresenta aproximadamente 400 m<sup>2</sup>, devido a suas milhões de microvilosidades e 8 metros de comprimento. Pode, assim, ser considerada o local com a maior exposição aos patógenos e antígenos do corpo (MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Aproximadamente 30 quilos de proteínas entram em contato com o TGI anualmente (MESTECKY, 2005) e cerca de 130 a 190 gramas são absorvidos diariamente (BRANDTZAEG, 1998). O TGI abriga também uma enorme microbiota, com densidade aproximada de 10<sup>14</sup> microorganismos e cerca de 500 a 1000 espécies (SHANAHAN, 2002; XU & GORDON, 2003; SONNENBURG *et al.*, 2009).

Vários eventos ocorrem no TGI, tais como a identificação, digestão, modificação e a absorção de componentes alimentares da dieta (proteínas, lipídios, carboidratos e micronutrientes, como vitaminas e minerais). Além disso, é nele que acontece a interação de micro-organismos patogênicos e não patogênicos com o organismo. Toda essa interação com antígenos da dieta e da microbiota desencadeia eventos imunológicos que se caracterizam por respostas reguladoras locais e sistêmicas. (ROTHENBERG & HOGAN, 2006; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006; SICHERER & SAMPSON, 2009).

Para que tudo ocorra com uma grande margem de acerto, a mucosa intestinal é composta de uma camada simples de células epiteliais intestinais e da lâmina própria. O epitélio separa o ambiente externo do interno e assim atua prevenindo que microorganismos patógenos, bem como substâncias nocivas no lúmen, ganhem acesso ao corpo. O epitélio intestinal é formado principalmente por enterócitos com junções celulares e borda em escova, seguido de outros tipos celulares como os linfócitos intraepiteliais, as células M, as células de *Paneth* e as células caliciformes (MCKAY, 2005). O epitélio intestinal, o muco (produzido pelas células caliciformes), o potencial hidrogeniônico (pH) ácido gástrico, as enzimas luminiais, os sais biliares, a microbiota residente e a motilidade intestinal, fazem parte de um conjunto de elementos que juntos formam os mecanismos fisiológicos do TGI, Figura 1 (FARHADI, *et al.*, 2003; SICHERER & SAMPSON, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2010).

Além do epitélio da mucosa intestinal, o TGI também é composto por um tecido linfóide associado a mucosas (MALT), e que por sua localização, esse tecido é denominado tecido associado ao intestino (GALT). O GALT é formado por ambos os sistemas imunes: o inato (células natural-killer, leucócitos polimorfonucleados, macrófagos, células epiteliais e receptores toll-like) e o adaptativo (linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria, placas de Peyer, imunoglobulinas do tipo A (IgA-s) e citocinas), formando os mecanismos imunológicos do TGI, Figura 1 (CHEHADE & MAYER, 2005; SICHERER & SAMPSON, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2010; BRANDTZAEG, 2010; VICKERY *et al.*, 2011).



**Figura 1: O Ambiente imunológico intestinal.**

O intestino mantém um sistema imune extensivo e altamente ativo. O epitélio sobrejacente ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT) contém células especializadas M que constantemente transportam bactérias e antígenos do lúmen intestinal para o tecido linfóide. Células dendríticas na lâmina própria alcançam as células epiteliais e também amostras de bactérias intestinais. No epitélio encontram-se linfócitos T intraepiteliais tipo CD8<sup>+</sup> e a lâmina própria contém linfócitos T CD4, macrófagos e plasmócitos produtores de anticorpos IgA-s. Processos inflamatórios mediados por linfócitos T, podem ser inibidos pelas citocinas imunossupressoras e células T reguladoras. Adaptado de Macdonald & Monteleone, 2005.

Mesmo o TGI sendo formado por vários componentes, que atuam como uma barreira imunológica, pode ocorrer uma falha nessa proteção, permitindo assim a entrada de proteínas não digeridas pela mucosa intestinal. Como consequência, pode ser desencadeada uma resposta imune aos componentes da dieta (MAYER, 2003; EINGEMANN, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2009; WANG & SAMPSON, 2011). Essa penetração de macromoléculas da dieta no organismo, através da mucosa intestinal, pode acarretar sérias consequências imunológicas, sendo, uma delas, a alergia alimentar (SALDANHA *et al.*, 2004).

## **1.2 Reações adversas a alimentos e Alergia Alimentar.**

Se os mecanismos de filtragem dos antígenos da dieta falham ou não são suficientes, componentes alimentares que seriam inócuos ou pouco danosos, podem se tornar patológicos, levando a reações adversas aos alimentos. Os efeitos adversos podem ser só localizados, como dor abdominal, diarreia e vômitos, mas podem acometer outros órgãos, como pele (eritema, prurido), trato respiratório (dificuldade respiratória), sistema nervoso (tontura, dor de cabeça, perda de memória), e sistema cardiovascular (taquicardia, hipotensão, hipertensão). Reações adversas podem até mesmo ser fatais em alguns casos, como quando geram choque hemodinâmico por desidratação profunda, choque séptico ou choque anafilático. Toda essa variedade de sintomas tem origens diversas, dependendo do alimento, componentes intrínsecos a ele ou adicionados e possíveis toxinas ou microrganismos que estejam associados. Para um diagnóstico mais preciso, que leve ao tratamento mais adequado, tem-se postulado uma classificação baseada nos mecanismos patogênicos dessas reações adversas (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995).

Primeiramente, de acordo com a Associação Europeia de Alergia e Imunologia Clínica, as reações aos alimentos, consideradas indesejáveis, podem ser divididas em tóxicas e não tóxicas. Ou seja, podemos, num primeiro momento separar em dois mecanismos: aqueles relacionados com substâncias que causariam efeitos indesejáveis a qualquer indivíduo, ou aqueles relacionados com substâncias que potencialmente são inócuas, mas que devido a sensibilidades individuais podem causar danos em algumas pessoas (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995; BRANDTZAEG, 2010).

As reações tóxicas podem ser causadas por toxinas ou por agentes infecciosos que estão presentes nos alimentos. Um exemplo pode ser a ingestão de ovo contaminado com salmonela (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995).

No entanto, mesmo alimentos não contaminados podem levar a reações indesejáveis e essas reações são enquadradas como reações a alimentos de origem não tóxica. Esse tipo de reação pode ainda ser subdividida de acordo com o mecanismo patogênico envolvido, ou seja, podem envolver mecanismos imunológicos e não imunológicos. As reações de sensibilidade causadas pelo mecanismo não imunológico são chamadas de intolerância alimentar. Essas reações não imunomediadas podem envolver mecanismos metabólicos, farmacológicos ou ainda mecanismos não totalmente definidos. A intolerância à lactose por uma deficiência em lactase é um exemplo de intolerância alimentar (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995; BRANDTZAEG, 2010).

As reações alimentares mediadas pelo sistema imune são conhecidas como reações de alergia alimentar e podem envolver mecanismos mediados pela imunoglobulina IgE, não mediados pela imunoglobulina IgE, ou uma mistura dos dois, chamada de alergia alimentar mista (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995; BISCHOFF & CROWE, 2005; EIGENMANN *et al.*, 2008; SICHERER & SAMPSON, 2009; CIANFERONI & SPERGEL, 2009; DAVIS, 2009; BRANDTZAEG, 2010).

A alergia alimentar também pode ser considerada uma manifestação anormal da resposta imune a antígenos que chegam ao organismo pela via oral. Em indivíduos com sensibilidade a esses antígenos, um grupo de distúrbios é desencadeado após a ingestão de determinados alimentos

(SICHERER & SAMPSON, 2010). Essas reações de origem imunológica a alimentos pode envolver mecanismos dependentes e independentes da IgE. Na independente de IgE, a inflamação que ocorre no TGI envolve a participação de linfócitos T e incluem a dermatite atópica, a esofagite eosinofílica, a enterite eosinofílica, entre outras. Já, as reações a alimentos dependentes de IgE respondem pela maioria das alergias alimentares (BRUIJNZEEL-KOOMEN *et al.*, 1995; BRANDTZAEG, 2010). Em geral, o termo alergia alimentar é empregado para essas condições patológicas, e será tratada aqui nesta dissertação como as dependentes de IgE.

Os alimentos mais comuns causadores de alergia alimentar na infância são: leite de vaca, ovos, amendoim, trigo, soja, castanha, peixe e frutos do mar (SICHERER, 2011), já nos adultos os alimentos mais comuns são: frutos do mar e o amendoim (WANG & SAMPSON, 2009).

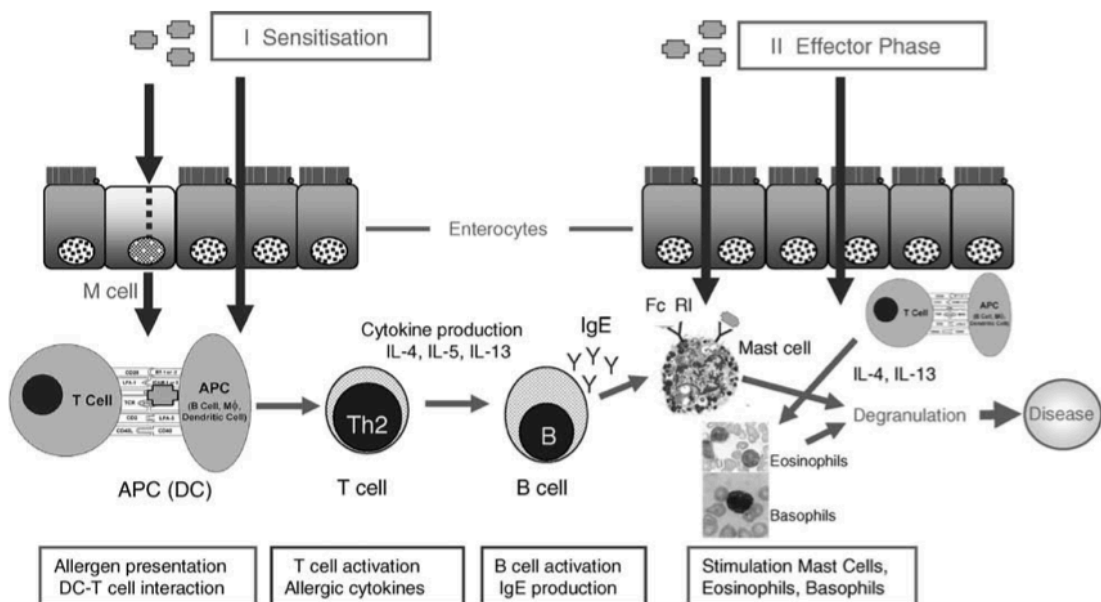
Essa condição patológica tem sido considerada um significativo problema de saúde pública, afetando em sua maioria crianças, sendo constatado um aumento de cerca de 18%, em crianças norte-americanas, entre os anos de 1997 - 2007 (BRANUM & LUKACS, 2009; MCBRIDE, 2011; SICHERER, 2011). Segundo estudos, a alergia alimentar afeta cerca de 6-8% das crianças e aproximadamente 3-4% da população adulta mundial (CIANFERONI & SPERGEL, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2010; SICHERER, 2011).

A alergia alimentar pode afetar diversos órgãos e conseqüentemente induzir uma diversidade de sintomas, como, os cutâneos, os gastrointestinais, os respiratórios, os comportamentais (irritabilidade), os sintomas múltiplos (dores de cabeça, nas articulações) e até asfixia e colapsos cardiovasculares

que podem resultar em morte (SAMPSON, 2004; EIGENMANN *et al.*, 2008; DAVIS, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2010; SICHERER, 2011). As reações alérgicas podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido, ou por distribuição sistêmica do antígeno após a ingestão (SAMPSON, 1999; SAMPSON, 2003).

Essas reações alérgicas podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando a seletividade da mucosa intestinal aos antígenos é alterada. Entre os fatores capazes de induzir esse desequilíbrio, podemos citar a imaturidade da mucosa intestinal em crianças (EIGENMANN, 2009), o uso prolongado de antiácidos (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2008) a ingestão de álcool (KESHAVARZIAN *et al.*, 2009) e o stress (VICARIO *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da alergia alimentar pode ser dividido em duas fases: fase de sensibilização e fase efetora, Figura 2 (HERZ, 2008).



**Figura 2: Imunopatogênese da alergia.**

Células apresentadoras de antígeno, células dendríticas, Imunoglobulina E (IgE), Interleucinas (IL), adaptado de Herz, 2008.

Uma vez que há a diminuição da regulação imunológica ou fisiológica da mucosa intestinal, pode ocorrer uma absorção exacerbada de moléculas da dieta. Essas moléculas atravessam o epitélio intestinal e são expostas às células apresentadoras de antígenos. As moléculas são processadas por essas células, e os antígenos provenientes dessas moléculas são apresentados para os linfócitos T helper ou auxiliares (Th), por via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Essa é a fase conhecida como sensibilização. Essa apresentação leva à proliferação de linfócitos T e a síntese de citocinas que, por sua vez, promovem uma resposta característica de linfócitos Th2 (EIGENMANN, 2009).

Essas citocinas são: interleucinas (ILs), dentre elas IL-3, IL-4, IL-5, IL9, IL-13 e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF). Cada citocina está envolvida em algum fenômeno imunológico, como recrutamento de mastócitos (IL-4,IL-9,IL-13), maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), maturação de basófilos (IL-3 e IL-4) e diferenciação, proliferação e mudança do isotipo A, IgA, para o E, IgE nos linfócitos B (IL-3 e IL-4) (HOLGATE & POLOSA, 2008). Sob a influência de dois fatores, produção de IL-3 e IL-4 (MINTON, 2008) e interação do receptor de membrana CD40 dos linfócitos B com o seu ligante CD154 (presentes em linfócitos B, linfócitos T, basófilos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas), os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos secretores de IgE (VAN KOOTEN & BACHEREAU, 2000; BISHOP & HOSTAGER, 2001; SCHONBECK & LIBBY, 2001; XU & SONG, 2004; BISCHOFF & CROWE, 2005).

Os anticorpos IgE específicos para o alérgeno entram na circulação e se ligam aos receptores de alta afinidade FcεRI em mastócitos e basófilos nos



tecidos, de modo que estas células ficam sensibilizadas e prontas para desgranular durante uma nova exposição ao alérgeno (SAMPSON, 1999; FINKELMAN *et al.*, 2005; NAUTA *et al.*, 2008).

Quando o antígeno é novamente ingerido formam-se ligações com várias moléculas de IgE (crosslinking) ligadas a mastócitos, resultando em ativação e liberação de mediadores inflamatórios que causam o recrutamento de células inflamatórias. Assim os sintomas são desencadeados, ocorrendo as reações alérgicas imediatas (de 1 a 30 minutos) e as reações alérgicas tardias (entre 6 a 72 horas), essa é a fase efetora (BREDEHORSR & DAVID, 2001; HELM *et al.*, 2003; HOLGATE & POLOSA, 2008; STONE *et al.*, 2010). Os mediadores inflamatórios são: histamina, prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas, proteases, entre outros (STONE *et al.*, 2010).

As reações alérgicas imediatas são caracterizadas pela vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento da taxa dos batimentos cardíacos, secreção de muco no TGI e no trato respiratório, causados pela liberação de histaminas e pelas citocinas IL-4 e IL-13 (STONE *et al.*, 2010; BLANCHARD *et al.*, 2004). As reações alérgicas tardias são causadas pela liberação de prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados e outras células inflamatória locais (MINAI-FLEMINGER & LEVI-SCHAFFER, 2009). A prostaglandina D2 (PGD2) causa vasoconstrição nos pulmões e coração, gera vasodilatação periférica e pode também estimular a produção de muco. Os leucotrienos e o PAF promovem broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular (CARA *et al.*, 2004; PEAVY & METCALFE, 2008). Uma característica importante nas reações alérgicas é o

acúmulo de eosinófilos. Pela ação da eotaxina e da IL-5, os eosinófilos são ativados e recrutados para as áreas inflamatórias (ROTHENBERG *et al.*, 2001).

A utilização de modelos animais é uma importante alternativa para o estudo dos mecanismos envolvidos nas condições patológicas, bem como para o desenvolvimento de estratégias clínicas que possam minimizar seus sinais e sintomas. Existem vários modelos experimentais que podem mimetizar diversas doenças. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental de alergia alimentar em camundongos, no qual a resposta imune do tipo Th2 é induzida para um determinado antígeno presente na dieta, no caso, a ovalbumina (OVA). Neste modelo, os animais recebem uma injeção subcutânea de OVA associada a um adjuvante, hidróxido de alumínio (AL(OH)<sub>3</sub>), onde a resposta Th2 é estimulada. Após a sensibilização, os animais têm como única opção líquida uma solução contendo OVA (SALDANHA *et al.*, 2004) ou então como única opção alimentar uma ração balanceada que também contém o antígeno (DOURADO *et al.*, 2011). Em resposta ao desafio oral, pode-se observar vários sinais clássicos do processo alérgico, como: alta produção de IgE anti-OVA, aumento da permeabilidade vascular, infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, aumento da produção de muco, perda de peso acentuada e uma drástica diminuição tecido adiposo, acompanhada por um infiltrado inflamatório mononuclear (SALDANHA *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2011). Além desses sinais clássicos, foi observado que camundongos sensibilizados com ovalbumina apresentam aversão à ingestão do antígeno tanto quando este está em solução aquosa (CARA *et al.*, 1994), como quando faz parte da ração (DOURADO *et al.*, 2011).

Alguns estudos já vem sendo conduzidos em função do tratamento e da prevenção da alergia alimentar, por exemplo, a partir da imunoterapia sublingual/oral (OIT), imunoterapia anti-IgE, vacinas usando proteínas recombinantes, terapias anti-citocinas, entre outros (WANG & SAMPSON, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2009). Outros tratamentos são desejáveis e estimulados inclusive pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2003). Nesse presente estudo avaliamos o uso da bactéria láctica *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) secretora ou não da proteína do choque térmico 65 (Heat shock protein 65: HSP65), como estratégia imunomoduladora da alergia alimentar.

### **1.3 Bactérias lácticas.**

As bactérias do ácido láctico são amplamente utilizadas na indústria de alimentos na produção e preservação de produtos fermentados. A designação “bactérias lácticas” (BL) se aplica a um grupo de bactérias gram positivas, não patogênicas, que têm o ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de carboidratos. As principais espécies do grupo BL são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*. Diversas espécies foram consideradas seguras e adquiriram o status de GRAS (Generally Recognized As Safe), são pouco imunogênicas, ao contrário dos microorganismos patogênicos e podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização. Outra propriedade atraente dessas bactérias é que elas não possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua parede celular, o que elimina os riscos de choque por endotoxina (MERCENIER *et al.*, 2000; DE VRESE *et al.*, 2001; CARR *et al.*, 2002).

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

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

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi alcançada tanto pelo desenvolvimento do conhecimento genético quanto pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Através deste dueto e a fim de obter níveis elevados e controlados de produção, vários vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos foram desenvolvidos e hoje constituem a base de todos os sistemas de expressão voltados para *L. lactis* (NOUAILLE *et al.*, 2003).

Contudo, para que algumas das proteínas produzidas (enzimas e antígenos) por estas bactérias tenham a atividade biológica desejada é preciso que após sua síntese, estas moléculas sejam corretamente endereçadas ao seu destino final: (i) citoplasma, (ii) membrana ou (iii) meio extracelular. A

secreção do antígeno permitirá a sua liberação para o meio externo, direcionando assim a interação deste com o ambiente (trato digestivo, por exemplo) (BERMÚDEZ-HUMARÁN *et al.*, 2004). Assim, vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas em diferentes localizações celulares já foram desenvolvidos não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL (NORTON *et al.*, 1995; PIARD *et al.*, 1997; DIEYE *et al.*, 2001; LE LOIR *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2004).

Steidler e seu grupo de pesquisa foram os primeiros a desenvolverem *L. lactis* geneticamente modificados para sintetizar e secretar, de modo eficiente, proteínas eucarióticas. As citocinas IL-2, IL-6 e IL-10 foram, então, produzidas por *Lactococcus* e testadas em diversos modelos experimentais (STEIDLER *et al.*, 1998; STEIDLER *et al.*, 2000). Em relação a alergia alimentar, Frossard e colaboradores, em 2007, administraram *L. lactis* que secretam IL-10 em camundongos sensibilizados para  $\beta$ -lactoglobulina, e os parâmetros alérgicos foram prevenidos.

Com a intenção de desenvolver uma estratégia para induzir mecanismos tolerogênicos e prevenir a reatividade aumentada do sistema imune associada a alergia alimentar, utilizamos a bactéria *L. lactis* geneticamente modificada para produzir e secretar a HSP65 de *Micobacterium leprae*. Por serem antígenos imunodominantes e diante dos diversos efeitos estimulantes sobre o sistema imunológico, as HSPs são consideradas antígenos potenciais a serem utilizados na profilaxia contra as mais variadas patologias.

#### **1.4 Proteínas do choque térmico (HSPs).**

As Proteínas do choque térmico (HSPs), também conhecidas como proteínas chaperonas, pertencem a um grupo de proteínas que podem ser encontradas em todos os tipos de células, procarióticas e eucarióticas e cuja a expressão se torna aumentada quando essas células são expostas a elevadas temperaturas ou outros tipos de estresse, como estresse oxidativo, deficiências nutricionais, radiação ultravioleta, exposição a agentes químicos, infecção viral, injúria por isquemias e inflamação. Quando encontradas em altas concentrações nessas ocasiões anteriormente descritas, as HSPs são também conhecidas como proteínas de estresse (LINDQUIST, 1986; LINDQUIST & CRAIG, 1988; ELLIS, 1990; SANTORO, 2000; POCKLEY, 2001).

De acordo com seu peso molecular, as chaperonas são classificadas, principalmente, em seis famílias, o que inclui HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100. São proteínas altamente conservadas durante o processo evolutivo; sendo que as mais conservadas são as famílias HSP60 e HSP70. O alto grau de homologia se reflete em reações cruzadas entre organismos distantes filogeneticamente, como entre microorganismos e mamíferos (VAN EDEN *et al.*, 2005). A HSP65 de *Micobacterium leprae* é um membro da família das HSPs60. É homóloga a HSP60 humana tendo cerca de 55% de similaridade/identidade, em seu genoma (MARENCO *et al.*, 2008).

Estão presentes em diversas localizações celulares, tanto em procariotos como em eucariotos (GULLO & TEOH, 2004).

Funcionalmente, as proteínas chaperonas auxiliam na conformação tridimensional da estrutura de proteínas recém-formadas. Após o estresse, as chaperonas reparam as proteínas mal-formadas ou favorecem a sua degradação pelos proteassomas (WALTER & BUCHNER, 2002; BORGES &

RAMOS, 2005). Além de atuar como chaperonas, as HSPs realizam diversas outras funções mais especializadas, tais como o controle transcricional (XING *et al.*, 2004) e o controle de apoptose (TAKAYAMA *et al.*, 2003). Entretanto, uma de suas mais importantes funções que vem sendo amplamente estudada recentemente, relaciona-se à regulação do sistema imune (NISHIKAWA *et al.*, 2008).

O fato de as HSPs apresentarem sua expressão aumentada em tecidos inflamados tornam essas proteínas alvos potenciais para estratégias terapêuticas. Estudos anteriores utilizando a HSP65 em protocolos de indução de imunomodulação já foram relatados em modelos de aterosclerose, artrite, lúpus, diabetes e colite (MARON *et al.*, 2002; VAN EDEN *et al.*, 2005; VAN EDEN *et al.*, 2007; MARENGO *et al.*, 2008; XIONG, *et al.*, 2009, SANTOS, 2011). Esse efeito imunomodulador foi explicado pela expansão ou aumento da atividade das células reguladoras reativas a HSP. Em modelo de artrite, essas células produziram IL-10 uma vez reestimuladas com o antígeno (WIETEN *et al.*, 2009). Além disso, a HSP60 em particular, liga-se a receptores imunes inatos como o receptor toll-like (TLR) tipo 2 - TLR2, levando à inibição da migração de células T e a consequente redução da entrada dessas células no sítio inflamado (ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2003; ZANIN-ZHOROV *et al.*, 2005).

As HSPs podem, de fato, ativar o sistema imune através de receptores de superfície como TLR2, TLR4, CD14, CD91 e CD40 (BINDER *et al.*, 2004). A sinalização de TLRs via HSP parece também ser diferente daquela induzida por LPS. A sinalização via HSP parece ser dependente de endocitose enquanto o LPS sinalizaria na superfície celular (TSAN & GAO, 2004).

Além de induzirem células T reguladoras e se ligarem a receptores da imunidade inata, as HSPs constituem auto-antígenos dominantes (QUINTANA *et al.*, 2008), segundo a teoria do homunculus imunológico proposto por Irun Cohen (COHEN & YOUNG, 1991). Segundo o autor, o repertório de linfócitos auto-reativos envolvidos na auto-imunidade fisiológica seria direcionado a três classes principais de antígenos homunculares: moléculas do sistema imune, moléculas de manutenção e moléculas tecido-específicas. As HSPs, conforme dito anteriormente, são moléculas de manutenção envolvidas em uma série de processos de homeostase intracelular. Foi possível observar que essas proteínas desempenham um mecanismo adicional no controle do processo imune inflamatório: células T efetoras ativadas aumentam a expressão de HSP60 e apresentam seus próprios epítomos via MHC-I ou MHC-II à células T reguladoras (QUINTANA *et al.*, 2008). Tais células T regulatórias promovem a redução dos efeitos pró-inflamatórios produzidos pelos linfócitos efetores, ocasionando, por exemplo, diminuição dos danos causados pela resposta inflamatória em doenças autoimunes (MOR *et al.*, 1996; MIMRAN *et al.*, 2004).

Dessa forma, uma vez demonstrado o aumento da expressão de HSP60 pelos linfócitos T efetores ativados e a regulação dos efeitos pró-inflamatórios dessas células por linfócitos T reguladores, torna-se de extrema relevância avaliar se a indução de tolerância oral à HSP65 produzida e liberada por bactérias, como *L. lactis* é capaz de prevenir a alergia alimentar.

## **1.5 Tolerância Oral.**



Normalmente o contato dos antígenos presentes no lúmen do intestino (dieta e microbiota) com o tecido linfóide associado à mucosa desencadeia uma reatividade imunológica não inflamatória com a indução de citocinas reguladoras como IL-10 e o fator de crescimento e transformação - beta (TGF- $\beta$ ) e de células T reguladoras capazes de suprimir a imunidade sistêmica aos antígenos introduzidos pela via oral, um fenômeno conhecido como “tolerância oral”. Esse fenômeno já foi descrito em várias espécies de mamíferos inclusive no homem (FARIA & WEINER, 2005) e parece ser um processo fisiológico importante pelo qual o tecido linfóide da mucosa incorpora antígenos cotidianamente sem desenvolver para eles uma reatividade imunológica inflamatória potencialmente danosa ao corpo. Nesse sentido, um componente importante da alergia alimentar parece ser a quebra da tolerância oral a antígenos da dieta e da microbiota ocasionada pela alteração inflamatória do microambiente normalmente tolerogênico da mucosa intestinal e/ou pelo aumento da entrada de antígenos devido a destruição da camada epitelial. Alguns autores (WALKER, 1986; LOUIS *et al*, 1996) consideram a alteração na permeabilidade da mucosa intestinal decorrente de danos infecciosos ou não (quebra de barreira) e o conseqüente aumento na entrada de antígenos os principais eventos iniciadores do processo inflamatório da mucosa.

Há alguns anos, estudos demonstraram que um fator importante na indução de tolerância oral é o regime de administração do antígeno por via oral. A ingestão contínua do antígeno diluído na mamadeira do animal é mais eficiente na indução de supressão que a administração da mesma quantidade de antígeno por via intragástrica *in bolus* (gavagem). Um dos mecanismos importantes na eficácia da ingestão contínua de antígenos é sua capacidade

aumentada de induzir a produção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (FARIA *et al*, 2003). Essa propriedade da ingestão voluntária torna esse regime de administração de *L.lactis* produtor de HSP65 um candidato potencial a imunomodulador de situações inflamatórias normalmente não moduladas pela simples administração oral de antígenos específicos.

Sendo assim, nossa hipótese é de que o processo de alergia alimentar envolve lesões do TGI com liberação das HSPs e, conseqüentemente, intensificação da resposta inflamatória. A indução de uma resposta tolerogênica à HSP sugere-se na diminuição dos sinais inflamatórios encontrados na alergia alimentar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar a administração oral de *Lactococcus lactis* produtores de HSP65, como tratamento potencialmente imunomodulador no modelo experimental de alergia alimentar em camundongos BALB/c.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar, em animais submetidos ao protocolo de alergia alimentar, se o tratamento prévio com *Lactococcus lactis* produtores de HSP65 interfere:

1. Na produção de IgE e IgG1 específicos para ovalbumina;
2. Nos parâmetros clínicos : consumo de ração, peso corpóreo e Índice de atividade da doença – Score DAI (Disease activity index);
3. Nos parâmetros morfológicos do Jejuno Proximal (edema, aumento da produção de muco, presença de infiltrado eosinofílico, alteração na atividade enzimática de eosinófilos e neutrófilos) e tecido adiposo periuterino e mesentérico (peso, presença de células inflamatórias, tamanho dos adipócitos).
4. Na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, no Jejuno Proximal e tecido adiposo periuterino.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com três a quatro semanas de idade. Os animais foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia, em gaiolas de plástico, contendo o máximo de seis animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (Ivermectina 1%, JA Produtos Veterinários, Patrocínio Paulista, SP). Os animais receberam água “*ad libitum*” durante todo o experimento e ração comercial para camundongos (Purina, São Paulo, SP) até o desafio antigênico.

#### **3.2 Produção de *L. lactis* expressando HSP65.**

As linhagens bacterianas que foram empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco) suplementado com 0,5% de glicose ou 1% de xilose (GM17 ou XM17, respectivamente). Para o cultivo das bactérias, com a exceção de *L. lactis* selvagem (*L. Lactis* WT), 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado. As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio sólido por um período de 18 horas (“overnight”). Em seguida, colônias isoladas foram

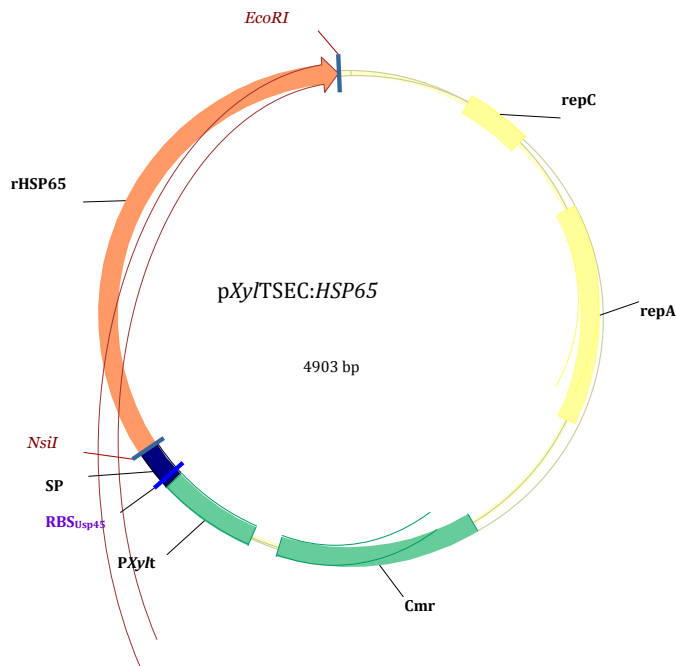
individualmente coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável e inoculadas em meio líquido. Depois de cultivadas, as culturas foram diluídas (4:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer -80°C. A representação dos vetores de expressão de *L. lactis* produtor de HSP65 está ilustrado na Figura 3. Foi estimado por Western Blotting que *L. lactis* pSEC (produtor de HSP na forma secretada) produz 7 mg/L de HSP65. Além disso, a HSP65 produzida por *L. lactis* é livre de LPS (Azevedo, 2009).

**Tabela 1: Linhagens bacterianas**

Espécie	Linhagem	Fonte
<i>L. lactis</i> NCDO2118 a	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	LGCM
<i>L. lactis</i> pSEC:HSP65 b	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXylT:SEC:HSP65/Cmr contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 (SPUsp) de <i>L. lactis</i> fusionada à ORF de interesse sob o controle do promotor PxyIT.	Rocha, 2007

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

b: Linhagem recombinante de *L. lactis* portadora do plasmídeo pXylT:SEC:HSP65 foi desenvolvida por Rocha, 2007.



**Figura 3: Representação dos vetores de expressão pXylT:SEC:HSP65.**

P<sub>XylT</sub>: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. NsiI e EcoRI: Sítio para as enzimas de restrição NsiI e EcoRI. rHSP65: ORF HSP65 de *Micobacterium leprae*. repA e repC: origens de replicação. Cm: Gene que confere resistência ao cloranfenicol.

### 3.3 Esquema de indução e tratamento com *L. lactis* WT e *L. Lactis* produtoras de HSP65.

#### Primeiro dia

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

## **Segundo dia**

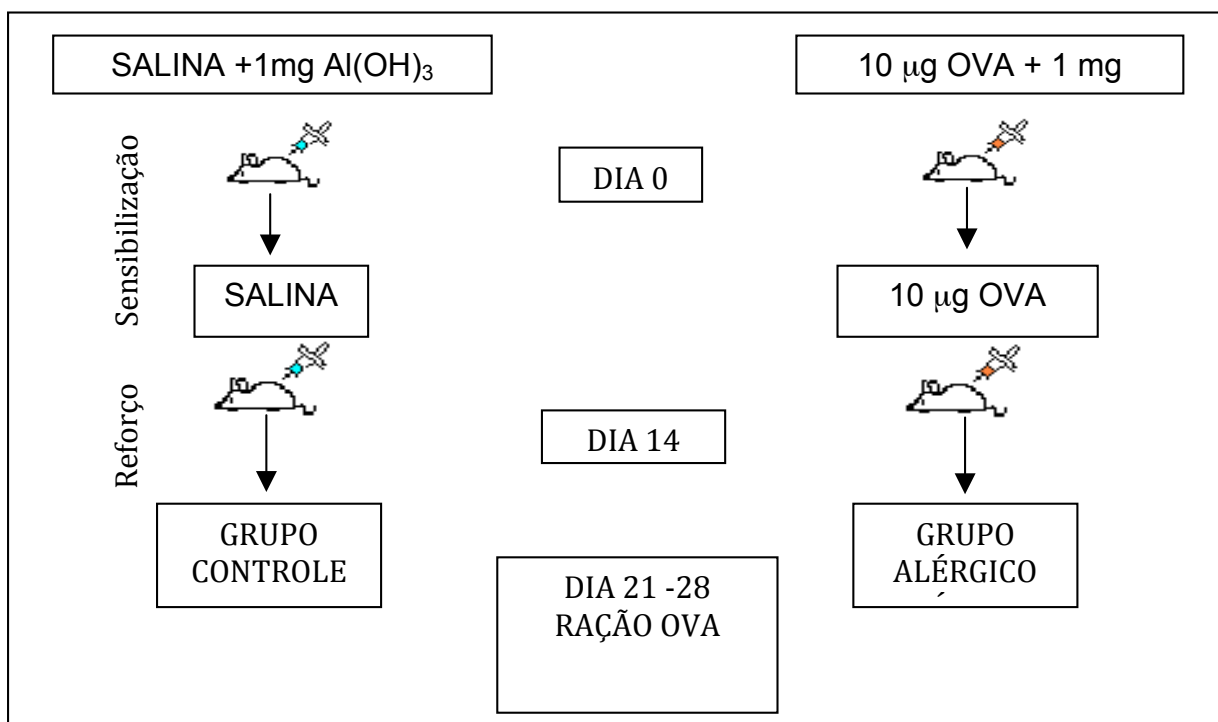
As culturas crescidas “overnight” foram diluídas (1:10.000) em 10 mL de XM17. Posteriormente, os inóculos foram incubados na estufa a 30° C, sem agitação, por mais 18 horas.

## **Terceiro dia**

Após as culturas terem alcançado uma densidade óptica (OD) 600nm 2.0, as culturas crescidas “overnight” foram acondicionadas em mamadeiras de vidro autoclavadas e ofertadas aos camundongos. O procedimento foi feito por 4 dias consecutivos.

### **3.4 Protocolo de indução de alergia alimentar a ovalbumina.**

O modelo de alergia alimentar utilizado neste estudo foi o desenvolvido por Saldanha e colaboradores, em 2004, representado na Figura 4. Para indução da alergia (imunização primária), os camundongos foram injetados com ovalbumina, na dose de 10 µg, adsorvida em AL(OH)<sub>3</sub> (1 mg) por via subcutânea (dia 0). O controle recebeu apenas adjuvante - AL(OH)<sub>3</sub>. Receberam uma segunda imunização (secundária ou reforço) 14 dias depois (dia 14). A partir do sétimo dia após a sensibilização secundária (dia 21), os animais receberam ração balanceada à base de ovalbumina (OVA) a 14% - desafio oral. Os animais dos grupos controles passaram pelo mesmo procedimento de sensibilização que os animais alérgicos, porém não recebem OVA.



**Figura 4: Protocolo Experimental de Indução da Alergia**

O trabalho foi realizado com seis grupos experimentais, contendo seis animais em cada. Os grupos 1, 3 e 5 receberam injeção s.c. de salina + 1 mg Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0, e apenas salina no dia 14. Os grupos 2, 4 e 6 receberam injeção s.c. de 10 µg OVA + 1 mg Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0, e apenas OVA no dia 14. Sete dias após o reforço (dia 21) todos os grupos receberam ração contendo OVA.

### 3.5 Ração Balanceada

Para o desafio antigênico, foi utilizada ração com composição baseada na AIN (Instituto Americano de Nutrição)-93G descrita por Reeves e colaboradores, em 1993. Essa ração foi preparada utilizando-se clara de ovo liofilizada (Saltos's, Salto, SP) na concentração de 14% (Tabela 2).

Todos os ingredientes foram pesados e misturados. O óleo foi pesado em uma quantidade 2 gramas maior, considerando-se a perda deste no vasilhame. A mistura de vitaminas foi adicionada por último e ao abrigo da luz. Após a adição de todos os ingredientes, a mistura foi peneirada três vezes para



homogeneização. Após acréscimo de água, a ração foi moldada e acondicionada no freezer (-20° C).

**Tabela 2: Ração padrão para roedores baseada na AIN-93G**

INGREDIENTES	Nutriente em gramas	Kcal
Clara de ovo liofilizada (ovalbumina)	200	800
Cistina (metionina)	3	12
Amido de milho(Maisena®)	397,5	1590
Sacarose	100	400
Celulose	50	0
Óleo de soja	70	630
BHT	0,014	
Mistura de minerais (Rosther ®)	35	
Mistura de vitaminas (Rosther ®)	10	
Bitartarato de colina	2,5	

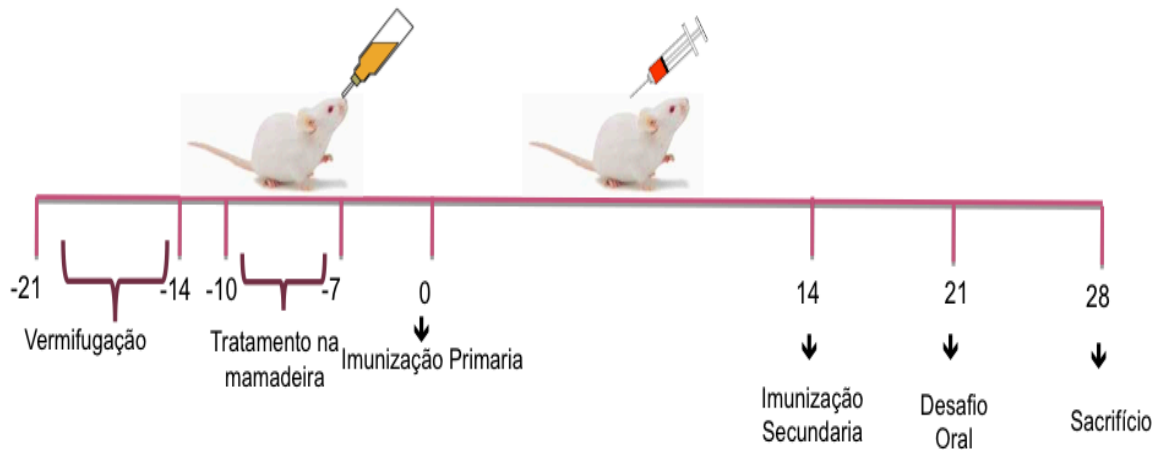
### 3.6 Desenho Experimental

Os grupos foram separados da seguinte maneira:

**Tabela 3: Divisão dos grupos experimentais**

Tratamento na mamadeira/Sensibilização	Meio (M17 Difco) sem a presença de <i>L.lactis</i> .	<i>L. lactis</i> WT	<i>L. lactis</i> produzindo HSP65
Não sensibilizado (Controle)	Grupo 1 (Meio)	Grupo 3 (WT)	Grupo 5 (HSP65)
Sensibilizado (Alérgico)	Grupo 2 (Meio)	Grupo 4 (WT)	Grupo 6 (HSP65)

Escala Temporal (dias):



**Dia -21 ao dia -14 :** Vermifugação;

**Dia -10 ao dia -7:** Os animais receberam na mamadeira *ad libitum* uma solução, os grupos “meio” receberam somente o meio, M17 difco, acrescido de cloranfenicol e xilose; o grupo WT recebeu a mesma solução do grupo meio acrescido de 5 µl do inóculo de *L.lactis* WT; o grupo HSP65 também recebeu a mesma solução do grupo meio acrescido de 5 µl do inóculo de *L.lactis* que produz HSP65.

**Dia -7 ao dia 0:** Intervalo de tolerância oral.

**Dia 0:** Sensibilização primária;

**Dia 14:** Sensibilização secundária (Reforço);

**Dia 21 ao dia 28:** Desafio oral com troca da ração comercial pela ração AIN93G, acrescida do antígeno ovalbumina.

**Dia 28:** Eutanásia dos animais para avaliação sorológica e histológica.

### 3.7 Eutanásia

Após sete dias (dia 28) de consumo restrito e voluntário de ração de ovalbumina a 14%, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg; Dopaser®, Hertape Calier Saúde Animal, Juatuba, MG) e ketamina (200 mg/kg; Vetanarcol®, Laboratórios Konig do Brasil, Santana de Parnaíba, SP) para retirada do sangue, através dos vasos axilares e obtenção do soro. Posteriormente, e ainda sob anestesia, sofreram eutanásia através de deslocamento cervical.

Na necropsia, o soro e os órgãos foram retirados. Esses foram congelados a -20° C (soro, jejuno proximal e tecido adiposo periuterino) ou fixados em formol (jejuno proximal, tecido adiposo periuterino e tecido adiposo mesentérico).

### **3.8 Obtenção de soro**

Após coagulação, o sangue foi centrifugado, 3000 rotações por minuto (r.p.m.), por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior dosagem sérica de anticorpo IgE anti-OVA e IgG1 anti-OVA.

### **3.9 Avaliação da Alergia Alimentar a ovalbumina.**

#### **3.9.1 Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no Soro**

A dosagem de anticorpos IgE foi realizada através do teste de ELISA (Ensaio de Absorção Imunoenzimático). Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a  $-4^{\circ}\text{C}$  overnight, contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em tampão carbonato pH 9.6, 50  $\mu\text{L}$ /poço. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com salina-Tween 20 e incubadas por 1 hora contendo 200  $\mu\text{L}$ /poço de solução caseína a 0,25% em tampão salina fosfato (PBS), para bloqueio à temperatura ambiente (TA). Após este período a placa foi lavada 3 vezes salina-Tween 20 e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  /poço do soro total das amostras dos animais a serem testados, as placas foram incubadas por 2 horas à TA e lavadas com solução salina-Tween 20 por 5 vezes. As placas foram incubadas por 1 hora à TA com 1  $\mu\text{L}$  de OVA-Biotinilada em 50 $\mu\text{L}$  de PBS-Caseína, por poço. Após nova lavagem com salina-Tween 20, as placas foram incubadas com 50 $\mu\text{L}$ /poço com Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1:5000 por 45 minutos à TA. As placas foram lavadas 4 vezes com salina-Tween 20 e em seguida foi realizada a etapa de revelação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ortofenileno-diamino (OPD), as placas foram incubadas em uma câmara escura por 15 minutos à TA até que a reação ocorresse. Decorridos os 15 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu\text{L}$ /poço de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 2 normais de concentração (2N). Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A OD foi obtida em Leitor de ELISA (Expert Plus, Asys

Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) e lidas com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.) sendo o padrão positivo considerado como 1000 unidades e as demais amostras comparadas a este valor.

### 3.9.2 Dosagem de Imunoglobulinas IgG1 anti-OVA no Soro.

A dosagem de IgG1 foi feita através do teste de ELISA, que, resumidamente, segue a metodologia descrita a seguir: microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas overnight (4°C), com 2 µg de OVA diluídos em 100 µl por poço de tampão carbonato concentrado pH=9,6 (Coating Buffer). Após 18 horas, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA – solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 µl de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 1 hora, com 100 µl por poço de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:1000 (diluições 1:1000 a 1:32000). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas por 1 hora (37°C) com 100 µl por poço de uma solução com anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo (Goat anti-mouse IgG1, Southern Biothechnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora (37°C) com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (Rabbit anti-goat IgG – HRP, Southern Biothechnology Associates, Birmingham,

AL, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OPD. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2%. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA ( Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos em U.A. utilizando-se a melhor diluição das amostras (1:8000), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo.

### **3.10 Avaliação dos parâmetros clínicos.**

#### **3.10.1 Avaliação do consumo de ração.**

Para medir o consumo de cada grupo de animais, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas, antes e após o desafio antigênico, com ração balanceada com ovalbumina. O resultado foi expresso em gramas através do consumo semanal estimado por animal. Uma possível perda da ração no fundo da gaiola não foi computada.

#### **3.10.2 Avaliação do peso corpóreo.**

O peso corpóreo foi expresso em gramas e avaliado individualmente uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final, ou seja, 7 dias após o início do desafio antigênico (dia 28).

### 3.10.3 Índice de atividade da doença – Score DAI (Disease activity index).

Após o desafio antigênico, houve o acompanhamento diário de alguns parâmetros clínicos dos animais, através de uma escala que foi adaptada a partir de dados obtidos na literatura (Yu *et al.*, 2004), sendo assim usada pelo nosso grupo de pesquisa (Dourado *et al.*, 2011).

A escala do índice de atividade da doença - Score DAI – Disease activity index, avalia: a variação do peso corporal (% de perda de peso durante a semana do desafio antigênico), consistência das fezes e a presença de sangue oculto nas mesmas. O sangue oculto foi verificado através do kit diagnóstico da FECA-CULT™, de acordo com as instruções do fabricante. Estes três parâmetros foram pontuados de acordo com a tabela 4, abaixo, somando um total de 9 pontos.

**Tabela 4: índice de atividade da alergia alimentar induzida por ovalbumina.**

Índice	% perda de peso	Consistência das fezes	Sangue oculto nas fezes
0	Nenhuma	Normal	Ausente
1	1% a 5%		
2	6% a 10%	Amolecidas	Oculto
3	>10%		
4		Diarréicas	

### 3.11 Avaliação do Intestino Delgado - Jejuno Proximal.

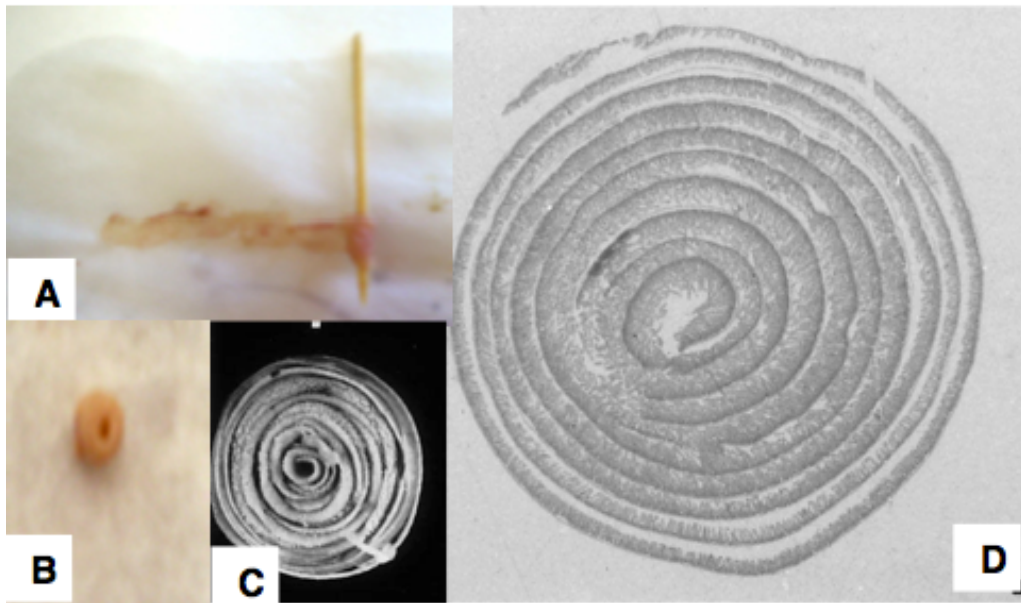
#### 3.11.1 Avaliação do edema intestinal.

A quantificação do edema foi realizada pela técnica de Moore-Olufemi e colaboradores, em 2005, modificada. Após a eutanásia, um pedaço de 1 cm do duodeno foi pesado (peso úmido) e seco em estufa a 56°C, por 24 horas, e novamente pesado (peso seco). Para avaliação da perda de água utilizou-se a fórmula:  $\{(Peso\ úmido - Peso\ seco) / Peso\ seco\}$ .

### 3.11.2 Avaliação Morfológica do Jejuno Proximal.

O intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, e foi utilizado o critério baseado em Ferraris e colaboradores, em 1992. A alergia alimentar foi avaliada, morfológicamente, pela observação de alterações no segmento de jejuno proximal, que foi retirado (Figura 5), fixado em formol tamponado a 10%, enrolado (Figura 5) e desidratado em soluções decrescentes de alcoóis e incluído em parafina. A partir desses blocos, cortes de 4 µm foram obtidos e as lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Periodic Acid Schiff (P.A.S.). As técnicas estão descritas no ANEXO I.





**Figura 5: Preparação dos intestinos para confecção de lâminas histológicas em forma de rocambole.**

A – os intestinos foram enrolados com a ajuda de um palito de madeira começando o rolo pela sua porção inicial. B – intestino em forma de rolo após imersão em formol. C – Visão superior do intestino em forma de rolo em aumento maior (foto: Arantes & Nogueira, 1997). D – Corte em micrótomo do intestino (foto: Arantes & Nogueira, 1997).

#### 3.11.2.1 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Neste método, cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, realizados em micrótomo (American Optical - Spencer 820) foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até que atingissem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes foram evidenciadas em um tom rosa escuro.

Após montagem das lâminas foram capturadas imagens de três campos do jejuno proximal do intestino delgado a partir de um microscópio (Olympus Optical Co., Japan, B201) equipado com uma câmera digital (Moticam 2500,

China). As imagens foram analisadas com a utilização do software de morfometria ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

Para a determinação da área ocupada pelas células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em % PAS/campo.

### 3.11.2.2 Avaliação do número de eosinófilos

Para a avaliação do infiltrado intestinal de eosinófilos, lâminas histológicas foram coradas pela HE e examinadas em microscópio óptico (Olympus Optical Co., Japan, B201) equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). A contagem de células foi realizada observando 10 campos aleatórios em uma lente objetiva de 40X e o resultado expresso em número de eosinófilos/campo.

### 3.11.3 Dosagens enzimáticas das atividades de neutrófilos e de eosinófilos.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima de neutrófilos e sua dosagem reflete indiretamente a quantidade dessas células num tecido. Ela foi dosada no tecido do intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C, por meio do método anteriormente citado por Krawisz e colaboradores, em 1984. O material foi pesado, macerado com solução tampão e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado, sendo adicionados de cloreto de sódio (NaCl) 0,2% gelado e de NaCl 1,6% com

glicose 5% gelada. Feita uma nova centrifugação, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em tampão fosfato com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 5% e re-homogenizado por 30 segundos, um volume 1 mL das amostras foram congelados e descongelados seguidamente, 3x em nitrogênio líquido, submetidos novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 25 µl do sobrenadante foi adicionado em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), incubado com 50 µl de tampão com tetramethylbenzidine (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a absorbância foi lida em Leitor de ELISA ( Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) a 450 nm. Os valores foram expressos em O.D.

A peroxidase eosinofílica (EPO) é uma enzima de eosinófilos que reflete indiretamente a quantidade desta célula. A EPO foi dosada no tecido do intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C. Este ensaio foi conduzido assim como descrito por Strath e colaboradores, em 1985. Foram pesados 100 mg do jejuno dos animais e estes foram processados em um homogeneizador de tecidos com 1,9 mL de PBS. O material foi centrifugado a 12.000 g (especificamente 10.000 r.p.m. no rotor utilizado) por 10min. O sobrenadante foi descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1,5 mL de salina 0,2% seguida de 1,5 mL de salina 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado (pellet) foi ressuspenso em 1,9mL de solução de HTAB 0.5% em PBS. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado

no ensaio enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75 µl de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços juntamente com 75 µl da solução do substrato (1,5 mM OPD, em tampão tris-HCl - ácido clorídrico, 0,075 mM, pH=8,0 suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol/L. A absorbância foi lida em Leitor de ELISA ( Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) a 492nm. Os valores foram expressos em O.D.

### **3.12 Avaliação do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.**

#### **3.12.1 Peso do tecido adiposo periuterino e mesentérico.**

O tecido adiposo periuterino e mesentérico também foram pesados (apenas peso úmido). O resultado foi expresso relativo ao peso do animal no dia da eutanásia, peso do tecido adiposo(g) / peso do animal(g).

#### **3.12.2 Avaliação morfométrica do tecido adiposo periuterino e mesentérico.**

O tecido adiposo periuterino e o tecido adiposo mesentérico, foram coletados durante a necropsia e fixados em formalina 10% durante vinte e quatro horas para a coloração pela técnica de H.E, em ANEXO I.

Para a medida da área dos adipócitos, lâminas histológicas do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico coradas por H.E., foram

analisadas utilizando-se um microscópio (Olympus Optical Co., Japan, B201), em um aumento de 20X, equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). A medida da área de 50 adipócitos por animal foi realizada através do software Image J. O resultado foi expresso pela área do adipócito em  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.13 Preparação de extratos de tecidos**

Amostras do jejuno proximal e tecido adiposo periuterino foram pesadas e adicionados 1 mL de solução tampão contendo 0,05% de Tween-20, 0,1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0,1 mM de cloreto benzotônio, 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 20 kallikrein inactivator units (Kiu) de aprotinina A para cada 100 mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador e centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos, a 4°C . As amostras foram mantidas a - 20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

### **3.14 Medida da produção de citocinas por ELISA**

No jejuno proximal, foram medidas as concentrações de IL-4, IL-5 e IL-10 enquanto no tecido adiposo, foram medidas as concentrações de IL-6, IL-4 e IL-10 por ELISA (Maron *et al.*, 1999). Para tal, utilizou-se anticorpos monoclonais (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) anti-IL-6, anti-IL-4, anti-IL5, anti-IL10 murinos. Após 18 horas de incubação a 4°C as placas (NUNC) foram lavadas com salina acrescida de 0,05% de Tween-20 e bloqueadas com PBS a 0,5% de caseína. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, os

extratos de tecido foram adicionados às placas e as mesmas foram incubadas overnight a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas novamente com salina com 0,05% de Tween-20 e posteriormente foi adicionado anticorpos monoclonais (Pharmingem) conjugados com biotina específicos para as citocinas em questão. Após 2 horas de incubação, as placas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 1:15000 vezes em PBS contendo 0,5% caseína durante uma hora a 37°C. Finalmente, a revelação foi feita através da incubação de uma solução de citrato de sódio pH 4,5 acrescida de OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes como substrato. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria), em 492 nm. As reações de ELISA tiveram como controle positivo citocinas recombinantes de camundongo (RD Systems). Os resultados foram expressos como nanogramas/mililitro (ng/mL).

### **3.15 Análise estatística**

A análise das diferenças na resposta entre grupos relacionados foi feita pela análise de variância (ANOVA) e apresentados como média ± erro padrão da média. Para comparações pareadas entre grupos foi usado one-way ANOVA - Tukey. O nível de significância foi considerado quando  $p < 0.05$ . As análises foram realizadas com o auxílio do software de estatística: GraphPad Prism®4. Foi usado um asterisco (\*), quando houve diferença significativa entre um grupo alérgico e seu respectivo controle, e dois asteriscos (\*\*), quando a

diferença significativa foi constatada entre o grupo alérgico tratado e o grupo alérgico que somente recebeu Meio de cultura M17 (sem tratamento).

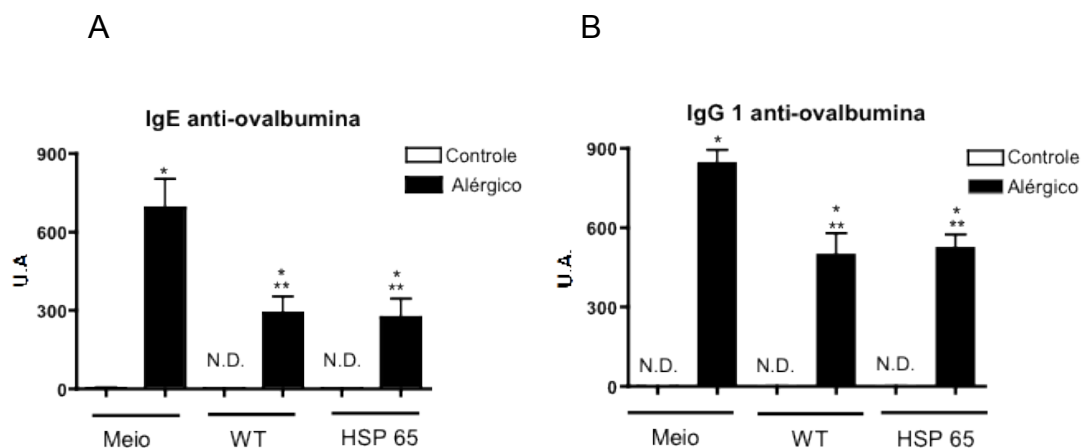
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Quantificação sérica de IgE e IgG1 anti-ovalbumina.

Para verificar se os animais ficaram realmente alérgicos e se os tratamentos interferiram nessa alergia, foi feita a dosagem imunológica de IgE e IgG1 anti-OVA, no soro dos animais, após a eutanásia. Os animais alérgicos produziram mais IgE anti-OVA do que os animais controle. Em relação ao grupo que recebeu a bactéria *L. lactis* WT, o grupo alérgico apresentou uma diminuição de 50,8% na dosagem dessa imunoglobulina. No grupo alérgico que recebeu a bactéria *L. lactis* que produz HSP65, foi constatada uma diminuição de 50,7% nos níveis de IgE anti-OVA, Figura 6, A.

Em relação a dosagem de IgG1 anti-OVA, todos os grupos alérgicos apresentaram um aumento nos níveis dessa imunoglobulina, quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Mas, quando os animais alérgicos foram tratados com a bactéria *L.lactis* WT houve uma diminuição sérica de 40,7% desse anticorpo e quando foram tratados com a mesma bactéria que produz HSP65, essa diminuição foi de 37,7%, ambos os grupos foram comparados com o grupo alérgico que recebeu somente o meio, M17 difco, Figura 6, B.





**Figura 6: Avaliação dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo obtidos em amostras de soro total para IgE anti-OVA (A) e IgG1 anti-OVA (B) comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A). N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

#### 4.2 Avaliação dos parâmetros clínicos: Consumo de ração, peso dos animais e o Índice de atividade na doença – Score DAI.

O consumo de ração foi quantificado diariamente durante uma semana antes do desafio antigênico (ração comercial, sem ovalbumina) e na semana durante o desafio antigênico (ração AIN-93G, contendo ovalbumina). O consumo de cada dia foi somado, feito a média e dividido pela quantidade de animais presentes na gaiola (n=6). Todos os animais dos grupos alérgicos demonstraram uma diminuição do consumo de ração – cerca de 60% a menos, quando a mesma foi trocada pela ração que contém o antígeno. E quando comparados com os grupos controles, durante o desafio oral, essa diminuição foi de cerca de 50%. Não há diferença de consumo entre os grupos que não receberam tratamento (meio) e os grupos que receberam os tratamentos com

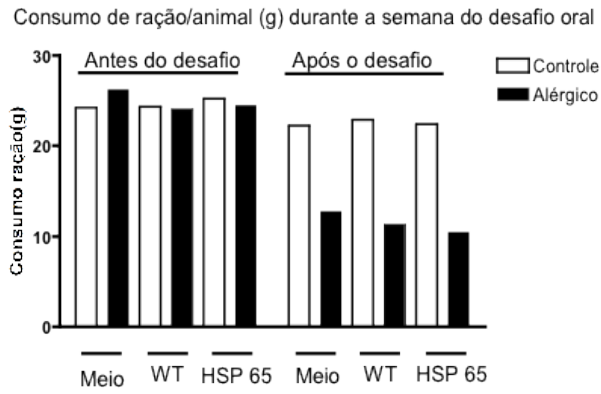
as bactérias *L.lactis* selvagem ou que produzem HSP65 (WT e HSP65), Figura 7, A.

Como outro parâmetro clínico, o peso dos animais também foi quantificado e expresso por  $\Delta$  peso (peso final – peso inicial), durante todo o experimento, e do mesmo modo que o peso da ração, uma semana antes do desafio antigênico e durante a semana do desafio antigênico. Antes do desafio antigênico, não houve diferença significativa entre o  $\Delta$  peso dos animais, tanto nos grupos controles quanto nos grupos alérgicos. Mas ao serem desafiados os todos os animais alérgicos apresentaram uma redução média de 50% no  $\Delta$  peso em relação ao  $\Delta$  peso da semana anterior ao desafio. E durante a semana do desafio o  $\Delta$  peso de todos os animais alérgicos foi cerca de 70% menor do que os animais controles que também foram desafiados. Os grupos tratados com as bactérias *L.lactis* selvagem ou que produzem HSP65 (WT e HSP65), não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo alérgico que não recebeu tratamento (meio), Figura 7, B e C.

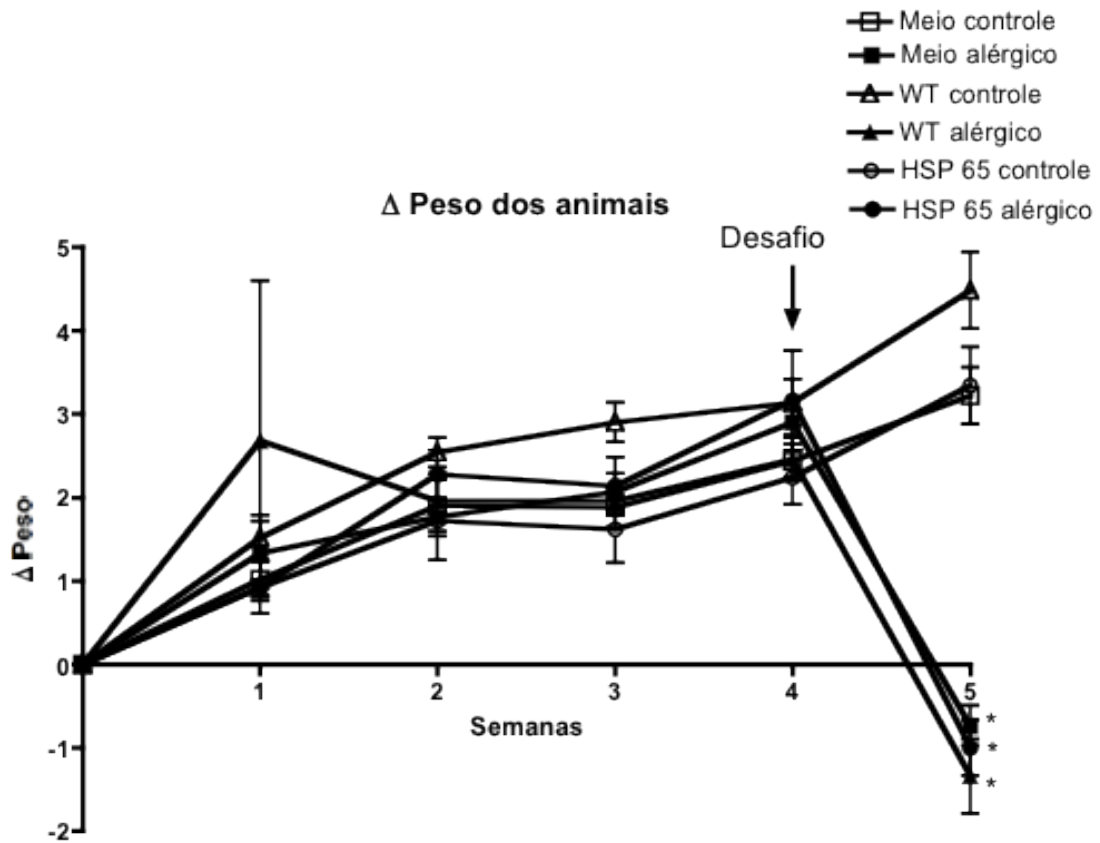
O Índice de atividade da doença – Score DAI, é uma junção de três parâmetros clínicos: alteração do peso corpóreo, presença de sangue oculto nas fezes e consistência das fezes do animal. Este índice foi medido durante toda a semana do desafio antigênico, em cada animal e tirado a média. O resultado é expresso por pontuação, sendo a pontuação máxima de 9 pontos. O grupos alérgicos apresentaram um aumento em relação aos seus respectivos controles. O grupo alérgico que recebeu a bactéria *L. lactis* WT quando comparado ao grupo alérgico que não recebeu tratamento, apresentou uma diminuição de 33,7%, nesta pontuação. Ao avaliarmos o grupo alérgico que recebeu a bactéria *L. lactis* que produz HSP65 também é possível

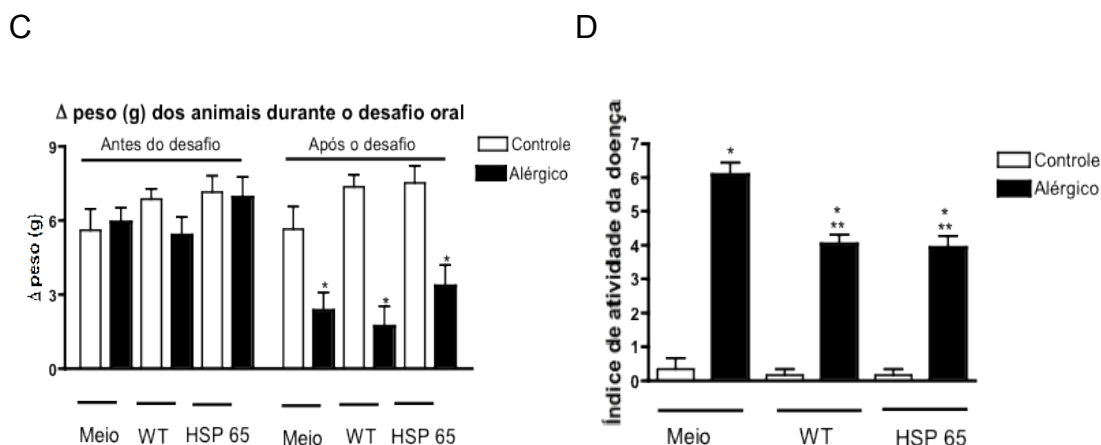
perceber uma diminuição de 35,3%, no índice de atividade da doença, quando comparado com o grupo alérgico que não recebeu tratamento, Figura 7, D.

A



B





**Figura 7: Avaliação dos parâmetros clínicos.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo.

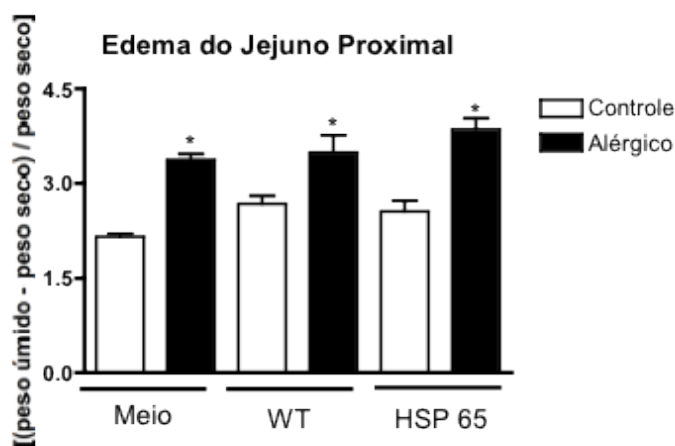
A: Consumo de ração por animal, uma semana antes do desafio antigênico e durante o desafio antigênico. B: Peso dos animais durante todo o experimento. C: Peso dos animais uma semana antes do desafio antigênico e durante a semana do desafio antigênico. D: Índice de atividade da doença, durante a semana do desafio antigênico. N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

### 4.3 Avaliação Morfológica do Intestino Delgado – Jejuno Proximal.

#### 4.3.1 Avaliação da presença de edema intestinal.

A reação imediata da alergia provém da atividade da histamina, que causa relaxamento da musculatura lisa de arteríolas e contração da célula endotelial em vênulas, gerando vasodilatação arteriolar e um aumento rápido na permeabilidade vascular das vênulas o que leva a um extravasamento de proteínas (como a albumina) e de líquidos para o interstício (exsudação). Avaliando o edema intestinal pela fórmula  $[(\text{peso úmido}) - (\text{peso seco}) / \text{peso seco}]$ , observou-se que todos os animais alérgicos, que não receberam tratamento (grupo meio) ou que receberam os tratamentos (WT e HSP65),

tiveram um aumento médio de 40% de edema em relação aos seus respectivos grupos controles. Não houve diferença significativa, entre os grupos alérgicos, que receberam ou não os tratamentos, Figura 8.



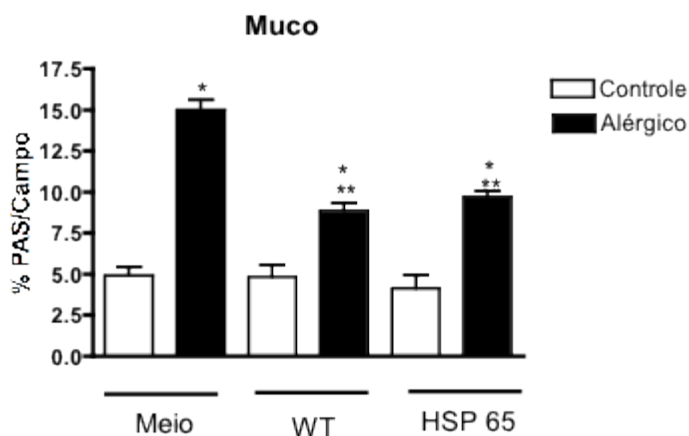
**Figura 8: Avaliação da presença de edema intestinal.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo calculados pela fórmula  $[(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso seco}]$ . N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

#### 4.3.2 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra.

Durante a alergia alimentar há um aumento da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado, no intento de proteger a mucosa intestinal contra a entrada em excesso de antígenos. A coloração de PAS, referência para mucinas neutras, foi realizada em lâminas com cortes de jejuno proximal para quantificar o muco produzido por estas células. Quando comparamos os grupos alérgicos com os seus respectivos grupos controles, podemos observar um aumento na produção de muco. No grupo alérgico tratado com a bactéria *L.lactis* WT houve uma diminuição de 40,9%, nessa

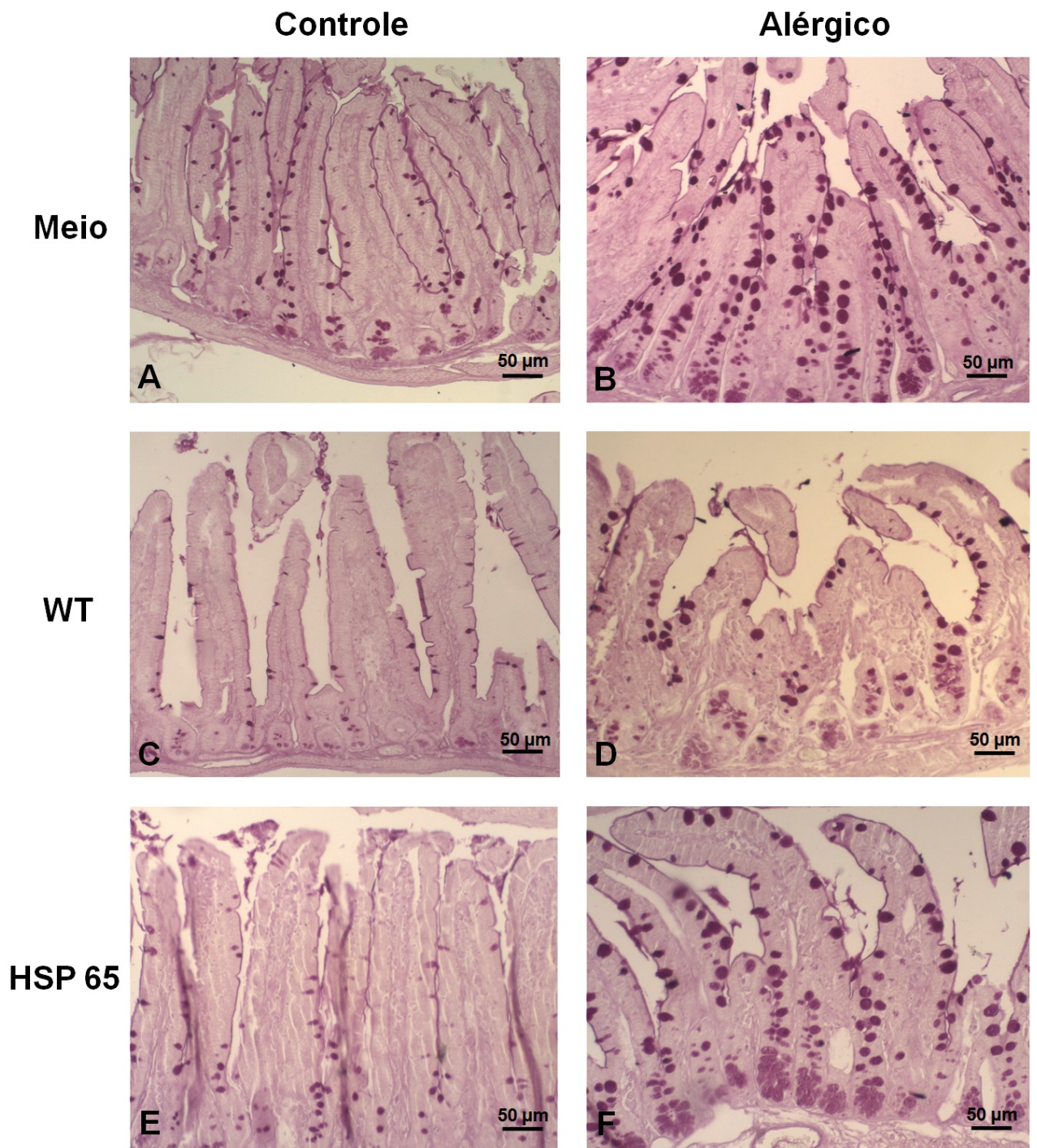
produção, ao ser comparado com o grupo alérgico que recebeu meio de cultura. O grupo tratado com a bactéria *L.lactis* que produz HSP65 apresentou uma diminuição de 35,1%, na produção de muco quando comparado com o grupo alérgico meio, Figura 9 e 10.



**Figura 9: Avaliação do muco neutro produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo e os resultados foram analisados 3 campos aleatórios do jejuno proximal morfometricamente. N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.



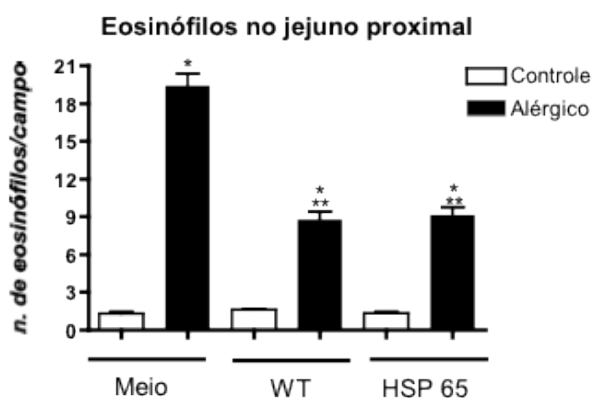


**Figura 10: Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Após a eutanásia, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S.. A: Camundongo Balb/c controle meio; B: Camundongo Balb/c alérgico meio; C: Camundongo Balb/c controle WT; D: Camundongo Balb/c alérgico WT; E: Camundongo Balb/c controle HSP 65; F: Camundongo Balb/c alérgico HSP 65. Aumento 10X.

#### 4.3.3 Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal.

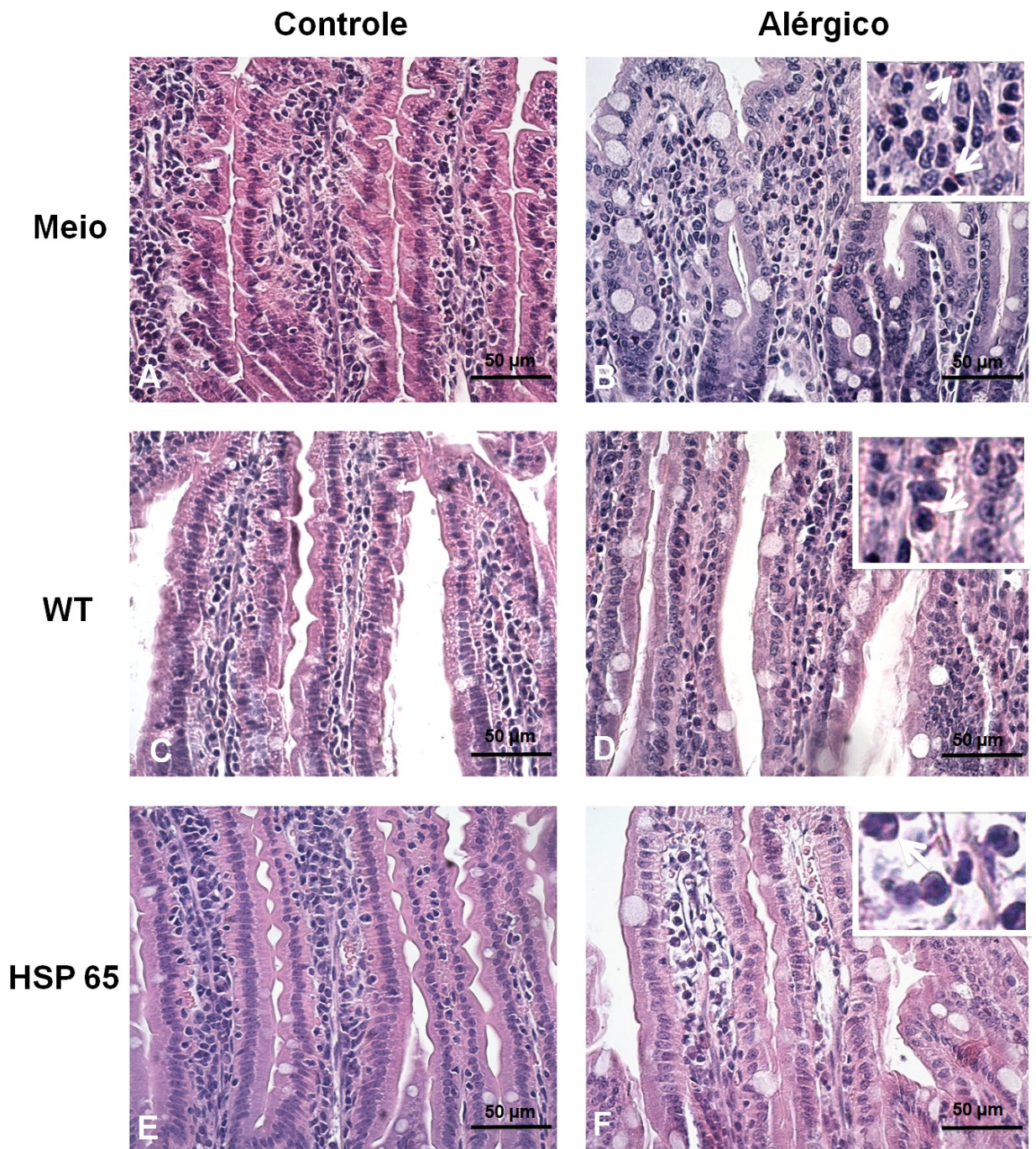
Durante a alergia alimentar, acontece a reação de fase tardia que é causada pela síntese induzida e pela liberação de mediadores, que incluem leucotrienos, as quimiocinas e as citocinas, pelos mastócitos ativados, recrutando outros leucócitos, incluindo linfócitos Th2 e eosinófilos para o local da inflamação. Os eosinófilos são importantes células relacionadas com fenômenos alérgicos. Ao compararmos os grupos controles com os grupos alérgicos, percebemos um aumento de infiltrado eosinofílico neste último. Em relação aos grupos alérgicos que receberam os tratamentos, houve uma diminuição significativa na contagem dessas células, grupo alérgico WT (54%) e grupo alérgico HSP65 (53%), quando comparados com o grupo alérgico meio, Figura 11 e 12.



**Figura 11: Infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo pela contagem de eosinófilos na mucosa (10 campos aleatórios). N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.





**Figura 12: Avaliação histológica do jejuno proximal de camundongos BALB/c evidenciando a contagem de eosinófilos.**

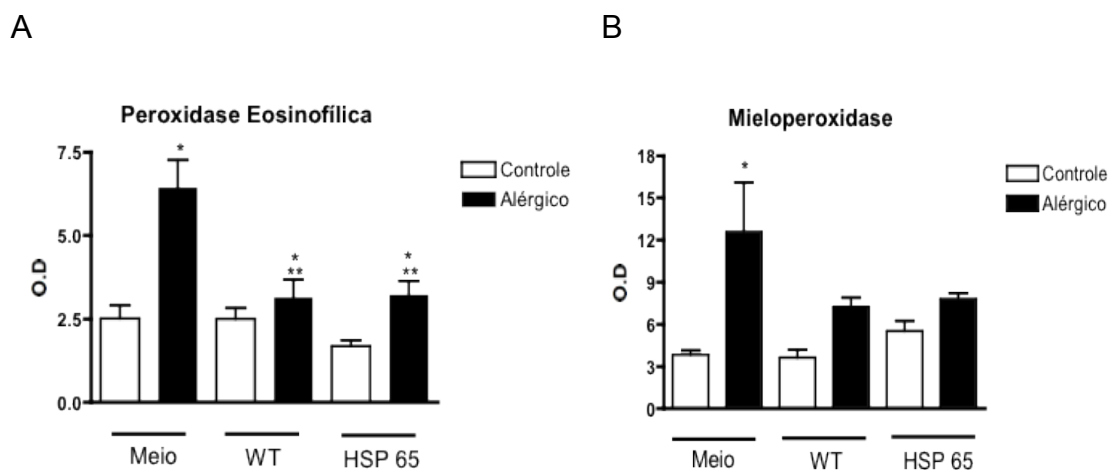
Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Após a eutanásia, o intestino delgado foi coletado, fixado, processado, incluído em parafina e corado em HE. A: Camundongo Balb/c controle meio; B: Camundongo Balb/c alérgico meio; C: Camundongo Balb/c controle WT; D: Camundongo Balb/c alérgico WT; E: Camundongo Balb/c controle HSP 65; F: Camundongo Balb/c alérgico HSP 65. Aumento 20X. Em detalhe, eosinófilos, setas brancas.

#### 4.3.4 Avaliação da ativação de eosinófilos e neutrófilos pela dosagem de Peroxidase Eosinofílica (EPO) e da mieloperoxidase (MPO).

Ao transferir íons de hidrogênio para peróxido de hidrogênio, gerando água, a enzima peroxidase, promove a oxidação de certos substratos. Pode ser encontrada em vários tipos celulares, como neutrófilos e eosinófilos. A dosagem da peroxidase eosinofílica reflete indiretamente o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, pois indica ativação destas células (BISCHOF & MEEUSEN, 2002; HOLGATE & POLOSA, 2008). No caso dos neutrófilos, a dosagem da MPO também é um indicador da ativação destas células (AMULIC *et al.*, 2012).

Nos animais alérgicos podemos perceber um aumento de EPO em relação aos animais controles. Quando os animais alérgicos são tratados com a bactéria *L.lactis* WT percebemos uma diminuição de 51% na dosagem dessa peroxidase. Nos animais alérgicos tratados com a bactéria *L.lactis* que produz HSP65, também há uma diminuição de 50%, ambos os grupos comparados com o grupo alérgico meio, Figura 13, A.

Quando avaliamos a dosagem de MPO, os animais alérgicos não tratados (grupo meio) apresentam um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) dessa enzima, quando comparados aos animais controles de seu respectivo grupo. Ao tratarmos esses animais alérgicos com ambas as bactérias (*L.lactis* WT ou que produz HSP65) percebemos que não há um aumento significativo de MPO, quando comparamos com seus respectivos grupos controles, Figura 13, B.



**Figura 13: Avaliação da atividade de eosinófilos por dosagem de peroxidase eosinofílica (EPO) e de neutrófilos por quantificação da mieloperoxidase (MPO).**

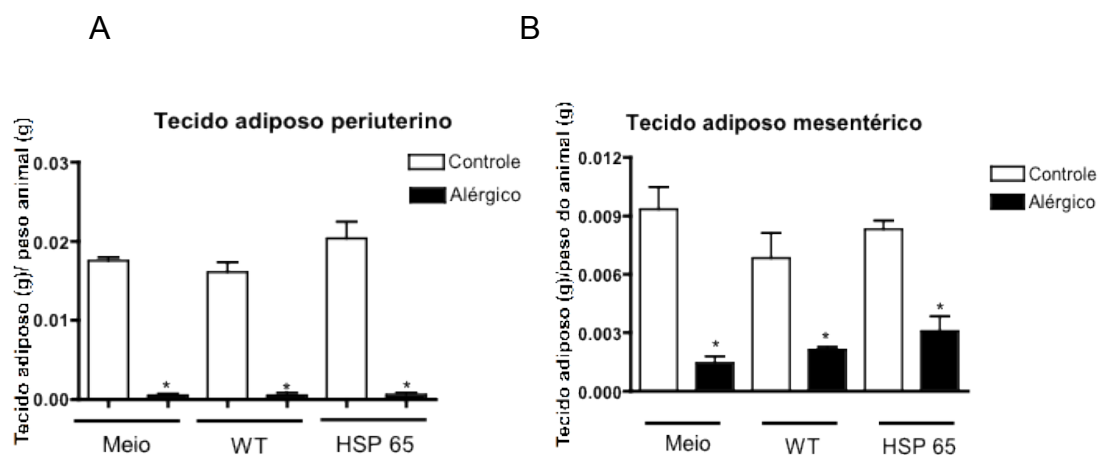
Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo e os dados foram expressos por densidade óptica (OD). A: Peroxidase eosinofílica (EPO); B: Mieloperoxidase (MPO). N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

#### 4.4 Avaliação do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.

##### 4.4.1 Avaliação da perda de peso do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.

Nos animais alérgicos podemos observar um deslocamento de reservas energéticas, como o tecido adiposo, para a obtenção de energia. No momento da eutanásia, os tecidos adiposos periuterino e mesentérico foram coletados e pesados. Todos os animais alérgicos tiveram uma perda significativa tanto de tecido adiposo periuterino quanto de tecido adiposo mesentérico. Não houve diferença significativa entre os grupos alérgicos que receberam os tratamentos

(WT e HSP65) e o grupo alérgico que não recebeu tratamento, Figura 14, A e B.



**Figura 14: Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de tecido adiposo periuterino e tecido adiposo mesentérico.**

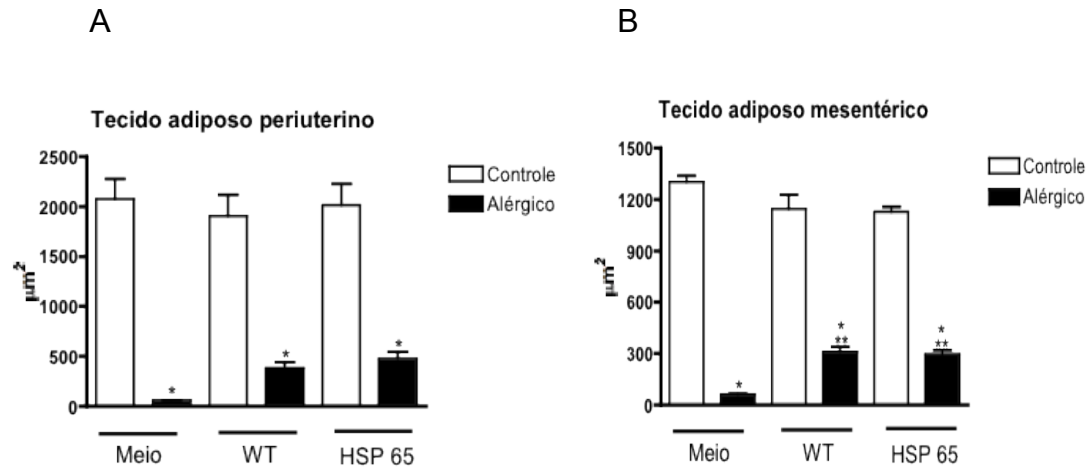
Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo do tecido adiposo periuterino (A) e tecido adiposo mesentérico, ambos pesados no dia 28 e calculados pela fórmula (peso da gordura/peso corporal). N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

#### 4.4.2 Avaliação morfométrica do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.

Os tecidos adiposos foram analisados em lâminas histológicas. A área dos adipócitos foi medida por morfometria para investigar se a perda de tecido adiposo estaria relacionada à hipotrofia destas células. Podemos perceber no tecido adiposo periuterino uma diminuição da área dos adipócitos em todos os grupos alérgicos, quando comparados com seus respectivos grupos controles. Quando observamos o tecido adiposo mesentérico, percebemos também uma intensa diminuição do tamanho dos adipócitos dos animais alérgicos não tratados em relação aos seus respectivos animais controles. Mas, no grupo

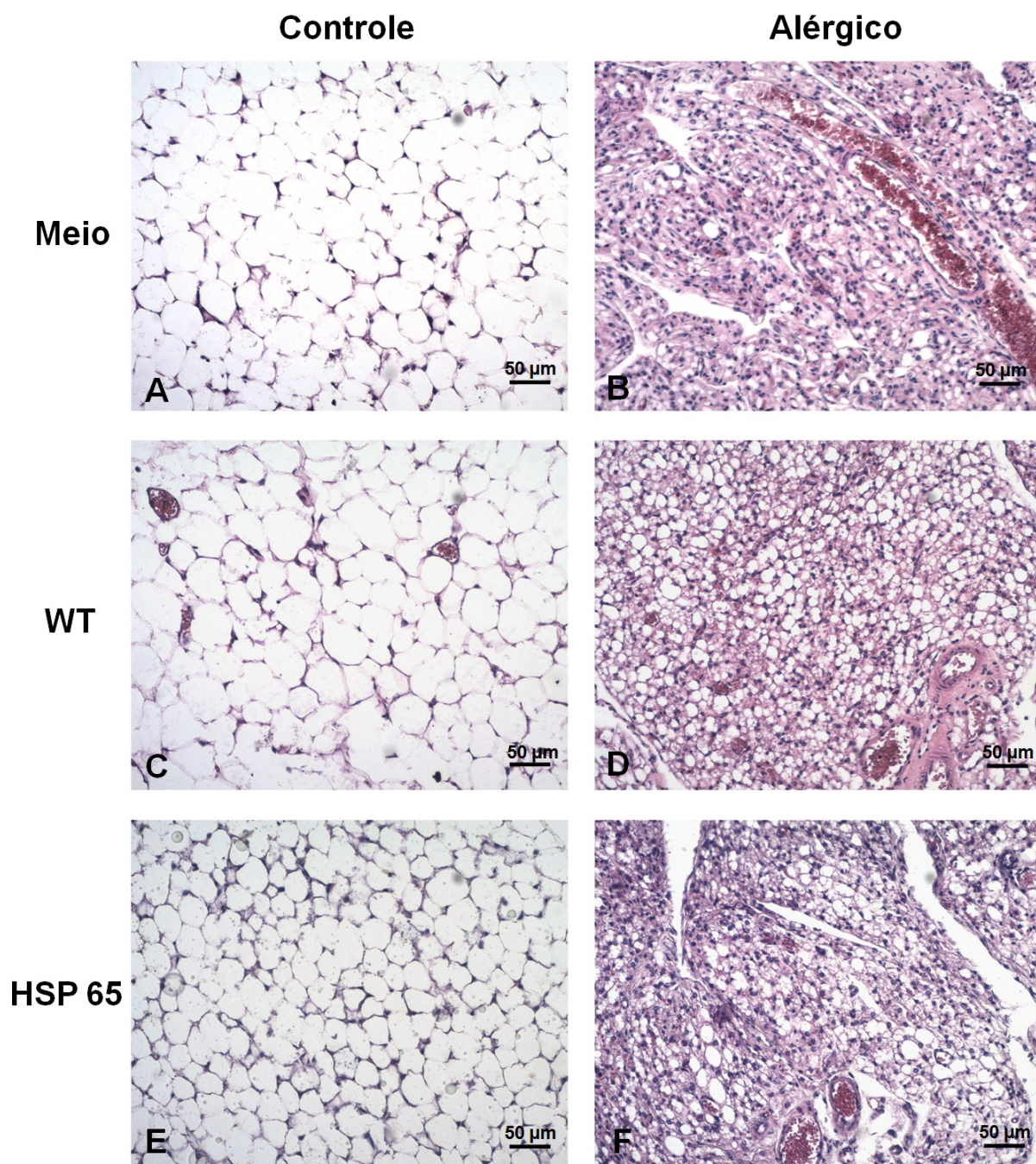


alérgico WT, percebemos um aumento de 425,7% na área dos adipócitos e no grupo alérgico HSP65, esse aumento foi de 399,5%, ambos em relação ao grupo alérgico meio. Figura 15, A e B; Figura 16 e 17.



**Figura 15: Avaliação da morfometria do tecido adiposo periuterino e tecido adiposo mesentérico.**

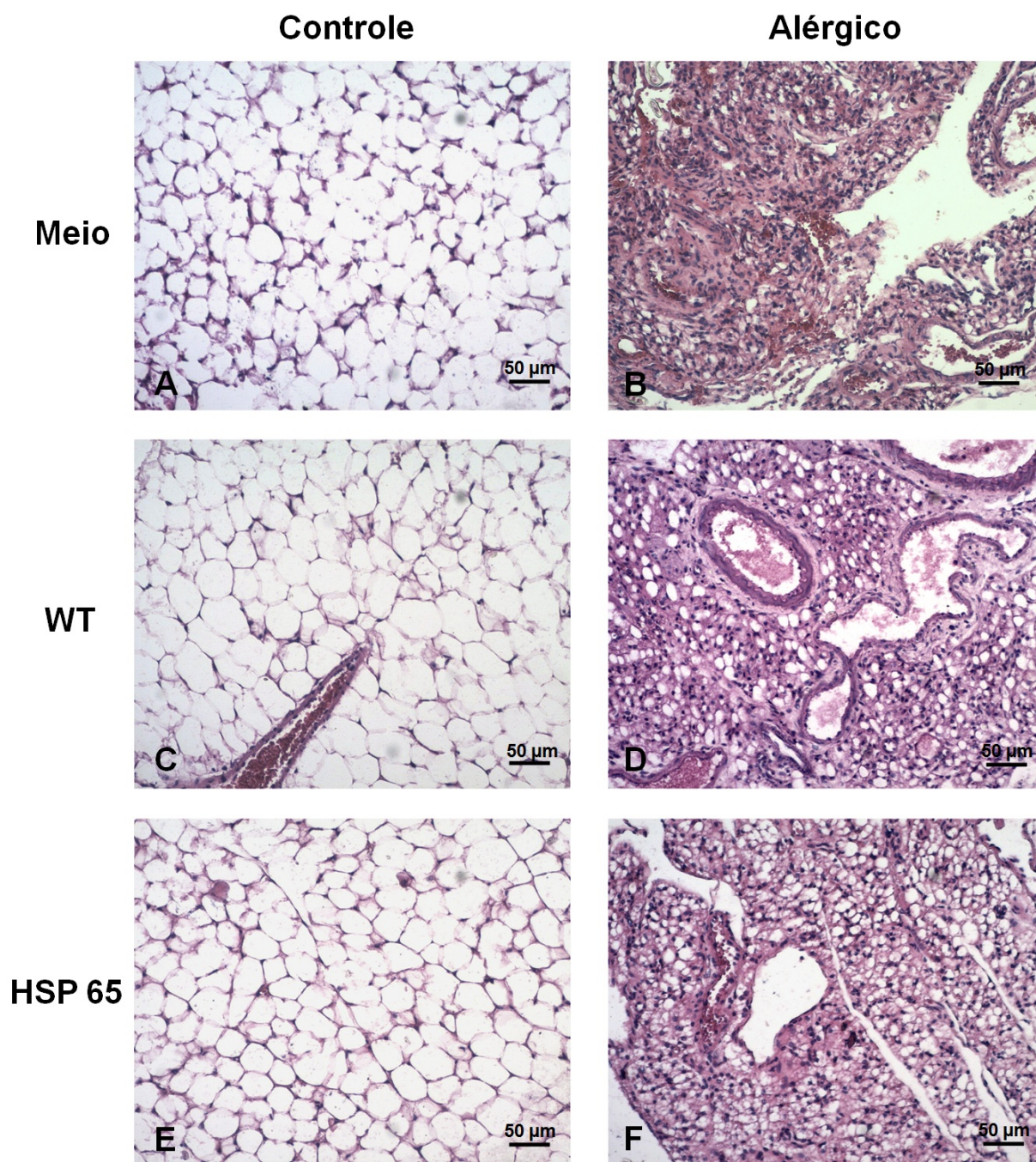
Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo do tecido adiposo periuterino (A) e tecido adiposo mesentérico (B), onde foi medida a área de 50 adipócitos por animal, expressos em  $\mu\text{m}^2$ . N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.



**Figura 16: Avaliação histológica do tecido adiposo periuterino de camundongos BALB/c, pela coloração de HE.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Após a eutanásia, o tecido adiposo periuterino foi coletado, fixado, processado, incluído em parafina e corado em HE. A: Camundongo Balb/c controle meio; B: Camundongo Balb/c alérgico meio; C: Camundongo Balb/c controle WT; D: Camundongo Balb/c alérgico WT; E: Camundongo Balb/c controle HSP 65; F: Camundongo Balb/c alérgico HSP 65. Aumento 10X.





**Figura 17: Avaliação histológica do tecido adiposo mesentérico de camundongos BALB/c, pela coloração de HE.**

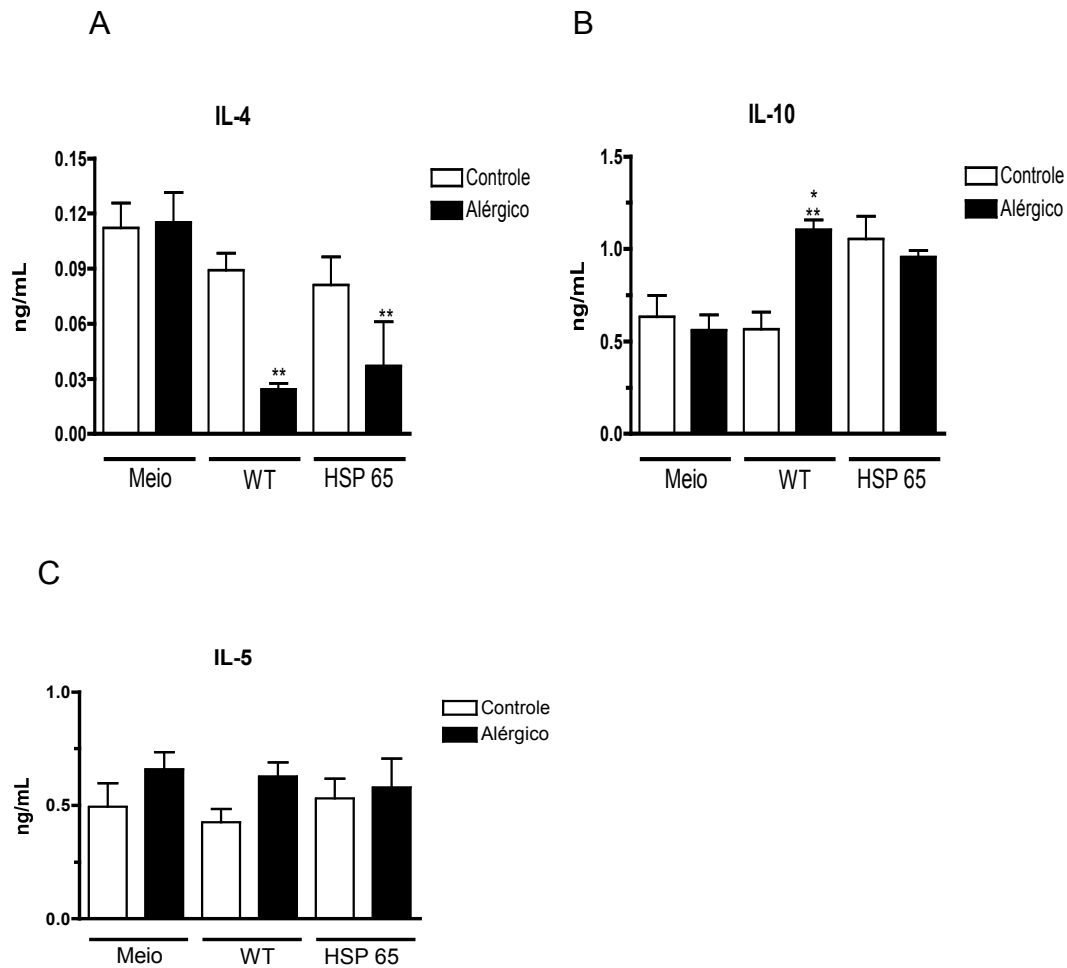
Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Após a eutanásia, o tecido adiposo mesentérico foi coletado, fixado, processado, incluído em parafina e corado em HE. A: Camundongo Balb/c controle meio; B: Camundongo Balb/c alérgico meio; C: Camundongo Balb/c controle WT; D: Camundongo Balb/c alérgico WT; E: Camundongo Balb/c controle HSP 65; F: Camundongo Balb/c alérgico HSP 65. Aumento 10X.

## **4.5 Avaliação da produção de citocinas por ELISA no Jejuno Proximal e no tecido adiposo periuterino.**

### 4.5.1 Dosagem dos níveis das citocinas IL-4, IL-10 e IL-5 no Jejuno Proximal.

Para avaliar se a inflamação no jejuno proximal dos camundongos alérgicos estaria associada ao aumento da produção local de citocinas, como IL-4, IL-10 e IL-5, este tecido foi submetido a análises pela técnica de ELISA. Foi demonstrado que o jejuno proximal dos animais alérgicos não tratados (grupo meio) não apresenta alterações nos níveis de todas as citocinas quantificadas, IL-4, IL10 e IL5 quando comparados aos seus respectivos controles. No caso da IL-4, podemos observar que todos os grupos alérgicos não apresentam diferença significativa em relação aos seus respectivos grupos controles, mas os grupos alérgicos WT e HSP65 apresentaram uma diminuição de 79% e 67,9%, respectivamente, nos níveis dessa citocina, quando comparados com o grupo alérgico meio (Figura 18, A). Em relação a citocina IL-10, somente o grupo alérgico WT apresentou diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo controle. Em relação ao grupo alérgico meio, houve um aumento de 97% nos níveis dessa citocina (Figura 18, B). A citocina IL-5 não apresentou diferença significativa em todos os grupos, se mantendo constante tanto nos grupos alérgicos, quanto nos grupos controles (Figura 18, C).





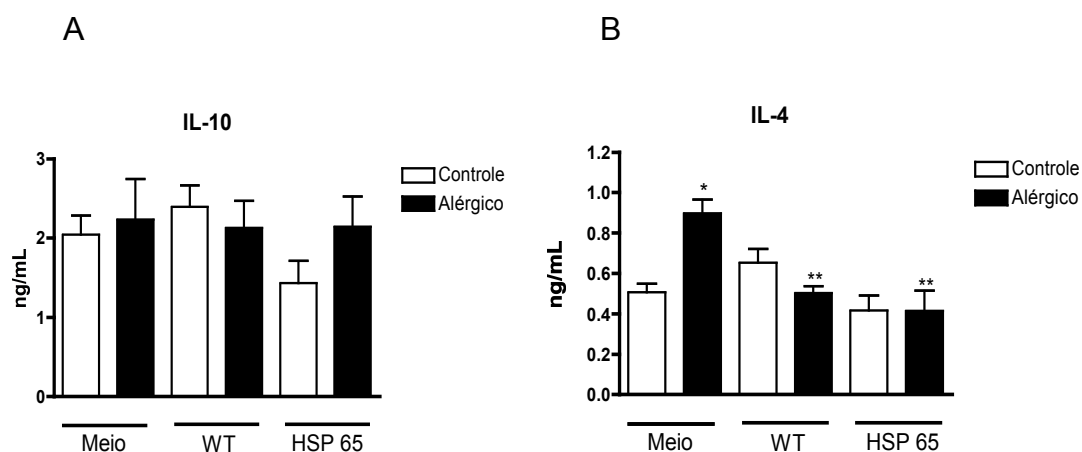
**Figura 18: Avaliação da produção de citocinas pelo Jejuno Proximal.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo dos níveis de citocinas do jejuno proximal, IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-5 (C) que foram medidas pela técnica de ELISA e os valores foram expressos em pg/mL. N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

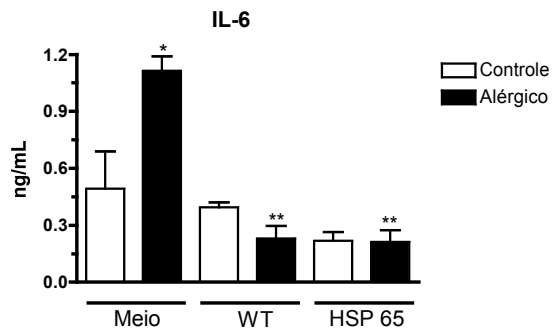
#### 4.5.1 Dosagem dos níveis das citocinas IL-10, IL-4 e IL-6 no tecido adiposo periuterino.

Com a mesma intenção de medir os níveis de citocinas no jejuno proximal, e para avaliarmos imunologicamente o tecido adiposo periuterino, fizemos a dosagem também por ELISA, de citocinas (IL-10, IL-4 e IL-6) neste

tecido. Os níveis de IL-10 se mantiveram estatisticamente iguais em todos os grupos, tratados ou não, alérgicos ou controles (Figura 19, A). No tecido adiposo periuterino, a dosagem de IL-4 apresentou-se maior no grupo alérgico meio em relação ao seu respectivo grupo controle, mas ao compararmos esses mesmos níveis, em ambos os tratamentos (animais que receberam a bactéria *L.lactis* WT ou produtora de HSP65), os animais alérgicos não apresentaram diferença significativa em relação aos seus respectivos animais controles. Os tratamentos demonstraram uma diminuição nos níveis de IL-4, grupo alérgico WT (43,8%) e o grupo alérgico HSP65 (53,9%), quando comparados ao grupo alérgico meio (Figura 19, B). A citocina IL-6 foi encontrada em maior quantidade nos animais alérgicos meio do que nos animais controle meio. Ao serem tratados, os animais alérgicos apresentaram uma diminuição de 80,1%, no grupo alérgico WT e de 81%, no grupo alérgico HSP65, ambos ao serem comparados com o grupo alérgico meio (Figura 19, C).



C



**Figura 19: Avaliação da produção de citocinas pelo tecido adiposo periuterino.**

Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizados (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a bactéria *L.lactis* selvagem, WT, ou com a mesma bactéria produtora da proteína do choque térmico, HSP65) ou não (grupo que recebeu somente meio, M17 difco). Os animais foram tratados do dia -4 ao dia -1, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. As barras representam a média (+/-SEM) dos valores de cada grupo dos níveis de citocinas do tecido adiposo periuterino, IL-10 (A), IL-4 (B) e IL-6 (C) que foram medidas pela técnica de ELISA e os valores foram expressos em pg/mL. N= 6 animais/grupo. \*P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle; \*\*P<0,05 em relação ao grupo alérgico meio, que só recebeu na mamadeira o meio, M17 difco.

## 5. DISCUSSÃO

Como podemos perceber, os resultados dos grupos que receberam a bactéria *L. lactis* selvagem foram equivalentes aos resultados dos grupos que receberam a bactéria *L. lactis* produtora de HSP65. Esse resultado indica que o nosso objetivo primário de promover a tolerância oral com a proteína HSP65 não foi alcançado. Sendo assim, consideramos que a bactéria *L. lactis* atuou como um probiótico, de acordo com a definição da OMS, em 2002: “probiótico é todo microorganismo vivo, no qual fornece benefícios ao hospedeiro quando fornecido em quantidades adequadas”.

Apesar da bactéria *L. lactis* não estar incluída na maioria das citações como uma bactéria com potencial probiótico (OUWEHAND *et al.*, 2002; SAVILAHTI *et al.*, 2008; CLARKE *et al.*, 2012), Gareau e colaboradores, em 2010, reconheceram que a bactéria *L. lactis* pode ser considerada um microorganismo probiótico, quando geneticamente modificado para produzir IL-10 ou outros fatores. Em 2011, Yoshida e colaboradores constataram uma diminuição da produção de IgE em camundongos sensibilizados a ovalbumina, e em 2012, Zuercher e colaboradores perceberam que *L. lactis* pode atenuar as manifestações da alergia alimentar em camundongos sensibilizados a OVA. Neste contexto, discutiremos nossos resultados.

Indivíduos que sofrem de alergia alimentar apresentam um aumento nos níveis de IgE específica para um antígeno específico. A IgE se liga ao seu receptor de alta afinidade ( $Fc\epsilon RI$ ) que está presente na superfície de mastócitos e basófilos ou então ao seu receptor de baixa afinidade ( $Fc\epsilon RII$ ), que está presente na superfície de macrófagos, monócitos, linfócitos e

plaquetas. Em roedores, a IgG1 também tem papel anafilático. Tem a capacidade de ligar e desligar ao seu receptor na superfície dos mastócitos e auxilia na opsonização, ajudando fagócitos a fixar fragmentos do complemento na superfície do antígeno (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000). A IL-4 produzida no baço e no jejuno de animais sensibilizados induz a diferenciação de linfócitos B para a produção de IgE. Esta citocina também está envolvida com a produção de IgG1 (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000; DOURADO *et al.*, 2010).

Ambos os grupos alérgicos que receberam *L. lactis* WT ou *L. lactis* produtor de HSP 65 demonstraram uma diminuição significativa nos níveis séricos de IgE anti-OVA e IgG1 anti-OVA, quando comparados com o grupo alérgico que não recebeu tratamento (Meio). Yoshida e colaboradores, em 2011, encontraram uma diminuição dos níveis de IgE sérica total, em animais sensibilizados com OVA tratados previamente com *L. lactis* durante 7 dias por gavagem. Mas esses mesmos animais não demonstraram diminuição de IgE anti-OVA. Zuercher e colaboradores em 2012, também não constataram uma diminuição em IgE anti-OVA e nos níveis de IgG1 anti-OVA, em animais sensibilizados com OVA por 7 semanas consecutivas e desafiados com o mesmo antígeno via gavagem, uma semana após a última sensibilização, e tratados com *L. lactis* cinco dias antes da primeira sensibilização até o desafio oral ou então o tratamento com *L. lactis* foi iniciado 1 semana antes do desafio oral. Como nesse experimento os animais foram sensibilizados várias vezes, pode acontecer que os níveis de imunoglobulinas específicas para o antígeno se acumulam ao longo do tempo com sensibilizações repetidas, levando a uma persistência a longo prazo de células B de memória, por isso então nesse

experimento não houve diminuição dos níveis de IgE anti-OVA e nem de IgG1-anti-OVA. Mantendo essa mesma bactéria, *L. lactis*, Frossard e colaboradores, em 2007, fizeram um estudo onde *L. lactis* foi modificada geneticamente para secretar IL-10, os animais eram sensibilizados para  $\beta$ -lactoglobulina, e recebiam a bactéria (tanto a geneticamente modificada para produzir IL-10 e a selvagem) durante 3 dias antes da sensibilização, após 28 dias os animais eram desafiados com o antígeno. Foi observado que no grupo que recebeu a bactéria *L. lactis* selvagem (WT) houve uma diminuição significativa nos níveis séricos de IgE anti- $\beta$ -lactoglobulina e de IgG1 anti- $\beta$ -lactoglobulina. A administração de outros probióticos, como *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e um mix com os dois probióticos, sensibilizados com OVA, demonstrou uma significativa diminuição dos níveis tanto de IgE anti-OVA quanto nos níveis de IgG1 anti-OVA, nesse estudo os animais receberam as bactérias liofilizadas na ração durante 7 semanas, começando 2 semanas antes da primeira sensibilização. Para explicar tais resultados, foi demonstrado que o uso de probióticos normaliza a produção de citocinas Th2/Th1, por células do baço, IL-14, Interferon – gamma (IFN- $\gamma$ ) e aumentou a produção de IL-10 que podem ser secretadas por células T regulatórias ativadas (KIM *et al.*, 2008).

No nosso modelo de alergia alimentar a OVA podemos observar vários sinais clássicos do processo alérgico, alguns deles são: perda de peso acentuada, aversão alimentar e aumento drástico do índice de atividade da doença (CARA *et al.*, 1994; SALDANHA *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2011). A aversão se mostrou associada a componentes imunológicos, uma vez que pôde ser transferido para animais receptores de células do baço e soro

provenientes de doadores sensibilizados (CARA *et al.*, 1997). Posteriormente, foi comprovado que a aversão à ingestão do antígeno está correlacionada com a produção de IgE (BASSO *et al.*, 2003) e da citocina IL-4 (DOURADO *et al.*, 2010).

No nosso estudo, os grupos alérgicos que receberam tanto *L. lactis* WT quanto *L. lactis* HSP65 não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo alérgico meio, na avaliação do consumo de ração contendo o antígeno. Podemos perceber que uma diminuição nos níveis de IgE anti-OVA não foi suficiente para diminuir a aversão dos animais alérgicos, uma vez que este quadro foi revertido quando os animais deficientes para IL-4 obtiveram níveis praticamente nulos de IgE anti-OVA (DOURADO *et al.*, 2010).

Em concordância com os dados de consumo de ração, a perda de peso dos animais alérgicos tratados (WT e HSP65) não apresentou diferença significativa quando comparados com os animais alérgicos que receberam meio. Essa perda de peso pode ser explicada pela aversão que os animais tiveram pela ração contendo o antígeno e pela inflamação do tecido adiposo, um outro sinal encontrado no nosso modelo de alergia alimentar a OVA (DOURADO *et al.*, 2011). Esse parâmetro será avaliado posteriormente. No estudo realizado com outros probióticos, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, os animais sensibilizados tratados com o probiótico *Lactobacillus acidophilus* também obtiveram uma perda de peso igual aos animais sensibilizados que não receberam tratamento, mas os animais sensibilizados que receberam o probiótico *Bifidobacterium lactis* e o mix com os dois probióticos, apresentaram uma manutenção e ganho de peso a partir da quarta semana experimental (KIM *et al.*, 2008).

O Índice de atividade da doença é um parâmetro que reúne 3 sinais relacionados com a alergia alimentar: perda de peso, consistência das fezes e presença de sangue oculto nas mesmas (DOURADO *et al.*, 2011). Quando o antígeno específico encontra a IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade, nos mastócitos ou nos basófilos, acontece um crosslinking e consequente liberação dos mediadores inflamatórios, como histaminas, PAF, IL-4 e IL-13 (LEE & BURKS, 2006; CIANFERONI & SPERGEL, 2009). As ações vasodilatadoras e de aumento de permeabilidade vascular destes mediadores causam um desequilíbrio eletrolítico com estimulação do transporte iônico epitelial e transporte passivo de água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (YU & PERDUE, 2001; STONE *et al.*, 2010; VICKERY *et al.*, 2011).

Nos nossos resultados, percebemos que, os grupos alérgicos WT e HSP65 demonstraram um declínio significativo no índice de atividade da doença, quando comparados com o grupo alérgico meio. Mesmo com perda de peso, esses animais demonstraram uma menor diarreia e escassa presença de sangue oculto nas fezes, o que fez esse parâmetro ser significativamente diferente. No trabalho de Zuercher e colaboradores, em 2012, foi feito um score da alergia, onde foram avaliados vários parâmetros, dentre eles a consistência das fezes e/ou diarreia, nos animais desafiados com OVA. Eles puderam observar que *L. lactis*, quando administrado 1 semana antes do desafio com OVA diminuiu significativamente o score da alergia, mas quando *L. lactis* foi administrado durante todo o experimento, esse resultado não se mostrou significativamente diferente. Schiavi e colaboradores, em 2011, obtiveram uma diminuição do score da alergia (onde a diarreia também era avaliada), ao



camarão quando camundongos foram tratados com um mix de probióticos liofilizados administrados durante 20 dias, após o desafio com o antígeno. Isso demonstra que o efeito do probiótico é dependente do tipo de cepa que se está usando e em qual fase da doença o probiótico é administrado. No caso de outras condições patológicas (infecção causada por *Clostridium difficile*, enterites e enterocolites), os probióticos têm se mostrado eficazes na prevenção da diarreia causada pelas mesmas. Esse benefício pode ser explicado pelo fato de alguns probióticos produzirem fatores antimicrobianos, como bacteriocinas. Ou, então, pelo fato desses probióticos conterem uma proteína de superfície que se liga a células dendríticas que induzem um fenótipo imunoregulatório, por estimularem células T regulatórias. Ainda pode ser explicado também pelo fato de alguns probióticos conseguirem manter a homeostasia da barreira epitelial intestinal e reduzirem, assim, a adesão bacteriana, prevenindo um rearranjo do citoesqueleto e preservando a arquitetura das junções apicais intercelulares (GAREAU *et al.*, 2010).

Na alergia alimentar acontecem também alterações intestinais, como: edema intestinal, aumento de muco e aumento de infiltrado inflamatório (SALDANHA *et al.*, 2004).

Com a liberação de mediadores inflamatórios pelos mastócitos ou basófilos, acontece o extravasamento de proteínas e líquido para o interstício, que contribui para a formação do edema inflamatório (GUO *et al.*, 2009).

Nos grupos alérgicos, WT e HSP65, não observamos diferença significativa em relação ao grupo alérgico meio. Mostrando que ambos os tratamentos não foram eficazes para conter o edema intestinal encontrado em animais alérgicos. Provavelmente o *L. lactis* agiu como um competidor de

microorganismos patógenos (PARVEZ *et al.*, 2006) evitando a diarreia, mas não conseguiu impedir que parte dos mediadores inflamatórios fossem liberados ativando toda a cascata de ativações até acontecer o edema intestinal. Huang e colaboradores, em 2010, fizeram um teste de permeabilidade intestinal em ratos alérgicos a OVA, usando gavagem de dextrana conjugada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC), em animais que receberam um mix de probióticos. A concentração de dextrana conjugada com FITC encontrada nas amostras de sangue dos grupos onde os probióticos foram administrados, tanto antes quanto durante as sensibilizações com OVA, foi significativamente menor do que no grupo sensibilizado que não recebeu tratamento. Mesmo sendo um teste diferente da nossa metodologia, este estudo nos mostra que alguns probióticos são mais eficazes para conter o extravasamento de proteínas e líquidos para o interstício.

Apesar dos tratamentos não interferirem no edema, ainda ficamos intrigados com a diminuição da diarreia e resolvemos investigar a produção de muco intestinal. O muco é um componente importante na formação de uma barreira contra a entrada de antígenos e patógenos na mucosa intestinal. É secretado pelas células caliciformes, constituído por íons, imunoglobulinas, proteínas, lipídios, água e por glicoproteínas chamadas mucinas. A taxa de secreção destes componentes, e sua densidade, são variáveis e dependem da quantidade de antígenos e patógenos que chegam à superfície epitelial, da atividade da microbiota, e da taxa de eliminação do mesmo pela ação da mucociliaridade. O muco ajuda a criar um ecossistema local epitelial, contribuindo para selecionar e hospedar a microbiota, já que os microorganismos comensais se ligam especificamente às glicoproteínas do

hospedeiro, enquanto definem e protegem o epitélio contra entrada de patógenos (MESTECKY *et al.*, 2005).

Em nossos resultados percebemos que ambos os grupos alérgicos WT e HSP65 obtiveram uma diminuição significativa na produção de muco, em relação ao grupo alérgico meio. Segundo Parvez e colaboradores, em 2006, trabalhos mostram que alguns probióticos aumentam a produção de mucinas intestinais, no que resultaria na prevenção da ligação de enteropatógenos em células epiteliais. Isso pode ser explicado por dois mecanismos propostos: essas mucinas estariam interferindo na estrutura do receptor de ligação nas células epiteliais ou através de inibição por competição por locais de ligação, onde as mucinas mimetizam locais de ligação das células epiteliais. No nosso caso, a diminuição da produção de muco nos mostra que o uso de *L. lactis*, pode ter agido de forma diferente. Perante ao desafio com a OVA, houve menor formação de IgE anti-OVA e IgG1 anti-OVA, que desencadeou um processo alérgico mais brando nos animais em ambos os tratamentos. Pode ter ocorrido uma diminuição da produção de citocinas IL-4 e IL-13 que induzem a produção do muco (SALDANHA *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2010) ou uma menor assimilação do antígeno, uma vez que, substâncias tóxicas e irritantes também podem estimular a hipersecreção de muco (MESTECKY *et al.*, 2005).

Após avaliarmos a presença de edema e muco intestinal, um outro parâmetro bem estipulado na alergia alimentar é o acúmulo de infiltrado inflamatório intestinal, tendo em destaque dois tipos celulares, os eosinófilos e os neutrófilos (BISCHOFF *et al.*, 2000; SALDANHA *et al.*, 2004). Produzida via resposta Th2, a IL-5, IL-3 e o GM-CSF, estimulam a maturação de eosinófilos e a mobilização dessas células da medula óssea para o sangue. Já a eotaxina,

produzida localmente, é responsável pelo recrutamento de eosinófilos para o tecido (FOSTER *et al.*, 2002). No local da lesão há uma liberação, pelos eosinófilos, de mediadores citotóxicos e pró-citotóxicos, como a peroxidase eosinofílica, proteína catiônica eosinofílica, entre outras e de citocinas pró-inflamatórias como, a IL-3, IL-5 e IL-13, que também contribuem para perpetuação das reações de fase tardia (BISCHOF & MEEUSEN, 2002; HOLGATE & POLOSA, 2008).

Nos nossos resultados podemos perceber que ambos os grupos alérgicos, WT e HSP65, apresentaram diferença significativa na contagem de eosinófilos intestinais, quando comparados com o grupo alérgico meio. Este é um método direto de avaliação de presença eosinofílica. Para complementar fizemos um teste indireto, que avalia a presença de uma enzima que está presente no eosinófilo que é a peroxidase eosinofílica (EPO). O resultado da dosagem de EPO, foi correspondente ao resultado da contagem de eosinófilos, confirmando nossos dados. Em concordância com nossos resultados, Huang e colaboradores, em 2010, e Kim e colaboradores, em 2008, encontraram uma diminuição significativa no número de eosinófilos em animais, sensibilizados ou alérgicos a OVA, quando tratados com probióticos. Esses resultados podem ser explicados pela diminuição dos níveis séricos de IgE anti-OVA e IgG1 anti-OVA, e explicam uma diminuição da diarreia nos animais alérgicos tratados (WT e HSP65), pois como já foi dito, eosinófilos ativados podem induzir um dano gastrointestinal pela liberação de mediadores citotóxicos (KELLY, 2000; SALDANHA *et al.*, 2004).

A citocina inflamatória, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é liberada pelos mastócitos, tanto na fase imediata quanto na fase tardia, ativando neutrófilos e

recrutando outras células efectoras, além de aumentar a síntese de quimiocinas (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998; BINGHAM & AUSTEN, 2000; BISCHOFF *et al.*, 2000; BISCHOFF & CROWE, 2005; PEAVY & METCALFE, 2008). Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares onde sua função primária é de fagocitose e destruição de microorganismos. Seus grânulos citoplasmáticos liberam mieloperoxidase (MPO), uma enzima específica de seus grânulos azurófilos. Devido à sua importante atividade enzimática, a MPO é cada vez mais considerada como um marcador de ativação e desgranulação dos neutrófilos em um número crescente de patologias. É a célula considerada como indicativa de inflamação aguda por ser a primeira célula a chegar no sítio de inflamação (AMULIC *et al.*, 2012).

Com o intuito de quantificar indiretamente os neutrófilos ativados no tecido intestinal, fizemos o ensaio de MPO. Podemos notar, que o grupo controle alérgico obteve um aumento significativo dessa enzima, enquanto os grupos tratados (WT e HSP65), tanto controle quanto alérgico não demonstraram diferença significativa, mostrando que os tratamentos normalizam os níveis dessa enzima. Hougee e colaboradores, em 2010, fizeram um modelo de asma alérgica, usando como alérgeno a OVA, e trataram os animais com vários tipos de probióticos diferentes separadamente, administrados por gavagem. Algumas cepas de probióticos foram capazes de reduzir o número de eosinófilos e linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar, mas nenhuma cepa foi capaz de diminuir o número de neutrófilos nesse mesmo fluido. Em doenças inflamatórias intestinais, foi observado que algumas cepas de probióticos são capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$ , estimulando células T reguladoras a produzirem IL-10 e de TGF- $\beta$ , que são citocinas anti-

inflamatórias, o que pode levar a diminuição de neutrófilos ativados (GAREAU *et al.*, 2010).

Após avaliarmos o intestino dos animais, partimos para a avaliação do tecido adiposo periuterino e mesentérico, que são tecidos que sofrem alterações metabólicas e imunológicas perante a alergia alimentar. Nosso grupo de pesquisa foi o pioneiro em demonstrar que a alergia alimentar experimental induz inflamação do tecido adiposo com o aumento tanto de células inflamatórias como de citocinas (DOURADO *et al.*, 2011). Diante desse fato, até o presente momento não encontramos trabalhos que mostrem alterações nesse tecido em doenças com perfil Th2, então analisaremos nossos dados histológicos e imunológicos baseados em outros tecidos e/ou em outras patologias, que tem como tecido alvo acometido o tecido adiposo, como é o caso da obesidade.

Percebemos em nosso trabalho que os animais alérgicos de ambos os tratamentos (WT e HSP65) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais alérgicos que não receberam tratamento (meio), tanto no peso do tecido adiposo periuterino, quanto no peso do tecido adiposo mesentérico. Esses dados são compatíveis com os dados de perda de peso dos animais. Percebemos que outros tipos de tratamentos, como por exemplo, plantas medicinais, esse resultado foi o mesmo, ou seja, o tratamento não conseguiu prevenir a perda de peso periuterino dos animais alérgicos (MOLLICA, 2011). Pode-se sugerir que, como *L. lactis* não foi capaz de prevenir a aversão, essa foi suficiente para alterar os pesos dos tecidos adiposos periuterino e mesentérico. Kang e colaboradores, em 2010, observaram em ratos obesos tratados com *Lactobacillus gasseri*, uma drástica

diminuição de peso total, como a perda de peso na alergia e o ganho de peso na obesidade, são também resultados de uma inflamação desse tecido (DOURADO *et al.*, 2011), sugere-se que os probióticos podem também induzir uma redução nos parâmetros inflamatórios desse tecido, assim fomos investigar histologicamente os mesmos.

O tecido adiposo periuterino se mostrou histologicamente igual nos grupos alérgicos meio, WT e HSP65. Histologicamente observamos uma hipotrofia de adipócitos e um grande infiltrado inflamatório. Mas por mais que este tecido se mostre igual, ele pode ter alterações nos perfis celulares, produzindo mais ou menos mediadores inflamatórios, que investigaremos adiante. No entanto o tecido adiposo mesentérico, se mostrou histologicamente diferente nos grupos alérgicos WT e HSP65, quando comparados com o grupo alérgico meio. Como o tecido adiposo mesentérico está em volta do intestino delgado (que mostrou uma diminuição de eosinófilos e de MPO), o efeito local do *L. lactis*, se expandiu até esse tecido adiposo, mas não conseguiu alcançar outro tecido que se encontra mais distante. Sato e colaboradores, em 2008, trataram ratos com leite fermentado com *Lactobacillus gasseri*, esses animais mostraram uma diminuição no tamanho dos adipócitos do tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal, sugerindo que o uso de probióticos pode diminuir uma hipertrofia ou hiperplasia dessas células, que pode ser mediada também por um processo inflamatório.

Com todos esses resultados de diminuição de infiltrado inflamatório intestinal e manutenção da perda de peso periuterino, resolvemos investigar a produção de citocinas em ambos os tecidos pelo método de ELISA.

No intestino, avaliamos a produção das citocinas IL-4, IL-10 e IL-5.

A IL-4, é uma citocina pleiotrópica, produzida por linfócitos T, e é essencial para o desenvolvimento de linfócitos envolvidos na resposta do tipo Th2, enquanto a IL-4 liberada por mastócitos e basófilos pode amplificar respostas deste tipo já estabelecidas (PAUL, 1991). Esta citocina tem sido fortemente associada com a alergia alimentar por estar relacionada com a troca de isotipo para IgE. A IL-4 induz a produção de IgE pelas células B (CARDOSO *et al.*, 2009). A IL-4 atua, juntamente com o fator de célula tronco (SCF), induzindo aumento da proliferação mastócitos e aumenta a liberação de mediadores pelos mesmos, após ativação por IgE (BISCHOFF *et al.*, 1999). A IL-4 em conjunto com a IL-5, contribui para um aumento da adesão dos eosinófilos às células endoteliais vasculares e promove sua infiltração nos sítios inflamatórios (ROMAGNANI, 2000). Além disso, a IL-4 é capaz de regular a função de barreira do epitélio intestinal, tendo sido relacionada com a Doença de Crohn e alergia alimentar (DI LEO *et al.*, 2002). Apesar dos níveis de IL-4, não mostrarem diferença significativa, entre os grupos controle e alérgico meio, os níveis dessa citocina foram significativamente menores, nos grupos alérgicos que receberam ambos os tratamentos (WT e HSP65) e também não houve diferença entre os grupos alérgicos e controles tratados. Huang e colaboradores, em 2010 e Kim e colaboradores, em 2008, obtiveram resultados parecidos com os nossos, mas dosando as citocinas em sobrenadante de culturas celulares do baço e de linfonodo mesentérico, os animais sensibilizados para OVA, que receberam os probióticos tiveram uma grande diminuição nos níveis dessa citocina, em relação aos animais não tratados. Em outra patologia, colite, os animais tratados com a bactéria *L. lactis* WT, obtiveram uma redução dessa citocina, em relação ao grupo não tratado



(SANTOS, 2011). Esses resultados podem ser explicados pela hipótese dos probióticos manterem um balanço entre células Th1 e Th2, no qual regula também a produção de IgE.

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2. Mas, estudos posteriores demonstraram que esta citocina também é produzida por outras células, incluindo células Th1, macrófagos, células dendríticas e células T reguladoras. A IL-10 é um inibidor da produção de citocinas pelas células Th1, através da sua ação em células dendríticas e macrófagos (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). A IL-10 modula também muitas funções efetoras das células associadas com doenças alérgicas, incluindo inibição da ativação de células Th2, da função de eosinófilos e mastócitos e da troca de isotipo para IgE pelas células B. Alguns estudos demonstraram a ocorrência de correlação inversa entre os níveis de IL-10 e a severidade das doenças alérgicas (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). Existem evidências de que a IL-10 esteja envolvida na modulação da tolerância oral, tendo sido demonstrado que camundongos tolerantes a antígenos alimentares apresentam produção aumentada de IL-10 pelas células da Placa de Peyer (FROSSARD *et al.*, 2004). Em nosso estudo, os níveis de IL-10, só foram significativamente maiores, nos animais alérgicos WT, percebemos uma leve tendência ao grupo alérgico HSP65, em aumentar esses níveis. Observamos resultados parecidos em animais alérgicos tratados com o probiótico *Bifidobacteria*, onde os níveis de IL-10 foram significativamente maiores, pelo mesmo método (ZHANG *et al.*, 2010). No modelo de colite, animais tratados com *L. lactis* não obtiveram diferença significativa nos níveis dessa citocina, em relação aos animais não tratados (SANTOS, 2011).

Frossard e colaboradores, em 2007, perceberam um leve aumento dessa citocina, secretada por células da placas de peyer de animais alérgicos a  $\beta$ -lactoglobulina tratados com *L. lactis* selvagem, perante o estímulo do antígeno. O aumento dessa citocina pode ser explicado pela hipótese dos probióticos aumentarem a ativação de células T regulatórias e inibirem parcialmente a produção de IgE.

A IL-5 é uma citocina produzida pelos mastócitos mediante ao estímulo de outras citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-4. Tem como função atrair eosinófilos e outras células inflamatórias para o local lesionado. Seu papel é fundamental, junto a outra citocina inflamatória, a eotaxina (BISCHOFF *et al.*, 2000; ROMAGNANI, 2000). Surpreendentemente, não houve diferença em nenhum grupo nos níveis de IL-5, seus níveis se mantiveram constantes em todos os grupos. Esse resultado nos surpreendeu já que percebemos uma diminuição de eosinófilos nos animais tratados e esta citocina é crucial para o recrutamento dos mesmos pela medula óssea. Mas em trabalhos anteriores não houve aumento dessa citocina perante o estado alérgico ou pela dosagem *in vitro* dessa citocina após indução de anafilaxia por injeção intra-peritoneal de OVA em camundongos sensibilizados (DOURADO, 2006; OKUNUKI *et al.*, 2003). Mas, Schiavi e colaboradores, em 2010, obtiveram uma diminuição dessa citocina dosada por ELISA, quando os animais alérgicos foram tratados com um mix de probióticos. Já Zuercher e colaboradores, em 2012, usando *L. lactis* em animais alérgicos a OVA, tiveram uma diminuição da expressão dos níveis genéticos de IL-5 no íleo, quando esses animais eram tratados 1 semana antes do desafio oral, mas no jejuno a expressão genética dessa citocina não se alterou, mesmo sendo administrada 1 semana antes do desafio

oral. Nesse mesmo experimento, eles fizeram dosagem dessa citocina por sobrenadantes de culturas de células de linfonodo mesentérico, onde também não houve alteração dos níveis de IL-5, nos animais alérgicos tratados com *L. lactis*. Mas foi observado uma diminuição da expressão de eotaxina, no íleo, podendo suportar a hipótese de que o local de ação de *L. lactis* na resposta imune na alergia alimentar pode ser outro ao invés do jejuno.

Mesmo com uma perda acentuada de tecido adiposo periuterino, em todos os grupos alérgicos, e histologicamente iguais, resolvemos investigar a produção de citocinas nesse tecido. Desse modo avaliamos a produção de IL-10, IL-4 e IL-6.

A produção de IL-10 se manteve inalterada em todos os grupos experimentais. Mostrando que sua produção, neste local, não foi modificada, nem pela alergia e nem pelos tratamentos. Marinho e colaboradores, em 2010, em animais com asma alérgica tratados com *L. lactis* selvagem, não demonstraram um aumento dessa citocina no tecido pulmonar, medida também por ELISA. Podemos perceber que o aumento dessa citocina pode ser observado apenas em alguns tecidos.

No caso da citocina IL-4, os grupos alérgicos WT e HSP65 mostraram uma diminuição significativa dessa citocina em relação ao grupo alérgico meio. Assim, os autores demonstraram que essa citocina foi inibida tanto no intestino como no tecido adiposo. Marinho e colaboradores, em 2010, no mesmo modelo citado acima, também não encontraram diferença na concentração dessa citocina no pulmão de animais com asma alérgica tratados com *L. lactis*. Wu e colaboradores, em 2011, mostraram uma alta incidência de eosinófilos expressando IL-4 no tecido adiposo de camundongos, o que pode estar

relacionada com a manutenção da homeostase da glicose desse tecido e manutenção de macrófagos ativados nesse mesmo tecido. Podemos sugerir com esses resultados que a presença dessas células no tecido adiposo não significa que elas estão ativadas, uma vez que a concentração de IL-4 se encontra diminuída no grupos alérgicos WT e HSP65.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que é citada como uma citocina produzida no tecido adiposo (adipocinas), sendo a concentração dessa citocina no tecido adiposo cem vezes maior que no plasma. Essa observação sugere uma importante regulação autócrina e parácrina da IL-6 no metabolismo do tecido adiposo (SOPASAKIS *et al.*, 2004). Apesar de os adipócitos serem capazes de secretar IL-6, a maior parte desta citocina no tecido adiposo é proveniente das células do estroma vascular (FAIN *et al.*, 2004). Em nosso trabalho percebemos uma drástica diminuição dessa citocina nos grupos alérgicos WT e HSP65, em relação ao grupo alérgico meio. Mencarelli e colaboradores, em 2011, demonstraram em modelo de colite (que mimetiza a doença de Crohn em humanos), animais tratados com um mix de oito bactérias probióticas obtiveram níveis de expressão de mRNA significativamente menores de IL-6 no tecido adiposo mesentérico, quando comparados aos animais acometidos pela colite que foram não tratados. Neste trabalho eles atribuíram a diminuição de citocinas pró-inflamatórias à diminuição de receptores nucleares no tecido adiposo, como receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- $\gamma$ ) e receptor X ativado do farnesóide (FXR), que são altamente expressos em pacientes com doença de Crohn.

## 6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a bactéria *L. lactis* se mostrou eficiente em prevenir alguns sinais clássicos desse modelo, podendo sugerir que esta bactéria tem potente efeito como probiótico. O tratamento com *L. lactis* que produz HSP65 não interferiu na resposta benéfica já encontrada pelo *L. lactis*, nem reduzindo-a, nem intensificando a mesma. A hipótese de que a tolerância oral induzida pela HSP65 é capaz de diminuir sinais de alergia alimentar ainda permanece não respondida.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G.L.; METZLER, K.D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 30, p. 459-489, 2012.

ANDERSON, J.A. Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. *Am Fam Physician.*, v. 56, n. 5, p.1365-74, 1997.

ARANTES, R.M.E.; NOGUEIRA, A.M.M.F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY- immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res.*, v. 290, p. 61-69, 1997.

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

BASSO, A.S.; PINTO, F.A.; RUSSO, M.; BRITTO, L.R.; DE SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *J Neuroimmunol*, v.140, n.1-2, p.69-77. 2003.

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

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.

BINGHAM, C.O.; AUSTEN, K.F. Mast-cell responses in the development of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 105, n. 2, p.S527-534, 2000.

BISCHOF, R.J.; MEEUSEN, E.N. Cellular kinetics of an allergic-type response in a sheep mammary gland model of inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, v. 32, p.619-626, 2002.

BISCHOFF, S.C.; SELLEGE, G.; LORENTZ, A.; SEBALD, W.; RAAB, R.; MANNS, M.P. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 14, p. 8080-8085, 1999.

BISCHOFF, S.C.; MAYER, J.H.; MANNS, M.P. Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol.*, v. 121, n. 4, p. 270-283, 2000.

BISCHOFF, S.C.; CROWE, S.E. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology*, v. 128, p. 1089-1113, 2005.

BISHOP, G.A.; HOSTAGER, B.S. Signaling by CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *Immunol. Res.*, v. 24, n. 2, p.97-109, 2001.

BLANCHARD, C.; DURUAL, S.; ESTIENNE, M.; BOUZAKRI, K.; HEIM, M.H.; BLIN, N.; CUBER, J.C. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol*, v. 172, n. 6, p.3775-3783, 2004.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett*, v. 12, n. 3, p.257-261, 2005.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr. Rev.*, v. 56, S5-S18, 1998.

BRANDTZAEG, P. Food allergy: separating the science from mythology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, v. 7, p. 380-400, 2010.

BRANUM, A.M.; LUKACS, S.L. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics*, v. 124, p. 1549-1555, 2009.

BREDEHORST, R.; DAVID, K. What establishes a protein as an allergen? *J Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, v. 756, p.33-40, 2001.

BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; ORTOLANI, C.; AAS, K.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BJÖRKSTÉN, B.; MONERET-VAUTRIN, D.; WÜTHRICH, B. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy*, v. 50, p. 623-635, 1995.

CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, n. 6, p.1331-1334, 1994.

CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice II. Passive/ Adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scan. J. Immunol.*, v. 45, n. 1, p.16-20, 1997.

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

CARDOSO, C.R.; PROVINCIALTO, P.R.; GODOI, D.F.; FERREIRA, B.R.; TEIXEIRA, G.; ROSSI, M.A.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, v. 296, n. 3, p. G593-600, 2009.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, v. 28, n. 4, p.281-370, 2002.

CIANFERONI, A.; SPERGEL, J.M. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol. Int.*, v. 58, p. 457-466, 2009.

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

CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol*, v. 115, n. 1, p.3-12, 2005.

COHEN, I.R.; YOUNG, D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today.*, v. 12, n. 4, p. 105-110, 1991.

DAVIS, C.M. Food Allergies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, v. 39, p.236-254, 2009.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*, v. 73, n. 2, Suppl, p.421-429, 2001.

DIEYE, Y.; USAI, S.; CLIER, F.; GRUSS, A.; PIARD, J.C. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, v. 183, p. 4157-4166, 2001.

DI LEO, V.; YANG, P.C.; BERIN, M.C.; PERDUE, M. H. Factors regulating the effect of IL-4 on intestinal epithelial barrier function. *Int. Arch. Allergy Immunol*, v. 129, p. 219-227, 2002.

DOURADO, L.P. Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos. *Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte*, 2006. 80 p.

DOURADO, L.P.; J.C. SALDANHA; GARGIULO, D.L.; NOVIELLO, M.L.; BRANT, C.C.; REIS, M.L.; SOUZA, R.M.; FARIA, A.M.; SOUZA, D.G.; CARA, D.C. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. *Cell. Immunol*. v. 262, n. 1, p. 62-68, 2010.

DOURADO, L.P.; NOVIELLO, M. DE L.; ALVARENGA, D.M.; MENEZES, Z.; PEREZ, D.A.; BATISTA, N.V.; MENEZES, G.B.; FERREIRA, A.V.; DE SOUZA, D. DA G.; CARA, D.C. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cell Immunol*, v. 270, n. 2, p.198-206, 2011.

EIGENMANN, P. A; BEYER K.; BURKS A.W.; LACK G.; LIACOURAS C.A.; HOURIHANE JO'B; SAMPSON H.A.; SODERGREN E. New visions for food allergy: An iPAC summary and future trends. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 19, s.19, p. 26-39, 2008.

EIGENMANN, P. A. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 20, n. 1, Feb, p.5-11. 2009.

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



FAIN, J.N.; MADAN, A.K.; HILER, M.L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, v. 145, n. 5, p.2273-2282, 2004.

FAQUIM-MAURO, E.L.; MACEDO, M.S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol.*, v. 12, n. 12, p. 1733-1740, 2000.

FARHADI, A.; BANAN, A.; FIELDS, J.; KESHAVARZIAN, A. Intestinal barrier: An interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.18, p.479-97, 2003.

FARIA, A.M.; MARON, R.; FICKER, S.M.; SLAVIN, A.J.; SPAHN, T.; WEINER, H.L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of TGF-beta\ IL-10 and suppression of experimental allergic encephalomyelitis. *J Autoimmunity*, v. 20, p. 135-145, 2003.

FARIA, A.M.; WEINER, H.L. Oral tolerance. *Immunol Rev.*, v. 206, p. 232-59., 2005.

FERRARIS, R.P.; VILLENAS, S.A.; DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am J Physiol*, v. 262, n. 6 Pt 1, p.G1047-1059, 1992.

FINKELMAN, F.D.; ROTHENBERG, M.E.; BRANDT, E.B.; MORRIS, S.C.; STRAIT, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 115, n. 3, p.449-457, 2005.

FOSTER, P.S.; YANG, M.; KUMAR, R.K. CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. *Lab. Invest.*,v. 82, n. 4, p.455-462, 2002.

FROSSARD, C.P.; TROPIA, L.; HAUSER, C.; EIGENMANN, P.A.. Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, v. 113, n. 5, p.958-964, 2004.

FROSSARD, C.P.; STEIDLER, L.; EIGENMANN, P.A. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 119, n. 4, p. 952-959, 2007.

FULEIHAN, R.L. Allergy, immunology, and related disorders. *Curr. Opin. Pediatr.*, v. 10, p.581- 583, 1998.

GAREAU, M.G.; SHERMAN, P.M.; WALKER, W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 7, n. 9, p. 503-514, 2010.

GULLO, C.A.; TEOH, G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett.*, v. 94, n. 1-2, p. 1-10, 2004.

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

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

HELM, R.M., ERMEL, R.W.; FRICK, O.L. Nonmurine animal models of food allergy. *Environ. Health Perspect.*, v. 111, n. 2, p.239-244, 2003.

HERZ, U. Immunological basis and management of food allergy. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.*, v. 47, s.2, p.S54-S57, 2008.

HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 8, n. 3, p.218-230. 2008.

HOUGEE, S.; VRIESEMA, A.J.; WIJERING, S.C.; KNIPPELS, L.M.; FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P.; KNOL, J.; GARSSSEN, J. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *Int Arch Allergy Immunol.*, v. 151, n. 2, p. 107-117, 2010.

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

KANG, J.H.; YUN, S.I.; PARK, H.O. Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. *J Microbiol.*, v. 48, n. 5, p. 712-714, 2010.

KELLY, K.J. Eosinophilic gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, v. 30, p. S.28-35, 2000.

KESHAVARZIAN, A.; FARHADI, A.; FORSYTH, C.B.; RANGAN, J.; JAKATE, S.; SHAIKH, M.; BANAN, A.; FIELDS, J.Z. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol*, v. 50, n. 3, p.538-547, 2009.

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

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, v. 87, n. 6, p.1344-1350, 1984.

LEE, L.A.; BURKS, A.W. Food allergies: prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies. *Annu Rev Nutr.*, v. 26, p. 539-565, 2006.

LE LOIR, Y.; NOUAILLE, S.; COMMISSAIRE, J.; BRETIGNY, L.; GRUSS, A.; LANGELLA, P. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p. 4119-4127, 2001.

LINDQUIST, S. The heat shock protein response. *Annu Rev Biochem.*, v. 55, p. 1151-1191, 1986.

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

LOUIS, W.; FRANCHIMONT, D.; DEPREZ, M.; LAMPROYE, A.; SCHAAF, N.; MAHIEU, P.; BELAICHE, J. Decrease in systemic tolerance to fed ovalbumin in indomethacin-treated mice. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 109, p. 21-26, 1996.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science*, v. 307, p. 1920 – 1925, 2005.

MARINHO, F.A.; PACÍFICO, L.G.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LE LOIR, Y.; GUIMARÃES, V.D.; LANGELLA, P.; CASSALI, G.D.; FONSECA, C.T.; OLIVEIRA, S.C. An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. *Clin Exp Allergy.*, v. 40, n. 10, p. 1541-1551, 2010.

MARENGO, E.B.; DE MORAES, L.V.; FARIA, M.; FERNANDES, B.L.; CARVALHO, L.V.; TAMBOURGI, D.V.; RIZZO, L.V.; PORTARO, F.C.; CAMARGO, A.C.; SANT'ANNA, O.A. Administration of M. leprae Hsp65 interferes with the murine lupus progression. *PLoS One*, v. 3, n. 8, p. e3025, 2008.

MARON, R.; HANCOCK, W.W.; SLAVIN, A.; HATTORI, M.; KUCHROO, V.; WEINER, H.L. Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol.*, v. 11, n. 9, p.1573-1580, 1999.

MARON, R.; SUKHOVA, G.; FARIA, A.M.; HOFFMANN, E.; MACH, F.; LIBBY, P.; WEINER, H.L. 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.

MCBRIDE, D.L. New food allergy guidelines. *Journal of Pediatric Nursing*, v. 26, p. 262-263, 2011.

MCKAY, D.M. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, s.1, p.205-210, 2005.

MENCARELLI, A.; DISTRUTTI, E.; RENGA, B.; D'AMORE, C.; CIPRIANI, S.; PALLADINO, G.; DONINI, A.; RICCI, P.; FIORUCCI, S. Probiotics modulate intestinal expression of nuclear receptor and provide counter-regulatory signals to inflammation-driven adipose tissue activation. *PLoS One.*, v. 6, n. 7, p. e22978, 2011.

MERCENIER, A.; MÜLLER-ALOUF, H.; GRANGETTE, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 2, n. 1, p. 17-25, 2000.

MESTECKY, J.; OGRA, P.L.; MCGREE, J.R.; LAMBRECHT, B.N.; WARREN, S. *Mucosal Immunity*. 3rd.ed. v.1. London: Academic Press, 2005. 2064p.

MIMRAN, A.; MOR, F.; CARMÍ, P.; QUINTANA, F.J.; ROTTER, V.; COHEN, I.R. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiertgotypic response. *J Clin Invest.*, v. 113, n. 6, p. 924-932, 2004.

MINAI-FLEMINGER, Y.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res.*, v. 58, n. 10, p.631-638, 2009.

MINTON, K. Allergy and Asthma: What drives IL-4 versus IL-13 signalling? *Nature Rev. Immunol.*, v. 8, p.166-167, 2008.

MIYOSHI, A.; JAMET, E.; COMMISSAIRE, J.; RENAULT, P.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 239, n. 2, p. 205-212, 2004.

MOLLICA, J.Q. Potencial de *Dioscorea trifida* L.f. e *Dioscorea opposita* thunb. (dioscoreaceae, inhames) no tratamento da alergia alimentar induzida com ovalbumina em camundongos BALB/c. *Ciência de Alimentos*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. 138 p.

MOORE-OLUFEMI, S.D.; KOZAR, R.A.; MOORE, F.A.; SATO, N.; HASSOUN, H.T.; COX, C.S. JR.; KONE, B.C. Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock*, v. 23, n. 3, p.258-263, 2005.

MOR, F.; REIZIS, B.; COHEN, I.R.; STEINMAN, L. IL-2 and TNF receptors as targets of regulatory T-T interactions: isolation and characterization of cytokine receptor-reactive T cell lines in the Lewis rat. *J Immunol.*, v. 157, n. 11, p. 4855-4861, 1996.

NAUTA, A.J.; ENGELS, F.; KNIPPELS, L.M.; GARSSSEN, J.; NIJKAMP, F.P.; REDEGELD, F.A. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol*, v. 585, n. 2-3, p.354-360, 2008.

NISHIKAWA, M.; TAKEMOTO, S.; TAKAKURA, Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. *Int J Pharm*, v. 354, n. 1-2, p. 23-27, 2008.

NORTON, P.M.; LE PAGE, R.W.; WELLS, J.M. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.*, v. 40, n. 3, p. 225-230, 1995.

NOUAILLE, S.; RIBEIRO, L.A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D.; LE LOIR, Y.; OLIVEIRA, S.C.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.*, v. 2, n. 1, p. 102-111, 2003.

OKUNUKI, H.; TESHIMA, R.; HARIKAI, N.; SAKAI, S.; AKIYAMA, H.; MAITANI, T.; SAWADA, J. Oral sensitization of W/W(v) mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in gamma delta-T cells. *Biol Pharm Bull.*, v. 26, n. 9, p.1260-1265, 2003.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 82, n. 1-4, p.279-289, 2002.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; AH KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.*, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

PAUL, W.E. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, v. 77, n. 9, p. 1859-1870, 1991.

PEAVY, R.D; METCALFE, D.D. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, v. 8, n. 4, p.310-315, 2008.

PIARD, J.C.; HAUTEFORT, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, S.D.; FONS, M.; GRUSS, A. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol.*, n. 179, p. 3068-3072, 1997.

POCKLEY, A.G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, p. 1-15, 2001.

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

QUINTANA, F.J.; MIMRAN, A.; CARMÍ, P.; MOR, F.; COHEN, I.R. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PLoS One*, v. 3, n. 12, p. e4026, 2008.

REEVES, P.G.; ROSSOW, K.L.; LINDLAUF, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and

bone mineralization in rats and mice. *J Nutr.*, v. 123, n. 11, Nov, p.1923-31. 1993.

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

ROMAGNANI, S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, v. 105, n. 3, p.399-408, 2000.

ROTHENBERG, M.E; MISHRA, A.; BRANDT, E.B.; HOGAN, S.P. Gastrointestinal Eosinophils. *Immunol. Rev.*, v. 179, p.139-155, 2001.

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* v. 24, p.147-174, 2006.

SALDANHA, J.C., GARGIULO, D.L.; SILVA, S.S; CARMO-PINHO, F.H.; ANDRADE, M.C., ALVAREZ-LEITE, J.I.; TEIXEIRA, M.M., CARA, D.C. A model of chronic IgE- mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 6, p.809-16, 2004.

SAMPSON, H.A. Food Allergy. In *Allergy and Allergic Diseases*. Kay, ed. Blackwell Science, Oxford, 1997, 1517p.

SAMPSON, H.A. Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 103, p.717-728, 1999.

SAMPSON, H.A. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, p.891-896, 2001.

SAMPSON, H.A. Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 11, n. 2, p.540-547, 2003.

SAMPSON, H.A. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 113, p.805-819, 2004.

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

SANTOS, A. C. G. Estratégias alternativas de imunomodulação nas doenças inflamatórias intestinais. Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. 164 p.

SATO, M.; UZU, K.; YOSHIDA, T.; HAMAD, E.M.; KAWAKAMI, H.; MATSUYAMA, H.; ABD EL-GAWAD, I.A.; IMAIZUMI, K. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr.*, v. 99, n. 5, p. 1013-1017, 2008.

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

SCHIAVI, E.; BARLETTA, B.; BUTTERONI, C.; CORINTI, S.; BOIRIVANT, M.; DI FELICE, G. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Allergy.*, v. 66, n. 4, p. 499-508, 2011.

SCHONBECK, U.; LIBBY, P. The CD40-CD145 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 58, n. 1, p. 4-43, 2001.

SHANAHAN, F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterology*, v.16, p.915-931, 2002.

SICHERER, S.H. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 127, n. 3, p. 594-602, 2011.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu. Rev. Med.*, v.60, p.261-277, 2009.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, v.125, n.2, s.116-125, 2010.

SONNENBURG, J.L.; ANGENENT, L.T., GORDON, J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.*, v. 5, n. 6, p. 569-573, 2004.

SOPASAKIS, V.R.; SANDQVIST, M.; GUSTAFSON, B.; HAMMARSTEDT, A.; SCHMELZ, M.; YANG, X.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res.*, v. 12, n. 3, p.454-460, 2004.

STEIDLER, L.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.; SCHOFIELD, K.M.; REMAUT, E.; LE PAGE, R.W.; WELLS, J.M. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun.*, v. 66, n. 7, p.3183-3189, 1998.

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

STEIDLER, L.; ROTTIERS, P. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1072, p.176-186, 2006.

STONE, K.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 125, n. 2 Suppl 2, p.S73-80, 2010.

STRATH, M.; WARREN, D.J.; SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*, v. 83, n. 2, p.209-215, 1985.

TAKAYAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, v. 22, n. 56, p. 9041-9047, 2003.

TSAN, M. F.; GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.*, v. 76, n. 3, p.514-519, 2004.

UNTERSMAJR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol. Ther.*, v. 112, n. 3, p.787-798, 2006.

UNTERSMAJR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 121, n. 6, p.1301-1308, 2008.

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

VAN EDEN, W.; WICK, G.; ALBANI, S.; COHEN, I. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1113, p. 217-237, 2007.

VAN KOOTEN, C.; BANCHEREAU, J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.*, v. 67, n. 1, p.2-17, 2000.

VICARIO, M.; GUILARTE, M; ALONSO, C; YANG, P.; MARTÍNEZ, C.; RAMOS, L.; LOBO, B.; GONZÁLEZ, A.; GUILÀ, M.; PIGRAU, M.; SAPERAS, E.; AZPIROZ, F.; SANTOS, J. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun.*, v. 24, n. 7, p.1166-1175, 2010.

VICKERY, B. P.; CHIN, S.; BURKS, A.W. Pathophysiology of food allergy. *Pediatr Clin N Am.*, v. 58, 363-376, 2011.

WALKER, W.A. Antigen handling by the small intestine. *Clin Gastroenterol.*, v. 15, p. 1-20, 1986.

WALTER, S.; BUCHNER, J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl.*, v. 41, n. 7, p.1098-1113, 2002.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, v. 1, n. 1, p.19-29, 2009.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. Food Allergy. *J Clin Invest.*, v. 121, n. 3, p. 827-835, 2011.



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

WHO, 2002. Traditional medicine. Fact sheet n° 134, atualização: maio 2003. [HTTP://www.who.int/topics/plants\\_medicine/en/](http://www.who.int/topics/plants_medicine/en/) Acesso em: 06 de janeiro de 2012.

WHO, 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).

Acesso em: 08 de janeiro de 2012.

WIETEN, L.; BERLO, S.E.; TEN BRINK, C.B.; VAN KOOTEN, P.J.; SINGH, M.; VAN DER ZEE, R.; GLANT, T.T.; BROERE, F.; VAN EDEN, W. IL-10 is critically involved in *mycobacterial* HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. *PLoS One*, v. 4, n. 1, p. e4186, 2009.

WU, D.; MOLOFSKY, A.B.; LIANG, H.E.; RICARDO-GONZALEZ, R.R.; JOUIHAN, H.A.; BANDO, J.K.; CHAWLA, A.; LOCKSLEY, R.M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.*, v. 332, n. 6026, p. 243-247, 2011.

XING, H.; MAYHEW, C.N.; CULLEN, K.E.; PARK-SARGE, O.K.; SARGE, K.D. HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin. *J Biol Chem.*, v. 279, n. 11, p. 10551-10555, 2004.

XIONG, Q.; LI, J.; JIN, L.; LIU, J.; LI, T. Nasal immunization with heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis and reduces serum lipids in cholesterol-fed wild-type rabbits probably through different mechanisms. *Immunol Lett.*, v. 125, n. 1, p. 40-45, 2009.

XU, J.; GORDON, J.I. Honor thy symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 100, p.10452-59, 2003.

XU, Y.; SONG, G. The role of CD40-CD145 interaction in cell immunoregulation. *J. Biomed. Sci.*, v. 11, n. 4, p.426-38, 2004.

YOSHIDA, A.; AOKI, R.; KIMOTO-NIRA, H.; KOBAYASHI, M.; KAWASUMI, T.; MIZUMACHI, K.; SUZUKI, C. Oral administration of live *Lactococcus lactis* C59 suppresses IgE antibody production in ovalbumin-sensitized mice via the regulation of interleukin-4 production. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 61, n. 3, p. 315-322, 2011.

YU, L.C.H.; PERDUE, M.H. Immunologically mediated transport of ions and macromolecules. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 915, p. 247-259, 2001.

YU, W.G.; LIN, P.; PAN, H.; XIAO, L.; GONG, E.C.; MEI, L. Pathophysiological significance of a reaction in mouse gastrointestinal tract associated with

delayed-type hypersensitivity. *World J Gastroenterol.*, v. 10, n. 15, p. 2254-2258, 2004.

ZANIN-ZHOROV, A.; NUSSBAUM, G.; FRANITZA, S.; COHEN, I.R.; LÍDER, O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J.*, v. 17, n. 11, p. 1567-1569, 2003.

ZANIN-ZHOROV, A.; TAL, G.; SHIVTIEL, S.; COHEN, M.; LAPIDOT, T.; NUSSBAUM, G.; MARGALIT, R.; COHEN, I.R.; LIDER, O. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol.*, v. 175, n. 1, p. 276-285, 2005.

ZHANG, L.L.; CHEN, X.; ZHENG, P.Y.; LUO, Y.; LU, G.F.; LIU, Z.Q.; HUANG, H.; YANG, P.C. Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. *J Gastroenterol Hepatol.*, v. 25, n. 5, p. 928-934, 2010.

ZUERCHER, A.W.; WEISS, M.; HOLVOET, S.; MOSER, M.; MOUSSU, H.; VAN OVERTVELT, L.; HORIOT, S.; MOINGEON, P.; NUTTEN, S.; PRIOULT, G.; SINGH, A.; MERCENIER, A. *Lactococcus lactis* NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. *Clin. Dev. Immunol.*, v. 2012, p. 1-10, 2012.

## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO 1

#### Técnicas de colorações histológicas

##### HE (HEMATOXILINA-EOSINA)

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

##### P.A.S. (ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF)

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