

2. Ciências Biológicas: 2.02.02 - Genética / Genética Molecular e de Microorganismos.

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 CARREANDO O PLASMÍDEO VACINAL PEXU:HSP65 PREVINE A MUCOSITE INTESTINAL EM MODELO MURINO

Nina Dias Coelho Rocha¹, Mariana Martin Drumond², Luís Cláudio Lima de Jesus³, Viviane Lima Batista¹,
Fernanda Alvarenga Lima³, Renata Salgado Fernandes³, Vasco Azevedo⁴ e Pamela Mancha-Agresti²

1. Bacharel em Ciências Biológicas
2. Pesquisador da Universidade Federal de Minas Gerais
3. Estudante de doutorado na Universidade Federal de Minas Gerais
4. Professor da Universidade Federal de Minas Gerais

Resumo

A mucosite é caracterizada pela inflamação do trato gastrointestinal, sendo um dos principais efeitos colaterais do tratamento quimioterápico com drogas antineoplásicas, como o 5- fluorouracil (5-FU). HSP65 é uma proteína de *Mycobacterium leprae* com capacidade de interagir com proteínas marcadas para degradação que tem sido descrita com propriedades anti-inflamatórias. O presente trabalho visou integrar o benefício da linhagem probiótica *L. delbrueckii* CIDCA133 com o efeito da proteína HSP65 em modelo de mucosite induzida por 5-FU. Os resultados mostraram que o tratamento com *L. delbrueckii* CIDCA133 (pExu:hsp65) aumentou a secreção de sIgA no lavado intestinal, reduziu o infiltrado inflamatório e protegeu contra o aumento da permeabilidade intestinal. Assim, ficou evidente que esta linhagem recombinante foi capaz de diminuir os efeitos da mucosite intestinal e potencializar o efeito da linhagem selvagem CIDCA 133, revelando assim, ser uma estratégia terapêutica promissora.

Autorização legal: este trabalho foi realizado com autorização legal para execução expedido pelo CEUA-UFMG, protocolo nº379/2018.

Palavras-chave: probióticos, vacina de DNA, antígeno HSP65.

Apoio financeiro: Capes, CNPq, FAPEMIG.

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade Federal de Minas Gerais

Introdução

A mucosite é caracterizada por ulcerações na cavidade oral e no trato gastrointestinal, afetando principalmente o intestino delgado. Essa condição é recorrente em pacientes submetidos à quimioterapia com antineoplásicos, como o 5-Fluorouracil, que é uma das drogas mais utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer. Sendo a mucosite um dos principais efeitos colaterais decorrentes da utilização desse fármaco, os pacientes apresentam sintomas como dor abdominal, náuseas, diarreias e dificuldade para comer, o que faz com que muitas vezes, o tratamento seja interrompido (Sonis et al., 2004). Tendo em vista que a interrupção reduz a eficácia do tratamento, medidas que visam aliviar os sintomas da mucosite tem ganhado grande relevância atualmente. Desta forma, a administração de probióticos, em especial de bactérias do ácido láctico (LAB), tem sido relatada na literatura como uma promissora alternativa para o tratamento da mucosite (Trindade et al., 2018). Com o intuito de aumentar o potencial benéfico destas bactérias, linhagens recombinantes que codificam proteínas anti-inflamatórias, podem ser um método eficaz para aliviar os sintomas desta doença (Carvalho et al., 2017).

Diversos estudos demonstraram que a proteína Hsp65 de *M. leprae* possui potencial anti-inflamatório, atuando na prevenção de doenças como tuberculose, encefalomielite, colite e alergias, apontando-a como boa candidata para fins terapêuticos (Jing et al., 2011; Gomes-Santos et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um vetor vacinal denominado pExu, capaz de carrear diferentes sequências para serem expressas por células eucarióticas (Mancha-Agresti et al., 2016). Recentemente, De Jesus et al. (2019) mostrou que a linhagem probiótica *L. delbrueckii* CIDCA 133 foi capaz de reduzir os efeitos da mucosite induzida por 5-FU. Dessa forma, esse trabalho visou conciliar o efeito protetor da linhagem *L. delbrueckii* CIDCA 133 (De Jesus et al., 2019) com o potencial anti-inflamatório da proteína Hsp65 através da construção da linhagem recombinante *L. delbrueckii* CIDCA 133 (pExu:hsp65) administrada oralmente em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida pelo 5-FU, afim de se avaliar seu efeito

potencializador na redução do quadro inflamatório.

Metodologia

Foram utilizados nesse experimento, camundongos BALB/c machos com 6 semanas de idade e peso de 21-24g do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob aprovação do CEUA-UFMG, protocolo n°379/2018. Os camundongos foram divididos em quatro grupos (n= 8 animais por grupo): I) CTL: leite+eritromicina 2,5µg/ml, II) rCIDCA133: *L. delbrueckii* CIDCA 133 (pExu:vazio)+5-FU+eritromicina 2,5µg/ml, III) MUC: 5-FU+eritromicina 2,5µg/ml, IV) rCIDCA 133:Hsp65: *L. delbrueckii* CIDCA 133 (pExu:hsp65)+5-FU+eritromicina 2,5µg/ml. Os animais foram submetidos ao tratamento por via oral com leite não fermentado (grupos I e III) ou leite fermentado contendo 5×10^7 CFU/mL da linhagem recombinante (grupos II e IV) durante treze dias. Para a indução da mucosite, os grupos II, III e IV receberam uma única injeção intraperitoneal de 5-FU (300 mg/kg) no dia 10 e foram eutanazados no dia 14. O sangue e o intestino delgado foram coletados para análise. O peso corporal e consumo hídrico e alimentar foram medidos durante todo o experimento.

Nesse trabalho, foram feitas as seguintes análises: avaliação da massa corporal e consumo hídrico e alimentar, comprimento intestinal, avaliação da permeabilidade intestinal e da translocação bacteriana, caracterização histopatológica, contagem de leucócitos, infiltrado de células polimorfonucleares e avaliação de IgA secretória. A manutenção da permeabilidade intestinal foi avaliada após a administração oral de DTPA marcado com tecnécio-^{99m} radioativo (^{99m}Tc-DTPA). Por sua vez, a análise da translocação bacteriana no sangue, fígado, baço, coração, rins, linfonodos mesentéricos e pulmões foi realizada a partir da administração oral de *E.coli* marcada radioativamente, como descrito por Diniz et. al. (1999). Ambas as análises foram realizadas no último dia de experimentação, utilizando-se um contador automático de radiação gamma (Perkin Elmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, Waltham, MA, USA). Análise histológica foi realizada para avaliação da arquitetura da mucosa intestinal do íleo e foram usados os seguintes parâmetros: medida da profundidade das criptas, altura das vilosidades, avaliação de células caliciformes e também análises do infiltrado inflamatório. As imagens foram capturadas em microscópio óptico (Olympus, Tokyo, Japan) e analisadas no software ImageJ 1.51j.8 (NIH, Bethesda, MD, USA). A contagem de leucócitos foi realizada por meio do contador hematológico automático (Bio-2900 Vet, Bioeasy, EUA). O infiltrado inflamatório por neutrófilos e eosinófilos foi mensurado por meio da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) respectivamente. Os níveis de IgA secretório do fluido intestinal foram medidos pela técnica de ELISA, como descrito por Martins et al., (2009). Em termos estatísticos, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e os dados analisados no software GraphPad Prism 7.0, com o $p < 0.05$ sendo considerado como estatisticamente relevante.

Resultados e Discussão

Um dos principais efeitos relacionados à mucosite intestinal é perda da arquitetura da mucosa intestinal, no qual se observa redução na altura das vilosidades, aumento da profundidade e destruição das células das criptas, ulceração e intensa resposta inflamatória, estando esses achados em consonância com a patobiologia da mucosite proposta por Sonis (2004) e os escores histopatológicos proposto por Soares et al. (2008). Estes efeitos resultam na dificuldade na mastigação, deglutição, absorção, bem como aumento na permeabilidade intestinal, deixando o intestino permissível à passagem de agentes exógenos, como bactérias patogênicas e antígenos nocivos que comprometem a homeostase do organismo (Cinausero et al., 2017). Os resultados obtidos demonstraram que rCIDCA 133:Hsp65 é capaz de prevenir o epitélio intestinal dos danos ocasionados pela administração de 5-FU, sendo que o efeito dessa linhagem na manutenção da integridade da arquitetura da mucosa pode estar relacionado à sua capacidade de (i) prevenir o estresse oxidativo, uma vez que a produção de ROS está associada com danos ao material genético das células, culminando em danos/morte e perda celular; (ii) reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente inibindo a ativação da via NF- κ B, de forma a proteger a mucosa de uma lesão tecidual exacerbada, e (iii) estimular a migração de enterócitos produzidos pelas células estaminais das criptas a reparar o epitélio intestinal pela substituição das células danificadas/mortas. Estes efeitos, por sua vez, previnem do encurtamento intestinal, e conseqüentemente, melhoram a absorção de nutrientes, água e eletrólitos, restabelecendo o balanço energético dos animais. Estas inferências estão em consonância com trabalhos prévios que utilizaram linhagens probióticas selvagens ou engenheiradas geneticamente e mostraram resultados promissores (Gomes-Santos et al., 2017; Carvalho et al., 2017; De Jesus et al., 2019;).

A destruição das células epiteliais do TGI durante o processo de mucosite intestinal induzido por quimioterápicos é o principal estímulo para o recrutamento de células polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para a mucosa intestinal (Sonis et al., 2004). Estas células iniciam uma cascata de sinalização, recrutando outras células da resposta imune inata, e conduzem a liberação de enzimas proteolíticas, ROS e citocinas pró-inflamatórias (Kolaczowska e Kubes, 2013), fazendo com que estes mediadores induzam dano tecidual adicional, resultando em ulceração da mucosa (Villa e Sonis, 2015). Essa ulceração promove uma mudança nos mecanismos de defesa que compõem a função de barreira intestinal, levando ao aumento da permeabilidade intestinal, facilitando assim a translocação de substâncias prejudiciais e agentes patogênicos do lúmen intestinal para o interior dos tecidos, inclusive para a corrente sanguínea, o que

por sua vez pode levar ao desenvolvimento e progressão de algumas condições patológicas como as Doenças Inflamatórias Intestinais (IBDs), sepsies, diabetes entre outros (Nalle e Turner, 2015; König et al., 2016).

Nesse contexto, os resultados do presente trabalho mostraram que a linhagem recombinante rCIDCA133:Hsp65 desenvolvida no nosso laboratório foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal e a leucopenia, prevenir a degeneração de células produtoras de muco (células caliciformes), e aumentar os níveis de IgA secretória que foram alterados pela indução da mucosite com 5-FU. A principal função da sIgA é desempenhar um papel na proteção e manter a homeostase nas superfícies mucosas contra agentes exógenos (Mantis et al., 2011). Nesse contexto, o aumento de sIgA nos animais inflamados por 5-FU no presente estudo era esperado, uma vez que os níveis desta imunoglobulina aumentam durante a processo inflamatório como mecanismo de defesa do hospedeiro. Além disso, o efeito de rCIDCA 133:Hsp65 na manutenção da homeostase intestinal pode estar atribuído ao seu efeito de proteger os danos à arquitetura do epitélio intestinal gerados por 5-FU, como redução da vilosidades e destruição das células das criptas intestinais, que contêm as células tronco intestinais que, por sua vez, se diferenciam em células com diferentes funções no epitélio intestinal, como as células caliciformes.

Conclusões

A administração oral do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 carreando o vetor codificante do antígeno HSP65 atenua a mucosite intestinal experimental induzida pelo antineoplásico 5-FU em modelo murino e potencializa os efeitos já demonstrados para *L.delbrueckii* CIDCA 133 selvagem, demonstrando ser uma estratégia terapêutica promissora para a prevenção ou tratamento da mucosite.

Referências bibliográficas

CARVALHO et al. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases, *Frontiers in Microbiology*, vol.8, p. 1-13, 2017

CARVALHO, R.D et al. Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, 1-11, 2017.

CINAUSERO, M et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, n. 354, p. 1-17, 2017.

DE JESUS, L.C.L et al. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *Functional Foods Journal*, vol 53, p. 107-207, 2019.

GOMES-SANTOS, A.C et al. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Frontiers in Immunology*, vol. 8, n. 30, p. 1-12, 2017

JING, H et al. Oral administration of *Lactococcus lactis* delivered heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Vaccine*, vol. 29, n. 24, p.4102-4109, 2011

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, vol.13, p. 159–175, 2013.

KÖNIG, J et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, v. 7, n. 10, p. e196, 2016

MANCHA-AGRESTI, P et al. A New Broad Range Plasmid for DNA Delivery in Eukaryotic Cells Using Lactic Acid Bacteria: In Vitro and In Vivo Assays. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, vol. 4, p. 83-91, 2016.

MANTIS, N.J et al. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal immunology*, vol.4, n.6, p.603-611, 2011

MARTINS, F.S et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives in Microbiology*, v. 191, n. 8, p. 623-630, 2009.

NALLE, S.C; TURNER, J.R. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal Immunology*, v. 8, n. 4, p. 720-30, 2015

SOARES, P.M et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 63, p. 91–98, 2008.

Sonis, S. T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 277–284.

TRINDADE, L.M et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Beneficial Microbes*, v. 9, p.477-486, 2018.

VILLA, A; SONIS, S.T. Mucositis: pathobiology and management. *Current Opinion in Oncology*, v.27, n. 3, p. 159-64, 2015.