

Hellem Crhistina Damazo Pereira

Correlação entre capacidade ectonucleotídásica de isolados de *Lactobacillus* e a produção de citocinas por células dendríticas.

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Mestrado Acadêmico em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como exigência parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Prof. Luis Carlos Crocco Afonso e coorientação da Prof^a Elisabeth Neumann.

OURO PRETO

2014

P436c Pereira, Hellem Crhistina Damazo.
Correlção entre capacidade ectonucleotidásica de isolados de *Lactobacillus* e a produção de citocinas por células dendríticas [manuscrito] / Hellem Crhistina Damazo Pereira. - 2014.
62f.: il.: grafos; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luiz Carlos Crocco.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. .
Área de Concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Lactobacilo - Teses. 2. Celulas - Teses. 3. citocinas - Teses. 4. Proteínas de cassetes de Ligação de ATP - Teses.
I. Afonso, Luiz Carlos Crocco . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.125.5



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Correlação entre capacidade ectonucleotidásica de isolados de *Lactobacillus* e a produção de citocinas por células dendríticas”

Aos quinze dias do mês de setembro de 2014, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Hellem Crhistina Damazo Pereira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram porA.PROVAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

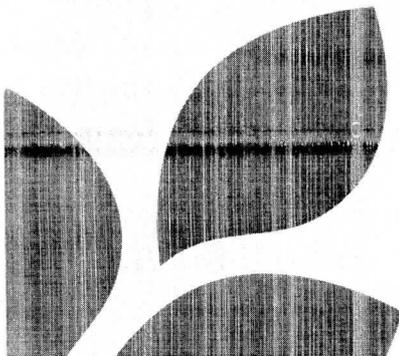
Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso
Presidente

Prof. Dr. André Talvani
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 15/09/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2013/36 relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Seleção de probióticos com base em sua capacidade ectonucleotidásica para utilização na modulação da resposta imune*", que tem como responsável o Prof. Dr. Luiz Carlos Crocco Afonso, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 31/03/2015.

Ouro Preto, 22 de julho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA-UFOP

Dedicatória

*Esse trabalho é dedicado aos meus pais,
Francisco e Carmem, e à minha
Irmã, Brunna, por todo apoio.*

Agradecimento

Agradeço a Deus, pela dádiva de poder concluir mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais e minha irmã, a quem todos os esforços valem a pena.

Agradeço ao Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, pelos ensinamentos, os quais foram muito importantes para a minha formação, e por toda a paciência ao longo do trabalho.

Agradeço a Prof. Dra. Elisabeth Neumann, pela colaboração do desenvolvimento desse trabalho, sugestões e por ter cedido as linhagens de lactobacillus. E ao seu aluno Mário Abatemarco pelo treinamento.

Agradeço aos amigos que desde o início do mestrado estiveram comigo em todos os momentos, Bijay, Deena, João, Fabiano e Marina, obrigada pelo companheirismo.

Agradeço aos colegas de LIP, Pauline, Amanda, Rodrigo, Míriam, Tiago, Maurício, Leandro, Renata, Priscila, Luana, Rodrigo Ventura, por todo o tempo de convivência, amizade e por toda colaboração durante esse trabalho.

Agradeço também aos técnicos Marco e Leandro por me auxiliarem em diversas tarefas dentro do laboratório.

Agradeço aos professores, funcionários e colegas de outros laboratórios do NUPEB.

Resumo

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados de forma adequada, agregam benefícios à saúde do hospedeiro. Várias espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam efeito probiótico comprovado e são importantes moduladoras do sistema imune intestinal. Os probióticos estimulam as células dendríticas (DCs) a produzirem citocinas que diferenciam as células T em Th1, Th2, Th17 ou Treg. As ectonucleotidases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados. Essas ectoenzimas são importantes para a modulação da resposta imune intestinal devido à hidrólise de ATP, que quando aumentada no meio extracelular é considerada uma molécula inflamatória. Por outro lado o acúmulo de adenosina, através da hidrólise de ATP em AMP, pela 5'-nucleotidase, estimula a resposta anti-inflamatória. O objetivo do trabalho foi relacionar a atividade ectonucleotidásica de diferentes linhagens de *Lactobacillus* com a capacidade de ativação de DCs e a produção de citocinas. Os *Lactobacillus* foram incubados com ATP, ADP ou AMP e os níveis de hidrólise foram avaliados através da liberação de fosfato inorgânico (Pi). Demonstrou-se que os lactobacilos hidrolisam ATP diferentemente, dependendo da linhagem, sendo que *Lactobacillus mali* L.11 e *Lactobacillus acidophilus* L.36 apresentaram maior capacidade de hidrólise de ATP. Não foi observado hidrólise significativa de ADP e AMP. Ao agruparmos as linhagens com e sem atividade, foi possível verificar o aumento significativo da atividade de *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36 quando comparado às linhagens que apresentaram pouca atividade ectonucleotidásica. Além disso, as DCs foram estimuladas com os lactobacilos, por 20 horas e os resultados dessa estimulação demonstrou que as linhagens não alteraram. Além disso, as DCs foram estimuladas com *Lactobacillus*, por 20 horas e não demonstrou alteração na expressão de CD40, CD86 e MHCII. Por fim observou-se a produção de citocinas após a estimulação por 20 horas. Houve um aumento de IL-6, TNF- α e IL-10 em relação às DCs não estimuladas. De maneira interessante, IL-12 teve a produção aumentada quando da estimulação de DC com *L. mali* L.10, que também mostrou baixa capacidade de hidrolisar ATP. Curiosamente, *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36 mostraram uma diminuição significativa da produção de IL-12, o que pode estar relacionado com a alta capacidade de hidrólise dessas cepas. Conclui-se então que *Lactobacillus* possuem capacidade ectonucleotidásica diferenciada e que a hidrólise de ATP pode ser relacionada com a produção de citocinas por DCs e, conseqüentemente, com a diferenciação de linfócitos T durante a resposta imune intestinal.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, célula dendrítica, ATP, ectonucleotidases.

Abstract

Probiotics are live microorganisms which, when administered properly, add health benefits to the host. Several species of the genus *Lactobacillus* have proven probiotic effect and are important modulators of the intestinal immune system. Probiotics stimulate dendritic cells (DCs) to produce cytokines that T cells differentiate into Th1, Th2, Treg and Th17. The ectonucleotidases are enzymes that hydrolyze nucleotide di- and triphosphates. These ectoenzymes are important for the modulation of intestinal immune response due to ATP hydrolysis, which when raised in the extracellular medium is considered an inflammatory molecule. On the other hand, the accumulation of adenosine by hydrolysis of ATP to AMP by 5'-nucleotidase, stimulates anti-inflammatory response. The objective was to relate the ectonucleotidase activity of different strains of *Lactobacillus* with the ability of DCs activation and cytokine production. *Lactobacilli* were incubated with ATP, ADP or AMP and hydrolysis levels were assessed by the release of inorganic phosphate (Pi). It has been shown that *Lactobacilli* hydrolyze ATP differently, depending on the strain, and *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus mali* L.11 L.36 showed greater capacity for ATP hydrolysis. No significant hydrolysis of ADP and AMP was observed. When we group the strains with and without activity, we observed a significant increase in activity of *L. acidophilus* and *L. mali* L.11 L.36 compared to strains that showed little ectonucleotidase activity. Furthermore, DCs were stimulated with *Lactobacilli* for 20 hours and the results of stimulation showed that the strains do not change. Furthermore, DCs were stimulated with *Lactobacillus* for 20 hours and showed no alteration expression of CD40, CD86 and MHCII. Finally the observed production of cytokines after stimulation for 20 hours. There was an increase in IL-6, TNF- α and IL-10 compared to non-stimulated DCs. Interestingly, IL-12 production was increased when the stimulation of DC with *L. mali* I.10, which showed poor ability to hydrolyze ATP. Interestingly, *L. acidophilus* and *L. mali* L.11 L.36 showed a significant decrease of IL-12, which can be associated with high hydrolysis capability of these strains. It is concluded that *Lactobacillus* ectonucleotidase have different capabilities and the hydrolysis of ATP may be related cytokine production by DCs and therefore with the differentiation of T lymphocytes in the intestinal immune response.

Keywords: Probiotics, dendritic cell, ATP, ectonucleotidases

ÍNDICE

Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	VI
Abstract.....	VI
Lista de Figuras.....	XIX
Lista de Siglas.....	X
Introdução.....	12
A mucosa intestinal.....	13
Probióticos.....	16
Probióticos e o sistema imune.....	18
Modulação da resposta imune por probióticos.....	23
Efeito adjuvante dos probióticos.....	23
Sinalização purinérgica e modulação da resposta imune.....	24
Justificativa.....	28
Objetivos.....	30
Material e Métodos.....	31
Animais.....	32
Linhagens de <i>Lactobacillus</i>	32
Dosagem da atividade ectonucleotidásica de <i>Lactobacillus</i>	33
Obtenção de Células Dendríticas derivadas de medula óssea.....	34
Estimulação de DCs por <i>Lactobacillus</i>	34
Avaliação da viabilidade celular.....	34
Citometria de fluxo.....	35
Quantificação das citocinas por ELISA.....	35
Análise estatística.....	36
Resultados	37
1. Linhagens diferentes possuem diferentes capacidades de hidrolisar nucleotídeos.....	38
2. Linhagens de <i>Lactobacillus</i> não alteram a expressão de CD86, CD40 e MHCII em DCs derivadas de medula óssea	40
3. A estimulação de DCs de medula óssea com <i>Lactobacillus</i> aumenta a produção de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10 dependente de cepa.....	42
Discussão.....	46
Sumário de Resultados.....	52
Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas.....	56

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Estrutura do tecido linfoide associado ao intestino (GALT)	15
Fig. 2: Linhagens possuem capacidade diferente de hidrólise de ATP.....	38
Fig. 3: <i>L. mali</i> L.11 e <i>L. acidophilus</i> L.36 tem maior capacidade de hidrólise de ATP.....	39
Fig. 4: <i>L. mali</i> L.11 e <i>L. acidophilus</i> L.36 agrupados mostraram maior hidrólise de ATP.	39
Fig. 5: A estimulação de DCs com <i>Lactobacillus</i> não altera a percentagem de MHCII+CD86+.	40
Fig. 6: A estimulação de DCs com <i>Lactobacillus</i> não altera a expressão de CD86.	41
Fig. 7: A estimulação de DCs com <i>Lactobacillus</i> não altera a expressão de MHCII.	41
Fig. 8: A estimulação de DCs com <i>Lactobacillus</i> não altera a expressão de CD40.	42
Fig. 9: Produção de IL-6 induzida por <i>Lactobacillus</i>	43
Fig. 10: Produção de TNF- α induzida por <i>Lactobacillus</i>	43
Fig. 11: <i>Lactobacillus</i> com maior capacidade ectonucleotidásica induziram menor produção de IL-12.....	44
Fig. 12: <i>Lactobacillus</i> induziram a produção de IL-10	45

LISTA DE SIGLAS

ADP: difosfato de adenosina

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

BAL: bactérias do ácido láctico

CD39: apirase

CD73: 5'-nucleotidase

DCs: células dendríticas

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

FAE: folículos associados ao epitélio

FAO/OMS: Organização das nações unidas para a Alimentação e Agricultura

GALT: tecido linfoide associado ao epitélio

HCl: ácido clorídrico

IECs: células epiteliais intestinais

IFN: interferon

IL: interleucina

KCl: cloreto de potássio

LP: lamina própria

LPS: lipopolissacarideo

MAMPs: padrões moleculares associados a microrganismo

MFI: intensidade média de fluorescência

MgCl: cloreto de magnésio

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

MLNs: linfonodos mesentericos

MRS: De Man, Rogosa Sharp

MyD88: fator diferenciados mieloide

Na₃PO₄: fosfato de sódio

NaCl: cloreto de sódio

NF-κB: fator nuclear kappa B

NK: natural killer

NLR: receptor nod-like

PBS: tampão de fosfato salina

Pi: fosfato inorgânico

PP: placas de Peyer

PRR: receptores de reconhecimento padrão

RNA: ácido ribonucleico

SFB: soro fetal bovino

TCD4: linfocitos auxiliares CD4

TGF: fator de transformação do crescimento

TIR: receptor tipo toll IL-1

TLR: receptores do tipo toll

TNF fator de necrose tumoral

UFC: unidade formadora de colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

A mucosa intestinal

O intestino é um ecossistema complexo e heterogêneo, composto por mais de 500 espécies de bactérias (Bron e cols., 2012), contendo aproximadamente 10^{14} unidades formadoras de colônia (UFC) que além de colonizar o lúmen, auxiliam no metabolismo intestinal (Million e cols., 2013).

Devido ao seu contato direto com essas bactérias e outros microrganismos do ambiente externo, o intestino possui barreiras físicas e químicas que protegem o indivíduo contra a ação de patógenos entéricos. O epitélio intestinal é dotado de intensa renovação tecidual, gerada a partir de células tronco multipotentes, e tem como principal função, servir de barreira física delimitando o lumen intestinal (Artis, 2008).

A monocamada de células que separa o lúmen intestinal do tecido linfóide intestinal, ou seja, a área de contato com o ambiente externo e a área estéril do intestino é composta por diferentes linhagens celulares: As células epiteliais intestinais (IECs) ou enterócitos, que apresentam superfície apical com densa microvilosidade compondo 80% das células do tecido; células caliciformes que são produtoras de peptídeos antimicrobianos como a mucina presente no muco; células enteroendócrinas, que produzem moléculas neuroendócrinas e células de Paneth, secretoras de defensinas, também peptídeos antimicrobianos. Outro tipo celular encontrado ao longo da camada monoepitelial e envolvido, principalmente, na resposta imune intestinal são as células M. Essas células possuem glicocálix e microvilosidades reduzidos em relação às células epiteliais e estão localizadas em regiões específicas sobrepostas ao tecido linfóide associado ao intestino, abreviado em inglês de GALT (Lievin-Le, V & Servin, 2006; Mabbott e cols., 2013). Um resumo esquemático de toda a estrutura do GALT está representado na Figura 1.

As células M, assim como as epiteliais, são integradas por complexos juncionais intercelulares formados por junções aderentes e desmossomas que,

em conjunto, tem a função de auxiliar a comunicação celular e manter a integridade da camada epitelial, servindo, juntamente com o complexo apical, como uma barreira semi-permeável entre o lúmen e o GALT (Yu & Yang, 2009). Contudo, ao longo da evolução, patógenos como bactérias, vírus e fungos desenvolveram maneiras de sobreviver na camada mucosa do intestino e modular a comunicação entre as junções celulares levando à disbiose intestinal (Turner, 2009).

A integridade da mucosa epitelial intestinal também depende da regulação de peptídeos antimicrobianos, como a mucina e defensinas presentes no muco. Esses peptídeos ajudam a compor a primeira linha de defesa do intestino e auxiliam na resposta imune inata contra bactérias patogênicas, vírus e fungos, além de produtos nocivos produzidos por eles (Kim & Ho, 2010).

Os microrganismos comensais anaeróbios colonizam a camada de muco localizada subjacente as IECs. Contudo, diferentemente da camada externa, a camada interna é estéril e dificilmente invadida pela microbiota comensal, probióticos ou por patógenos (Lievin-Le, V & Servin, 2006). Contrariamente, patógenos entéricos, ao longo da sua evolução, desenvolveram mecanismos para burlar essas barreiras e chegar ao epitélio subjacente. Diversos patógenos secretam toxinas que danificam células epiteliais e conseqüentemente conseguem alterar a produção de mucinas e peptídeos antimicrobianos, podendo causar alterações nas junções intercelulares, modulação da sinalização celular e da resposta imune facilitando a invasão patogênica e também de bactérias comensais, neste caso levando a alteração da microbiota residente (McGuckin e cols., 2011).

Na lâmina própria (LP) estão inseridas as placas de Peyer (PP) e os folículos associados ao epitélio, com abreviação em inglês de FAE. Essas estruturas linfóides presentes ao longo do intestino delgado funcionam como sítios indutores da resposta imune intestinal, no qual se encontram linfócitos T e B, e estão diretamente relacionadas ao equilíbrio da mucosa (Macpherson & Harris, 2004). Sobrepostas aos sítios indutores do GALT estão as células M que servem como entrada ou local de comunicação entre o lúmen e a PP.

Além da PP e do FAE, a LP, constituída de tecido conjuntivo, sustenta as células epiteliais e auxilia a resposta imune inata e adquirida, por conter vasos linfáticos que irrigam os sítios linfoides intestinais (Artis, 2008).

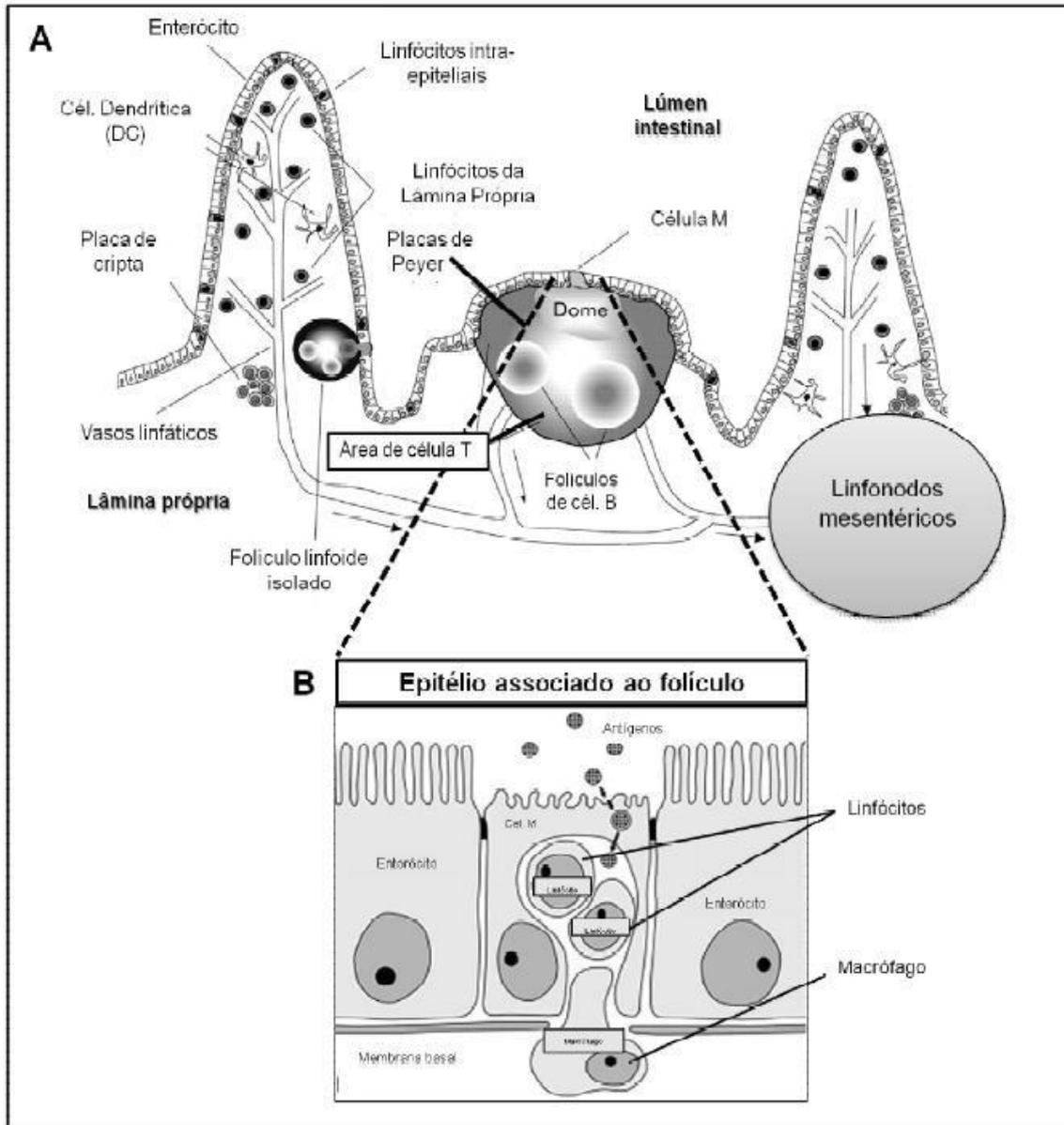


Figura1: Estrutura do tecido linfóide associado ao intestino (GALT): é composto pela monocamada de enterócitos, subjacente as Placas de Peyers, e os folículos linfoides isolados, ambos sustentados pela Lâmina Própria. Ainda no GALT estão contidos os vasos linfáticos e linfonodos mesentéricos que abrigam células do sistema imune como DC, macrófagos e linfócitos T e B. A principal invasão de patógenos acontece através das células M, localizadas entre os enterócitos e acima do GALT (Adaptada de Jepson & Clark, 2001).

Probióticos

A palavra probiótico tem como origem as palavras gregas pro e biotos e significa “para a vida”. A partir da década de 50 as definições para probióticos foram abordadas de forma intensa devido ao aumento dos estudos relacionados a esses micro-organismos (Galdeano & Perdigon, 2004). Contudo somente em 2002 a definição de probióticos se tornou universal, descrevendo-os como organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (WHO, 2002). Desde então essa é a definição mais aceita.

Atualmente existe uma extensa variedade de espécies e gêneros que podem ser considerados potenciais probióticos, entretanto os micro-organismos mais predominantes são as bactérias produtoras do ácido láctico. A maioria das bactérias utilizadas como probióticos são Gram positivas e pertencem aos gêneros *Lactobacillus* (*L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus* *L. paracasei*) *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*.), *Streptococcus* (*S. salivarius* e *S. thermophilus*) e *Lactococcus* (*Lactococcus lactis*). Além disso, algumas linhagens de leveduras (*Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*) tem sido utilizadas como probióticos (Naidu e cols., 1999).

Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (BAL) e estão distribuídos ao longo de todo o intestino delgado. São definidos como bactérias Gram-positivas, catalase negativa, não formadores de esporos, ácido-tolerantes, aerotolerantes e estritamente fermentativos. A principal característica dos *Lactobacillus* é produzir ácido láctico como produto final ao fermentar hidratos de carbono (Tsai e cols., 2012).

Durante os últimos anos, tem aumentado o interesse em pesquisas com relação aos benefícios e mecanismos de ação dos probióticos. Dentre os

benefícios conferidos a saúde do indivíduo pelo mesmo, podem-se destacar a prevenção ou tratamento de doenças inflamatórias intestinais como a colite ulcerativa e doença de Crohn, o tratamento e prevenção de diarreia aguda e prevenção da diarreia dos viajantes (Schultz e cols., 1986).

Os micro-organismos probióticos devem possuir propriedades específicas como resistência ao pH ácido e sais biliares, além disso, devem permanecer viáveis no intestino e conseguir aderir ao epitélio ou ao muco intestinal, além de apresentar atividade antagonista contra patógenos entéricos. Outra importante característica dos probióticos é a sua capacidade de inibir a aderência de patógenos ao lúmen intestinal, aumentando a produção de muco, contendo mucinas e defensinas, que são tóxicas para o patógeno (Bermudez-Brito e cols., 2012; Tuomola e cols., 2001).

Para melhor identificação das características probióticas a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO), em 2002, estabeleceu diretrizes para abordar metodologicamente a avaliação de *Lactobacillus* com capacidades probióticas. Essas diretrizes estipulam, primeiramente, o conhecimento de gênero e espécie da estirpe, feito através da combinação de testes fenotípicos. Outros critérios para estabelecer existência de propriedades probióticas são avaliados através de teste *in vitro* e *in vivo* (FAO/WHO, 2002). Para o teste *in vitro* as culturas de células intestinais como a Caco-2 e HT29-MTX, que representam uma parte da mucosa, são as principais linhagens de enterócitos utilizadas para avaliar algumas funções intestinais e modelos de inflamação. Para confirmação dos efeitos *in vitro*, são realizados testes *in vivo* utilizando modelos de animais compatíveis com as características do estudo (Tuomola e cols., 2001). Ainda de acordo com as diretrizes da FAO/WHO, o teste *in vivo* deve ter os benefícios comprovados em animais, para comparar com testes *in vitro*, e o resultado da eficácia deve ser, ainda, avaliado em humanos, para então verificar a eficácia de probióticos como potencial alimentício ou terapêutico. Nos testes em humanos, são avaliados a proporção de probióticos biologicamente ativos, sinais, sintomas e redução do risco ou melhora na recuperação de doenças (FAO/WHO 2002).

Os probióticos utilizam alguns mecanismos para mediar a manutenção do

equilíbrio intestinal. Dentre os principais mecanismos está a exclusão competitiva de bactérias patogênicas por meio de inibição ou competição por nutrientes e/ou sítios de ligação ao epitélio, modulação da barreira intestinal e modulação do sistema imune (Bron e cols., 2012; van e cols., 2011). Ao competir com outras bactérias, os probióticos exercem efeitos bactericidas de ação direta, ou seja, atacam diretamente o patógeno, ou através da produção de substâncias antibacterianas, que podem agir isoladamente ou em sinergismo para inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Peptídeos antimicrobianos como bacteriocinas, defensinas e mucinas, podem formar poros na membrana de bactérias não resistentes ou podem interferir na atividade de enzimas que são essenciais para a linhagem patogênica. Bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* produzem ácido láctico, acético e propiônico que reduzem o pH intestinal e conseqüentemente inibem o crescimento de bactérias patogênicas como a *Salmonella enteérica* (Vanderpool e cols., 2008).

Além disso, em relação à modulação da barreira epitelial, os probióticos melhoram a disposição dos complexos juncionais, tornando-os mais firmes, a fim de evitar a invasão por patógenos. Tanto a exclusão por inibição ou competição quanto a modulação da barreira epitelial possuem um efeito significativo sobre o sistema imune que, devido à eficiência desses mecanismos, pode levar a produção de citocinas específicas para a indução de diferentes perfis de Linfócitos T (Corthesy e cols., 2007).

Probióticos e o sistema imune

A modulação da resposta imune é um dos mecanismos de atuação dos probióticos, ocorre através da estimulação e modulação do sistema imune do hospedeiro. O GALT, localizado na submucosa intestinal, é responsável por abrigar as células da resposta imune inata e adaptativa que, ao serem ativadas, reconhecem agentes patogênicos, comensais ou probióticos (O'Hara e cols., 2006).

A interação inicial de bactérias comensais, probióticas ou patogênicas com as células da resposta imune acontece com as DCs que são capazes de emitir dendritos entre as junções epiteliais alcançando o microambiente luminal. Durante a inflamação por bactérias patogênicas ou a presença de bactérias comensais ou probióticas, DCs mielóides aumentam a expressão do receptor de quimiocina CX₃CR₁ e essas migram dos folículos linfóides para próximo da camada epitelial. As IECs também garantem a resposta imune inata contra bactérias e podem influenciar na produção de citocinas pelas DCs e conseqüentemente na polarização de subpopulações de linfócitos T helper como Th1, Th2 e Th17 (Cho, 2008).

Outra importante linhagem de DCs, as CD103+, se destaca por induzir linfócitos Treg, uma subpopulação de linfócitos T responsável pela tolerância imunológica, e por estarem envolvidos na resposta imune a bactérias comensais e probióticas. As DCs CD103+ expressam uma desidrogenase responsável pelo metabolismo do ácido retinóico em vitamina A. Esse processo parece ser crucial para converter linfócitos T auxiliares em Treg, através da indução de citocinas, como TGF- β , pelas DCs, constituindo um dos mecanismos propostos para a tolerância imunológica a probióticos durante a resposta imune adaptativa (Foligne e cols., 2007).

Além das células da resposta imune como DCs, macrófagos e linfócitos T e B, as IECs também reconhecem bactérias da microbiota e patógenos entéricos. As IECs também expressam uma variedade de receptores de reconhecimento padrão, abreviado no inglês PRR, que reconhecem padrões moleculares associados à microrganismos, que corresponde à sigla em inglês MAMPs. Os PRRs mais estudados são os receptores Toll-like, abreviado em inglês como TLRs, que compreendem uma família de glicoproteínas transmembranares, localizadas na superfície celular ou na superfície de vesículas como o endossoma. Os TLRs possuem repetições ricas em leucina no seu domínio extracelular apresentando grande diversidade no reconhecimento de ligantes (Trinchieri & Sher, 2007).

Os TLRs também possuem uma porção citoplasmática altamente conservada, também chamada de TIR (receptor toll- IL-1), que interage com

moléculas adaptadoras desenvolvendo a cascata de sinalização. Assim ao reconhecer o ligante, TLR aciona essas proteínas adaptadoras como o fator diferenciador mieloide MyD88, e desencadeia a ativação de fatores transcricionais, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) , de maneira sequencial que leva a indução de diversas citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras como CD86, CD80 e CD40 (Takeda e cols., 2003).

Em mamíferos, os TLRs são formados por 11 subfamílias de receptores, 1 a 11. As células do epitélio intestinal aumentam a expressão desses receptores ao reconhecer MAMPs. O TLR2, por exemplo, é expresso ao interagir com lipopeptídeos bacterianos, ácido lipoteicoico e zymozan. Além disso, atua sinergicamente com os heterodímeros TLR1 e TLR6; TLR4 reconhece LPS de bactérias Gram-negativas e para esse envolvimento é necessário um complexo receptor TLR4 e MD-CD14 que, em condições normais, comensalismo ou intervenção probiótica é baixo, respondendo fracamente ao LPS (Creagh & O'Neill, 2006; Smith e cols., 2001). A flagelina bacteriana é reconhecida por TLR5 e é expressa nas superfícies basolaterais das IECs. Geralmente, a ativação de TLR5 acontece devido a uma invasão ou dano das células epiteliais por bactérias patogênicas (Artis, 2008). TLR 3, no entanto, está envolvido no reconhecimento de RNA viral e TLR9 é estimulado por CpG bacteriano não metilado (Lavelle e cols., 2010).

Além dos TLRs a família de receptores Nod-like, abreviado em inglês de NLRs, também é importante na resposta imune da mucosa intestinal. Os NLRs estão localizados intracelularmente e, estruturalmente, são constituídos por um domínio N-terminal, e com base neste domínio podem ser designadas subfamílias como NOD e NLRP. Os receptores NOD 1 são expressos em tecidos humanos adultos, e NOD 2, expresso em leucócitos, DC e células epiteliais, constituindo sensores intracelulares de peptideoglicano bacteriano. De maneira específica, a expressão de NOD2 em células do epitélio intestinal é aumentada em resposta a estímulos como LPS e IFN-gama e TNF-alfa (Gutierrez e cols., 2002; Rosenstiel e cols., 2003). Estudos comprovam a importância dos receptores NOD2 na produção de α -defensinas, pelas células de Paneth, e conseqüentemente a proteção da mucosa contra bactérias

patogênicas. Além disso, a ausência ou redução de α -defensinas pode acontecer devido a polimorfismos de determinadas regiões de NOD2. Tanto em camundongos como em humanos esse polimorfismo está relacionado com a doença de Crohn, uma inflamação crônica intestinal (Herskovits e cols., 2007).

Coombes e cols., 2007 mostraram que a ativação das DCs da PP produziram níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 o que sugere uma resposta diferenciada em Th2 com relação as DCs do baço. As DCs dos linfonodos mesentéricos, cuja sigla em inglês é MLNs, induziram uma redução considerável da expressão de FOXP3 em células T virgens, visto ainda que as DCs CD103+ isoladas do intestino melhoram a expressão de FOXP3 na presença de TGF- β .

A expressão de moléculas co-estimuladoras também pode ser regulada pela presença de probióticos, contudo essa estimulação ocorre dependente da estirpe do probiótico utilizado. Um estudo utilizando um preparado probiótico VSL#3 mostrou que a estimulação de DC do sangue com o VSL#3 diminuiu a expressão de CD86, no entanto não houve alteração na expressão de CD40 quando avaliado nas mesmas condições (Hart e cols., 2004). Além disso, foi descrito também que determinadas cepas induzem a expressão de CD86 e MHCII em células derivadas de medula óssea de murinos o que resultaria em maturação e ativação de DCs, podendo gerar também melhor apresentação de peptídeos probióticos para células T, induzindo determinado perfil de citocinas (Christensen e cols., 2002).

As bactérias do ácido lático BAL também ativam células NK, envolvidas na defesa contra infecções, ao estimular DC. Geralmente DC apresenta os sinais de maturação, produzem IL-12 e induz NK a produzir IFN- γ (Rizzello e cols., 2011).

De maneira geral, a interação entre um MAMP e o PRR induz cascatas de sinalização que geram uma resposta imune dependente de estímulo de bactérias comensais, probióticas ou contra bactérias patogênicas. Os probióticos podem agir como adjuvante da resposta imune da mucosa estimulando padrões diferentes de citocinas e quimiocinas, no entanto, esse efeito adjuvante é dependente da dose que deve ser de 1×10^8 ou 1×10^9 /dia

(Maassen

e

cols.,

2000)

A tolerância a probióticos, ou seja, quando o sistema imune reconhece componentes de bactérias probióticas como inofensivos ou próprios ao intestino, é observada que a subpopulação de células T CD4+ que responde ao perfil de citocinas produzidas pela estimulação de DCs. Porém, algumas cepas de *L. reuteri* e *L. brevis* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-2, e pouco ou nenhum efeito sobre IL-1 β , IL-10 e IFN- γ (Seegers, 2002). Fuller, 1989 demonstrou também que as bactérias probióticas exercem efeito sobre citocinas como IFN- γ e TNF- α sem, necessariamente, induzir o aumento da resposta imune intestinal, apenas um leve aumento celular. Nesse caso o TNF- α seria necessário para ativar as células da imunidade inata a serem ativadas na LP e as IECs.

As BAL possuem alto poder imunomodulatório, podendo agir sobre as funções das DCs, macrófagos, linfócitos B e induzir a polarização de linfócitos T através da modulação por citocinas e quimiocinas. No epitélio intestinal as BAL atuam modulando principalmente as células e junções da camada epitelial (Kapsenberg, 2003). No epitélio intestinal algumas espécies de *Lactobacillus* conseguem reforçar a barreira epitelial contra bactérias patogênicas, substâncias tóxicas ou estresse. Um exemplo é *L. plantarum* que além de proteger contra patógenos ainda melhora a síntese de junções entre as células epiteliais, evitando invasão dos tecidos linfoides (Mangell e cols., 2002; Yan e cols., 2007).

A maturação de DCs e conseqüentemente toda a resposta gerada da estimulação por *Lactobacillus* pode ser modulada e inclusive com a diminuição da expressão de CD80 e CD40. A modulação e a expressão desses co-estimuladores implica diretamente na produção de citocinas, principalmente IL-12 e IL-10 e na indução de resposta Th1 e Th2 (Fink e cols., 2007; Veckman e cols., 2004). Um exemplo dessa diferenciação é observada através do efeito da linhagem de *L. rhamnosus* GG que mostrou induzir a produção de IFN- γ e a diferenciação em Th1, levando a apoptose, redução da proliferação celular e atenuação da integridade da barreira epitelial. Diante de uma infecção por

patógenos bacterianos, a resposta Th1 seria essencial para a eliminação do patógeno. Em processos inflamatórios, como a colite, a exacerbação da resposta imune causada por Th1 poderia ocasionar dano tecidual devido a constante produção de citocinas pro-inflamatórias (van e cols., 2009; van e cols., 2011).

L. plantarum str. WCFS1 é outro importante exemplo. Quando co-cultivado com células epiteliais induz a produção de IL-12 e TNF- α , servindo como estimulante da resposta inflamatória. Por outro lado o aumento de Treg é observado quando consumido com outras espécies de *L. plantarum* induz o aumento de Treg (Bron e cols., 2012). O isolado WCFS1, quando tem morte induzida por calor, libera componentes como o ácido teicoico, um importante estimulante presente na parede de bactérias gram-positivas, que está relacionado com a produção de IL-6 e IL-10. O mesmo isolado, com bactérias intactas e vivas, no entanto, produziu menos IL-6 e IL-10 (van e cols., 2009).

Efeito adjuvante dos probióticos

A ação de algumas espécies de *Lactobacillus* foi sugerida como adjuvante em um estudo com *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. delbrueckii* e mostrou que, ao ser desafiado com globulina de galinha trinitrofenilada e tratados com espécies de *Lactobacillus*, intraperitonealmente ou administrado via oral, *L. casei* e *L. plantarum* induziram fatores adjuvantes através da reposta imune por linfócitos T (Pouwels e cols., 1996).

Teoricamente, o fato de *Lactobacillus* serem utilizados e bem aceitos como produtos alimentares vem tornando-os candidatos para o desenvolvimento de vacina oral (Seegers, 2002). As BAL possuem características melhores estabelecidas como vetores para vacina oral, um exemplo disso foi mostrado por (Ribeiro e cols., 2002) que ao utilizar a proteína imunogênica L7/L12 de *Brucella abortus* em *Lactococcus lactis* mostrou fatores imunogênicos estratégicos para servir como vetor para vacina contra a brucelose.

Com base na estimulação oral, outro estudo mostrou melhor eficácia de *L. plantarum* em comparação com *L. casei* em expressar o fragmento C da toxina tetânica (TTFC) intracelular, que induziu níveis significativos de anticorpos específicos para TTFC através de administração oral e nasal (Shaw e cols., 2000).

Sinalização purinérgica e modulação da resposta imune.

As células da resposta imune são ativadas sob diversos estímulos. O ATP extracelular é uma molécula que, ao sinal de injúria ou dano tecidual, tem sua concentração aumentada. O nível elevado de ATP no meio extracelular funciona como um mediador inflamatório e portanto induz a produção de citocinas, maturação e ativação de células como macrófagos e DCs. De maneira contrária, o aumento de adenosina, metabólito final da hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), induz uma resposta imune anti-inflamatória. A ação dessas moléculas está relacionada à presença de enzimas localizadas na superfície celular (Haskó e cols., 2013).

Ectonucleotidases são ectoenzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares. Dentre as principais enzimas envolvidas, está a família da trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase ou CD39), que catalisa a hidrólise sequencial do ATP e difosfato de adenosina (ADP), e ecto-5'-nucleotidase (CD73) que hidrolisa o monofosfato de adenosina AMP em seu principal metabólito, a adenosina (Bours e cols., 2006a).

As E-NTPDases necessitam de concentrações milimolares de íons bivalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} para sua atividade, além disso, a principal característica dessas enzimas é a presença de cinco domínios, ACR1 a ACR5, altamente conservados, e envolvidos diretamente na atividade catalítica da enzima. Em mamíferos essa família de enzimas é constituída de 8 grupos, as E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 são encontradas, ligadas na membrana, nas superfícies das células. E-NTPDase 4, 5, 6 e 7 estão localizados intracelularmente, voltados

para o lúmen de organelas citoplasmáticas como o retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Robson e cols., 2005). A nomenclatura dessas enzimas é complexa e envolve também a preferência por substrato, íon bivalente catalisador e até mesmo o produto formado. A NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP de maneira idêntica, enquanto NTPDase 3 e 8 tem preferência pelo ATP como substrato (Kukulski e cols., 2005). NTPDases 1 e 2 são ativadas de forma preferencial por Mg^{2+} , enquanto as NTPDases 3 e 8 tem preferência pelo Ca^{2+} . Tais diferenças entre os subtipos de NTPDase e suas propriedades catalíticas são observadas devido a alterações na sequência primária dessas enzimas e nas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias (Grinthal & Guidotti, 2004).

As respostas mediadas pelo ATP extracelular acontecem através da ativação de receptores purinérgicos P2. Os receptores P2 são subdivididos nas subfamílias P2X, que estão associados a canais iônicos e contem sete subtipos de receptores caracterizados (P2X 1-7), e P2Y receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, com oito subtipos de receptores caracterizados (Burnstock & Knight, 2004). Os receptores P2X respondem primariamente para o ATP extracelular, já os receptores da família P2Y podem ser divididos em grupos específicos. Os receptores P2Y₁ e P2Y₁₁ respondem para purinas, P2Y₄ e P2Y₆ para pirimidinas, o receptor P2Y₂ possui especificidade mista. Já os receptores P2Y₁₂ e P2Y₁₃ respondem somente a ADP, enquanto o receptor P2Y₁₄ reconhece UDP (Bours e cols., 2006a).

O metabólito final da hidrólise do ATP, a adenosina, por sua vez exerce sua ação reguladora através dos receptores P1 que são subdivididos em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Esses receptores de adenosina são membros de família de receptores acoplados à proteína G. Os receptores A₁, A_{2A} e A₃ são ativados por concentrações sub micromolares de inosina extracelular, um produto da degradação da adenosina, enquanto A_{2B} é ativado por níveis micromolares de adenosina (Burnstock, 2007). Os receptores purinérgicos, tanto os P1 como P2, estão presentes em diversas células imunes, epiteliais e endoteliais (Di, 2007).

Nucleotídeos extracelulares modulam variadas funções nos tecidos de mamíferos, incluindo secreções, fluxo sanguíneo, processos inflamatórios e reações imunes. O ATP extracelular, assim como UDP e UTP podem ser liberados em caso do estresse/dano tecidual e celular funcionando como um alerta de perigo para o sistema imune do hospedeiro (Robson e cols., 2005). Normalmente as concentrações de ATP extracelular, no plasma, não ultrapassam quantidades submolares, entretanto, o aumento dessa concentração pode desencadear processos como o aumento da quimiotaxia por neutrófilos, através da produção autócrina de ATP, induzir a produção de IL-8 e IL-1 β durante a resposta imune inata. O aumento de ATP extracelular também exerce forte efeito sobre células da resposta imune adaptativa e desencadeia a liberação citocinas como IL-12 e IFN- γ , via receptores P2. Além disso, especificamente receptores P2X7, aumentam a produção de TNF- α por monócitos e macrófagos. O aumento dessas citocinas inflamatórias por P2X7 também regula negativamente a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 e receptores como P2Y2 (Bours e cols., 2006b; Xiang e cols., 2013).

Durante a resposta imune inata o ATP extracelular também é um estímulo para ativação de NLRP3 por DCs e macrófagos durante lesão das células epiteliais do intestino. NLRP3 é ativado pela estimulação de TLR, via MyD88 e leva a produção de IL-1 β e IL-18, por via dependente de receptores P2X7. Esse mecanismo resultaria na indução de células Th17 e inflamação intestinal (Lavelle e cols., 2010). Já se sabe também que o ATP extracelular induz a regulação positiva de moléculas co-estimulatórias como CD80, importante também para a maturação de DC, esse processo é essencial para a polarização de células Th1, Th2 ou Th17 durante a resposta imune adaptativa no intestino (Yao e cols., 2012).

No intestino, uma maneira pela qual IECs respondem a patógenos entéricos pelo reconhecimento de sinais específicos como o ATP extracelular. Curiosamente o ATP extracelular também é produzido por bactérias comensais em consequência de inflamação intestinal (Yao e cols., 2012). A expressão de CD39 está associada com resposta reguladora intestinal, por células T reg, aumentando a expressão de CD25 e FOXP3. A redução da expressão de

CD39, contudo, está relacionada com o aumento de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-23, responsáveis pela diferenciação de linfócitos Th17 que por sua vez, está relacionado à inflamação intestinal (Doherty e cols., 2012).

A hidrólise do AMP em adenosina é catalizada pela CD73, e a sinalização por adenosina é feita através dos receptores P1. De modo geral, a expressão e função de CD73 podem ser reguladas pela presença de citocinas como TGF- β , IFN- γ , TNF- α e IL-1 β durante o processo inflamatório. Com relação à Th 17, o principal perfil de células T envolvidas na resposta imune intestinal, a expressão de CD39 e CD73 é regulada por IL-6 e TGF- β , citocinas responsáveis pela diferenciação de Th17. A IL-6 juntamente com TGF- β são considerados essenciais para o aumento da expressão de ectonucleotidases durante a inflamação intestinal (Antonioli e cols., 2013).

O ATP extracelular possui um forte efeito sobre a maturação e ativação de DCs. O acúmulo de ATP no meio extracelular modula a atividade das células imunes, exercendo um efeito sinérgico e aumentando a liberação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β e IL-8. A produção dessas citocinas ativa, além de células polimorfonucleares, as DCs e conseqüente a maturação destas devido ao aumento da expressão de CD86, CD80 e MHCII. O ATP, quando não hidrolisado por ectonucleotidases, direciona a produção de citocinas para um perfil inflamatório de Linfócitos T como Th1 e Th17. A hidrólise elevada e a conseqüente produção de adenosina inibe a ativação de DCs, bem como a produção de citocinas inflamatórias, induzindo, portanto, a polarização de um perfil antiinflamatório como Th2 (Di, 2007; Lavelle e cols., 2010).

Justificativa

Sabe-se da importância de probióticos para a o equilíbrio intestinal e se tem conhecimento sobre alguns dos mecanismos pelos quais esses micro-organismos modulam o sistema imune do intestino. Diversos trabalhos já elucidaram alguns desses mecanismos, e de maneira quase unânime, se sabe que os probióticos agem sobre as diversas células do sistema imune. Contudo, o conhecimento de como essas células auxilia na resposta imune a patógenos e de quais as linhagens de probióticos possuem melhores efeitos sobre determinadas patologias ainda é escasso.

A constante exposição do lúmen intestinal a patógenos entéricos pode desencadear processos inflamatórios. Sabe-se que o ATP extracelular encontra-se aumentado nesses processos inflamatórios e que os probióticos desencadeiam mecanismos que podem modular essa inflamação. Contudo é necessário avaliar a presença e a capacidade de enzimas que hidrolisam o ATP em moléculas como a adenosina, que diminui a inflamação, em probióticos.

O estudo é importante por servir como base inicial para o entendimento de como o processo inflamatório pode ser desencadeado através de uma estreita relação com a produção de ATP.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Correlacionar a atividade ectonucleotidásica de *Lactobacillus* com a capacidade de ativação de DCs e a produção de citocinas.

Objetivos Específicos

Avaliar as diferentes atividades ectonucleotidásicas de sete linhagens de *Lactobacillus*;

Avaliar o efeito dos isolados sobre a ativação de células dendríticas:

-Expressão de CD86, MHCII e CD40:

-Produção de citocinas como IL12, IL-10, IL-6 e TGF- β

Correlacionar a atividade ectonucleotidásica do probiótico com a expressão dessas moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas pela DCs estimulada.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Camundongos das linhagens C57BL/6J de 2 a 4 meses de idade foram obtidos e mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, onde receberam água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Câmara de Experimentação Animal do Comitê de Ética em Pesquisa, dessa mesma instituição, pelo Ofício CEP nº 36/2013, de 16 de janeiro de 2009, como comprovado pelo documento em anexo.

Lactobacillus

As linhagens bacterianas foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Elisabeth Neumann do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG. Todas foram isoladas de grãos de kefir provenientes de diferentes regiões do Brasil e estão sendo caracterizadas quanto ao potencial probiótico

Para melhor compreensão dos resultados, resolvemos apresentar as siglas dos isolados, cuja identificação pode ser observada no quadro a seguir.

Isolados	Identificação dos isolados
L.10	<i>L. mali</i> (água)
L.11	<i>L. mali</i> (leite)
L.14	<i>L. casei</i>
L.27	<i>L. parafarraginis</i>
L.36	<i>L. acidophilus</i>
L.43	<i>L. satsumensis</i>
L.46	<i>L. perolens</i>

Os isolados pertencem às espécies *L. mali*, *L. casei*, *L. parafarraginis*, *L. acidophilus*, *L. satsumensis* e *L. perolens*. As bactérias foram mantidas a -80°C em caldo MRS (De Man, Rogosa Sharp, Acumedia), adicionado de 30% de glicerol a 80% (v/v) esterilizado. Para todos os testes *in vitro* de caracterização

probiótica, as culturas foram previamente ativadas em caldo MRS, a 37°C durante 24-48 horas. Para a avaliação do crescimento e contagem bacteriana foram realizadas diluições sucessivas das culturas ativas em salina 0,9% estéril, seguindo-se plaqueamento de 1 mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em placas de ágar MRS para contagem de isolados de *Lactobacillus* pela técnica de *pour plate*. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 48h em anaerobiose, e então foi realizada a contagem das colônias. O crescimento bacteriano foi expresso em UFC/mL de cultura. Todos os experimentos foram feitos com linhagens intactas e vivas.

Dosagem da atividade ectonucleotidásica de probióticos

As atividades de hidrólise de ATP, ADP e AMP foram medidas pela incubação de 1×10^7 (UFC) intactas por 1 hora a 30°C em tampão de reação (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, D-glicose 5,5 mM, MgCl₂ 5 mM e tampão HEPES-tris 50 mM, pH 7,2), na presença de ATP, ADP ou AMP (Sigma- Aldrich) 5mM. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,2N. As suspensões foram centrifugadas e alíquotas dos sobrenadantes foram usadas para a quantificação do Pi liberado adicionando-se 1/3 do volume do sobrenadante de uma mistura contendo 1 parte de molibdato de amônio 10% diluído em HCl 4M para 3 partes de verde de malaquita 0,2% também diluído em HCl 4M.

Foi feita uma curva padrão utilizando diluições seriadas de soluções de Na₃PO₄, na qual mostrou a melhor interpolação dos valores de absorbância encontrados para as amostras. A quantificação do Pi liberado foi feita após 10 minutos de incubação, a 25°C, por espectrofotometria sob comprimento de onda de 650 nm (Ekman & Jager, 1993). Por fim, a atividade enzimática, indiretamente determinada pela quantidade de Pi liberado, foi calculada pela subtração da hidrólise não específica e ajustada para valores gerados por 10^7 ufc/hora.

Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea

Células dendríticas foram diferenciadas a partir de células da medula óssea, como previamente descrito (Lutz e cols., 1999). Retiraram-se fêmures e tíbias de camundongo C57BL/6J e imergiram-se os ossos em álcool 70°GL por 2 minutos, seguidos por imersão em PBS, pH 7,2. Cortaram-se as duas epífises e injetaram-se, pelas extremidades, 5 mL de PBS/5% SFB, pH 7,2. A suspensão de células foi centrifugada a 210 x g/ 4°C / 10 minutos e as células foram ressuspendidas em meio RPMI-1640 (Sigma- Aldrich) suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL e β-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia) 50 μM, pH 7,2. As células foram plaqueadas em placas de Petri a uma concentração de 3x10⁶ células/mL, e incubadas a 37°C / 5% CO₂. O fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF- R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foi adicionado a cada placa nos dias 0, 3 e 6, a uma concentração de 3 ng/mL (1050 U/mL). Células não aderentes foram coletadas no 9º dia de cultura. A população de células dendríticas foi caracterizada pela expressão dos marcadores de superfície CD11c, CD11b, CD40, CD86, MHCII e F4/80.

Estimulação de células dendríticas com Probióticos

As bactérias probióticas e células dendríticas foram co-cultivadas em tubos de polipropileno, numa proporção de 10 bactérias por célula dendrítica, (10:1) a 37°C / 5% CO₂, por 20 horas. As células dendríticas estimuladas foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade de células dendríticas foi avaliada por coloração com azul de Trypan. Suspensões de células foram diluídas em igual volume de azul de

Trypan (Sigma-Aldrich) 0,4% e as células contadas em câmara de Neubauer. Fez-se a contagem diferencial das células vivas (íntegras e não coradas) e das células mortas (permeabilizadas e coradas em azul). Por fim, calculou-se a porcentagem de células viáveis. As células foram analisadas por citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

Células a uma concentração de 10^5 células/mL, em PBS / 1% albumina sérica bovina (BSA), pH 7,2, foram submetidas ao bloqueio do receptor para Fc γ na presença do anticorpo anti-CD16/CD32 de camundongo (produzido em nosso laboratório), a $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células, por 5 minutos. Foram retirados 25 μL da suspensão de células e incubados com a combinação dos anticorpos de interesse a 4°C, por 30 minutos, ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD11c (APC ou PE-Cy7, clone HL3, a $2 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-CD40 (APC, clone 3/23, a $0,6 \mu\text{g}/10^6$ células – BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), anti-CD11b (FITC, clone M1/70, a $0,04 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-MHCII (APC, clone M5 114.15.2, a $0,06 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-CD86 (PE, clone GL1, a $0,12 \mu\text{g}/10^6$ células), anti-F4/80 (PE-Cy7, clone BM8, a $0,096 \mu\text{g}/10^6$ células – BioLegend, San Diego, CA, EUA), e seus respectivos controles de isotipo. As suspensões foram centrifugadas e as células lavadas com PBS, pH 7,2 e ressuspendidas em uma solução de 1% de paraformaldeído, cacodilato de sódio 47,7 mM e NaCl 113 mM, pH 7,2. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. A aquisição de células foi realizada com o auxílio do programa BD CellQuest™ Pro. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

Quantificação de citocinas por ELISA

A quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura foi feita por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Foram utilizados kits da linha BD

OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) para dosagem das citocinas IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- α , de acordo com orientações do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura *overnight*, a 4°C. Em seguida, foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e secas em papel toalha. Feito isso, adicionaram-se o padrão e as amostras, e seguiu-se incubação à temperatura ambiente, por duas horas. As placas foram lavadas e os poços receberam o reagente de detecção, contendo o anticorpo de detecção e o reagente enzimático seguido de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após a incubação foi adicionado a reação com tampão citrato fosfato, ABTS e Peróxido de hidrogênio e seguiu-se de trinta minutos de incubação à 37°C, ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 3 mol/L. Procedeu-se à leitura fotométrica a 415nm, utilizando o leitor Spectra max e o *software* SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Foram analisados por ANOVA ou pelo teste *t* de student, de acordo com as características de cada experimento, utilizando-se o *software* GraphPad Prism versão 5.0.3 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

1. Linhagens Diferentes possuem diferentes capacidades de hidrolisar nucleotídeos.

A fim de avaliar a capacidade dos probióticos de hidrolisarem nucleotídeos, os isolados foram incubados com ATP, ADP e AMP, na concentração de 10^7 UFC/mL, por 1 hora a 30° C. Após a incubação foi retirada uma alíquota do sobrenadante e o Pi liberado foi avaliado através da reação com o conjugado de verde malaquita com molibdato de amônio. A concentração de UFC/ mL foi obtida através da contagem em meio Agar MRS. Primeiramente mostramos a atividade ectonucleotidásica diferenciada de todos os lactobacilos com relação a ATP, ADP e AMP (Fig. 2). A hidrólise de ATP foi observada em todos os isolados, curiosamente, apenas o isolado L.10 mostrou hidrólise para ADP e AMP.

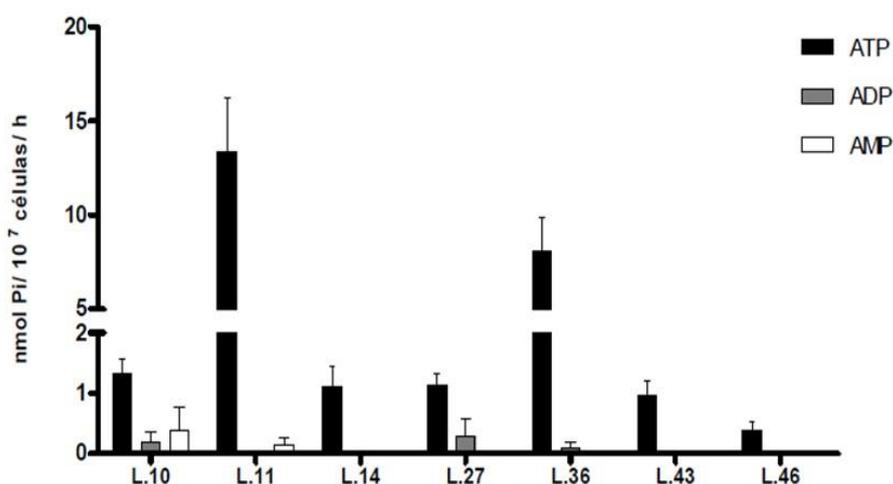


Fig. 2: Linhagens possuem capacidade diferente de hidrólise de ATP. Os lactobacilos foram ativados em caldo MRS por 18h a 37° C. Os isolados foram incubados com ATP, ADP ou AMP por 1 hora. A atividade enzimática foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado através da reação com verde malaquita. A leitura foi feita em 650 nm. Os experimentos representam média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Devido o fato de todas as cepas hidrolisarem ATP, mas não ADP e AMP, concentramos nossos resultados na hidrólise desse nucleotídeo. As linhagens 11 e 36 apresentaram capacidade de hidrólise do ATP significativamente maior que as demais linhagens (Fig. 3).

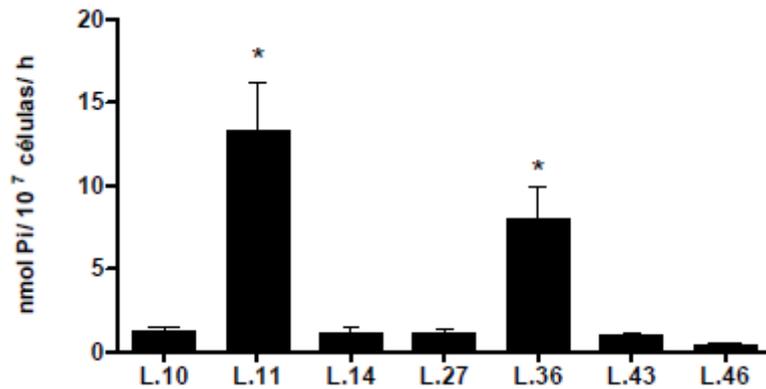


Fig. 3: *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36 tem maior capacidade de hidrólise de ATP. Os lactobacilos foram ativados em caldo MRS por 18h a 37°C. Os isolados foram incubados com ATP, ADP ou AMP por 1 hora. A atividade enzimática foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado através da reação com verde malaquita. A leitura foi feita em 650 nm. Os experimentos representam média e desvio padrão de três experimentos independentes * p<0.0001 ANOVA em relação aos demais grupos.

Com base na maior capacidade de hidrólise do ATP e para melhor entendimento dos dados, preconizamos que as linhagens L.11 e L.36 seriam os isolados com atividade e as demais linhagens sem atividade ectonucleotidásica. Para avaliar a diferença de hidrólise, agrupamos os experimentos contendo os isolados com atividade e sem atividade. Desta forma o grupo com atividade apresentou hidrólise de ATP significativamente maior que o grupo sem atividade (Fig. 4).



Fig. 4: *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36 agrupados mostraram maior hidrólise de ATP. Os lactobacilos foram ativados em caldo MRS por 18h a 37°C. Os isolados foram incubados com ATP, ADP ou AMP por 1 hora. A atividade enzimática foi avaliada pela quantidade de fosfato inorgânico liberado através da reação com verde malaquita. A leitura foi feita em 650 nm. Os experimentos foram agrupados da seguinte maneira: L11 e L36 (com atividade), L.10, L14, L.27, L43 e L46 (sem atividade). Os experimentos representam média e desvio padrão de tres experimentos independentes * p<0.01 teste t em relação ao agrupado sem atividade.

2. Linhagens de *Lactobacillus* não alteram a expressão de CD40, CD86 e MHCII em DCs derivadas de medula óssea.

A fim de verificar a expressão das moléculas co-estimuladoras CD86, MHCII e CD40, importantes para a ativação e maturação de DCs, DCs derivadas da medula óssea, foram estimuladas com lactobacilos vivos e intactos, por 20 horas, na proporção de dez UFC para uma DC (10:1) e receberam as devidas marcações após esse período. Testes foram realizados (não mostrados) para avaliar a sobrevivência dos isolados no meio RPMI com e sem penicilina, a fim de verificar possível morte ou crescimento atípico frente ao antibiótico. Foi observado que a penicilina, na condição usada, não alterava a viabilidade dos isolados. Quanto aos resultados, não houve nenhuma diferença na porcentagem de CD86+MHCII+ em DCs estimuladas e não estimuladas (Fig. 5A) e quando agrupado em função da atividade ectonucleotidásica, também não se verificou diferença estatística entre os grupos com e sem atividade (Fig. 5B).

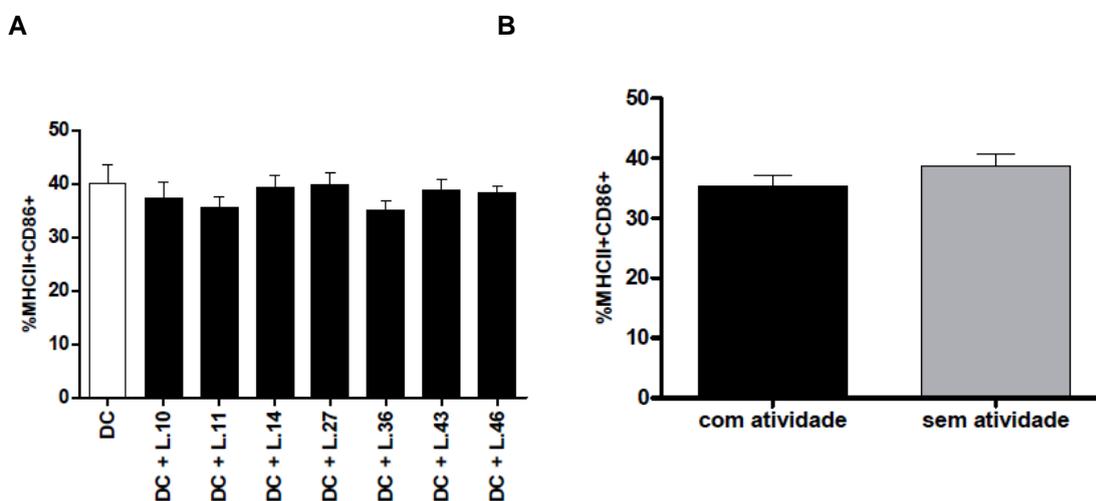


Fig. 5: A estimulação de DCs com *Lactobacillus* não altera a porcentagem de MHCII+ CD86+. As DCs foram estimuladas com lactobacilos (1×10^7 UFC/ mL), por 20 horas. A marcação das DCs estimuladas foi avaliada através de citometria de fluxo. **(A)** %MHCII+CD86+ referente a cada linhagem probiótica. **(B)** %MHCII+CD86+ referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes

Além da porcentagem de células que expressavam MHCII e CD86 também avaliamos a intensidade média de fluorescência (MFI) de CD86 e MHCII (Fig.6 A e B) e (Fig. 7 A e B). Também não foi encontrada diferença significativa entre as DCs estimuladas com cada linhagem e não estimuladas. Mesmo ao agruparmos os isolados em função da atividade ectonucleotidásica, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre eles.

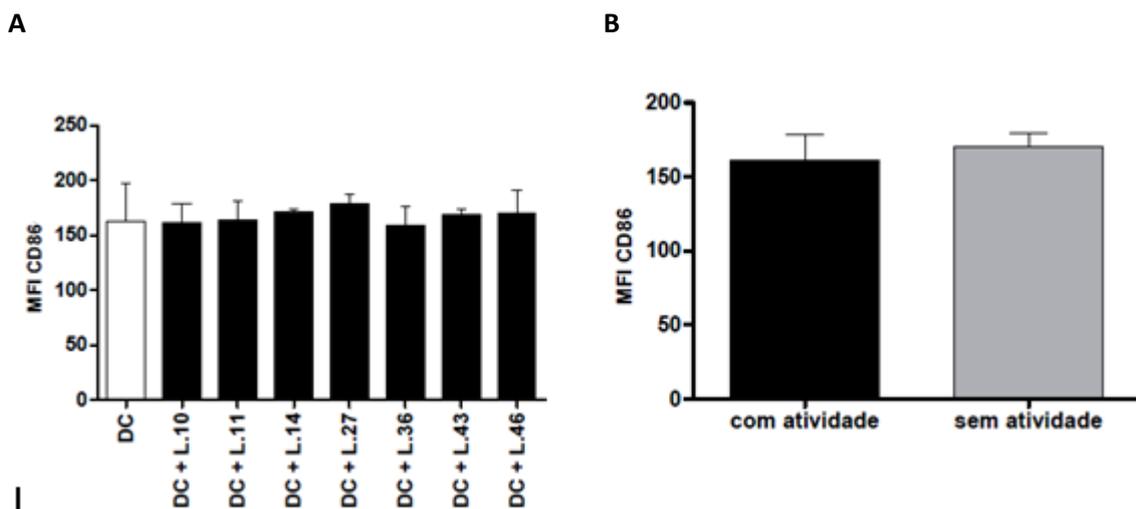


Fig. 6: A estimulação de DCs com *Lactobacillus* não altera a expressão de CD86+. As DCs foram estimuladas com probióticos 1×10^7 UFC/mL por 20 horas. A marcação das DCs estimuladas foi avaliada através da citometria de fluxo. **(A)** MFI MHCII+ referente a cada linhagem probiótica. **(B)** MFI MHCII+ referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes.

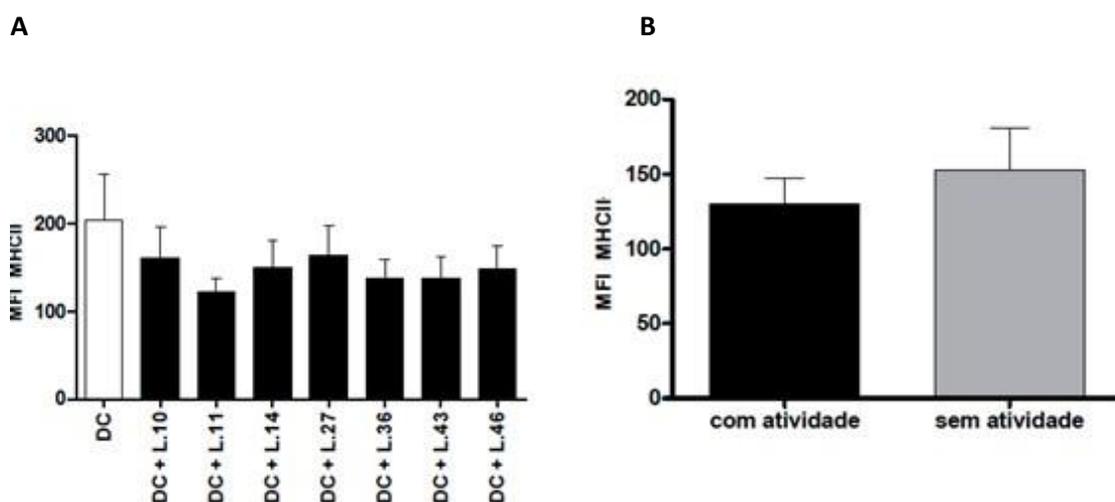


Fig. 7: A estimulação de DCs com *Lactobacillus* não altera a expressão de MHCII. As DCs foram estimuladas com probióticos 1×10^7 UFC/mL por 20 horas. A marcação das DCs estimuladas foi avaliada através da citometria de fluxo. **(A)** MFI CD86+ referente a cada linhagem probiótica. **(B)** MFI CD86+ referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes.

A expressão de CD40 também foi avaliada e conforme demonstrado (Fig. 8 A e B) não houve diferença significativa entre as linhagens ou quando agrupados os resultados de linhagens com e sem atividade.

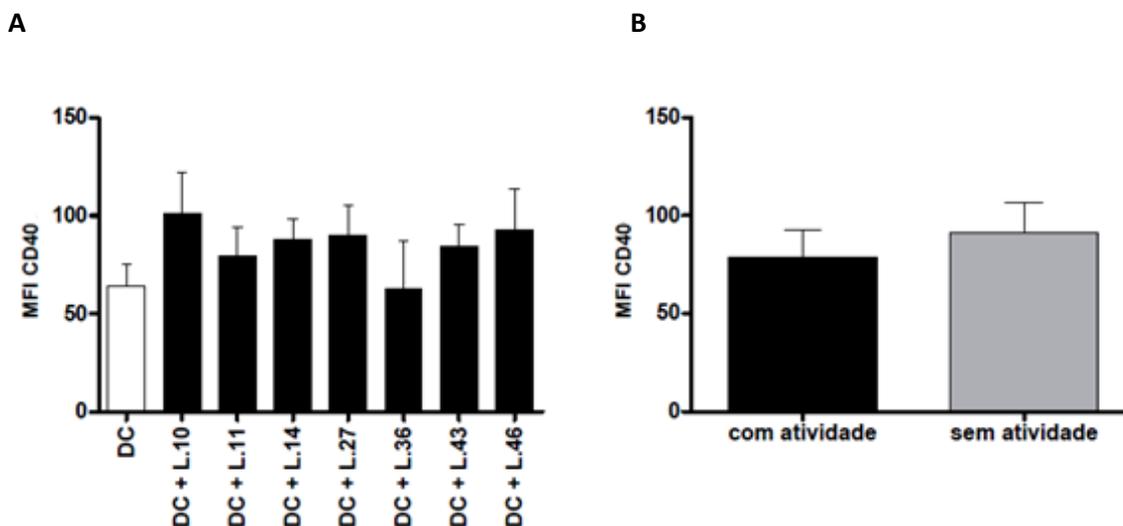


Fig. 8: A estimulação de DCs com *Lactobacillus* não altera e a expressão de CD40: As DCs foram estimuladas com probióticos 1×10^7 UFC/mL por 20 horas. A marcação das DCs estimuladas foi avaliada através da citometria de fluxo. **(A)** MFIC D40+ referente a cada linhagem probiótica. **(B)** MFI CD40+ referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes.

3. A estimulação de DCs derivadas de medula óssea com *Lactobacillus* aumenta a produção de citocinas como IL6, TNF- α , IL12 e IL-10 dependente de linhagem.

A produção de citocinas pelas DCs direciona a resposta imune a induzir a polarização de subpopulações de Linfócito T auxiliar, em Th1, Th2, Th17 ou Treg. A fim de verificar a capacidade dos lactobacilos induzirem a produção de determinadas citocinas, foram recolhidos os sobrenadantes da estimulação de DCs com as diferentes linhagens probióticas após 20 horas, e então foi avaliada a produção de IL-12, IL-10, IL-6 e TNF- α .

A estimulação de DCs com as diferentes linhagens aumentou a produção de IL-6, quando comparado às DCs não estimuladas. Contudo, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os as linhagens (Fig. 9 A). Também não foi observada diferença quanto à produção de IL-6 entre os grupos com e sem atividade (Fig. 9 B).

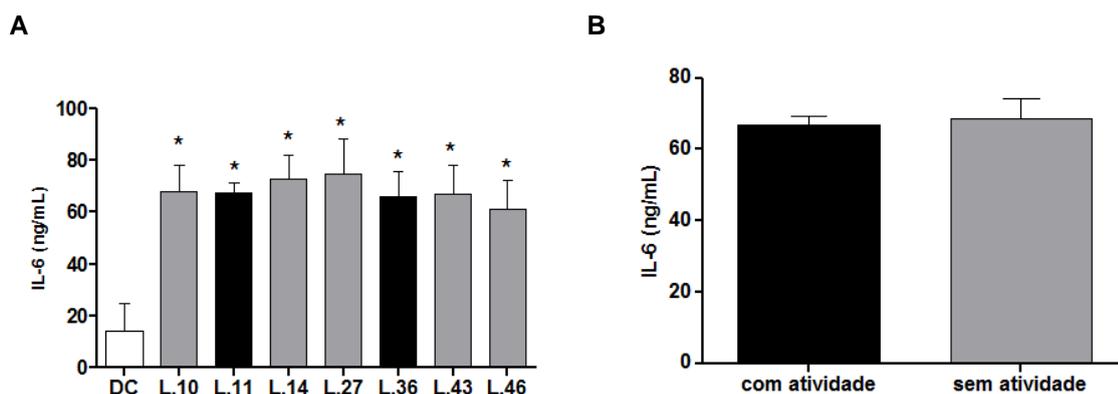


Fig. 9: Produção de IL-6 induzida por *Lactobacillus*. A dosagem da citocinas nos sobrenadantes das DCs estimuladas com probióticos por 20 horas foi realizada por ELISA. (A) Concentração de IL-6 referente a cada linhagem. (B) Concentração de IL-6 referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$ ANOVA em relação a DC.

Os resultados para TNF- α foram semelhantes a IL-6 quando foi verificado o aumento significativo das DCs estimuladas com cada linhagem em comparação com as DCs não estimuladas (Fig. 10 A). Quanto aos grupos com e sem atividade, também não foi verificado diferença significativa (Fig. 10 B).

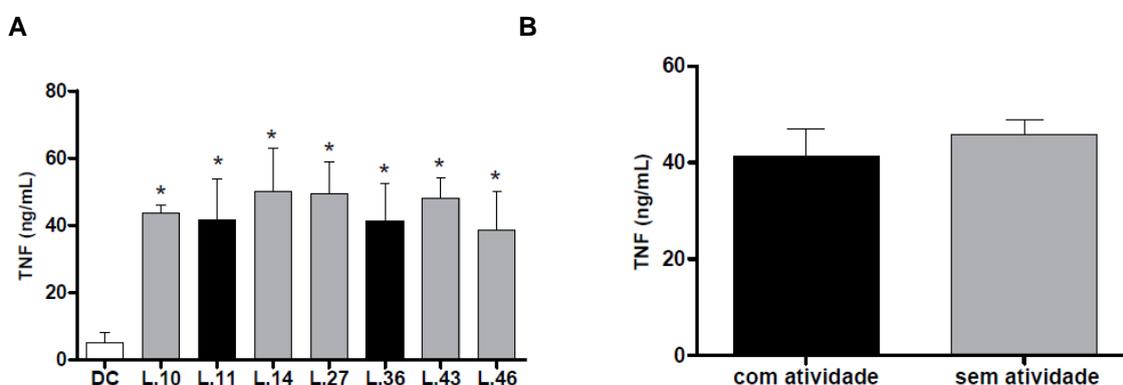


Fig. 10: Produção de TNF- α induzida por *Lactobacillus*. A dosagem da citocinas nos sobrenadantes das DCs estimuladas com probióticos por 20 horas foi realizada por ELISA. (A) Concentração de TNF- α

referente a cada linhagem. (B) Concentração de **TNF- α** referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$ ANOVA em relação a DC.

Quanto à produção de IL-12 os resultados evidenciam o aumento significativo quando as DCs foram estimuladas pela linhagem *L. mali* L.10 tanto com relação ao controle de DCs não estimuladas, como em relação aos demais isolados. Além disso, as linhagens com atividade, *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36, mostraram valores significativamente menores de IL-12 quando comparado a *L. mali* L.10 (Fig. 11 A). Quando agrupamos os resultados de linhagens das com e sem atividade também foi observado redução significativa de IL-12 no grupo com atividade (Fig. 11 B).

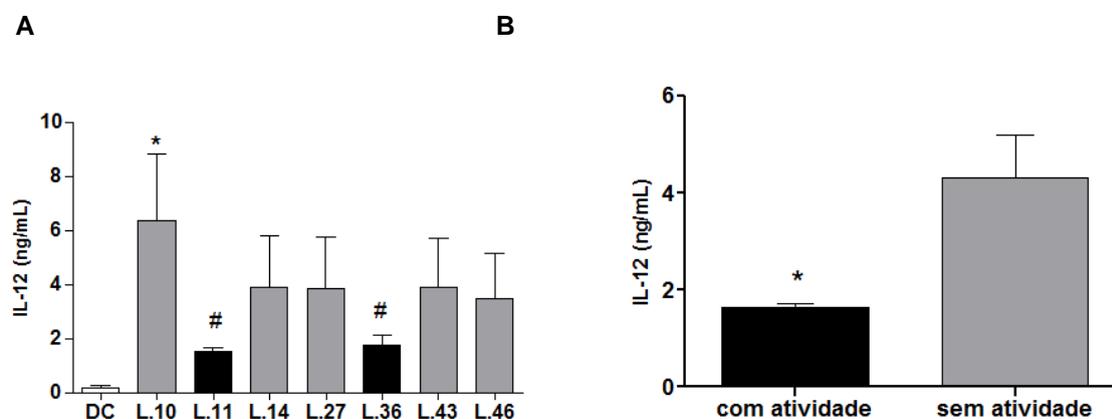


Fig. 11: *Lactobacillus* com maior capacidade ectonucleotidásica induziram menor produção de IL-12: A dosagem da citocinas nos sobrenadantes das DCs estimuladas com probióticos por 20 horas foi realizada por ELISA. (A) Concentração de **IL-12** referente a cada linhagem. (B) Concentração de **IL-12** referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$ ANOVA em relação a DC.

A produção de IL-10 também se mostrou significativamente aumentada em relação a DC não estimulada, exceto para as linhagens *L. mali* L.10 e *L. perolens* L.46. Neste ponto, é possível se notar uma provável correlação entre atividade ectonucleotidásica e citocinas produzidas pelas DCs. Os isolados *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36, ambos com alta capacidade ectonucleotidásica, induziram a produção dos menores níveis de IL-12 e, coerentemente, *L. mali* L.10, que apresentou baixa capacidade de hidrolisar ATP, foi capaz de aumentar a produção de IL-12. Com relação a IL-10, as cepas *L. mali* L.11 e *L. acidophilus* L.36 apresentaram valores significativamente maiores que o

encontrado em DCs não estimuladas; no entanto, o estímulo com *L. mali* L.10 não induziu um aumento estatisticamente significativo da produção dessa citocina, quando comparado às DCs não estimuladas.

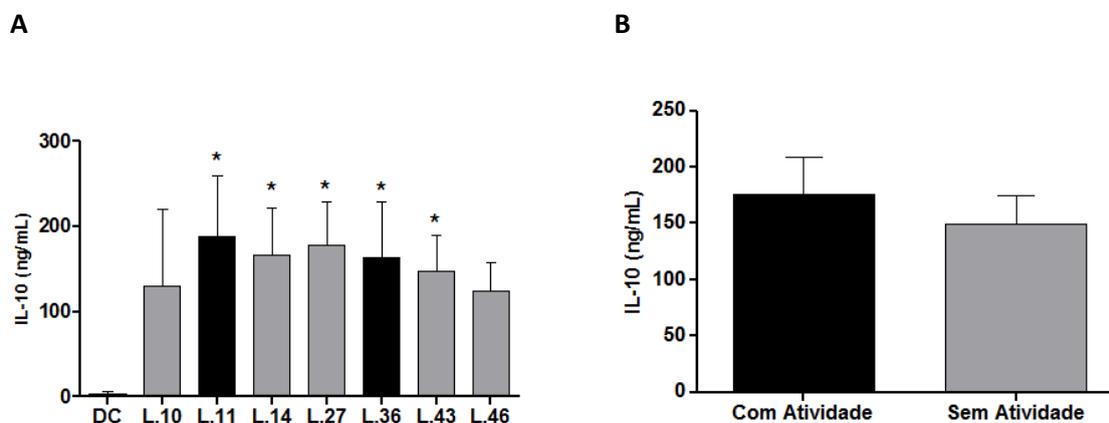


Fig. 12: *Lactobacillus* induziram a produção de IL-10: A dosagem da citocinas nos sobrenadantes das DCs estimuladas com probióticos por 20 horas foi realizada por ELISA. (A) Concentração de **IL-10** referente a cada linhagem. (B) Concentração de **IL-10** referente aos resultados agrupados de linhagens com e sem atividade. Os experimentos representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$ ANOVA em relação a DC.

DISCUSSÃO

O conteúdo probiótico intestinal interfere diretamente no equilíbrio luminal. Essas bactérias conseguem reverter algumas patologias como síndrome do intestino irritável, inflamações intestinais e diarreia (Belkaid & Hand, 2014). O aumento ATP extracelular liberado nestas condições regula a resposta imune inflamatória. No caso de infecção por invasão patogênica o ATP pode melhorar a resposta imune contra o invasor e, por sua vez, eliminá-lo. A hidrólise de ATP em adenosina, por meio de ectonucleotidases presentes nesses patógenos, pode direcionar uma resposta anti-inflamatória e com isso servir como mecanismos de escape do sistema imune (Thammavongsa e cols., 2009).

Sabe-se que as ectonucleotidases são encontradas em diversos organismos eucariotos. Dentre os organismos que expressam essas enzimas estão os protozoários, como *Leishmania (L.) amazonensis* (Marques-da-Silva e cols., 2008), *Toxoplasma gondii* (Asai e cols., 1995). *Trypanosoma cruzi* (Meyer-Fernandes e cols., 2004) e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* (Thammavongsa e cols., 2009). O nosso trabalho propôs estudar se probióticos também possuem ectonucleotidases e se essas enzimas estariam envolvidas na modulação da resposta imune através da produção de citocinas pelas DCs.

Nossos dados confirmam a capacidade de *Lactobacillus* de hidrolisarem nucleotídeos. Foi possível observar uma diferente capacidade de hidrólise entre os 7 isolados, entretanto, os isolados L.11 e L.36 mostraram a maior capacidade de hidrolisar o ATP. Quanto à hidrólise em ADP e AMP foi observada somente no isolado 10. Curiosamente, já foi mostrado que o probiótico L.36 (*L. acidophilus*) induziu perfil Th17 e foi capaz de colonizar o intestino em animais gnotobióticos, contudo, em relação às citocinas, não foi observado efeito imunomodulador em animais convencionais quando desafiados com *Salmonella*. A ausência de bactérias colonizando o intestino em animais gnotobióticos e em consequência disso, a falta de estimulação da resposta imune e a falha da tolerância imunológica, podem ser os principais

fatores para induzir a inflamação intestinal através de linfócitos Th17 (Silva, 2012).

É importante ressaltar que intestino delgado possui um ambiente ideal para o desenvolvimento da resposta imune intestinal e que as DCs intestinais iniciam a resposta imune ao serem ativadas e expressarem moléculas co-estimuladoras. Após isso, ocorre a polarização de subpopulações de linfócitos T CD4+ através da produção de citocinas específicas pela DCs, que direcionam a resposta pró e anti-inflamatória. Evidentemente, as DCs intestinais precisam de determinados estímulos para sua maturação e ativação da função de apresentadora de antígeno profissional. Ao avaliarmos a relação entre a capacidade ectonucleotidásica dos probióticos com a estimulação de CD86, MHCII e CD40 os resultados não mostraram alterações na expressão desses marcadores. Mesmo os probióticos que mostraram alta capacidade de hidrólise mostraram expressão semelhante aos sem atividades. O estado não alterado da expressão dessas moléculas não está diretamente relacionado com a ausência ou baixa produção de citocinas.

Diversos estudos mostraram a modulação de MHCII e moléculas co-estimuladoras por diferentes isolados, como por exemplo: isolados de *L. reuteri* DSM12246 e *L. casei* subsp. *alactus* CHCC3137, foi diferente em relação as DCs não estimuladas, percebendo o aumento da percentagem de CD86 e MHCII. Contudo não foi avaliada a expressão de CD40. Ainda com relação a CD40 Foligne e cols. 2007, estudaram DC derivadas de medula óssea em estimulação por 5 cepas probióticas, e demonstraram que apenas *L. salivarius* foi capaz de reduzir a expressão dessa molécula com relação ao controle, diferente disso outros probióticos como *L. acidophilus* e *E. coli* mostraram expressão de CD40 maior que 80%, o que pode ser devido a características da própria cepa, visto que a ativação de DCs foi semelhante para todas as cepas do estudo.

Yao e cols., 2012, ao relatarem ao aumento do ATP e seu efeito nas IECs para o desenvolvimento de inflamação intestinal, destaca que na presença de ATP e agonista TLR1/2, a MFI de CD80 e MHCII aumentou consideravelmente em DCs derivadas de medula óssea. O aumento de ATP no lúmen intestinal,

pode ser por fatores como estresse, dano tecidual, referente a bactérias patogênicas, vírus ou fungos, e até mesmo por bactérias comensais. O reconhecimento desses patógenos por TLR induz a produção de citocinas inflamatórias dependente de receptores purinérgicos como P2X7, preferencialmente expressos em IECs.

A principal modulação da resposta imune, na presença de *Lactobacillus*, é feita através da produção de determinadas citocinas. Essas citocinas tem a capacidade de induzir respostas direcionadas a Th1, Th2, T reg e, no intestino, Th17 (Brown e cols., 2013). Um fator crítico que auxilia no mecanismo de polarização desses Linfócitos T é a presença de ATP extracelular, servindo, portanto, como uma molécula importante para a resposta inflamatória do hospedeiro (Burnstock, 2011).

A correlação entre a hidrólise de ATP e a produção de citocinas foi observada principalmente com relação a IL-10 e IL-12. O isolado L.10 apresentou baixa hidrólise de ATP, e conseqüentemente foi o que mais produziu IL-12, entretanto, quando observamos as linhagens L.11 e L.36, ambas com a maior liberação de Pi, a partir de ATP, observamos a redução de IL-12. Quando agrupados com e sem atividades, foi possível confirmar a menor produção de IL-12 pelo grupo com atividade. Tal achado confirma com a ideia inicial do nosso trabalho justificando que o acúmulo de ATP está relacionado com a indução de citocinas inflamatórias, ou seja, no caso, a produção de IL-12. Contudo a hidrólise do ATP, está relacionada a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10.

Nossos dados também mostram um aumento significativo de IL-10 em cinco das sete linhagens, L.10 e L.46 não foi verificado aumento, a produção em relação DCs não estimuladas. O fato de L.10 e L.46 apresentarem baixa capacidade de hidrólise de ATP e conseqüentemente baixa produção de ATP sugere que a hidrólise do ATP é importante para direcionar a resposta imune. O aumento de IL-10 em L.11 e L.36 é um forte indício de que a hidrólise de ATP pode ser fundamental para a resposta imune anti-inflamatória.

É importante ressaltar que o ATP extracelular pode induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β através da ativação de receptores P2,

além disso, induz a maturação e ativa DCs a produzir de IL-12 direcionando para uma resposta Th1 (Sansom e cols., 2008). O perfil de linfócitos Th1 é mais eficaz durante a invasão de bactérias patogênicas devido a produção de IFN- γ . A produção IFN- γ estimula células fagocíticas como macrófagos que auxiliam no combate e eliminação da bactéria (Bron e cols., 2011).

Outras citocinas avaliadas foram TNF- α e IL-6. Ambas são pró-inflamatórias, contudo, TNF- α participa, principalmente da resposta imune inata, enquanto IL-6 está envolvida na resposta imune adquirida e seu maior efeito é observado quando age em conjunto com TGF- β na indução de Th17. Os resultados de TNF- α e IL-6 foram semelhantes com relação ao aumento significativo das DCs estimuladas, com as linhagens testadas, com as DCs não estimuladas. Os grupos com e sem atividades não mostraram diferenças significativas em nenhuma destas citocinas.

Em concordância com a produção de TNF- α e IL-10 pelas sete linhagens estudadas no presente trabalho, estudos in vivo, tendo como desafio o *Citrobacter rodentium*, mostraram uma redução de TNF- α e um concomitante aumento de IL-10 quando tratado, previamente, com cepas de *L. helveticus* R0052 e *L. rhamnosus* R0011 antes da infecção, contudo, houve aumento quando administrado concomitantemente com o probiótico ou quando o *C. rodentium* foi administrado antes da dose probiótica, indicando uma supressão da resposta imune quando se trata com probiótico antecipadamente. Outro dado importante foi a drástica redução de IL-17 dos tratados com probióticos em relação aos infectados/não tratados com *C. rodentium*, mesmo nosso trabalho não tendo avaliado essa citocina, é preciso ressaltar a sua importância na resposta mediada por Th17 um perfil inflamatório e importante para a resposta imune e eliminação de patógenos entéricos (Rodrigues e cols., 2012).

Em relação a IL-6, Plantinga e cols., 2012, observaram, com os achados em DCs do sangue periférico de humanos, um aumento com relação às DCs não estimuladas. A IL-6 juntamente com TGF- β ao serem produzidas, diferencia em um perfil Th17. A subpopulação de Th 17 é caracterizada pela produção de IL-17A, IL-17F, IL21 e IL-22 e expressão dependente de STAT3 e fator de transcrição ROR- γ t. Exceto em camundongos germ free, essas células

estão presentes de maneira assídua do intestino delgado. A administração de ATP para camundongos germ free elevou o número de Th17 na lâmina própria, através da produção de citocinas como IL-6, TGF- β e IL-23, entretanto, os animais livres de germes, quando não recebem nenhum estímulo, mostram redução acentuada de IL-17 e de níveis de IgA fecal (Atarashi e cols., 2008; Sutton e cols., 2006)

Outro estudo envolvendo a produção de citocinas e a presença de ATP destacou a importância de E-NTPDase7 na modulação da resposta imune. Camundongos selvagens mostraram maiores níveis de Th17 em relação a camundongos germ free, visto que os animais livres de germes não possuem estímulos para o desenvolvimento de respostas imunes intestinais. Além disso, foi observado também o aumento de IL-17 e IFN- γ em camundongos deficientes para ENTPDase7 e a resistência a infecção por *C. rodentium*, mostrando, portanto, a importância dessa enzima para a hidrólise de ATP. Contudo, neste caso, a hidrólise de ATP pode levar a redução de citocinas pró-inflamatórias que tem ação sobre o patógeno. Por outro lado, a produção de adenosina poderia facilitar a sobrevivência do mesmo, visto que esse nucleosídeo induz a produção de citocinas anti-inflamatórias e conseqüentemente a o bloqueio vias de sinalização responsáveis pela eliminação de bactérias patogênicas (Kusu e cols., 2013).

De maneira geral, o nosso trabalho sugere que *Lactobacillus*, originados do kefir, são capazes de modular a produção de citocinas. Além disso, mostramos que a baixa hidrólise de ATP é capaz de direcionar a produção de citocinas inflamatórias. Isso indica um possível mecanismo pelo qual as células da resposta imune respondem diferentemente a estímulos bacterianos. Nossos achados podem ser importantes também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas como a seleção de probióticos como vetores para vacinas em casos de inflamação intestinal.

SUMÁRIO DE

RESULTADOS

1. Probióticos possuem capacidade ectonucleotidásica dependente de cepa.
2. Não foi observado alteração na expressão de DC40, CD86 e MHCII.
3. Existe correlação entre a capacidade ectonucleotidásica de probióticos e a produção de citocinas pela estimulação de DCs.
4. A estimulação de DCs com probióticos mostrou uma maior produção de IL-12 em isolados com baixa atividade ectonucleotidásica.
5. O probiótico L.10 possui baixa hidrólise de ATP, aumento de IL-12 e em relação a IL-10 não foi diferente das DCs não estimuladas.
6. Os probióticos L.11 e L.36 possuem alta hidrólise de ATP e produziram pouca IL-12.

CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho que a presença de ectonucleotídeos em probióticos pode, em conjunto com as DCs, modular a resposta imune através da produção de citocinas. Essa modulação, principalmente com relação à produção de IL-12 favorece a utilização desses probióticos como estratégias para o desenvolvimento de novos vetores de vacinas.

Referências Bibliográficas

- ANTONIOLI L., PACHER P., VIZI E.S. & HASKO G. (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol.Med.* **19**, 355-367.
- ARTIS D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 411-420.
- ATARASHI K., NISHIMURA J., SHIMA T., UMESAKI Y., YAMAMOTO M., ONOUE M., YAGITA H., ISHII N., EVANS R., HONDA K. & TAKEDA K. (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808-812.
- BELKAID Y. & HAND T.W. (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121-141.
- BERMUDEZ-BRITO M., MUNOZ-QUEZADA S., GOMEZ-LLORENTE C., MATENCIO E., BERNAL M.J., ROMERO F. & GIL A. (2012) Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against Salmonella infection in the presence of Lactobacillus paracasei upon TLR activation. *PLoS.One.* **7**, e43197
- BOURS M.J., SWENNEN E.L., DI V.F., CRONSTEIN B.N. & DAGNELIE P.C. (2006a) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol.Ther.* **112**, 358-404.
- BOURS M.J., SWENNEN E.L., DI V.F., CRONSTEIN B.N. & DAGNELIE P.C. (2006b) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol.Ther.* **112**, 358-404.
- BRON P.A., VAN B.P. & KLEEREBEZEM M. (2012) Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat.Rev.Microbiol.* **10**, 66-78.
- BROWN E.M., SADARANGANI M. & FINLAY B.B. (2013) The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat.Immunol.* **14**, 660-667.
- BURNSTOCK G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol.Life Sci.* **64**, 1471-1483.
- BURNSTOCK G. (2011) Purinergic signaling in the gastrointestinal tract. *World J.Gastrointest.Pathophysiol.* **2**, 31-34.

- BURNSTOCK G. & KNIGHT G.E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int.Rev.Cytol.* **240**, 31-304.
- CHO J.H. (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 458-466.
- CHRISTENSEN H.R., FROKIAER H. & PESTKA J.J. (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J.Immunol.* **168**, 171-178.
- COOMBES J.L., SIDDIQUI K.R., ARANCIBIA-CARCAMO C.V., HALL J., SUN C.M., BELKAID Y. & POWRIE F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J.Exp.Med.* **204**, 1757-1764.
- CORTHESEY B., GASKINS H.R. & MERCENIER A. (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J.Nutr.* **137**, 781S-790S.
- CREAGH E.M. & O'NEILL L.A. (2006) TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* **27**, 352-357.
- DI V.F. (2007) Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic.Signal.* **3**, 1-3.
- DOHERTY G.A., BAI A., HANIDZIAR D., LONGHI M.S., LAWLOR G.O., PUTHETI P., CSIZMADIA E., NOWAK M., CHEIFETZ A.S., MOSS A.C. & ROBSON S.C. (2012) CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur.J.Immunol.* **42**, 3062-3072.
- EKMAN P. & JAGER O. (1993) Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal.Biochem.* **214**, 138-141.
- FINK L.N., ZEUTHEN L.H., CHRISTENSEN H.R., MORANDI B., FROKIAER H. & FERLAZZO G. (2007) Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. *Int.Immunol.* **19**, 1319-1327.
- FOLIGNE B., NUTTEN S., GRANGETTE C., DENNIN V., GOUDERCOURT D., POIRET S., DEWULF J., BRASSART D., MERCENIER A. & POT B. (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J.Gastroenterol.* **13**, 236-243.
- GALDEANO C.M. & PERDIGON G. (2004) Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J.Appl.Microbiol.* **97**, 673-681.

- GRINTHAL A. & GUIDOTTI G. (2004) Dynamic motions of CD39 transmembrane domains regulate and are regulated by the enzymatic active site. *Biochemistry* **43**, 13849-13858.
- GUTIERREZ O., PIPAON C., INOHARA N., FONTALBA A., OGURA Y., PROSPER F., NUNEZ G. & FERNANDEZ-LUNA J.L. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J.Biol.Chem.* **277**, 41701-41705.
- HART A.L., LAMMERS K., BRIGIDI P., VITALI B., RIZZELLO F., GIONCHETTI P., CAMPIERI M., KAMM M.A., KNIGHT S.C. & STAGG A.J. (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* **53**, 1602-1609.
- HERSKOVITS A.A., AUERBUCH V. & PORTNOY D.A. (2007) Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS.Pathog.* **3**, e51
- JEPSON M.A. & CLARK M.A. (2001) The role of M cells in Salmonella infection. *Microbes.Infect.* **3**, 1183-1190.
- KAPSENBERG M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 984-993.
- KUKULSKI F., LEVESQUE S.A., LAVOIE E.G., LECKA J., BIGONNESSE F., KNOWLES A.F., ROBSON S.C., KIRLEY T.L. & SEVIGNY J. (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic.Signal.* **1**, 193-204.
- KUSU T., KAYAMA H., KINOSHITA M., JEON S.G., UEDA Y., GOTO Y., OKUMURA R., SAIGA H., KURAKAWA T., IKEDA K., MAEDA Y., NISHIMURA J., ARIMA Y., ATARASHI K., HONDA K., MURAKAMI M., KUNISAWA J., KIYONO H., OKUMURA M., YAMAMOTO M. & TAKEDA K. (2013) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J.Immunol.* **190**, 774-783.
- LAVELLE E.C., MURPHY C., O'NEILL L.A. & CREAGH E.M. (2010) The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal.Immunol.* **3**, 17-28.
- LIEVIN-LE M., V & SERVIN A.L. (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin.Microbiol.Rev.* **19**, 315-337.
- LUTZ M.B., KUKUTSCH N., OGILVIE A.L., ROSSNER S., KOCH F., ROMANI N. & SCHULER G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* **223**, 77-92.
- MAASSEN C.B., VAN HOLTEN-NEELEN C., BALK F., DEN BAK-GLASHOUWER M.J., LEER R.J., LAMAN J.D., BOERSMA W.J. &

- CLAASSEN E. (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* **18**, 2613-2623.
- MABBOTT N.A., DONALDSON D.S., OHNO H., WILLIAMS I.R. & MAHAJAN A. (2013) Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal.Immunol.* **6**, 666-677.
- MACPHERSON A.J. & HARRIS N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 478-485.
- MANGELL P., NEJDFORS P., WANG M., AHRNE S., WESTROM B., THORLACIUS H. & JEPPSSON B. (2002) *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. *Dig.Dis.Sci.* **47**, 511-516.
- MCGUCKIN M.A., LINDEN S.K., SUTTON P. & FLORIN T.H. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat.Rev.Microbiol.* **9**, 265-278.
- MILLION M., LAGIER J.C., YAHAV D. & PAUL M. (2013) Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin.Microbiol.Infect.* **19**, 305-313.
- NAIDU A.S., BIDLACK W.R. & CLEMENS R.A. (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **39**, 13-126.
- O'HARA A.M., O'REGAN P., FANNING A., O'MAHONY C., MACSHARRY J., LYONS A., BIENENSTOCK J., O'MAHONY L. & SHANAHAN F. (2006) Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* **118**, 202-215.
- POUWELS P.H., LEER R.J. & BOERSMA W.J. (1996) The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J.Biotechnol.* **44**, 183-192.
- RESCIGNO M., URBANO M., VALZASINA B., FRANCOLINI M., ROTTA G., BONASIO R., GRANUCCI F., KRAEHENBUHL J.P. & RICCIARDI-CASTAGNOLI P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* **2**, 361-367.
- RIBEIRO L.A., AZEVEDO V., LE L.Y., OLIVEIRA S.C., DIEYE Y., PIARD J.C., GRUSS A. & LANGELLA P. (2002) Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl.Enviro.Microbiol.* **68**, 910-916.
- RIZZELLO V., BONACCORSI I., DONGARRA M.L., FINK L.N. & FERLAZZO G. (2011) Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in

immunomodulation by commensal bacteria probiotics.
J.Biomed.Biotechnol. **2011**, 473097

- ROBSON S.C., WU Y., SUN X., KNOSALLA C., DWYER K. & ENJYOJI K. (2005) Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin.Thromb.Hemost.* **31**, 217-233.
- RODRIGUES D.M., SOUSA A.J., JOHNSON-HENRY K.C., SHERMAN P.M. & GAREAU M.G. (2012) Probiotics are effective for the prevention and treatment of *Citrobacter rodentium*-induced colitis in mice. *J.Infect.Dis.* **206**, 99-109.
- ROSENSTIEL P., FANTINI M., BRAUTIGAM K., KUHBACHER T., WAETZIG G.H., SEEGERT D. & SCHREIBER S. (2003) TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1001-1009.
- SANSOM F.M., ROBSON S.C. & HARTLAND E.L. (2008) Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **72**, 765-81, Table.
- SCHULTZ G., SENFT G., LOSERT W. & SITT R. (1986) [Biochemical bases of diazoxide hyperglycemia]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* **253**, 372-387.
- SEEGERS J.F. (2002) Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* **20**, 508-515.
- SHAW D.M., GAERTHE B., LEER R.J., VAN DER STAP J.G., SMITTENAAR C., HEIJNE D.B.-G., THOLE J.E., TIELEN F.J., POWELS P.H. & HAVENITH C.E. (2000) Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing lactobacilli. *Immunology* **100**, 510-518.
- SMITH P.D., SMYTHIES L.E., MOSTELLER-BARNUM M., SIBLEY D.A., RUSSELL M.W., MERGER M., SELLERS M.T., ORENSTEIN J.M., SHIMADA T., GRAHAM M.F. & KUBAGAWA H. (2001) Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J.Immunol.* **167**, 2651-2656.
- SUTTON C., BRERETON C., KEOGH B., MILLS K.H. & LAVELLE E.C. (2006) A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J.Exp.Med.* **203**, 1685-1691.
- TAKEDA K., KAISHO T. & AKIRA S. (2003) Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **21**, 335-376.

- THAMMAVONGSA V., KERN J.W., MISSIAKAS D.M. & SCHNEEWIND O. (2009) Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J.Exp.Med.* **206**, 2417-2427.
- TRINCHIERI G. & SHER A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat.Rev.Immunol.* **7**, 179-190.
- TSAI Y.T., CHENG P.C. & PAN T.M. (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **96**, 853-862.
- TUOMOLA E., CRITTENDEN R., PLAYNE M., ISOLAURI E. & SALMINEN S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am.J.Clin.Nutr.* **73**, 393S-398S.
- TURNER J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat.Rev.Immunol.* **9**, 799-809.
- VAN B.P., TROOST F., VAN DER MEER C., HOOIVELD G., BOEKSCHOTEN M., BRUMMER R.J. & KLEEREBEZEM M. (2011) Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108 Suppl 1**, 4562-4569.
- VAN B.P., TROOST F.J., VAN H.S., VAN DER MEER C., DE VOS W.M., DE GROOT P.J., HOOIVELD G.J., BRUMMER R.J. & KLEEREBEZEM M. (2009) Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 2371-2376.
- VANDERPOOL C., YAN F. & POLK D.B. (2008) Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm.Bowel.Dis.* **14**, 1585-1596.
- VECKMAN V., MIETTINEN M., PIRHONEN J., SIREN J., MATIKAINEN S. & JULKUNEN I. (2004) Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* **75**, 764-771.
- XIANG Y., WANG X., YAN C., GAO Q., LI S.A., LIU J., ZHOU K., GUO X., LEE W. & ZHANG Y. (2013) Adenosine-5'-triphosphate (ATP) protects mice against bacterial infection by activation of the NLRP3 inflammasome. *PLoS.One.* **8**, e63759
- YAN F., CAO H., COVER T.L., WHITEHEAD R., WASHINGTON M.K. & POLK D.B. (2007) Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* **132**, 562-575.

- YAO Y., LEVINGS M.K. & STEINER T.S. (2012) ATP conditions intestinal epithelial cells to an inflammatory state that promotes components of DC maturation. *Eur.J.Immunol.* **42**, 3310-3321.
- YU Q.H. & YANG Q. (2009) Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biol.Int.* **33**, 78-82.