

**Denise Alves Perez**

**Avaliação do uso de *Lactococcus lactis* produtores ou não da Proteína do choque térmico 65 como estratégia imunomodulatória em camundongos com alergia alimentar experimental à ovalbumina**

**Programa de Pós-graduação em Biologia Celular  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte / 2012**

**Denise Alves Perez**

**Avaliação do uso de *Lactococcus Lactis* produtores ou não da Proteína do choque térmico 65 como estratégia imunomodulatória em camundongos com alergia alimentar experimental à ovalbumina**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Denise Carmona Cara Machado**

**Departamento de Morfologia**

**Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Gustavo Batista Menezes**

**Departamento de Morfologia**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte / 2012**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG.

“Mas é claro que o sol vai voltar amanhã  
Mais uma vez, eu sei  
Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã  
Espera que o sol já vem...  
Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém  
Tem gente que machuca os outros  
Tem gente que não sabe amar  
Mas eu sei que um dia a gente aprende  
Se você quiser alguém em quem confiar  
Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

## **Agradecimentos**

À Deus por ter me dado o direito à vida e ter colocado em meu caminho pessoas que só me fizeram crescer e me ensinaram o quanto seu amor é bom, infinito e supremo.

À minha orientadora Denise, que me aceitou em seu laboratório, de braços abertos, que me tratou como uma filha e me orientou com muita paciência e compreensão. Você me fez crescer e ter gosto por tudo o que fiz! Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Gustavo, por ter puxado minha orelha sempre que necessário, por ter paciência de me explicar coisas óbvias, e por estar sempre disposto a me escutar.

Aos professores Ana Maria Caetano e Anderson Miyoshi, pela colaboração fundamental para que esse trabalho fosse realizado. Agradeço por terem aberto as portas de seus laboratórios e nos cedido com muita confiança e carinho.

À Débora Moreira Alvarenga, co-autora desse trabalho, e minha melhor amiga durante esse tempo. Muito obrigada, nunca existirão palavras que descrevam o quanto você é importante pra mim e para este trabalho. Você é minha companheira, amiga-irmã. Não me deixou desistir de nada, fez coisas por mim que eu nunca conseguiria ter feito, escutou tudo o que eu tinha e o que eu não tinha pra falar, não me abandonou por nenhum momento e me apoiou quando eu mais precisei. Eu te amo muito, pra sempre!

Às alunas-amigas da professora Denise, Nathália, Rafaela, Roberta, Samira, Letícia e Fernanda, se não fosse vocês, os experimentos nunca teriam fim e a rotina do laboratório não poderia ser mais divertida, esse trabalho também é de vocês!

Às amigas Maria Noviello e Luana Dourado, pelo apoio emocional, pelas discussões de resultados, pelas idéias compartilhadas, pelas risadas, por todo apoio em tudo. Vocês serão sempre minhas amigas de verdade e pessoas excepcionais, como referência em minha vida.

À Juliana Mollica, Mirna e Olivia, que me ensinaram o que sabiam, me passaram o que tinha de melhor, sempre com carinho e atenção!

À todos os alunos e ex-alunos, do Laboratório do Sistema linfóide e da Regeneração, pela ótima convivência, pelas festas e pelo apoio científico, vocês são demais! Em destaque: Priscila, Alesandra, Albená, Bárbara, William, Marina – pessoal, vocês foram mais que demais, foram companheiros e amigos, adoro sem palavras, vocês. Pedro e Sylvia e seus respectivos alunos de iniciação, por todo apoio científico – vocês mandam muito bem! Aos não só colegas, mas também amigos, Patrícia, Luana, Rodolfo e Andrei, além de

assessores para assuntos aleatórios, são vocês os “chefes” e os “administradores”, obrigada pelo carinho e atenção, adoro vocês! Aos alunos da professora Cláudia, pelo apoio científico e pelo apoio sempre cedido!

Aos alunos da professora Ana Maria, Ana Cris – obrigada INFINITAMENTE por tudo, Rafael Rezende – obrigada pelas infinitas explicações e pela paciência, Rafael Pires, Thais, Mauro, Archimedes, Flávia e Santiago e pela aluna do professor Anderson, Camila, por todos os ensinamentos, trocas de reagentes, soluções e protocolos, pela companhia e por todo carinho, que vocês dedicaram a mim.

À toda turma de Biologia Celular, do ano de 2010, vocês foram uns queridos!!! Obrigada pela ótima convivência, pelas farras, pelos risos e apertos compartilhados! Essa turma é inesquecível!

Aos professores do laboratório do Sistema linfóide e da Regeneração, Vanessa, Cláudia e Valéria, pelo carinho e atenção quando tive dúvidas e precisei da ajuda de vocês, e por terem me aguentado durante esses anos, falando alto e fazendo bagunça no laboratório. Muito obrigada!

À Professora Júnia Amorim, que foi mais que uma orientadora na graduação, foi uma amiga, uma mãe, uma confidente. Me ajudou nas fases mais difíceis da minha vida e me apoiou em todas as minhas decisões....Muito obrigada, se não fosse você, eu nunca estaria aqui! Você é mais que especial!

À Sibele, Sheila e Diana pela disponibilidade em ajudar com assuntos administrativos, que me tiravam do sério e vocês sempre estavam dispostas a me ajudar!

Ao Frank, que com muita paciência, amor, companheirismo e dedicação me acompanhou durante minha vida. Amo você demais! Aos seus familiares, que hoje também são minha família, e com carinho e amor me acolheram durante todos esses anos....Muito obrigada!

Aos meus pais, Marli e Constantino, por me ensinarem a ser quem eu sou, por me passarem seus valores, com dignidade, respeito e amor. Por nunca deixarem que me faltasse nada, por estarem sempre ao meu lado, longe ou perto, por serem quem vocês são! Mãe você é incrível e Pai, sei que você está orgulhoso e está em paz. Amo vocês mais que tudo neste mundo!

Ao meu tio Isidoro, pelo apoio de pai substituto desde 2009, pelo apoio emocional, por manter contato sempre e pelo apoio em todos os momentos. Obrigada por você e sua família serem minha família! Amo vocês! A família da minha mãe, que não dá para escrever para todos, pois são muitos, mas mesmo assim obrigada pela força, por ter entendido quando não pude estar presente, obrigada por me amarem, também amo muito todos vocês!

Aos meus avós, Angelina, Pedro e Regina, vocês são e foram os melhores avós do mundo....Obrigada pelas orações e pelo amor.

Ao meu irmão, Cleiton, que mesmo de longe torceu por mim, e entendeu todas as minhas faltas e mancadas. Amo você!

Aos meus amigos, extra-lab, ao grupo "Friends", ao João, ao Daniel e a Fernanda, pela paciência, pela torcida e pelo carinho! À minha treinadora Flavia Antunes e aos amigos do pilates. Vocês foram fundamentais pelo backstage....

Ao campus da Universidade Federal de Minas Gerais, por ser lindo e ter me acolhido como casa durante esses anos.

E à todos, que se eu esqueci de citar, contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho. O meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Trato Gastrointestinal.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Reações adversas a alimentos e Alergia Alimentar.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Bactérias láticas.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4 Proteínas do choque térmico (HSPs).....</b>	<b>31</b>
<b>1.5 Tolerância Oral.....</b>	<b>34</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Produção de <i>L. lactis</i> expressando HSP65.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Esquema de indução e tratamento com <i>L. lactis</i> WT e <i>L. lactis</i> produtores de HSP65.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Protocolo de indução de alergia alimentar a ovalbumina.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Ração Balanceada.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6 Desenho Experimental.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7 Eutanásia.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8 Obtenção de soro.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9 Avaliação da alergia alimentar a ovalbumina.....</b>	<b>45</b>
3.9.1 Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no Soro.....	45
3.9.2 Dosagem de Imunoglobulinas IgG1 anti-OVA no Soro.....	47
<b>3.10 Avaliação dos parâmetros clínicos.....</b>	<b>48</b>
3.10.1 Avaliação do consumo de ração.....	48
3.10.2 Avaliação do peso corpóreo.....	48
3.10.3 Índice de atividade da doença - Score DAÍ (Disease activity index).....	49



<b>3.11 Avaliação do Intestino Delgado - Jejuno Proximal.....</b>	<b>49</b>
3.11.1 Avaliação do edema intestinal.....	49
3.11.2 Avaliação Morfológica do Jejuno Proximal.....	50
3.11.2.1 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra.....	51
3.11.2.2 Avaliação do número de eosinófilos.....	52
3.11.3 Dosagens enzimáticas das atividades de neutrófilos e de eosinófilos...52	
<b>3.12 Avaliação do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.....</b>	<b>54</b>
3.12.1 Peso do tecido adiposo periuterino e mesentérico.....	54
3.12.2 Avaliação morfométrica do tecido adiposo periuterino e mesentérico.....	54
<b>3.13 Preparação de extratos de tecidos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.14 Medida da produção de citocinas por ELISA.....</b>	<b>55</b>
<b>3.15 Análise Estatística.....</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Quantificação sérica de IgE e IgG1 anti-ovalbumina.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Avaliação dos parâmetros clínicos: consumo de ração, peso dos animais e o Índice de atividade da doença.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Avaliação Morfológica do Intestino Delgado - Jejuno Proximal.....</b>	<b>62</b>
4.3.1 Avaliação da presença de edema intestinal.....	62
4.3.2 Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra.....	63
4.3.3 Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal.....	66
4.3.4 Avaliação da ativação de eosinófilos e neutrófilos pela dosagem de Peroxidase Eosinofílica (EPO) e da Mieloperoxidase (MPO).....	68
<b>4.4 Avaliação do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.....</b>	<b>69</b>
4.4.1 Avaliação da perda de peso do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.....	69
4.4.2 Avaliação morfométrica do tecido adiposo periuterino e do tecido adiposo mesentérico.....	70

<b>4.5 Avaliação da produção de citocinas por ELISA no Jejuno Proximal e no tecido adiposo periuterino.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5.1 Dosagem dos níveis das citocinas IL-4, IL-10 e IL-5 no Jejuno Proximal.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5.2 Dosagem dos níveis das citocinas IL-10, IL-4 e IL-6 no tecido adiposo periuterino.....</b>	<b>75</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>8.1 Anexo I.....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O Ambiente imunológico intestinal.....	21
Figura 2 - Imunopatogênese da alergia.....	25
Figura 3 - Representação dos vetores de expressão pXylT:SEC:hsp65.....	40
Figura 4 - Protocolo Experimental de Indução da Alergia.....	42
Figura 5 - Preparação dos intestinos para confecção de lâminas histológicas em forma de rocambole.....	51
Figura 6 - Avaliação dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA.....	59
Figura 7 - Avaliação dos parâmetros clínicos.....	62
Figura 8 - Avaliação da presença de edema intestinal.....	63
Figura 9 - Avaliação do muco neutro produzido pelas células caliciformes do Jejuno Proximal de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS.....	64
Figura 10 - Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do Jejuno Proximal de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS.....	65
Figura 11 - Infiltrado de eosinófilos no Jejuno Proximal.....	66
Figura 12 - Avaliação histológica do jejuno proximal de camundongos BALB/c evidenciando a contagem de eosinófilos.....	67
Figura 13 - Avaliação da atividade de eosinófilos por dosagem de peroxidase eosinofílica (EPO) e de neutrófilos por quantificação da mieloperoxidase (MPO).....	69
Figura 14 - Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de tecido adiposo periuterino e tecido adiposo mesentérico.....	70
Figura 15 - Avaliação da morfometria do tecido adiposo periuterino e tecido adiposo mesentérico.....	71
Figura 16 - Avaliação histológica do tecido adiposo periuterino de camundongos BALB/c, pela coloração de HE.....	72

Figura 17 - Avaliação histológica do tecido adiposo mesentérico de camundongos BALB/c, pela coloração de HE.....	73
Figura 18 - Avaliação da produção de citocinas pelo jejuno proximal.....	75
Figura 19 - Avaliação da produção de citocinas pelo tecido adiposo periuterino.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas.....	39
Tabela 2 - Ração padrão para roedores baseada na AIN-93G.....	43
Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais.....	43
Tabela 4 - Índice de atividade da alergia alimentar induzida por ovalbumina.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

2N – dois normais de concentração

AIN – Instituto americano de nutrição

AL(OH)<sub>3</sub> – hidróxido de alumínio

BHT – butil-hidroxi-tolueno

BL – bactérias lácticas

CEBIO – centro de bioterismo

DAI – índice de atividade da doença

ELISA – ensaio de absorção imunoenzimático

EPO – peroxidase eosinofílica

FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FXR – receptor X ativado do farnesóide

GALT – tecido linfóide associado ao intestino

GM-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

GRAS – Generally Recognized As Safe

H.E – hematoxilina – eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HSP – proteína do choque térmico

HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

ImageJ – image processing and analysis in java

Kiu - kallikrein inactivator units

*L. lactis* – *Lactococcus lactis*

LPS – lipopolissacarídeo

MALT – tecido linfóide associado a mucosa

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MPO – mieloperoxidase

NaCl – cloreto de sódio

OD – densidade óptica

OIT – imunoterapia sublingual/oral

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – ortofenileno-diamino

OVA – ovalbumina

PAF – fator ativador de plaquetas

PAS – Ácido periódico de shiff

PBS – tampão salina fosfato

PGD2 – prostaglandina D2

pH – potencial hidrogeniônico

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride

PPAR – proliferador de peroxissoma

R.P.M. – rotação por minuto

SCF – fator de célula tronco

T.A – temperatura ambiente

TCR – receptor de células T

TGF – fator de crescimento e transformação

TGI – trato gastrointestinal

Th – células T auxiliares

TLR – *toll like receptor*

TMB - Tetramethylbenzidine

TNF – fator de necrose tumoral

U.A – unidade arbitrária

WT – selvagem



## RESUMO

A alergia alimentar é frequentemente resultado de reações de hipersensibilidade mediadas por IgE e está relacionada com algumas falhas nos mecanismos regulatórios. Tem sido proposto que a proteína do choque térmico 65 (Heat Shock Protein 65 - HSP65) é liberada durante a lesão celular e pode intensificar a resposta inflamatória. Baseado nisso, nós sugerimos que a tolerância oral a HSP65 poderia reduzir a resposta inflamatória alérgica. Para investigar essa hipótese, a tolerância oral a HSP65 foi induzida pela ingestão de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) transgênico que secreta HSP65 antes da sensibilização pelo antígeno. A alergia alimentar foi induzida pela injeção subcutânea com ovalbumina (OVA) em hidróxido de alumínio e desafiados durante 7 dias com uma dieta contendo o antígeno, em camundongos BALB/c fêmeas. Os tratamentos consistiram na ingestão oral (durante 4 dias) de *L. lactis* wild-type (WT), ou *L. lactis* secretando HSP65, ou somente meio de cultura M17, 7 dias antes da sensibilização com OVA. Ambos os tratamentos (WT e HSP65) reduziram igualmente os principais sinais observados pela alergia alimentar. Quando comparados ao grupo alérgico meio, houve redução nos níveis de IgE anti-OVA no soro, no número de eosinófilos intestinais, na produção de muco e nos níveis de IL-6 no tecido adiposo. O tratamento com *L. lactis* WT foi suficiente para reduzir os sinais da alergia alimentar sugerindo que o *L. lactis* pode ser um probiótico em potencial. Para se testar a hipótese de que HSP65 pode estar intensificando a resposta inflamatória alérgica e, conseqüentemente a tolerância oral ao HSP65 pode reduzir os sinais da alergia alimentar, outros procedimentos deverão ser utilizados.

## ABSTRACT

Food allergy is most frequently the result of IgE-mediated hypersensitivity reactions and is related to the failure of some regulatory mechanisms. It has been shown that Heat Shock Protein 65 (HSP65) is released during cellular injury and can increase inflammatory response. Based on this, we suggest that an oral pretreatment with HSP65, which could turn the mice tolerant to HSP65, could decrease signs of food allergy. To investigate this hypothesis, we induced oral tolerance to HSP65, through the ingestion of transgenic *Lactococcus lactis* (*L. lactis*)-secreting HSP65 before antigen sensitization. Food allergy was induced through subcutaneous injection with ovalbumin in aluminum hydroxide and challenged with the antigen containing diet for 7 days, in female mice BALB/c. The treatments consisted of oral ingestion (during 4 days) of *L. lactis* wild-type (WT), or *L. lactis* secreting HSP65, or only the medium M17 cultures, 7 days before the OVA sensitization. Both treatments reduced almost equally the majority of the food allergy observed signs. Compare to allergic group medium, animals from allergic groups treated with WT and HSP65 had reduction in serum anti-OVA IgE levels, intestinal eosinophils numbers, mucus production and IL-6 levels in the adipose tissue. We conclude that *L. lactis* could be a probiotic in potential. To investigate whether oral tolerance to HSP65 is involved in this response, new experiments with new protocols should be further addressed.