

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



TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E PROBIÓTICAS
DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE CÃES, PARA USO EM VACINAS
ORAIS CONTRA LEPTOSPIROSE, COMO ADJUVANTE IMUNE OU
CARREADOR ANTIGÊNICO**

ORIENTADO: **LENICE ROTEIA CARDOSO JUNG**

ORIENTADOR: Prof. Dr. **ÁLVARO CANTINI NUNES**


CO-ORIENTADORA: Prof^a Dra. **MARIA ROSA QUARESMA BOMFIM**

Belo Horizonte

2013

LENICE ROTEIA CARDOSO JUNG

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E
PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE
CÃES PARA USO EM VACINAS ORAIS CONTRA
LEPTOSPIROSE COMO ADJUVANTE IMUNE OU
CARREADOR ANTIGÊNICO



Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Geral do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Genética.

Área de Concentração: Genética Molecular, de
Microrganismos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes
Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Rosa
Quaresma Bomfim.
Universidade CEUMA, São Luis - MA.

Belo Horizonte

2013

Jung, Lenice Roteia Cardoso.

Caracterização das propriedades funcionais e probióticas de bactérias lácticas isoladas de cães, para uso em vacinas orais contra leptospirose, como adjuvante imune ou carreador antigênico. [manuscrito] / Lenice Roteia Cardoso Jung. – 2013.

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

Orientador: Álvaro Cantini Nunes. Co-orientadora: Maria Rosa Quaresma Bomfim.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Lactobacilo – Teses. 2. Citocinas - Teses. 3. Leptospirose - Vacina - Teses. 4. Vacina – Teses. 5. Resposta imune – Teses. 6. Hamster - Teses. 7. Leptospirose – Teses. 8. Genética molecular – Teses. 9. Genética microbiana – Teses. 10. Antígenos recombinantes. I. Nunes, Álvaro Cantini. II. Bomfim, Maria Rosa Quaresma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 576.8.095.5

“Aprendi com o Mestre da Vida que viver é uma experiência única, belíssima, mas brevíssima e por saber que a vida passa tão rápido, sinto necessidade de compreender minhas limitações e aproveitar cada lágrima, sorriso, sucesso e fracasso como uma oportunidade preciosa de crescer”.

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Álvaro Cantini Nunes, o acolhimento, a orientação e por ter propiciado a oportunidade de renovação da minha experiência. Também pelo aprendizado em Biologia Molecular, contribuindo na minha formação profissional.

À Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim, eu agradeço a co-orientação e disponibilidade em todas as etapas desta pós-graduação, ensinando, auxiliando e incentivando o desenvolvimento dos trabalhos, além da ótima convivência.

Meu agradecimento a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, que direta ou indiretamente auxiliaram o desenvolvimento desse trabalho ou que contribuíram para um convívio harmônico e produtivo durante as atividades. Em especial quero agradecer aos colegas Sávio Cicco Sandes, Luige Biciati Alvim, Bruno Campos Silva e Raphael Steinberg da Silva a colaboração recebida.

Aos professores e pesquisadores do departamento de Biologia Geral agradeço as várias vezes que disponibilizaram o uso de equipamentos em seus laboratórios.

À coordenação da Pós-Graduação em Genética, aos professores, funcionários da secretaria e aos colegas pelo aprendizado, auxílio e troca de experiências, meu agradecimento.

À D. Nailda, agradeço o ótimo convívio na cantina e o cafezinho estimulante.

Meu agradecimento às agências financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMIG e aos membros da banca de avaliação, a disponibilidade e atenção.

À minha família e amigos, agradeço o estímulo, carinho e paciência recebidos.

Estou grata, principalmente ao “Divino Mestre” e seus ensinamentos que me fazem ser um indivíduo melhor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A LEPTOSPIROSE.....	1
1.1.1. Características do agente etiológico.....	1
1.1.2. Fatores de virulência das leptospiros.....	4
1.1.3. Patogênese da leptospirose.....	4
1.1.4. Epidemiologia da leptospirose	5
1.1.4.1 Vias de infecção e formas de transmissão da leptospirose em cães	9
1.1.4.2 Epidemiologia da leptospirose canina no Brasil	10
1.1.5. Resposta imunológica dos hospedeiros à infecção por leptospiros.....	11
1.1.6. Vacinas contra leptospirose	17
1.1.7. Vacinas orais	20
1.1.7.1. Adjuvantes de vacinas orais.....	21
1.2.O GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	23
1.2.1. Probióticos.....	25
1.2.1.1. Características de um microrganismo probiótico	27
1.3.A PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA DAS MUCOSAS	30
1.4. O MODELO ANIMAL: <i>Golden Syrian Hamsters</i>	35
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	37
3.1.OBJETIVO GERAL.....	37
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VEÍCULO VACINAL	38
4.1.1. Isolamento de bactérias lácticas a partir das fezes de cães lactentes	38
4.1.2. Identificação molecular dos isolados de bactérias lácticas	39
4.1.2.1. Extração do DNA genômico	39
4.1.2.2. Identificação molecular dos lactobacilos	39

4.1.3. Caracterização funcional e probiótica dos lactobacilos isolados	41
4.1.3.1. Teste de crescimento em aerobiose.....	41
4.1.3.2. Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial.....	41
4.1.3.3. Avaliação da susceptibilidade aos sais biliares.....	41
4.1.3.4. Teste <i>in vitro</i> da hidrofobicidade da superfície celular (MATS).....	42
4.1.3.5. Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra patógenos bacterianos.....	42
4.1.3.6. Produção de peróxido de hidrogênio.....	43
4.1.3.7. Teste de resistência a antibióticos.....	44
4.1.3.8. Identificação das linhagens de <i>L. reuteri</i> por rep-PCR (GTG) ₅	44
4.1.4. Avaliação da resposta inflamatória de hamsters, induzida por lactobacilos com propriedades probióticas	45
4.1.4.1. Obtenção, manutenção, formação dos grupos experimentais e tratamento dos animais utilizados nos experimentos	45
4.1.4.2. Efeito da administração dos probióticos sobre o peso dos hamsters.....	46
4.1.4.3. Eutanásia e coleta dos tecidos e fezes dos animais para os testes <i>ex vivo</i> e imunomodulatório.....	46
4.1.4.4. Teste de produção de substâncias antagônicas contra patógenos (<i>ex-vivo</i>)....	46
4.1.5. Determinação da expressão de RNAm de citocinas, nos tecidos dos hamsters inoculados por via oral, com lactobacilos	47
4.1.5.1. Extração do RNA total dos tecidos coletados nos experimentos com hamsters submetidos aos tratamentos com <i>L.paraplantarum</i> (isolado 15) e <i>L. reuteri</i> (isolado 2)	47
4.1.5.2. Produção de cDNA a partir do RNA extraído dos tecidos dos hamsters....	48
4.1.6. Padronização das reações de qRT-PCR com iniciadores para citocinas de hamsters	49
4.1.7. Quantificação relativa da expressão de citocinas no baço, linfonodos e porções inicial, medial e distal do intestino delgado usando RT-qCR	51
4.1.7.1 Análise estatística dos dados obtidos na quantificação	52
4.2. OBTENÇÃO DOS PATÓGENOS E SEUS ANTÍGENOS RECOMBINANTES	52
4.2.1. Origem das linhagens de <i>Leptospira</i>	52
4.2.2. Cultivo e extração do DNA genômico das leptospiros	53
4.2.3. Construção dos iniciadores, amplificação dos genes <i>lipL32</i> , <i>loa22</i> , preparo do vetor e do inserto para ligação	53
4.2.4. Preparação dos amplicons ligados ao vetor pCR4-TOPO	54
4.2.5. Preparação do vetor de expressão pTrcHis-TOPO® para ligação dos insertos ..	55
4.2.6. Ligação do amplicon de LipL32 ao vetor de expressão pTrcHis-TOPO® e transformação na bactéria <i>E. coli</i> Top10	55

4.2.7. Padronização do tempo de máxima expressão da proteína recombinante	56
4.2.8. Expressão da proteína LipL32	57
4.2.8.1. Verificação da forma de expressão da proteína LipL32	57
4.2.8.2. Purificação da proteína LipL32 por cromatografia líquida de alta pressão	58
4.2.8.3. Confirmação da purificação de LipL32 em gel SDS-PAGE	59
4.2.8.4. Preparo de anticorpos policlonais anti-leptospira, em camundongos BALB/c	59
4.2.8.5. Identificação da lipoproteína LipL32 de <i>L. interrogans</i> por Western blotting	60
4.2.8.6. Cálculo da concentração da proteína LipL32 purificada	60
4.2.8.7. Produção de anticorpos policlonais anti-LipL32 de <i>L. interrogans</i> , sorovariedade Icterohaemorrhagiae, em camundongos BALB/c	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VEÍCULO VACINAL	62
5.1.1. Isolamento, caracterização morfológica e identificação dos <i>Lactobacillus</i> de fezes de cães lactentes	62
5.1.2. Resultados e discussão dos testes de caracterização probiótica	66
5.1.2.1. Resistência ao suco gástrico artificial	67
5.1.2.2. Susceptibilidade dos lactobacilos aos Sais Biliares	69
5.1.2.3. Hidrofobicidade da Superfície Celular	71
5.1.2.4. Antagonismo <i>in vitro</i> contra patógenos bacterianos	73
5.1.2.5. Produção de peróxido de hidrogênio	75
5.1.2.6. Teste de resistência dos <i>Lactobacillus</i> isolados, aos antibióticos	76
5.1.2.7. Isolados com potencial probiótico	77
5.1.2.8. Caracterização das linhagens diferentes entre os <i>L. reuteri</i> isolados	79
5.1.3. Testes realizados <i>in vivo</i>	79
5.1.3.1. Avaliação de ganho de peso pelos hamsters inoculados por via oral com as duas espécies de lactobacilos <i>L. paraplantarum</i> e <i>L. reuteri</i>	79
5.1.3.2. Teste de antagonismo (<i>ex-vivo</i>) contra patógenos	81
5.1.3.3. Avaliação da indução de resposta imune em tecidos de hamsters tratados oralmente com lactobacilos das espécies <i>L. reuteri</i> (isolado 2) e <i>L. paraplantarum</i> (isolado 15)	82
5.1.3.3.1. Verificação de ausência de DNA contaminante nas amostras de RNA total extraído de tecidos de hamsters	83
5.1.3.3.2. Padronização dos iniciadores	84
5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS VACINAIS.....	95

5.2.1. Amplificação e análise da sequência de DNA de <i>lipL32</i> das sorovarieties Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippityphosa	95
5.2.2. Clonagem e expressão de LipL32 recombinante	99
5.2.3. Resultado do processo de ligação de <i>lipL32</i> ao vetor pTRcHis-TOPO e clonagem em <i>E. coli</i> Top10	101
5.2.4. Padronização do melhor tempo de expressão da proteína LipL32.....	102
5.2.5. Verificação da forma de expressão da proteína LipL32	102
5.2.6. Purificação da proteína LipL32 sintetizada em <i>E.coli</i> Top10.....	103
5.2.7. Confirmação de LipL32 por western blotting com soro anti-leptospira	104
5.2.8. Determinação da concentração da proteína LipL32 purificada, pelo método de Bradford	105
5.2.9. Produção de antisoro policlonal específico para LipL32	107
5.2.10. Obtenção das sequências da proteína Loa22 de <i>Leptospira</i>	107
6. CONCLUSÃO	110
7. REFERÊNCIAS	111
8. ANEXOS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura da membrana de <i>Leptospira</i> spp.....	3
Figura 2 - Ciclo da contaminação por leptospiros.....	8
Figura 3 - Mecanismos da defesa inata das membranas mucosas.....	32
Figura 4 - Perfis resultantes da amplificação por PCR, do espaçador transcrito entre os genes para rRNA 16S e 23S, dos isolados 1 a 16.....	62
Figura 5 - Perfis de restrição de alguns isolados de bactérias lácticas	64
Figura 6 - Diferenciação entre espécies de <i>Lactobacillus</i> do grupo <i>L. plantarum</i> por PCR multiplex do gene <i>recA</i>	64
Figura 7 – Diversidade de espécies de lactobacilos isolados de fezes de cães lactentes	66
Figura 8 - Gráfico representativo do crescimento de <i>Lactobacillus</i> com adição e na ausência de suco gástrico artificial (pH 2.5)	67
Figura 9 - Gráfico representativo do crescimento de <i>Lactobacillus</i> , em presença (em vermelho) e na ausência de sais biliares (em azul)	70
Figura 10 - Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio por <i>Lactobacillus</i> isolados de fezes caninas	75
Figura 11 – Perfil de bandas obtidos das sequências amplificadas com o primer GTG ₅ , para identificar linhagens diferentes entre as espécies de <i>L. reuteri</i> , isoladas em fezes de cães lactentes.....	79
Figura 12 - Ganho de peso dos hamsters submetidos ao tratamento com <i>Lactobacillus reuteri</i> (2), <i>L. paraplantarum</i> (15) e grupo controle, durante 9 dias.....	80
Figura 13 – Resultados do antagonismo ex-vivo contra patógenos	82
Figura 14 – Curva de amplificação na reação de qPCR realizada com amostras de RNA total, tratado e não tratado com DNase I	84
Figura 15 - Curvas de amplificação, dissociação e diluição do cDNA de TGFβ obtido do RNA total, extraído de baço de hamsters.....	85

Figura 16 - Perfil mostrado na RT-qPCR e análises estatísticas dos dados de níveis relativos de mRNA para os genes normalizadores β -Actina, γ -Actina e HPRT, obtidos nos três tecidos de hamsters testados (baço, linfonodos e intestino delgado), em função dos tratamentos, por via oral, com solução salina (controle), com <i>L. paraplantarum</i> (15) e <i>L. reuteri</i> (2)	89
Figura 17 – Perfil mostrado na RT-qPCR relativos a expressão de citocinas nos tecidos do baço dos <i>Golden Syrian Hamsters</i> submetidos aos tratamentos via oral com <i>L. paraplantarum</i> (15) e <i>L. reuteri</i> (2), isolados em fezes de cães lactentes	90
Figura 18 – Perfil da RT-qPCR mostrando os dados relativos da expressão de citocinas nos linfonodos dos <i>Golden Syrian Hamsters</i> , submetidos aos tratamentos por via oral com <i>L. paraplantarum</i> (15) e <i>L. reuteri</i> (2), isolados em fezes de cães lactentes	91
Figura 19 – Perfil da RT-qPCR mostrando os dados relativos da expressão de citocinas nos tecidos do intestino delgado dos <i>Golden Syrian Hamsters</i> , submetidos aos tratamentos via oral com <i>L. paraplantarum</i> (15) e <i>L. reuteri</i> (2), isolados em fezes de cães lactente.....	91
Figura 20 - Perfil de amplificação do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospira</i> das sorovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa, respectivamente	95
Figura 21 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da lipoproteína LipL32 dos sorovariedade, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippotyphosa de <i>Leptospira</i>	96
Figura 22 - Estrutura terciária presumida de LipL32	98
Figura 23 - Gel de agarose 1.2% mostrando os produtos da PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH5 α , contendo o gene <i>lipL32</i> ligado ao vetor pCR4-TOPO	99
Figura 24 - Os géis de agarose mostrando etapas do preparo da ORF <i>lipL32</i> para ligação ao vetor de expressão	100
Figura 25 - Preparação do vetor de clonagem e expressão	101
Figura 26 - Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie mostrando os resultados dos procedimentos de padronização para a obtenção do melhor tempo de expressão de LipL32.....	102
Figura 27 – Fases solúvel e insolúvel de LipL32	103
Figura 28 - Géis SDS-PAGE, corados por prata, mostrando o grau de pureza obtido com 50 ml da cultura induzida, obtido para LipL32	103
Figura 29 - Cromatograma gerado no AKTA-Plus durante o processo de purificação da proteína LipL32 de <i>Leptospira</i> , sorovariedade Icterohaemorrhagiae	104

Figura 30 - Western blot resultante da confirmação de LipL32, revelada pela ligação ao anti-soro anti-leptospira total	104
Figura 31 - Confirmação do anti-soro anti-LipL32, produzido em camundongos	107
Figura 32 - Teste de amplificação do gene para a <i>OmpA like protein</i> (Loa22)	108
Figura 33 - Clones do vetor pRC4TOPO recombinante com os três insertos de <i>loa22</i> , após restrição com a endonuclease <i>HindIII</i> , que linearizou os vetores	109

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Volume dos reagentes usados no tratamento com a Turbo DNase I	48
Quadro 2 - Mistura de reagentes utilizados para confecção do cDNA	49
Quadro 3 - Identificação das espécies de bactérias lácticas isoladas das fezes de cães lactentes	65
Quadro 4 - Taxa de inibição de crescimento dos isolados em presença de suco gástrico artificial, calculada pela área sob a curva dos gráficos.....	68
Quadro 5 - Taxa de inibição do crescimento dos isolados em presença de 0,3% de sais biliares, calculada pela área sob a curva dos gráficos	70
Quadro 6 - Proporção de adesão, que representa a hidrofobicidade, exibida pelos lactobacilos isolados, em presença de solvente orgânico apolar (xileno)	72
Quadro 7 - Antagonismo <i>in vitro</i> dos isolados contra os patógenos: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salomonella enterica</i> Tiphymurium e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Quadro 8 - Perfil de resistência aos antimicrobianos dos sete isolados de lactobacilos selecionados como melhores probióticos em potencial	76
Quadro 9 - Resultados da caracterização probiótica dos lactobacilos isolados em fezes de cães lactentes	78
Quadro 10 – Resumo da expressão relativa de citocinas, obtido a partir da qRT-PCR do cDNA, produzido com o RNA total extraído dos tecidos dos hamsters tratados com <i>L. paraplantarum</i> e <i>L. reuteri</i>	94
Quadro 11 - Cálculo da concentração de LipL32 purificada. Os tubos contendo a proteína LipL32 resultante de duas purificações por HPLC, tiveram sua quantidade proteica calculada, por absorbância em 595 nm, usando o reagente de Bradford, em relação ao padrão (soroalbumina bovina-BSA a 3,0 µg/µl)	105

Tabela 1 - Sequências de primers usados para quantificar a expressão relativa dos genes de citocinas em hamsters	50
Tabela 2 - Condições padronizadas de RT-qPCR e eficiência das reações e tamanho dos amplicons, que foram usados para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas sintetizadas em amostras de baço de hamsters	86
Tabela 3 - Condições padronizadas, dos dados de RT-qPCR e eficiência das reações, usadas para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de linfonodos de hamsters	86
Tabela 4 - Condições padronizadas, dos dados obtidos do RT-qPCR e eficiência das reações, usadas para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de intestino de hamsters	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
μ g	Microgramas (10^{-6} g)
2xYT	Meio para cultivo de <i>E. coli</i>
aa	Aminoácidos
Act β	Beta-actina
Act γ	Gama-actina
Amp	Ampicilina
AP-1	Fator de transcrição nuclear
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ARDRA	Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Brain Heart Infusion-meio de cultivo
BSA	Fração V da Albumina Bovina
CCL	Ligantes de Quimiocinas
CCR	Receptores de Quimiocinas
CM	Membrana citoplasmática
CT	Toxina do cólera
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
DC	Células Dendríticas
DL ₅₀	Meia dose letal
ECM	Membrana Extra Celular
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
EMJH	Meio Ellinghausen-McCulloch-Johnson-Harris
EtBr	Brometo de Etídio
FAE	<i>Follicle-Associated Epithelium</i>
FAO/WHO	“Food and Agriculture Organization / World Health Organization” –
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IFN- γ	Interferon tipo gama
IgA	Imunoglobulina tipo A
IgE	Imunoglobulina tipo E
IgG	Imunoglobulina sistêmica (gamaglobulina)
IL	Interleucina (quimiocina)
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside
ISCOMS	Complexos Imunoestimuladores
kDa	Quilodaltons
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>

MAMP	<i>Microbe Associated Molecular Patterns</i>
MATS	<i>Microbial adhesion to solvents</i> / adesão de micróbios aos solventes
MCP-1	Monocyte chemotatic protein-1
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MP	Membrana Plasmática
MRS	D-Main Rugosa e Sharpe- Meio de cultivo
NB2	Nível de Biossegurança 2
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
nm	Nanômetros (10 ⁻⁹ m)
NO	Receptores de Oxído Nítrico
OD	Densidade óptica
OM	Outer Membrane
OMS	Organização Mundial da Saúde
Oxgal	Sais biliares
PBS	Solução salina tamponada
PC	Células Plasmáticas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pIgR	Receptores poliméricos de imunoglobulina
pmol	Picomol
Polilynker	Sítio Múltiplo de clonagem nos vetores (MCS)
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
rDNA	DNA ribossômico
REP-PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase com seqüências de elementos extragênicos repetitivos, palindrômicos.
RFLP	Polimorfismos de fragmentos de restrição
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SAM	Microaglutinação microscópica
SIg	Secretores de imunoglobulinas
TGF-β	Fator de transformação do crescimento- beta
TGI	Trato Gastrointestinal
Th1 e Th2	Células T auxiliares (T-helper)
TLR	Receptores Toll-like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
tRNAs	Ácido ribonucléico transportador
U/μl	Unidade/microlitro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Luz Ultra Violeta

RESUMO

A leptospirose canina tem aumentado significativamente nos últimos anos. No Brasil alguns estudos têm demonstrado o caráter endêmico dessa zoonose em cães e que estes animais podem exibir o *status* de portadores renais crônicos da *Leptospira*. A exposição e o convívio do homem com os cães poderão torná-lo vulnerável à infecção por *Leptospira*. Na intenção de desenvolver uma vacina oral contra a leptospirose canina busca-se avaliar a possibilidade de usar lactobacilos autóctones como veículos ou adjuvantes vacinais. Para isso, setenta e nove linhagens bacterianas foram isoladas das fezes de cães lactentes, em meio seletivo para bactérias lácticas e analisadas. Destas, 41 eram Gram positivo e catalase negativo, sugestivo de Bactérias Lácticas. As linhagens foram identificadas molecularmente por *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) dos espaçadores entre os genes 16S e 23S rRNA. Ao final, 37 isolados pertencentes ao gênero *Lactobacillus* distribuíram-se em 6 espécies – *Lactobacillus reuteri* (16/37; 43,3%), *Lactobacillus animalis* (7/37; 18,9%), *Lactobacillus acidophilus* (3/37; 8,1%), *Lactobacillus sanfranciscensis* (2/37; 5,4%), *Lactobacillus murinus* (2/37; 5,4%) e *Lactobacillus paraplantarum* (1/37; 2,7%). Essas linhagens de *Lactobacillus* foram avaliadas quanto a propriedades funcionais desejáveis em probióticos. Na avaliação geral, dos *Lactobacillus*, isolados de cães, com características probióticas e possíveis candidatos a veículos ou adjuvantes vacinais orais, destacaram-se seis isolados de *L. reuteri* e um isolado pertencente à espécie *L. paraplantarum*. Os isolados da espécie *L. reuteri* foram diferenciados em três linhagens diferentes, de acordo com as sequências poli-trinucleotídicas intercaladas (GTG₅). Duas espécies de lactobacilos *L. reuteri* (isolado 2) e *L. paraplantarum* (isolado 15) tiveram testadas a sua capacidade imunomodulatória a partir da suplementação por via oral de *Golden Syrian Hamsters*, identificando-se as citocinas expressas, por RT qPCR. A espécie *L. reuteri* demonstrou-se boa moduladora ao induzir citocinas pró-inflamatórias e ativar também citocinas regulatórias da resposta imunológica nos hamsters. a espécie *L. paraplantarum* apresentou baixa atividade imune. Os antígenos LipL32 e Loa22 de três sorovares de *Leptospira*, foram amplificados, sequenciados e posteriormente alinhados, entre si e com sequências homólogas de outros sorovares disponíveis, confirmando o alto grau de conservação evolutiva desses genes. LipL32 foi sintetizada e sua fração solúvel purificada, obtendo-se 7,96 mg da proteína por litro de cultura induzida. Foram produzidos antisoros anti-leptospira, com a inoculação de uma vacina comercial, produzida com 5 sorovares de *L. interrogans*, em camundongos BALB/c. A massa molecular da proteína LipL32 foi determinada por *Western blot*, pela ligação do soro anti-leptospira, na posição correspondente a 32 kDa. Foram produzidos antisoros policlonais, anti-LipL32, em camundongos, para uso na confirmação dessa proteína, em novas purificações.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, citocinas, vacina, adjuvante, imunomodulação, hamsters, LipL32, leptospirose.

ABSTRACT

Leptospirosis is an important reemerging infectious disease that affects populations worldwide. Caused by pathogenic spirochaetes of the genus *Leptospira*, the disease presents higher incidence in tropical and subtropical regions. Aiming new live vehicles or immune adjuvants for a new leptospirosis vaccine, Lactic Acid Bacteria were isolated and identified in the faeces of Chinese Crested and Yorkshire terrier pups and their probiotic features were investigated *in vitro*. Thirty-seven isolates were identified as *Lactobacillus* or *Enterococcus*. Out of these isolates, 31 were lactic acid bacteria (LAB) and belonged to the species *Lactobacillus reuteri* (16/37; 43.3%), *Lactobacillus animalis* (7/37; 18.9%), *Lactobacillus acidophilus* (3/37; 8.1%), *Lactobacillus sanfranciscensis* (2/37; 5.4%), *Lactobacillus murinus* (2/37; 5.4%), and *Lactobacillus paraplantarum* (1/37; 2.7%), while six other LAB isolates were *Enterococcus* spp. (6/37; 16.2%). Based on these results, two *Lactobacillus* strains – *L. paraplantarum* (15) and *L. reuteri* (2) – showed promising probiotic-related features and merit investigation as probiotics for dogs. Golden Syrian Hamsters fed with both strains had immunomodulatory properties assessed by RT-qPCR for selected cytokines and they stimulated proinflammatory (INF- γ , IL-12, TNF- α) and regulatory cytokines (IL-10, TGF- β). The genes of LipL32 and Loa22 antigens of three *Leptospira* serovars were amplified by PCR, sequenced and then aligned with each other, confirming the high degree of evolutionary conservation of these genes. Recombinant LipL32 (rLipL32) was expressed in an *E. coli* heterologous system and purified as soluble fraction, yielding 7.96 mg of protein per liter of IPTG-induced culture. Antisera against *Leptospira*, were produced in BALB/c mice by inoculation of a commercial vaccine produced with five serovars of *L. interrogans*. The molecular mass of rLipL32 was determined by Western blot to be 32 kDa. Polyclonal antisera anti-rLipL32 was also produced in mice. Recombinant Loa antigen was not produced at this time.

Keywords: *Lactobacillus*, cytokine, vaccine, adjuvant, immunomodulation, hamsters, LipL32, leptospirosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma importante zoonose, de ampla distribuição geográfica, que afeta um diversificado grupo de hospedeiros mamíferos. Trata-se de uma doença tropical bastante negligenciada e por isso reemergente. A doença é causada por bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira* (Adler & de La Peña Moctezuma, 2010; Adler et al., 2011), que têm os animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, como seus hospedeiros primários. Os humanos são hospedeiros ocasionais (Adler & de La Peña Moctezuma, 2010; Evangelista & Coburn, 2010).

1.1.1. Características do agente etiológico

As leptospirosas são espiroquetas pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae (Johnson & Faine, 1984). A classificação sorológica, também denominada *sensu lato* dividiu o gênero *Leptospira* em duas espécies, a saber: *Leptospira interrogans*, compreendendo as 268 sorovariedades patogênicas, agrupadas em 24 sorogrupos e a espécie saprofítica *L. biflexa*, composta de 65 sorovariedades, distribuídas em 38 sorogrupos (Johnson & Faine, 1984; Baranton et al., 1995; Brown & Levett, 1997; Bergey et al., 1998; Adler & Moctezuma, 2010). Na classificação sorológica, a base taxonômica é a sorovariedade, entretanto, o reagrupamento das mesmas, em sorogrupos, baseado na forte similaridade antigênica entre eles, é realizado por razões práticas (OMS, 2010).

A classificação genômica, também denominada *sensu stricto*, baseia-se nos estudos de homologia de DNA e reconhece em torno de 268 sorovariedades distribuídas em treze espécies patogênicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilli*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. fainei*, *L. inadai* e *L. wolffii* e em seis espécies saprofíticas compreendendo: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomospecies 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomospecies 4) e *L. wolbachii* (Yasuda et al., 1987; Ramadass et al., 1992; Pérolat et al., 1998; Brenner et al., 1999; Adler & Moctezuma, 2010).

Bactérias pertencentes ao gênero *Leptospiras* são aeróbias obrigatórias, saprofíticas ou patogênicas e com crescimento ótimo em temperatura entre 28-30°C (Adler; Chappel; Faine,

1982; Perolat & Baranton, 1990). Apresentam estrutura flexível, dotada de motilidade e forma helicoidal ou espiralada, medindo cerca de 1 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento, sendo visualizadas por microscopia de campo escuro e por contraste de fase.

No nível ultraestrutural pode ser observada a existência de um cilindro protoplasmático helicoidal contendo dois filamentos axiais inseridos sub-terminalmente, em polos opostos, conferindo-lhe extremidades dobradas em forma de gancho. Ambos, cilindro protoplasmático e filamentos axiais, são envolvidos por várias camadas de membrana externa, compondo o envelope externo. Os filamentos axiais ou flagelos se estendem desde a membrana citoplasmática, passando pelo espaço periplasmático, até o final da célula, sendo necessários para a motilidade da bactéria (Picardeau et al., 2001; Wolgemuth et al., 2006).

Como característica exclusiva das espiroquetas, elas possuem uma membrana interna (citoplasmática) intimamente associada com o peptidoglicano da parede celular, em vez da membrana externa (Figura 1). Em relação à arquitetura dessa membrana externa foi verificado que as leptospiiras patogênicas apresentam uma membrana dupla, similar às bactérias Gram-positivo e Gram-negativo que fornece proteção contra alguns antígenos a partir do ambiente externo. Entretanto, a membrana externa das espiroquetas parece ser fluida e lábil, quando comparada com a membrana externa, das bactérias Gram-negativo (Picardeau et al., 2001; Wolgemuth et al., 2006). Paralelamente, a membrana externa das leptospiiras e demais espiroquetas parece ter baixa densidade de proteínas transmembranares e uma grande quantidade de lipoproteínas (Haake, 2000^a; Levett, 2001; Haake & Matsunaga, 2002; Bharti et al., 2003; Vijayachari et al., 2008).

Estudos sobre os principais componentes da parede das leptospiiras mostraram a presença de lipopolissacarídeos (LPS) e peptideoglicanos, com o predomínio de alanina, ácidos glutâmicos, diaminopimélicos, murâmicos e glucosamina. Os lipídeos constituem de 18 a 28% do peso seco da célula e são compostos por aproximadamente 70% de fosfolipídios e 30% de ácidos graxos livres (Bergey et al., 1998). O LPS da parede celular de *Leptospira* tem composição química e características tintoriais similares aos das bactérias Gram negativo, porém com baixa atividade endotóxica (Vinh et al., 1999). Várias pesquisas demonstraram que a variação na composição de carboidratos dos LPS reflete a diversidade entre as leptospiiras patogênicas, sendo o terço final da estrutura, a porção variável e antigênica, apresentando na composição, dissacarídeos repetidos. Comparando-se a imunorreatividade de muitos grupos de ácidos graxos com a dos LPS das leptospiiras, ela mostrou-se baixa, tal como a reatividade da porção não variável dos lipopolissacarídeos, demonstrando que é na

região variável que estão os componentes antigênicos (Haake et al., 1998; Palaniappan et al., 2002; Nally et al., 2007; Wang et al., 2007; Murray et al., 2010). O lipídio A do LPS das leptospiros possui características incomuns tais como uma unidade de glicosamina dissacarídeo, fosforilada e metilada. Existem ainda muitas proteínas estruturais e funcionais que fazem parte da superfície celular dessas bactérias tais como as lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL41, LigA, LigB, Lp49, Lp29 (Cullen et al., 2005) e proteínas tipo porinas, que atravessam a membrana OmpL1 (Loa22), que já foi demonstrado serem antigênicas (Shang et al., 1995; Koizumi & Watanabe, 2003^a).

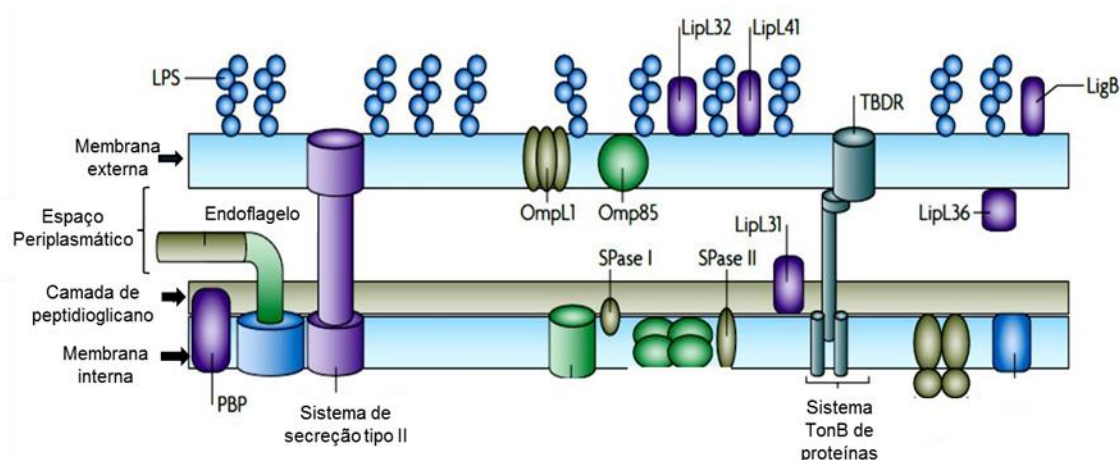


Figura 1: Esquema da estrutura da membrana de *Leptospira* spp na qual pode ser observada a membrana interna ligada à camada de peptideoglicano, o espaço periplasmático onde situam os endoflagelos e algumas proteínas intermembrana e porinas; sistema TonB, de obtenção de energia, as proteínas de membrana externa (Outer membrane proteins – Omp), lipoproteínas e a camada de lipopolissacarídeos, na membrana externa. Adaptada de Ko et al., 2009.

Quanto às exigências nutricionais, são organismos quimiorganotróficos que utilizam ácidos graxos de cadeia longa, saturados ou insaturados como fonte de carbono e energia. As leptospiros podem ser cultivadas em meios de Fletcher & Stuart, contendo de 8 a 10% de soro de coelho ou em meio de Ellinghausen & Mcculloch modificado por Johnson & Harris (EMJH), acrescido de albumina bovina (Johnson & Faine, 1984; Krieg & Holt, 1984; Ellinghausen & Mcculloch, 1965). São resistentes à atividade antimicrobiana do composto 5'-fluorouracil, que é usado em meio seletivo para o isolamento destas bactérias a partir de fontes contaminadas (Johnson & Faine, 1984).

O genoma das leptospiiras pode ser considerado grande, quando comparado ao de outras espiroquetas. Este fato pode estar relacionado à habilidade deste microrganismo sobreviver em diferentes condições tais como no hospedeiro animal e livre no meio ambiente (Bharti et al., 2003). Nas leptospiiras patogênicas, como *L. interrogans*, o genoma é formado por dois cromossomos circulares, um com 4.279 kb e outro, menor, com 350 kb e não há registros de plasmídeos (Nascimento et al., 2004^a). Na espécie saprofítica de vida livre, *L. biflexa*, além dos dois cromossomos de tamanho molecular (3.603 kb e 277 kb), foi constatada ainda a presença de uma unidade de replicação com cerca de 74 kb que corresponde a um plasmídeo (Girons et al., 2000; Picardeau et al., 2008).

1.1.2. Fatores de virulência das leptospiiras

As leptospiiras penetram ativamente através de abrasões na pele ou pelas mucosas oral, nasal, ocular e genital de homens e animais expostos aos fatores de risco (Epstein et al., 1995). Para isso, a bactéria conta com sua motilidade vigorosa e a quimiotaxia direcionada à hemoglobina (Haake, 2000; Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Vijayachari et al., 2008). Algumas enzimas como fibronectinases, fosfolipases, hialuronidases e invasinas ajudam na instalação da infecção (Matsunaga et al., 2003). Essas bactérias evoluíram de maneira a escapar da defesa imunológica dos hospedeiros. Linhagens patogênicas são capazes de penetrar através de monocamadas de células, a uma taxa significativamente superior à das não patogênicas (Barocchi et al., 2002). A translocação rápida entre células de mamíferos permite que as leptospiiras alcancem rapidamente a corrente sanguínea difundindo-se para múltiplos órgãos (Barocchi et al., 2002). Como exemplos temos as evidências encontradas por Merrien et al. (1998) de que leptospiiras virulentas podem entrar rapidamente em fibroblastos de rim e induzirem uma morte celular programada.

1.1.3. Patogênese da leptospirose

A interação da *Leptospira* com o hospedeiro animal resulta na leptospirose, em um processo dinâmico envolvendo fatores relacionados à bactéria e ao próprio hospedeiro. Entretanto, a patogenia da leptospirose nas diferentes espécies animais acometidas, ainda não está completamente elucidada (Zunino & Pizarro, 2007).

Na fase inicial ou bacterêmica, alguns dias após a infecção, os sintomas de leptospirose podem ser confundidos aos de várias outras patologias tais como gripe, dengue, febre amarela entre outras. Na segunda fase, cerca de dez dias após a fase inicial, as manifestações são extremamente amplas e incluem meningite (Everard et al., 1985), pneumonite (de Figueiredo C.M., 2001); hepatite (Natarajaseenivasjan et al., 2004), nefrite (Freitas et al., 2004; Jansen et al., 2007), pancreatite (Ko et al., 1999; Jansen et al., 2007)), eritema nodoso (Levett PN. 2001) e morte (de Lima et al., 1990; Wang; Jin; Wegrzyn, 2007; McBride et al., 2009). Os casos da “forma pulmonar grave da leptospirose” podem evoluir para insuficiência respiratória aguda, hemorragia maciça ou síndrome de angústia respiratória do adulto. Muitas vezes precede o quadro de icterícia e insuficiência renal. O óbito pode ocorrer nas primeiras 24 horas de internação (Zunino & Pizarro, 2007).

A lesão primária da leptospirose caracteriza-se por dano ao endotélio de pequenos vasos sanguíneos levando à isquemia localizada dos órgãos e resultando em necrose tubular renal, dano hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite (Adler & Moctezuma, 2010). O dano tecidual pode levar a um processo de cicatrização que é macroscopicamente observado nos rins de caninos, suínos e ovinos, na forma de manchas brancas (White Spots), (Dorjee et al., 2009; Adler & Moctezuma, 2010). A uveíte é outra seqüela bem estabelecida em animais, que normalmente aparece meses ou anos, após a exposição natural onde os principais sinais são ataques de fotofobia (sensibilidade à luz), lacrimejamento e conjuntivite. Os dois olhos são afetados e as lesões levam progressivamente à cegueira (Dziejyc, 2000; Rathinam, 2005; Verma et al., 2012).

1.1.4. Epidemiologia da leptospirose

Em 1850 foi descrita uma icterícia infecciosa, de causa desconhecida, em cães e somente em 1918 foi descoberto que o agente causal daquela enfermidade era *Leptospira* spp. (de Souza Junior, 2011). No ano de 1886, Adolph Weil e Mathieu descreveram simultaneamente o quadro clínico da leptospirose humana, como uma doença infecciosa que causava esplenomegalia, nefrite e icterícia. Por esse motivo a forma grave da doença em humanos é denominada Doença de Weil, (Confalonieri et al., 2003). O primeiro isolamento de leptospirosas patogênicas foi feito por Inada et al. (1916), no Japão, a partir do sangue de um trabalhador de mina de carvão, onde pesquisadores realizaram estudos clássicos de infecção experimental, inoculando em cobaias o sangue de um paciente com doença icterica febril. Ao

analisarem o tecido hepático dos animais, observaram a presença de bactérias espiraladas e denominaram *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Em 1917, Noguchi descobriu a presença de reservatórios animais e as formas de transmissão da doença (Wolff & Broom, 1954). No ano seguinte (1918), Noguchi e colaboradores classificaram o agente em um novo gênero: *Leptospira* (leptós do grego, fino, delicado e speira, espira, novelo). A espécie patogênica foi denominada *Leptospira icterohaemorrhagiae* e no gênero foi incluída a *Spirochaeta biflexa*, não patogênica, por similaridades morfológicas. Nesse mesmo ano, Martin e Petit desenvolveram um método para diagnóstico da leptospirose, com base nas propriedades aglutinantes do soro de pacientes acometidos pela doença. A técnica foi então denominada de aglutinação por lise e é atualmente conhecida como reação de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) e usada na classificação sorológica.

Estudos têm demonstrado que o aumento dos surtos epidêmicos está diretamente relacionado com a explosão demográfica, fatores socioeconômicos e ambientais (Murray et al., 2009). Embora tenha ampla distribuição mundial, a leptospirose é mais frequente em regiões tropicais do que em regiões de clima temperado (Levett, 2001; Brown et al., 2008; Slack et al., 2010). Isto ocorre, sobretudo, em razão das condições de calor e umidade que favorecem a manutenção da bactéria no meio ambiente. A leptospirose é sazonal nos países de clima tropical com maior incidência nos períodos chuvosos ou após desastres naturais, tendo como fator potencializador a ocorrência de enchentes e inundações propiciando condição para disseminação do agente da doença em áreas urbanas, (Sanders et al., 1999; Ko et al., 1999; Barcellos & Sabroza, 2001; Costa et al., 2001; Sarkar et al., 2002; Tassinari et al., 2004; Jansen et al., 2007).

Vasconcelos, (2000) classifica a doença segundo três ambientes básicos (rural, silvestre e urbano) de acordo com os grupos de animais e as variáveis ambientais, manifestando-se na população animal sob a forma de surtos epidêmicos ou permanecendo dentro de um limite de endemicidade. Representando, portanto, uma importante questão de saúde pública.

O homem pode se infectar pelo contato direto (animais de estimação, exposição direta aos fluidos e secreções animais, trabalhos em granjas ou matadouros) ou indiretamente, através do ambiente (água, solo).

Há muitos anos epidemias e surtos, associados à doença febril com hemorragia pulmonar e alta letalidade têm sido fartamente relatados em humanos (Zaki & Shieh, 1996). A letalidade depende, entre outros fatores, das sorovariedades infectantes, da gravidade da

forma clínica, da precocidade do diagnóstico, do tratamento prescrito e da faixa etária do paciente. As formas graves da doença produzem uma taxa de letalidade que pode variar entre 5% e 40% (Zunino & Pizarro, 2007). É importante salientar que ocorre uma estreita relação entre determinadas sorovariedades e algumas espécies animais. Por isso, a investigação para identificar a sorovariedade circulante de *Leptospira* pode indicar a provável fonte de infecção entre os animais (Pereira et al., 2000).

Vem sendo demonstrado que no ambiente silvestre diversos animais selvagens apresentam sorologia positiva, podendo indicar a presença do agente etiológico, o que contribui para a permanência do ciclo de infecção (de Souza Júnior et al., 2006; Jansen et al., 2007). Existem relatos de casos de leptospirose humana contraída neste ambiente, associados com atividades de recreação em águas naturais, compartilhadas por animais silvestres e de produção pecuária (de Lima et al., 1990; Sarkar et al., 2002; Tassinari et al., 2004; Jansen et al.; 2007; Brown et al., 2008; Yoder et al., 2010).

Nos centros urbanos o crescimento desordenado e maior produção de lixo propiciam condições ambientais favoráveis para a reprodução da população de roedores, considerados principais reservatórios das leptospiras sendo de especial importância a espécie *Rattus norvegicus*, conhecida como ratos de esgotos, à qual é atribuída a maior responsabilidade pela transmissão (de Figueiredo, 2001; Tassinari et al., 2004). Nas grandes cidades, as redes pluvial e de esgotos, que com frequência se interconectam e não recebem tratamento adequado, funcionam como criadouros dos animais reservatório, possibilitando uma maior contaminação ambiental (Possas, 2000; Sarkar et al., 2002). Contudo, outros animais, especialmente os cães, participam dessa cadeia de transmissão. Estes, quando infectados, podem eliminar leptospiras por meio da urina, durante meses, sem apresentar sintomas (Batista et al., 2004; Freitas et al., 2004; Blazius et al., 2005; Brown et al., 2008). Em áreas rurais o cão também exerce um importante papel na cadeia de transmissão, mas outros animais de produção, como bovinos, suínos, equinos, bubalinos, caprinos e ovinos são susceptíveis à infecção e participam da transmissão da bactéria para o ambiente e por meio do contato com outros animais e trabalhadores do setor agropecuário (Vasconcellos, 2000; Homem et al., 2001).

Após serem eliminadas, na urina de animais hospedeiros e/ou reservatórios, as leptospiras podem sobreviver por meses em água limpa ou solo úmido, aguardando oportunidade de penetrarem em novos hospedeiros, através das membranas mucosas ou

abrasões da pele. Nos hospedeiros acidentais o resultado da infecção é potencialmente fatal (Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005; Pinne & Haake, 2013) (Figura 2).

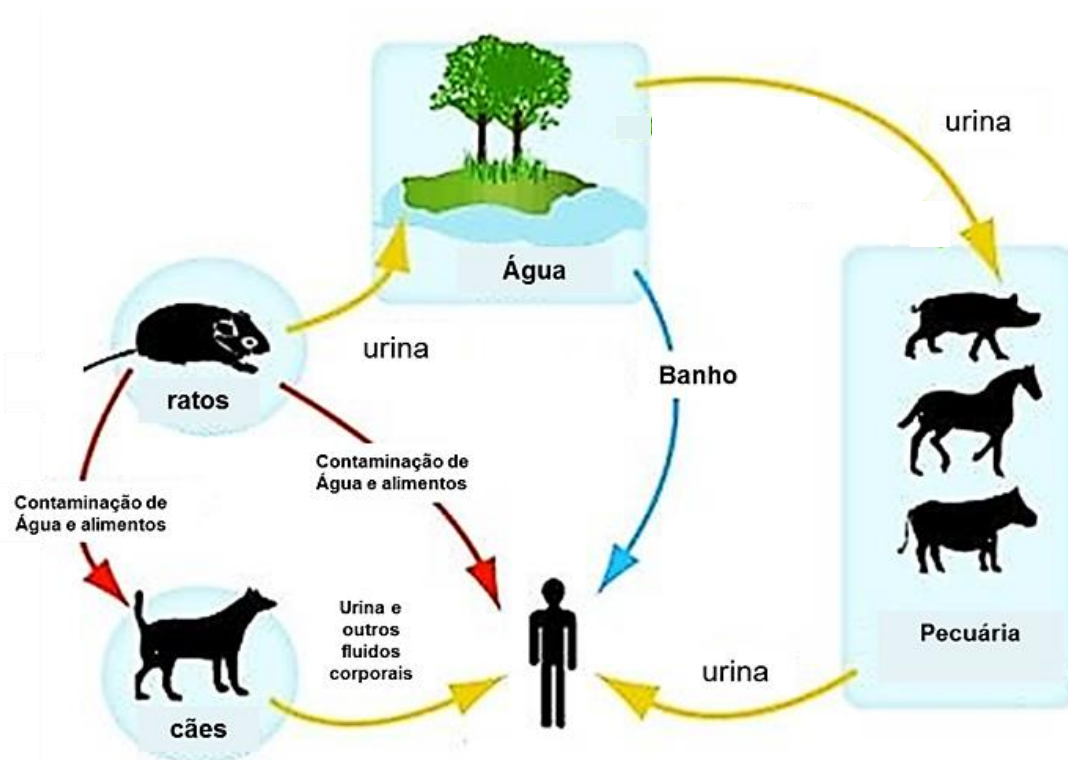


Figura 2: Ciclo da contaminação por leptospirosas. A figura esquematiza o ciclo da leptospirose na qual os ratos são os principais reservatórios e transmissores indiretos da zoonose para humanos e outros animais. Adaptado de <<http://www.imaxio.com/index.php>>.

O Brasil apresenta algumas condições favoráveis à manutenção das leptospirosas no ambiente, destacando-se o clima tropical úmido, a debilidade sanitária, principalmente nas periferias urbanas onde ocorre vasta população de animais reservatório do agente etiológico (Evangelista & Coburn, 2010). Os primeiros registros de leptospirose humana, no Brasil, ocorreram no período compreendido entre 1910 e 1940, tendo sido inicialmente confundida com febre amarela. Infecções e formas graves da doença foram reconhecidas na década de 1930. Após 1960, vários surtos urbanos foram relatados nas grandes cidades brasileiras (Gonçalves et al., 2006).

A partir de 1985 a leptospirose tornou-se uma doença de notificação compulsória no Brasil. Segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica (SVE), até 2005 foram confirmados 60.753 casos com 6.778 óbitos (FUNASA - Boletim eletrônico Epidemiológico) com maior ocorrência entre o grupo etário de 20 a 49 anos. O coeficiente de incidência no país foi de 1,7/100.000 habitantes e a letalidade média, de 12% (Sistema Nacional de Vigilância em

Saúde, BVS). A Região Sul detém o maior coeficiente de incidência e a Região Centro-Oeste, o menor.

Nos últimos anos, constatou-se aumento das notificações da doença em vários países do mundo: Nicarágua, Austrália, Estados Unidos, Índia, Sudeste da Ásia e Brasil. Aproximadamente dez mil casos são notificados por ano nas grandes metrópoles da América Latina, sendo uma das epidemias urbanas mais frequentes (Levett, 2001; Tassinari et al., 2004; McBride et al., 2005). Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), em média, 500 mil casos de leptospirose humana são confirmados no mundo, por ano, com uma taxa de mortalidade em torno de 10%, entre os casos graves (Murray et al., 2009^a).

Apesar de a leptospirose humana ser uma doença de notificação obrigatória, muitos surtos ainda não são confirmados devido à dificuldade no diagnóstico. A identificação laboratorial da leptospirose humana e animal é principalmente sorológica uma vez que o isolamento da bactéria é pouco sensível e demorado. A reação de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) é o método diagnóstico recomendado pela OMS. Entretanto, a SAM apresenta desvantagens tais como: (a) ser um procedimento laborioso, necessitando da manutenção de leptospiras vivas de diferentes sorovariedades para serem utilizadas como antígenos; (b) apresentar reações cruzadas entre as sorovariedades do mesmo sorogrupo; (c) ter a interpretação dos resultados subjetiva. Além disso, a sorologia de animais com infecções crônicas pode exibir resultado negativo e, eventualmente, uma infecção ativa nesses animais pode não apresentar títulos de anticorpos detectáveis pela SAM (Vinh et al., 1999).

É importante ressaltar que, essa zoonose tem causado perdas econômicas significativas aos proprietários de rebanhos bovinos, equinos, suínos, caprinos e ovinos em todo o mundo, principalmente pelas infecções crônicas, mais comuns, na qual as bactérias se multiplicam nos túbulos renais e são eliminadas por longos períodos. A maioria das infecções por *Leptospira* é subclínica e a principal fonte de infecção é um animal infectado, silvestre e ou doméstico, que contamina o pasto, a água e os alimentos, via urina (Levett, 2001). O estado de carreador renal crônico de leptospira é considerado o principal fator da persistência e epidemiologia da leptospirose (Adler & Moctezuma, 2010).

1.1.4.1. Vias de infecção e formas de transmissão da leptospirose em cães.

A transmissão direta de leptospiras de um canino infectado para outro suscetível pode ocorrer devido ao hábito de se lamberem (urina, descarga uterina pós-aborto e fluidos

placentários), pelo contato sexual ou transplacentariamente. Os animais podem ser indiretamente infectados por ingestão de água e alimentos contaminados pela urina de outros animais portadores, principalmente ratos e pelo consumo de carcaças de animais infectados. Os cães de vida livre adquirem o hábito de se alimentarem de restos de comida ou beberem água poluída, ficando expostos aos agentes infecciosos. Neste contexto, os cães podem ser considerados uma das principais fontes de infecção para o homem, disseminando a bactéria pela urina por meses sem apresentarem sinais clínicos (Blazius et al., 2005).

1.1.4.2. Epidemiologia da leptospirose canina no Brasil

O Brasil é o segundo maior país do mundo em número de cães, com uma população estimada em torno de 32 milhões de animais. Estudos sorológicos realizados na população canina brasileira têm demonstrado o caráter endêmico da leptospirose nesses animais (Chapola et al., 2005; Silva et al., 2009; Castro et al., 2011; Fonzar et al., 2012; Lavinsky et al., 2012). As taxas sorológicas encontradas pelos autores acima citados variaram de 13,1 a 35%, com uma média de 26% e as sorovariedades mais prevalentes incluem: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa* e *Autumnalis*. Entretanto, é importante ressaltar que a leptospirose canina pode ser causada por qualquer sorovariedade dentre as 268 já descritas. Apesar de estes resultados apontarem o caráter endêmico da leptospirose canina no Brasil, não existem estimativas quanto ao número de cães infectados. Este fato tem gerado discussões a respeito da efetividade, da eliminação do *status* de portador renal crônico e duração da cobertura das vacinas existentes contra a leptospirose nestes animais. Além disso, houve apenas dois relatos de proteção conferida por uma bacterina clássica (10 meses e 13 meses) contra a sorovariedade *Canicola* (Minke et al., 2009). Assim, inúmeros fatores devem ser considerados no desenho e avaliação de vacinas contra a leptospirose canina. Esses fatores incluem a idade dos cães, esquema de vacinação recomendado, seleção da linhagem e da técnica de desafio, bem como do modelo animal a ser testado (Minke et al., 2009).

Existem indicações de que a leptospirose canina tem aumentado significativamente nos últimos anos em vários países e está sendo considerado um importante problema de saúde pública no mundo. Apresentando uma prevalência variável conforme a região, os cães estão ocupando o segundo lugar como carreadores de leptospiras, perdendo apenas para os ratos (Brod et al., 2005; Stokes et al., 2007; Vanasco et al., 2008). Vale ressaltar também que, nas

últimas décadas, o contato de humanos com os cães tem aumentado significativamente a ponto de algumas pessoas considerarem este animal parte integrante da família. A exposição e o convívio do homem com os cães poderão torná-lo vulnerável à infecção por *Leptospira*.

1.1.5. Resposta imunológica dos hospedeiros à infecção por leptospiras.

Em caninos, a primeira resposta imunológica à infecção por *Leptospira* spp. acontece logo após o término da fase bacteriêmica, quando os anticorpos aglutinantes do tipo IgM são detectados no soro, geralmente de dois a dez dias pós-infecção, dependendo das condições imunológicas do hospedeiro e da sorovariedade infectante. Os cães desenvolvem título elevado de IgM maior que 1:320 na fase aguda da leptospirose (Merien et al., 1998). Após vários dias, um segundo grupo de imunoglobulinas, as IgG, provocam a lise das leptospiras circulantes por opsonização, resultando na remissão dos sinais clínicos, sendo verificada no entanto, a persistência do agente nos rins e trato reprodutivo, podendo ser eliminadas na urina por vários meses após a infecção (Vinh et al., 1999). A proporção de anticorpos IgM e IgG na fase convalescente após a imunoestimulação varia dependendo da sorovariedade e esta resposta imune humoral frente à exposição ao agente, pode ser demonstrada em testes sorológicos com uma maior atividade de anticorpos da classe IgM e IgG, após infecção natural ou imunização (Strasser et al., 2003).

A formação de anticorpos do tipo IgM ocorre principalmente frente a antígenos proteicos de membrana externa (*Outer membrane proteins* - OMPs) de baixo peso molecular, de 14 a 45 quilodaltons (kDa), enquanto que a formação de anticorpos do tipo IgG ocorre contra antígenos de peso molecular entre 31 kDa-82 kDa. Os mecanismos humorais envolvem a opsonização das leptospiras e fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Vinh et al., 1999). Os macrófagos conseguem fagocitar as leptospiras não patogênicas sem a presença de anticorpos específicos. Já as amostras patogênicas precisam estar opsonizadas para que ocorra a fagocitose por estas células (Strasser et al., 2003). A interação macrófagos, complemento e anticorpos específicos, seriam responsáveis pelo efeito bactericida sobre linhagens patogênicas (Wang; Jin; Wegrzyn, 2007).

As OMPs e os LPS localizados na membrana externa da bactéria são os principais antígenos que conferem imunidade à *Leptospira*. Porém, a resposta predominante é humoral e sorovariedade específica, tanto em humanos quanto em animais, incluindo caninos, bovinos, equinos, suínos e hamsters. Indivíduos que contraem leptospirose ficam protegidos contra a

reinfeção pela mesma sorovariedade ou por sorovariedade do mesmo sorogrupo, por certo período de tempo (Levett, 2001). Com relação ao envolvimento das OMPs na resposta imune humoral um estudo em soro humano mostrou que os principais antígenos de *Leptospira* reconhecidos incluem as lipoproteínas LipL32, e LipL41 e proteínas de choque térmico, obtidas da fração citoplasmática das bactérias, como GroEL e DnaK (Guerreiro et al., 2001). Com efeito, ensaios realizados em culturas de células dos túbulos renais indicaram que a LipL32 induz uma resposta inflamatória. Por outro lado, estudos *in vivo* demonstraram também que esta lipoproteína é o alvo principal da resposta imune humoral em animais e no homem, sendo expressa nos rins destes (Yang et al., 2002).

Infecção por *Leptospira* pode induzir nefrite aguda e insuficiência renal, causada diretamente pela invasão do organismo nos rins. São os LPS, glicolipídios e lipoproteínas que determinam a virulência em leptospirosas patogênicas, sendo os principais alvos das respostas imunes (Schröppel & He, 2006). Os LPS de *Leptospira* são altamente imunogênicos sendo também os principais antígenos envolvidos na resposta sorológica. São eles e não as lipoproteínas, o componente predominante de sinalização para os macrófagos através da via TLR2 e a liberação de Interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos estimula a diferenciação de linfócitos T- CD4+, produtoras de IFN- γ , em células Th1, induzindo o sistema imune celular na leptospirose (Schröppel & He, 2006).

São também os TLR, que controlam a ativação da resposta imune adaptativa, na leptospirose reconhecendo especificamente padrões moleculares associados aos patógenos (MAMPS) expressos, tais como LPS, lipoproteínas e peptidoglicanos (Schröppel & He, 2006; Yang et al., 2006). A sinalização mediada pelo TLR ativa as vias de transdução de sinal, fator nuclear κ B, fator nuclear p38, IL-6 e fator regulatório de interferon, que induzem a expressão de citocinas, quimiocinas e proteínas celulares de membrana, relacionadas à resposta inflamatória (Schröppel & He, 2006).

Infecções em linhagens de camundongos, deficientes para TLR4 (C3H/HeJ-SCID), causaram sua morte por icterícia e hemorragia pulmonar tal como no doente de leptospirose aguda, a partir do qual o isolado foi obtido. Ao contrário, na infecção controle, as linhagens selvagens contraíram a doença na forma crônica. Leptospirosas mortas pelo calor estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. Porém, em estudo *in vitro* foi demonstrado que o estímulo dessas citocinas é dependente da sinalização pela via TLR4 (Chassin et al., 2009).

As espécies patogênicas de *Leptospira* expressam inúmeras proteínas durante o processo de infecção em mamíferos, algumas dessas proteínas já foram clonadas e caracterizadas, incluindo proteínas de membrana externa, lipoproteínas OmpL1, Lsa24, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45, LipL48, LigA, LigB, Loa22, LruA e LruB (Zuerner et al., 2000; Yang et al., 2002; Verma et al., 2005.; Barbosa et al., 2006; Palaniappan et al., 2007; Nally et al., 2007; Hauk et al., 2008; McBride et al., 2009; Zhang et al., 2010; Hauk et al., 2011; Hauk et al., 2012).

A utilização de técnicas de biologia molecular possibilitou que antígenos recombinantes fossem testados em animais de laboratório, em processos vacinais. Já foram produzidas algumas vacinas a partir de proteínas de membrana externa (OMPs) de *Leptospira kirschneri*, tais como as de choque térmico, Hsp58; as porinas transmembrana, OmpL1; as lipoproteínas de 41 kDa (LipL41); de 36 kDa (LipL36) e de 32 kDa (LipL32) (Haake et al., 2000; Verma et al., 2005.; Koizumi & Watanabe, 2005; Palaniappan et al., 2007; McBride et al., 2009; Zhang et al., 2010; Yan et al., 2010).

Os estudos sobre as proteínas de membrana de *Leptospira* têm sido extremamente importantes uma vez que essa bactéria expressa extensivamente essas proteínas durante o processo de infecção. As leptospiras podem sobreviver muito bem fora ou no interior de um hospedeiro e algumas proteínas da membrana externa têm sido encontradas nos dois ambientes, porém, reguladas diferencialmente sob condições *in vivo* e *in vitro* (Palaniappan et al., 2007).

Em 1993, foi relatado o primeiro efeito imunoprotetor de uma proteína OMP de 31 kDa, a OmpL1 da superfície da leptospira (Haake et al., 1993). Seis anos depois, em 1999, novos estudos usando como modelo o *Golden Syrian Hamster* comprovaram os efeitos imunoprotetores das OmpL1 e lipoproteínas LipL41 (Haake et al., 1999). Porém, em 2001 foi observado que vacina construída com adenovírus carregando a proteína OmpL1 não foi capaz de proteger roedores contra a infecção por leptospira, diferentemente daquela produzida com adenovírus ligado ao gene *hap1* (*lipL32*), que induziu uma proteção significativa (Branger et al., 2005). Esses antígenos foram adicionalmente avaliados, em amostras de soro humano, pela técnica ELISA IgM e IgG. Os melhores resultados de sensibilidade e especificidade foram apresentados pelo antígeno recombinante LipL32 (rLipL32) em soros de caninos e de bovinos com suspeitas clínicas de leptospirose e demonstraram sensibilidade e especificidade que variaram entre 97 e 100%, respectivamente (Dey et al., 2007).

A lipoproteína (LipL32) também conhecida como proteína associada à hemolisina (Hap1) é considerada a principal OMP de *Leptospira*, cuja sequência e expressão é altamente conservada, expressa *in vivo*, encontrada exclusivamente nas espécies patogênicas e altamente imunogênica. LipL32 exibe padrão de 32 kDa em gel mas a massa molecular da proteína madura é de 27,6 kDa (Haake et al., 2002). Além disso, LipL32 é a proteína mais abundante do perfil proteico desta bactéria, apresentando cerca de 38.000 cópias por célula, número muito maior que as outras proteínas estruturais como as flagelinas (FlaB) que apresentam até 20.000 cópias (Malmstrom et al., 2009), sugerindo que essa proteína exerce uma função importante (Haake et al., 2000^b; Verna et al., 2005; Palaniappan et al., 2007; McBride et al., 2009; Zhang et al., 2010).

As sequências de LipL32 de espécies patogênicas, quando comparadas com as espécies de patogenicidade intermediária (*L. broomii*, *L. inadai* e *L. liceraceae*), apresentaram apenas 67% de identidade (Haake et al., 2000). Análise cristalográfica de LipL32 mostrou uma estrutura globular compacta com forma “*jelly-roll*” que se cristaliza como dímero, contendo duas seções de cargas eletronegativas na superfície, que poderiam mediar interações com ligantes carregados positivamente, tais como a laminina. Mesmo não possuindo sequência semelhante a nenhuma outra proteína conhecida, LipL32 apresenta homologia estrutural com adesinas que se ligam à matriz extracelular de outras bactérias (Hauk et al., 2009^{a,b}; Vivian et al., 2009).

LipL32 é o antígeno dominante na resposta humoral de 95% dos pacientes com leptospirose (Flannery et al., 2001; Guerreiro et al., 2001; Luo et al., 2009). Foi demonstrado que anticorpos monoclonais de LipL32 exercem proteção passiva contra leptospirose em hamsters (Maneewatch et al., 2008). Uma vacina de LipL32, das sorovariedades Autumnalis e Grippytyphosa foi expressa em Adenovírus, mostrando-se promissora ao induzir significativa proteção, durante a fase aguda da doença, no modelo murino gerbil, desafiado com a sorovariedade Canicola (Branger et al., 2005). Pesquisas apontaram que a combinação da LipL32 com outros antígenos leptospirais, como por exemplo a hemolisina HlyX, poderia ser utilizada para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose (Branger et al., 2005). Lucas et al., (2011) investigando a capacidade das proteínas da superfície de leptospirosas, LipL32 e LigA, atuarem como protetores vacinais em hamsters, amplificaram as regiões entre 155-200 pb, do gene *lipL32* e os seis domínios carboxi-terminal da proteína LigA (Ig-like repeat domains) LigANI de *L. interrogans* sorovariedade Manilae. Os autores fusionaram as sequências de *lipL32* e de *ligANI* e induziram a expressão dessa proteína. Testaram em

hamsters uma vacina comum, de *Leptospira* integral morta por formalina; uma vacina com a porção 155-200 pb da proteína LipL32 purificada e outra com a proteína resultante da fusão LipL32-LigANI, também purificada. Não obtiveram proteção com a vacina das proteínas e apenas os animais que receberam a vacina convencional não contraíram leptospirose, após desafio. Em uma pesquisa mais direta Murray et al. (2009^b), construíram linhagens de leptospirosas mutantes para o gene LipL32 e inocularam, via sistêmica e mucosa em hamsters. Os autores observaram, porém, que a linhagem mutante para LipL32, causou a doença na forma aguda, do mesmo modo que a linhagem tipo selvagem, concluindo que LipL32, não tem participação na infecção aguda das leptospirosas.

Novos estudos visam identificar alterações na expressão de LipL32, *in vitro* e *in vivo* e os mecanismos envolvidos na sua interação com proteínas da superfície das células. Supõe-se que a proteína LipL32 pode não estar totalmente disponível na superfície da célula, uma vez que é mais fácil detectá-la em material lisado (Cullen et al., 2005; Chaemchuen et al., 2011). Induzindo-se proteólise da superfície de leptospirosas não ocorre digestão de LipL32, na concentração da enzima capaz de digerir proteínas reconhecidas expostas na superfície da (*Outer membrane* – OM), tais como, OmpL47 e OmpL37, contudo, ela foi digerida nas células previamente lisadas. Outros testes de reconhecimento de anticorpos anti-LipL32 em células, cujas membranas foram previamente lisadas por metanol, confirmaram que a maior parte dessa lipoproteína não está exposta na superfície da célula. A consequência da não exposição de LipL32 é a não ativação do sistema de complemento e opsonização das bactérias (Lottersberger et al., 2009; Pinne & Haake, 2013). Análise por imunofluorescência da superfície de leptospirosas, realizada após apresentação a três tipos de anticorpos, revelou que LipL32 é reconhecida pelo anticorpo monoclonal específico ou anticorpos de pacientes, somente após permeabilização da membrana externa OM, expondo as frações da proteína, localizadas abaixo da superfície celular. Pela marcação obtida por imunofluorescência foi mostrado que soro de coelho anti-LipL32 reconhece fracamente a proteína em células integrais, em comparação com células permeabilizadas (Pinne & Haake, 2013). A geração de anticorpos anti-LipL32 não comprova sua exposição na superfície, uma vez que a ocorrência de resposta imune está relacionada à frequente presença de proteínas citoplasmáticas *Chaperones "Folding"*, tais como GroEL e DnaK, durante a infecção e inclusive durante a leptospirose. Então é possível que a função de LipL32 seja alterada por modificações pós-traducionais (Guerrero et al., 2001).

O potencial humoral de LipL32 não possibilitou desenvolver proteção significativa contra a morte por *Leptospira*, apesar de induzir intensa resposta de anticorpos. Além disso, ainda não existem estudos comparativos, sobre a resposta protetora e não protetora, em animais vacinados com a lipoproteína LipL32. Análise da resposta humoral pode levar à identificação de alterações nos epítopos reconhecidos pelos anticorpos, para que uma vacina seja bem direcionada (Murray, G.L., 2013^a).

No ano 2003, Koizumi e Watanabe^b investigaram fatores determinantes que poderiam exercer função na virulência da sorovariedade Manilae de *L. interrogans*. Um deles é uma proteína, com peso molecular de 22 kDa, que possui um domínio OmpA na região carboxi-terminal e é fortemente reconhecida por soros de pacientes humanos com leptospirose. Foi denominada Loa22 e está posicionada na membrana externa em direção ao espaço periplasmático, expondo apenas uma pequena parte na superfície.

Em estudos recentes, Yan et al. (2010) investigaram a atividade protetora de um grupo de seis proteínas da membrana externa de *Leptospira interrogans*, sorovariedade Pomona, que possuem domínio OmpA-like tal como a Loa22. Todas elas foram expressas, purificadas e inoculadas em grupos de oito hamsters (seis para desafio e dois para controle) com 50µg de cada proteína purificada. As análises indicaram que atividade protetora foi conseguida com três das proteínas testadas, em duas repetições dos testes. Uma delas foi a Lp0222, que em outras bactérias atua como proteína multifuncional, envolvida na adesão celular, invasão e indução da resposta imune. Sua sequência correspondeu à Loa22, descrita por Koizumi e Watanabe (2003^b).

Ristow et al. (2007) obtiveram uma *Leptospira* com mutação, determinada por um transposon de origem eucariótica (*Himar1*), que inseriu uma sequência dentro do gene *loa22*. Essa *Leptospira* mutante não expressou a proteína Loa22 e teve a virulência atenuada em hamsters. Após a restauração do gene, a linhagem geneticamente complementada teve a expressão e virulência reativadas, demonstrando que Loa22 é expressa durante a infecção no hospedeiro e é necessária para a virulência de *L. interrogans*, além de ser o primeiro fator de virulência definido geneticamente.

Para investigar a função de Loa22 na leptospirose, Barbosa et al. (2006) compararam a capacidade das proteínas Lsa24 (*Leptospiral Surface Adhesin 24*) e a Loa22 (*OmpA like protein*) aderirem *in vitro* aos componentes da matriz extracelular (laminina, colágeno tipo IV e fibronectina), em relação ao índice de adesão à BSA (soroalbumina bovina) imobilizada.

Lsa24 aderiu fortemente à laminina, proporcionalmente à quantidade da proteína usada, já a adesão de Loa22 foi moderada em todos os componentes testados, comprovando que essa proteína não exerce importante função na adesão da bactéria aos hospedeiros.

Nally et al. (2007) testaram a expressão de proteínas de leptospiras patogênicas, obtidas do soro de pacientes humanos, quando inoculadas em porcos da Índia e observaram substancial aumento na expressão das proteínas Loa22 e LipL32, durante a fase aguda da infecção.

Zhang et al. (2010) investigaram os efeitos citotóxicos da proteína Loa22 sintetizada em *E. coli* e purificada sobre células (NRK52E) de túbulos proximais de rins de ratos e concluíram que Loa22 estimula a expressão de TLR2 e, na ausência deles estimula a produção de MCP-1 e NO (óxido nítrico), sugerindo ser um importante fator de virulência e incrementador de respostas inflamatórias. É interessante observar que Picardeau et al. (2008) encontraram genes ortólogos de Loa22 na espécie saprofítica, *L. biflexa*, apresentando 73% de similaridade na sequência gênica.

Os resultados obtidos com LipL32 e Loa22 influenciaram a escolha dos genes destas proteínas para a elaboração deste trabalho. Por outro lado, as estratégias vacinais utilizadas pelos diferentes autores com essas proteínas, não foram suficientes para a obtenção de uma proteção total dos animais desafiados. Além disso, foi possível perceber que o sucesso parcial obtido nas diferentes pesquisas, até então, estava relacionado à escolha do vetor vacinal. Neste sentido, buscando na literatura algum vetor que pudesse oferecer vantagens adicionais, em relação aos que já foram utilizados, encontramos vários trabalhos publicados nos quais os *Lactobacillus* spp foram apontados com potencial para serem excelentes vetores vacinais (Pouwels, Leer, Boersma, 1996; Christensen et al., 2002; Seegers, J. F. M. L., 2002; Mohamadzadeh et al., 2005; Stoeker et al., 2011; Maidens et al., 2013).

1.1.6. Vacinas contra leptospirose

Nos últimos 50 anos, alguns tipos de vacinas contra a leptospirose animal foram desenvolvidos em laboratórios de pesquisa em todo o mundo. Entretanto, as vacinas de uso veterinário ainda apresentam problemas de segurança e eficiência. Para uso humano, somente em Cuba e na China foram autorizadas algumas vacinas que mostraram eficácia de 78% e 75%, respectivamente, prevenindo a manifestação clínica da doença pelo período de um ano (McBride et al., 2005). Tal como a vacina para animais são baseadas na célula integral

(suspensões de uma ou mais sorovariedades patogênicas) e denominadas bacterinas, constituídas de leptospiros inativadas, por métodos químicos, por aquecimento ou pela atenuação da bactéria através de muitas passagens em meios de cultivo, mantendo a atividade imunogênica. Estas vacinas têm como vantagens a incapacidade de replicação da bactéria dentro do hospedeiro e serem bem toleradas. Porém, elas induzem respostas sorológicas baixas e pouco duradouras, em torno de seis a doze meses, sendo necessária a revacinação duas vezes por ano, para manutenção da imunidade (Bharti et al., 2003; Nascimento et al., 2004^a; Koizumi & Watanabe, 2005). De fato, praticamente não houve avanço com relação à melhoria da cobertura vacinal e as revacinações periódicas são praticamente inviáveis quando em grandes criações (Koizumi & Watanabe, 2005).

Com base no fato de que as bactérias integrais são as principais responsáveis pelas reações pós-vacinais, as bacterinas atuais, ao invés de utilizarem a célula integral do microrganismo, usam apenas as proteínas imunogênicas do envoltório, conferindo maior segurança. Assim, as frações da *Leptospira* nas bacterinas para cães, comercializadas no Brasil, geralmente são preparadas a partir de componentes de membrana externa, por meio da tecnologia OMC (Outer Membrane Complex), na qual são extraídos os antígenos imunogênicos. Todavia essas vacinas são restritas a poucas sorovariedades não fornecendo proteção cruzada contra aquelas pertencentes a sorogrupos não contidos na formulação, mas que podem, eventualmente, causar a leptospirose (Wang et al., 2007).

Com relação às vacinas atenuadas, embora a maioria das vacinas comerciais atuais confira relativa segurança e eficácia, existem as exceções nas quais a doença pode ser induzida pela própria vacina ou não forneçam proteção adequada para o animal (Jansen, 2007). Vacinas atenuadas podem ser obtidas a partir de leptospiros vivos, que foram submetidas a inúmeras passagens em meios de cultivo. Estas são capazes de induzir títulos de anticorpos mais elevados do que os induzidos pelas bacterinas, mas ainda não conseguiram aceitação dos laboratórios farmacêuticos devido aos riscos de reversão da virulência. A inocuidade e a ausência de riscos de reversão no seu uso mantêm as vacinas “mortas” como uma opção segura e preferida em muitos casos, sendo esta a razão de sua utilização na leptospirose animal (Lamphear et al., 2002).

Na preparação de bacterinas antileptospíricas devem estar contidas as principais sorovariedades que acometem cada espécie animal, numa dada região geográfica. As sorovariedades comumente encontradas nas vacinas comerciais contra a leptospirose canina são: *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*. Entretanto, cães vacinados regularmente com essas

bacterinas, não estão totalmente protegidos, podendo apresentar insuficiência renal aguda ou hepática, decorrente da leptospirose causada por outra sorovariedade (Wolgemuth et al., 2006). Vale ressaltar que bacterinas induzem proteção contra a doença clínica, mas nem sempre protegem do estado de portador renal crônico (de Souza Junior et al., 2002). Portanto, é um desafio para pesquisadores o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra leptospirose (Guerreiro et al., 2001; Gordon, 2002).

A utilização de novas estratégias para a produção de vacinas contra a leptospirose tem sido a meta de muitos pesquisadores e, nesse sentido, a engenharia genética tornou-se uma atraente alternativa para o melhoramento das vacinas já existentes, bem como no desenvolvimento de vacinas recombinantes. Entre estas estão as vacinas de DNA, as vetorizadas e as de subunidades. Na vacina de DNA está contida uma ou mais sequências do material genético do agente infeccioso, que codificam antígenos imunodominantes. Além disso, são estáveis, têm baixo custo de produção e não oferecem risco infeccioso (Dhama et al., 2008). Contudo, a vacina de plasmídeos contendo DNA, para proteínas antigênicas, apresenta a possibilidade de recombinação e indução de tolerância em neonatos. Por isso, ainda não foram liberadas, pelos órgãos da saúde, para uso humano ou veterinário. As vacinas recombinantes têm como base microrganismos vivos (vírus, bactérias, etc...) carreando e/ou expressando genes de antígenos de outros organismos. Este tipo de vacina apresenta algumas limitações: no uso de bactérias como veículos do material genético, a exibição de antígenos da superfície da célula, poderá sobrecarregar o sistema imunológico do indivíduo com resposta imune desnecessária. Elas podem ainda apresentar problemas de proliferação do agente veicular, no caso de vírus, ou reversão de patogenicidade, quando são usadas bactérias patogênicas atenuadas como veículos. As vacinas de subunidade são baseadas na produção de proteínas recombinantes heterólogas, o que pode ser feita tanto em organismos procariotos como em eucariotos. Uma vez expressas, essas proteínas antigênicas podem ser rapidamente purificadas e administradas (Seixas et al., 2007).

A inoculação de proteínas imunogênicas, somada à utilização de um adjuvante amplamente testado, poderá aumentar significativamente o potencial de indução do sistema imunológico gerando tanto resposta imune celular quanto a humoral, pela produção de anticorpos específicos (Vajdy et al., 2004; Freytag & Clements., 2005; Holmgren & Czerlinsky, 2005).

1.1.7. Vacinas orais

O desenvolvimento de sistemas de vacinação por via oral é pré-requisito para indução de imunidade protetora contra a maioria dos patógenos entéricos de mucosas de homens e animais. Com raras exceções, as vacinas contra patógenos e toxinas sistêmicas, em uso atualmente, são veiculadas por via parenteral (Powels et al., 1998).

As vacinas tradicionais via parenteral, são produzidas com a célula ou partícula integral, do microrganismo, inativada por formalina ou pelo calor ou de subunidades desses agentes etiológicos, resultando em menor efeito colateral. Essas vacinas são eficazes na prevenção de doenças, que necessitam de anticorpos séricos circulantes (tétano, varíola, difteria, coqueluche, febre amarela, hepatites, etc.); entretanto não são capazes de gerar resposta imune local com a produção de sIgA, em mucosas. Uma alternativa para o controle dessas e muitas doenças seria o desenvolvimento de vacinas capazes de induzir proteção imunológica, diretamente na área mucosa, em contato com o antígeno (Brandtzaeg, P., 2009).

Já está comprovado que a aplicação de vacinas via mucosa apresenta inúmeras vantagens sobre as tradicionais, tais como: ter potencial para conferir imunidade tanto mucosa como sistêmica; maior estabilidade e tempo de estocagem e não haver necessidade da agressão por agulhas nem pessoas treinadas para aplicação (Freytag & Clements, 2005). As vacinas orais apresentam inúmeras vantagens em relação às vacinas parenterais: a administração oral é mais conveniente, segura e pode ser realizada em larga escala sem grandes custos. Outra questão importante é que diversos patógenos, incluindo bactérias, vírus e parasitas, invadem os hospedeiros através das superfícies mucosas ou mesmo transitam por estas nos estágios iniciais da infecção. Em homens e animais mais de 60% dos anticorpos protetores, encontrados nas mucosas, têm origem da produção diária local e não do *pool* sistêmico. Por isso, a imunização oral resulta na proteção contra a doença e futuras infecções (Neutra & Kozlowski, 2006). Além disso, existe evidência da ocorrência de diferentes ações imunológicas, nas mucosas de vias áreas superiores e intestinais. Em consequência, algumas vacinas com adjuvantes podem não funcionar de acordo com o esperado, quando inoculadas nas mucosas nasais, por exemplo, se devem atuar no intestino.

Previamente, o sistema imune inato era tido como de função não específica e independente do sistema imune adquirido. Recentemente, evidências demonstraram que o sistema imune inato reconhece e responde, adaptativamente, a tipos e classes de patógenos. Essa resposta específica inicia e dirige a imunidade adquirida que é conferida a patógenos

invasores. Então, as pesquisas atuais buscam desenvolver vacinas orais vivas, para obter uma ação imunológica imediata e de memória. Por isso, a importância em estudar o comportamento de genes que codificam para proteínas, que atuam como fortes antígenos (de bactérias, vírus, protozoários e outros agentes de doenças).

Os novos conhecimentos sobre o genoma e os determinantes de virulências das leptospirosas possibilitam a pesquisa de vacinas de subunidade e, com a atual possibilidade de expressão heteróloga de genes de *Leptospira* o potencial vacinal de muitas proteínas de membrana tem sido avaliado. A tendência é que, partindo da construção de sistemas de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* chegar-se à formação de técnicas de clonagem de proteínas, com potencial vacinal, que deverão ser expressas, preferencialmente, em microrganismos pertencentes à microbiota autóctone, dos indivíduos alvo da vacinação (Macpherson e Harris, 2004; 2005; del Rio et al., 2008; Bermúdez-Humarán et al., 2011).

Atualmente, a modificação genética de bactérias do ácido lático (BAL), como *Lactobacillus*, para expressar proteínas heterólogas ou para serem usadas como carreadoras de antígenos para a imunização de hospedeiros é agora um assunto promissor devido à patogenicidade quase nula e aos benefícios nutricionais destas bactérias. O sucesso da expressão de proteínas heterólogas nas BAL depende da compatibilidade do promotor entre as espécies ou linhagens. Algumas espécies de *Lactobacillus* têm recebido atenção considerável devido às suas comprovadas propriedades, quando ingeridas como probióticos. Assim, o presente trabalho teve a proposição de avaliar o desempenho de *Lactobacillus*, isolados de cães, para serem usados no desenvolvimento de uma vacina oral contra a leptospirose canina, como vetores de um antígeno recombinante para a imunização ou associado ao antígeno, como adjuvante imune.

1.1.7.1. Adjuvantes de vacinas orais

A imunogenicidade de uma vacina é definida por sua capacidade em invocar uma resposta imune no indivíduo vacinado e a utilização de adjuvantes imunológicos pode aumentar a capacidade de ligação, processamento e apresentação de antígenos às células dendríticas (DC). Tanto os adjuvantes não microbianos (sais minerais e baseados em emulsões) como os adjuvantes microbianos atuam por intermédio da interação com as DC. A maturação e comportamento das DC com os antígenos são necessários para melhor

apresentação desse antígeno e indução da resposta imune por meio da estimulação das células T. Portanto, adjuvantes que induzem a maturação das DC ativam a resposta imune através da ativação das células T.

Ainda que a função dos adjuvantes seja provocar o estímulo, ele somente será completo a partir do contato com o antígeno heterólogo exposto, sendo apresentado ao MHC, para produção de células de memória B e T. Nos processos de imunização deve haver, obrigatoriamente, uma resposta inflamatória, para que haja ativação dos mecanismos de imunidade específica (linfócitos B e T). Portanto, a escolha do adjuvante deve ser direcionada para este fim (Scheerlinck, 2001).

A resposta do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I usualmente está relacionada à resposta contra antígenos intracelulares, como os vírus e é conduzida por linfócitos T citotóxicos (CTL). Entretanto, esta resposta não é observada usualmente, contra antígenos de peptídeos. Muitos adjuvantes podem induzir uma resposta por CTL direcionada a peptídeos e vírus inativados. Por outro lado, uma resposta MHC classe II está relacionada a antígenos proteicos ou organismos inativados, induzindo a produção de anticorpos. Muitos adjuvantes são eficientes em induzir uma resposta de MHC de classe II, como por exemplo, o adjuvante de Freund (Resende et al., 2004).

O sistema imunológico animal ou humano pode se comportar de maneira diferenciada frente aos diferentes tipos de substâncias adjuvantes. Os mesmos mecanismos usados pelo organismo para proteção contra infecções podem, em situações particulares, serem causadores de doenças. Por isso, a importância do estudo individual de cada adjuvante a ser usado (Resende et al., 2004).

Desde 1926, a atividade adjuvante de compostos naturais ou sintéticos vem sendo testada em modelos animais. A utilização de substâncias adjuvantes auxilia a formação de uma resposta imune rápida, de maior intensidade e maior duração, com uma quantidade menor de antígeno, podendo diminuir os custos da produção de vacinas. Um exemplo é a produção de vacinas sintéticas e de subunidades que é muito dispendiosa. Com a utilização de adjuvantes potentes, menor quantidade de antígeno para a estimulação da resposta imune efetiva é requerida (Scheerlinck, 2001; Resende et al., 2004).

Historicamente, os melhores componentes utilizados como adjuvantes de vacinas incluem extratos de parede bacteriana (principalmente de micobactérias), óleos de parafinas, sais de metais (alumínio), endotoxinas e óleos minerais. Recentemente, lipossomos,

interferon, os complexos imunoestimuladores (ISCOMS) e citocinas têm sido testados como potenciais adjuvantes. Muitas toxinas de bactérias e proteínas da superfície de bactérias patogênicas também têm sido testadas em sua atuação como adjuvante imune (Ryan, et al., 2001).

Novos adjuvantes e sistemas de entrega têm demonstrado grande potencial para uso em vacinas via mucosas, em modelos animais e já começam ser testados em humanos. A ativação imunológica depende da interação dos receptores da superfície celular com os antígenos. As membranas mucosas, que estão em contato permanente com milhares de bactérias, pertencentes à microbiota residente, podem não responder a um antígeno exposto em organismos recombinantes ou proteína heteróloga, quando expresso pela própria célula, tal como nas vacinas de DNA. Nesse caso, é conveniente usar um microrganismo patogênico atenuado ou a sua toxina, como por exemplo: a toxina termo lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica (LT), a toxina de *Vibrio cholerae* (CT), mutantes ou atóxicas, ou usar citocinas, nas vacinas de RNA (Vajdy, et al., 2004). Já está disponível na web um banco de dados sobre adjuvantes (*Vaxjo adjuvant database*).

1.2. O GÊNERO *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* fazem parte do grupo das Bactérias Ácido-Láticas (BAL) que participam da microbiota intestinal dos mamíferos e fermentam uma variedade de nutrientes formando ácido lático como principal produto. São bactérias Gram-positivo com forma de bastonetes ou cocobacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias aerotolerantes e catalase negativo, entretanto a atividade pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens (Tannock, 1999; Felis & Dellaglio, 2007). A maioria dos lactobacilos é homo-fermentativo, tendo como produto final o ácido lático, mas existem representantes hetero-fermentativos, que produzem lactato, dióxido de carbono e etanol em quantidades equimolares. Essas bactérias são nutricionalmente fastidiosas, exigindo um meio rico em nutrientes: carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucléicos e vitaminas para crescer (Carr et al., 2002). São microrganismos ubíquos, podendo ser encontrados em uma variedade de ambientes onde existam carboidratos disponíveis para seu metabolismo. Entre os ambientes com abundância dessas bactérias podem-se citar: ambientes orgânicos como os tratos gastrointestinal, respiratório e geniturinário, vários alimentos (cereais, queijos e produtos lácteos, carne e derivados, massas, vegetais, frutas e

bebidas) e ambientes físicos como lagos, rios, esgotos (Hammes & Hertel, 2003; Felis & Dellaglio, 2007).

Os principais gêneros de Bactérias Ácido-Láticas são: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera* e *Oenococcus* (Carr et al., 2002). Taxonomicamente o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (Lilburn & Garrity, 2004). O gênero *Lactobacillus* é distribuído em 182 espécies e 27 subespécies (Euzéby, 2011). A divisão clássica do gênero está baseada em suas características metabólicas, nas quais o tipo de fermentação pode ser classificado em: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório. A composição de bases CG do DNA genômico dessas bactérias é normalmente menor que 54 mol % (Felis & Dellaglio, 2007). O conhecimento do genoma das BAL ainda é restrito, mas têm aumentado rapidamente nos últimos anos, após o sequenciamento dos genomas de *Lactobacillus plantarum* (Kleerebezem et al., 2003), *L. johnsonii* (Pridmore et al., 2004), *L. acidophilus* (Altermann et al., 2005), *L. sakei* (Chaillou et al., 2005), *L. salivarius* (Claesson et al., 2006) e *L. helveticus* (Cremonesi et al., 2012).

As BAL podem produzir bacteriocinas que têm como alvo principal as bactérias Gram-positivo, podendo também atuar contra bactérias da mesma espécie, no organismo produtor (estreito espectro de atividade) ou contra bactérias de outros gêneros (amplo espectro de atividade) (Cotter et al., 2005). As bacteriocinas das BAL são um grupo heterogêneo de compostos antimicrobianos, de natureza peptídica, formados por 20 a 60 resíduos de aminoácidos, com características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. Esses peptídeos são distintos dos antibióticos na sua síntese, modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas, mecanismos de resistência, toxicidade e origem genética (Carolissen-Mackay et al., 1997). Está comprovado que ocorre um ótimo potencial de inibição, de *Lactobacillus acidophilus* contra bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* (causador de enterite necrótica), *Salmonella* e *E. coli*. (Bruno & Montville, 1993; Cleveland et al., 2001; Han et al., 2007).

A nisina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente; também é a única aprovada internacionalmente e legalizada para utilização em alimentos (Guerra & Castro, 2003). É considerada atóxica para seres humanos, pois é rapidamente inativada pela α -quimiotripsina, produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado. A sensibilidade dessas bacteriocinas à degradação por enzimas

proteolíticas é bastante interessante com respeito à segurança alimentar, uma vez que a sua ingestão não promove alterações na ecologia do trato digestivo e, portanto, não apresenta os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para aprovação de novos tipos de bacteriocinas (Chervinets et al., 2006).

O reconhecimento de que espécies de bactérias autóctones podem executar a função de carreador ou adjuvante imune, melhor do que qualquer outro microrganismo tem incentivado as pesquisas com lactobacilos de diferentes animais. Portanto, o impacto do metabolismo de *Lactobacillus* sobre a nutrição e a fisiologia de animais de produção se tornou uma importante área de estudo.

Atualmente, os lactobacilos têm sido empregados como vetores vacinais de proteínas enterotoxigênicas de *E. coli* (Wen et al., 2011), expressão de GM-CSF, um fator estimulador de macrófagos e granulócitos caninos (Chung et al., 2009), agente protetor contra toxinas tetânicas (Grangette et al., 2001; Scheppler et al., 2002), antígenos protetores de *Bacillus anthracis* (Mohamadzadeh, 2010), de *Clostridium* spp (Li et al., 2009), *Salmonella* (Kajikawa et al., 2007), glicoproteínas de coronavírus (Ho et al., 2005), urease de *Helicobacter pylori* (Corthèsy et al., 2005), antígenos pneumocócicos (Oliveira et al., 2006), receptores para o vírus HIV (Chang et al., 2003) e outros determinantes antigênicos virais (Lee P. et al., 2006) e o gene *lap* para a enzima essencial álcool acetoaldeído desidrogenase de *Listeria monocitogenes* (Koo; Amalaradjou; Bhunia, 2012). O extrato da proteína LipL32 de *Leptospira shermani*, recombinante foi testado em cultura de células PKSV-PR, derivadas de túbulos proximais de rim de ratos L-PK/Tag1 e, observada sua atuação na indução da nefrite, verificando a viabilidade das células e seu efeito imunomodulador (Yang et al., 2002) e a toxina tetânica foi expressa em *L. plantarum* para inoculação oral (Grangette et al., 2001). Em todos estes experimentos, *Lactobacillus* provaram serem veículos vacinais eficientes, induzindo respostas imunes locais e sistêmicas contra os antígenos carreados.

1.2.1. Probióticos

Em 1907, Metchnikoff publicou um estudo no qual postulava que a ingestão de bactérias do ácido-lático exerce influência positiva na microbiota natural do trato intestinal e que, no intestino, *Lactobacillus* contribuem com todas as funções benéficas da microbiota indígena para o hospedeiro (Dobrogosz et al., 2010). Desde então, essas BAL são

denominadas probióticos (Rolfe, 2000). A definição atualmente proposta pela OMS para os organismos usados como probióticos é a seguinte:

“Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado que a microbiota comensal intestinal inibe patógenos, que distúrbios da microbiota intestinal podem aumentar a susceptibilidade a infecções e que a adição de probióticos na alimentação aumenta a resistência aos patógenos (Patterson & Burkholder, 2003; Lebeer et al., 2008; 2010). Foi comprovado também que as BAL exercem efeitos no tratamento de infecções entéricas, como diarreias agudas, síndromes relacionadas ao uso de antibióticos (Nicoli & Vieira, 2004; Sazawal et al. 2006), além de proteção contra infecções do trato urogenital, como vaginoses (Falagas et al. 2007). Em adição, já foi confirmado que a microbiota residente estimula o desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro, o que é de fato a segunda maior função da microbiota autóctone, ou seja, a manutenção constante do sistema imune em estado ativado (Berg, 1996).

Tem sido demonstrado que algumas bactérias probióticas são capazes de modular a liberação de citocinas nas células do tecido linfóide associado à mucosa (GALT) e estimular o aumento do número de células produtoras de IgA (Imunoglobulina do tipo A), na lâmina própria, fato que tem sido investigado como uma importante ferramenta para melhorar as respostas desencadeadas por vacinas orais (Maassen et al., 2000; Christensen et al., 2002; Perdigón et al., 2002).

As propriedades probióticas de um microrganismo são linhagem-dependentes e tendem estar intimamente relacionadas ao hospedeiro de origem, embora já tenha sido demonstrada a eficácia de algumas linhagens probióticas em mais de uma espécie de hospedeiro, como no caso de *L. rhamnosus* GG (Kailasapathy & Chin, 2000; Ouwehand et al. 2002). A regulação do sistema imunológico do hospedeiro pode ser obtida diretamente pelas células vivas das bactérias probióticas, como por componentes estruturais e produtos secretados por essas células (Lammers et al., 2003; Matsuguchi et al., 2003; Hoarau et al., 2006). Esse efeito ocorre por meio da manutenção do equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias e entre as populações de células T ativadas (Isolauri et al., 2001; Gackowska et al., 2006; Winkler et al., 2007).

A maioria dos microrganismos probióticos, com ação no sistema imunológico é de bactérias do ácido lático, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e

Streptococcus (Cross et al., 2004^a; Gupta & Garg, 2009). Elas estão presentes também em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, entre outros (Hammes & Hertel, 2003). Portanto, considera-se que os microrganismos probióticos estão intimamente associados à promoção da saúde e do bem-estar do hospedeiro.

1.2.1.1. Características de um microrganismo probiótico

Atualmente dispõe-se de muita informação sobre as características ideais de um probiótico. De modo geral, os efeitos benéficos dos probióticos são os mesmos atribuídos à microbiota intestinal, ou seja, possuem atividade antimicrobiana, exercerem as funções de barreira epitelial intestinal e atuarem como imunomoduladores (Parvez et al., 2006; Ng et al., 2009). Entretanto, para ser considerado um probiótico, o microrganismo deve apresentar outras qualidades tais como: quando ingerido ser resistente à passagem pelo pH ácido do estômago; ser capaz de colonizar o trato gastrointestinal, mesmo que temporariamente; ter capacidade de produzir substâncias antimicrobianas e de influenciar atividades metabólicas humanas e de animais ativando o metabolismo do colesterol, com a produção de vitaminas e digestão da lactose, entre outras. É necessário também que demonstre resistência aos antibióticos modernos e seja capaz de aumentar o nível nutricional, quando utilizado como alimento (Zhang, M. et al., 2007; Collins, 2010). Em adição, um bom probiótico deve ter aptidão de inibir a proliferação de patógenos e restaurar a homeostase da microbiota do indivíduo, mediando interações com outros organismos (essa propriedade é denominada “mecanismo de exclusão competitiva” e resulta da disputa pela ligação aos mesmos receptores, usados por patógenos invasores, durante a invasão da mucosa e fixação), além da competição por nutrientes disponíveis (Nemcová, 1997; Collins & Gibson, 1999).

A atividade antimicrobiana de bactérias probióticas está relacionada com a redução do pH intestinal devido à estimulação da produção de ácido lático pela microbiota residente (Langhendries et al., 1995). As substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL são importantes para a exclusão competitiva ou inibição da invasão por outras bactérias. Estas substâncias podem ser ácidos graxos de cadeia curta (Carr et al., 2002), peróxido de hidrogênio, que é característico de lactobacilos (Eschenbach et al., 1989), bacteriocinas, que são altamente específicas (de espectro amplo ou restrito), sintetizadas nos ribossomos ou por bacteriófagos (Tagg & Dierksen, 2007). Essa atividade antagônica contra patógenos resulta da

produção de substâncias como ácido lático, peróxido de hidrogênio, de bacteriocinas que induzem secreção de defensinas, por células do hospedeiro ou ainda pela promoção de barreira epitelial, competindo pelos sítios de adesão e nutrientes na mucosa (De Vuyst & Vandamme, 1992; Gibson & Wang, 1994).

A capacidade dos *Lactobacillus* inibirem patógenos já é conhecida, devido ao seu uso na conservação de alimentos. O reforço da função de barreira intestinal por probióticos é causado pela sua capacidade de influenciar as interações célula-célula e a estabilidade celular do epitélio intestinal, preservando a arquitetura do citoesqueleto e regulando a permeabilidade celular, por meio da fosforilação das proteínas das junções intracelulares (NG et al., 2009). Algumas linhagens de lactobacilos são capazes de reforçar a barreira epitelial intestinal, induzindo a produção de mucinas e levando a um aumento da produção de muco, de forma a estimular a adesão célula-célula e prevenir a apoptose das células intestinais (Mack et al., 2003; Otte & Podolsky, 2004; Seth et al., 2008; Yan et al., 2011).

As BAL podem ativar a imunidade do hospedeiro, com a produção de anticorpos e recrutamento de fagócitos, mas também pela modulação da resposta imune local e sistêmica, induzindo a produção de várias citocinas tais como: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e óxido nítrico (NO), (Fuller & Gibson, 1997).

Durante a avaliação das propriedades probióticas em uma bactéria, devem ser analisadas algumas características específicas, tais como: sua capacidade de resistir por no mínimo noventa minutos em pH ácido (2,0 - 3,0), que é o tempo de trânsito gástrico humano (Chou, LS & Weimer, 1999), de resistir à destruição pela bile e de aderir ao epitélio intestinal. É importante ainda considerar que após a administração por via oral, se sua população mínima não se mantiver entre 10^6 e 10^8 UFC/g de conteúdo, no intestino humano, ela pode não sobreviver (Charteris et al., 1998). Em complementação, a bactéria não deve ter potencial patogênico e precisa apresentar propriedades que permitam a sua produção em larga escala, tal como facilidade de proliferação *in vitro*.

O surgimento de patógenos emergentes e o reaparecimento de antigos patógenos, bem como o aumento no desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos, estimularam a pesquisa e seleção de linhagens de lactobacilos com características de probióticos, para que possam ser usadas no combate às infecções bacterianas (McCoy e Gilliland, 2007). Possuindo várias dessas características, quando fornecidos em quantidade adequada, os lactobacilos apresentam efeitos probióticos (Zhang, M et al., 2007). Testes indiretos, baseados nos

mecanismos de ação probiótica dos lactobacilos, podem direcionar a seleção de isolados com as características de interesse.

Por suas características, as BAL têm sido consideradas também, boas candidatas ao uso como veículos de antígenos, em processos de vacinação oral, em substituição às bactérias patogênicas atenuadas (*Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, e vírus *Vaccinia*) que vem sendo empregadas nas vacinas recombinantes atuais. Além de serem parte da microbiota residente dos indivíduos, as BAL não exibem patogenicidade, evitando o risco de liberação de um organismo que ocasionalmente possa apresentar patogenicidade residual ou reversão da virulência (Dunham, 2002; Atkins et al., 2006).

Para a análise dos mecanismos imunes induzidos, devido à administração de probióticos, são utilizadas técnicas que permitem a dosagem de mediadores da resposta imunológica. A maior parte do conhecimento adquirido nos últimos anos, sobre as respostas imunológicas é resultante da avaliação do perfil de citocinas usando a técnica Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA). Entretanto, devido às limitações desta abordagem vêm surgindo alternativas para a dosagem de mediadores da resposta imune, entre elas o uso da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Vizoso Pinto et al., 2009).

O princípio da qPCR envolve a mensuração do produto acumulado durante a fase exponencial de amplificação com a interrupção da PCR em um ciclo. Refinamentos dessa técnica agregaram maior especificidade para as reações de qPCR. Os mais importantes avanços foram alcançados pela adição de fluoróforos à reação (que podem ser agentes intercalantes de DNA ou sondas de hidrólise com marcador de fluoresceína) e pela integração de sistemas de detecção óptica de fluorescência aos termociladores permitindo acompanhar, em tempo real, a cinética da reação. Essas modificações possibilitaram quantificar o produto acumulado em cada ciclo de amplificação (Logan et al., 2009), viabilizando maior precisão e agilidade na execução da quantificação, em comparação com os métodos anteriores, sem a necessidade de manipulações posteriores (Giulietti et al., 2001). A quantidade de produto mensurada pode ser usada para determinar a quantidade de ácido nucléico original, adicionado à reação, pois quanto mais moléculas alvo existirem no início, menor o número de ciclos necessários para obter-se uma quantidade de produto detectável em uma faixa arbitrária de fluorescência “threshold” (Logan et al., 2009).

Esses avanços significativos da técnica de qPCR induziram o desenvolvimento de uma nova geração de plataformas e de reagentes. Vários equipamentos e sondas de detecção

(sondas de hidrólise *TaqMan*, *Molecular Beacons*, sondas de hibridização e SYBR Green I) foram desenvolvidos. SYBR Green I é um dos mais utilizados devido à facilidade e custo reduzido. Consiste em um corante fluorescente que é incorporada ao DNA fita dupla, durante a amplificação, não sendo detectável na forma livre (Giulietti et al., 2001). Entretanto, SYBR Green I apresenta especificidade reduzida devido ao acúmulo de dímeros de iniciadores e à geração de produtos inespecíficos, ambos capazes de incorporar o corante e serem detectados como produto de amplificação. Para contornar essas desvantagens, deve ser empregada uma padronização acurada das reações, além da utilização de curvas de dissociação, após o término da amplificação, de modo a tornar o uso do SYBR Green I reprodutível e confiável (Giulietti et al., 2001).

1.3. A PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA DAS MUCOSAS

A maioria dos patógenos penetra o organismo humano e de outros mamíferos por meio de membranas das mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário. Doenças como meningites bacterianas e virais, AIDS, tuberculose, hepatites, poliomielite, gripes e leptospirose, infectam por essa via ou transitam por ela, nos estágios iniciais da infecção (Neutra et al., 2001).

Patógenos de mucosas utilizam várias táticas para infectar o corpo e a proteção contra essas ameaças envolve muitas estratégias em ambos os lados da barreira epitelial. Por exemplo, a *Escherichia coli* enteropatogênica e *Vibrio cholerae* causam doença colonizando a superfície epitelial, enquanto os vírus Influenza e Rotavírus infectam as células epiteliais; alguns organismos como *Salmonella Typhimurium* estabelecem a infecção na lâmina própria e outros, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), permanecendo na mucosa até a dispersão da infecção para outras áreas (Neutra et al., 2001).

O sistema imunológico do corpo é capaz de distinguir patógenos, antígenos e vacinas que entram no organismo através de superfícies mucosas, daqueles que são introduzidos nos tecidos por via parenteral ou devido a lesões. Esse sistema funciona em níveis de alta complexidade e interações entre tecidos estruturalmente diferentes, compartilhadas entre várias espécies de seres vivos (Neutra & Kozlowski, 2006). Existe evidência de diferenças nas ações imunológicas entre as membranas mucosas de vias áreas superiores e intestinais (Jahnsen et al., 1998). Por isso, algumas vacinas com adjuvantes podem não funcionar de acordo com o esperado, quando inoculadas nas mucosas nasais, por exemplo, se devem atuar

no intestino. A mucosa intestinal possui além da função de absorção de nutrientes, a atuação como primeira linha de defesa do hospedeiro ativando o sistema imune na fase inicial de infecções causadas por uma variedade de microrganismos patogênicos (Macfarlane & Cummings, 2002; Malago, et al., 2010).

A superfície mucosa em um humano adulto possui área aproximada de 400 m², coberta por uma delicada monocamada epitelial, o tecido mucoso, que possui sítios indutivos concentrados em áreas de entrada de patógenos no corpo. Exemplos são as tonsilas palatina e lingual, as adenóides, a nasofaringe e o trato intestinal inferior, onde agregados de folículos linfóides, formam as Placas de Peyer, além da presença de muitos folículos isolados no apêndice, cólon e reto (Neutra et al., 2001; Brandtzaeg, 2007).

No lúmen intestinal, a mucosa é formada por uma camada simples de células epiteliais que estão muito próximas “*tight-junctions*” e funcionam como barreira às infecções. A integridade dos epitélios bem como a microbiota normal, associada a eles, são essenciais para as funções fisiológicas do tecido. Nesse epitélio estão diversas células sentinelas, que apresentam receptores variados, os *Pattern Recognition Receptors* (PRR), incluindo os *Toll-Like Receptors* (TLRs) (Brandtzaeg et al., 2007).

Os receptores *Toll-like* são expressos principalmente em células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como: monócitos-macrófagos e células dendríticas. Eles possuem a capacidade de discriminar entre os distintos padrões moleculares associados a componentes microbianos (MAMP), de modo que as respostas de defesa das células da mucosa sejam fortemente reguladas apenas contra antígenos estranhos (Neutra et al., 2001; Brandtzaeg, 2007). A incapacidade do sistema imunológico inato de reagir contra as células e moléculas do hospedeiro se deve tanto à especificidade inerente da imunidade inata para estruturas microbianas como ao fato de que células dos mamíferos expressam proteínas regulatórias que evitam as reações inatas. O reconhecimento de produtos microbianos por TLR leva a uma variedade de vias de transdução de sinais que regulam a natureza, a magnitude e a duração da resposta inflamatória (Brandtzaeg, 2009).

Portanto, quando um antígeno na superfície celular ou produto da secreção de patógenos se liga aos receptores da superfície celular, induzem a produção de mediadores químicos, citocinas e quimiocinas, que sinalizam para as células dendríticas (DC) e macrófagos das camadas inferiores da mucosa (Neutra et al., 2001; Brandtzaeg, 2007). Essas células, por sua vez, ativam a resposta inata ou defesa não específica, na qual as células reconhecem e

respondem de modo genérico, sem conferir imunidade duradoura ao hospedeiro. A resposta compreende funções tais como: recrutamento das células imunes ao local da infecção, produzindo mediadores químicos; ativação da cascata do complemento, para identificar as células ativadas por bactérias e desintegrar as células mortas e os complexos de anticorpos; a identificação e remoção, pelos leucócitos, de substâncias estranhas presentes nos órgãos, tecidos, sangue e linfa.

Além disso, a atuação como barreira física e química aos agentes infecciosos e ativação do sistema imune adaptativo, pelo processo de apresentação de antígenos (Neutra et al., 2001; Brandtzaeg, 2007), (Figura 3).

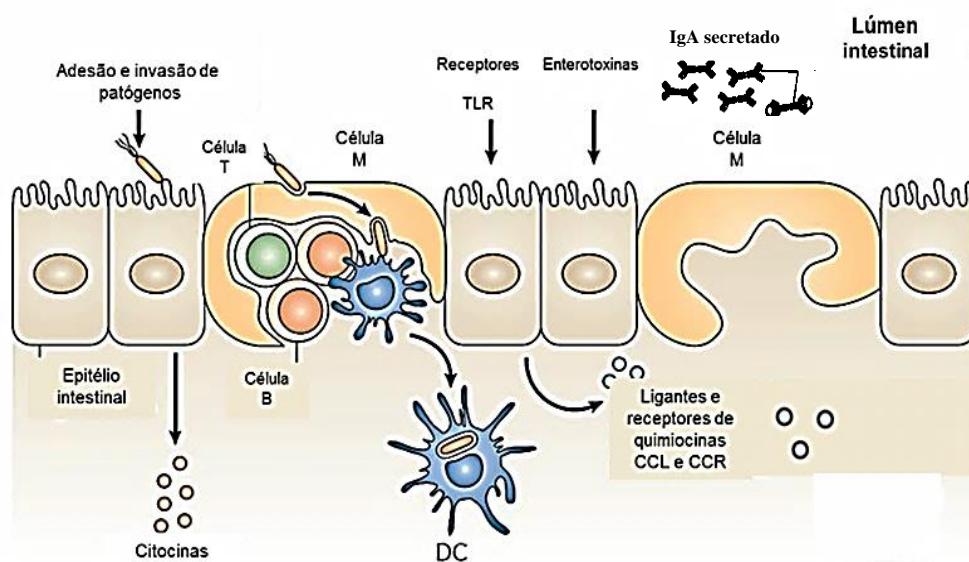


Figura 3: Mecanismos da defesa inata das membranas mucosas. Esquema do Folículo Associado ao Epitélio (FAE) contendo grupos de células M, especializadas na endocitose e no transporte de antígenos e microrganismos para cápsulas intraepiteliais com tendo células B e T e algumas vezes as células DC. Essas células contribuem na sensibilidade aos patógenos do lúmen e seus produtos, sinalizando com a liberação de citocinas e quimiocinas, que atraem e ativam as células dendríticas (DCs), ligantes de quimiocinas (CCL); receptores de quimiocinas (CCR); receptores Toll-like (TLR). Adaptado de Neutra e Kozlowski, (2006).

O sistema imune adaptativo é ativado principalmente, quando o patógeno evade do sistema inato, gerando um nível perigoso de antígenos. A proteção imunológica pela via adaptativa é mediada por linfócitos T cuja principal função é eliminar micróbios que podem viver em fagócitos nas células. Linfócitos T imaturos expressam receptores para antígenos e outras moléculas mas só serão funcionais quando se diferenciarem em células efetoras o que ocorre após a interação com as moléculas do *Major Histocompatibility Complex* (MHC), sintetizadas e expostas na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) e estímulo dos sinais provenientes dos microrganismos ou das reações inatas a eles. O

resultado é a rápida expressão e regulação de muitas citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina 8 (IL-8), uma quimiocina que atrai e direciona neutrófilos para o local da inflamação (McCafferty & Zeitlin, 1989; Indaram et al., 2000).

Embora a produção de citocinas pró-inflamatórias seja importante para mediar a defesa inicial do hospedeiro, contra a invasão por patógenos, a incapacidade para regular a natureza ou a duração da resposta inflamatória pode ser prejudicial em doenças inflamatórias crônicas. Os mecanismos celulares subjacentes, que controlam diretamente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, após a estimulação por TLR, ainda não foram definidos, mas estudos têm mostrado que a via de sinalização TLR pode ativar fosfatidilinositol 3-OH quinase (PI3K) para limitar a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12 (IL-12). Além disso, a ativação da via PI3K, por TLR2, incrementa a produção de IL-10, e a redução da produção de IL-12 (Martin et al., 2005).

Com exceção das células anucleadas, todas as células do sistema linfático são capazes de apresentar antígenos e ativar a resposta adaptativa. As células envolvidas nesse tipo de resposta inata incluem: granulócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos) e as células do sistema monocítico fagocitário (monócito, macrófagos e células dendríticas mielóides), que são ativadas de acordo com o patógeno infectante (Foster et al., 2012). A consequência dessa apresentação de antígenos, é que vacinas que induzem resposta imunológica intensa, quando injetadas em ambiente estéril, tal como os músculos, podem ser ignoradas quando fornecidas via mucosa, onde o tecido é constantemente exposto aos microrganismos (Neutra & Kozlowski, 2006).

Nas mucosas, os linfócitos intraepiteliais e células fagocíticas se agrupam com as células epiteliais formando estruturas linfóides, *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* (MALT), que ativam e abrigam a maioria das células B. Nesses tecidos linfóides estão células sentinelas, que apresentam receptores capazes de reconhecerem a estrutura dos antígenos na superfície epitelial. O objetivo dessa verificação é prevenir respostas contra a microbiota normal do organismo e nutrientes inócuos, o que poderia levar a inflamações indesejáveis nas mucosas (Brandtzaeg, 2007; Rossi et al., 2011).

Outra característica importante da resposta imune adaptativa das mucosas é a produção local e secreção da imunoglobulina A (IgA), que é resistente à degradação nesse ambiente rico em proteases. Quando antígenos estranhos e microrganismos atingem estruturas MALT, induzem a diferenciação das células B ativadas em células plasmáticas (PC), produtoras de

imunoglobulinas (Ig). Essas Ig possuem uma ou mais cadeias “joining” (J), ligadas a uma porção do epitélio denominado *Secretory Component* (SC) que por sua vez se une, por pontes dissulfeto, a uma das subunidades IgA. Algumas vezes são formados trímeros de IgA denominados IgA poliméricos (pIgA), que podem se juntar, formando o IgA pentamérico e nessa forma, são exportados pelas células epiteliais secretoras, para formarem anticorpos SIgA e IgM (SIgM), (Brandtzaeg et al., 1999; Johansen et al., 2005).

Os anticorpos tipo IgA secretores (SIgA) são moléculas díméricas estáveis, altamente glicosiladas durante a síntese, nas células plasmáticas da mucosa (Kozłowski et al., 2002; Becher, et al., 2010; Strugnell & Wijburg, 2010). Aparentemente, a função desses anticorpos naturais (SIgA) aumenta na medida que são detectadas substâncias reativas nas secreções humanas. Eles são protetores imediatos, não inflamatórios, atuando antes que uma resposta imune específica seja ativada ou formada. No lúmen, esses SIgA cobrem a bactéria comensal, sem bloquear seu crescimento, mas restringindo seu acesso à superfície epitelial, protegendo a mucosa contra invasão e hipermultiplicação da microbiota indígena, de modo a manter o equilíbrio parasita-hospedeiro (Macpherson; Geuking; McCoy, 2005; Strugnell & Wijburg, 2010).

As células dendríticas (DC), células B e macrófagos das camadas inferiores, também as APC, possuem receptores imunoestimulatórios para as células T maduras. Nos linfonodos, essas células se ligam ao MHC, são reconhecidas pelas células T maduras e são liberados dos linfonodos. As células dendríticas engolfam patógenos exógenos e toxinas nos tecidos e migram para os linfonodos cheios de células T. Vários grupos de células T podem ser ativadas pelas APC e as respostas geradas, dependem do contexto em que essas células encontram inicialmente o antígeno (Strugnell & Wijburg, 2010).

Os linfócitos T podem se tornar citotóxicos (CTL, CD8+) ou T *helper* (Th1 e 2 ou CD4⁺) dependendo do antígeno ser endógeno ou exógeno. Os CTLs liberam citotoxinas, que formam poros nas células infectadas para entrada de enzimas líticas que irão induzir a lise ou apoptose. Essa liberação é limitada por forte sinal de ativação de antígenos MHC ou células T-auxiliares (Th). A liberação de mediadores tem também a função de ativar o sistema do complemento para reconhecer as células ativadas por bactérias e desintegrar as células mortas, os complexos de anticorpos e, por meio dos leucócitos, remover substâncias estranhas presentes nos órgãos, tecidos, sangue e linfa (Vandermeer et al., 2004; Abbas & Lichtman, 2009).

1.4. O MODELO ANIMAL: *Golden Syrian Hamsters*

São várias as razões para a adoção dos *Golden Syrian Hamsters* em pesquisas: sua disponibilidade e facilidade de reprodução; sua relativa resistência às doenças naturalmente adquiridas; sua susceptibilidade a muitos patógenos; sua característica anatômica e fisiológica exclusivas; seu rápido desenvolvimento e curto ciclo de vida. Hamsters são empregados extensivamente em ciências biomédicas, na pesquisa de doenças infecciosas por serem susceptíveis a uma grande variedade de agentes bacterianos, virais e parasitas. Esses animais têm sido usados como modelos para infecções por micoplasmas, na leishmaniose e toxoplasmose, para provas de New Castle, encefalite eqüina, varíola, raiva e mais comumente em leptospirose, além de algumas enfermidades bacterianas, estudos imunológicos e da cárie dental, bem como nas áreas de citogenética e imunogenética. Além disso, algumas doenças que ocorrem espontaneamente nesses animais têm características patológicas e fisiológicas similares às doenças humanas tais como a trombose atrial, epilepsia e distrofia muscular que apresentam base genética semelhante.

Os hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* possuem anatomia semelhante, de maneira geral com a dos ratos, mas o estômago destes animais se encontra dividido em duas partes devido a uma espécie de prega. Possuem glândulas sebáceas pigmentadas, localizadas nos flancos, atrás do arco costal, que originam uma secreção de odor específico. Bem características são as bolsas laterais que formam parte das bochechas, constituídas por tecido epitelial muito vascularizado.

2. JUSTIFICATIVA

Casos de leptospirose canina têm aumentado muito nas últimas décadas em todo o mundo. No Brasil, estudos têm demonstrado o caráter endêmico da leptospirose em diferentes espécies de animais, entre os quais os cães ocupam um lugar de destaque. Os canídeos têm sido considerados como a segunda espécie animal carreadora de leptospiras, perdendo apenas para os ratos. Este fato é bastante preocupante devido à proximidade cada vez maior do homem com os cães gerando possibilidade de contaminação.

Por outro lado, as vacinas (bacterinas) existentes conferem imunidade sorovariedade-específica, por um curtíssimo período de tempo, além de não eliminarem o *status* de carreador renal crônico de leptospiras apresentado pelos cães. Existe, portanto, a necessidade urgente do desenvolvimento de uma vacina que ofereça proteção contra a maioria das sorovariedades patogênicas de *Leptospira* e que confira imunidade duradoura eliminando, no animal, a condição de portador.

Somado aos fatores acima estão os promissores resultados obtidos pela utilização de antígenos recombinantes, derivados de diferentes proteínas da membrana externa de leptospiras, dentre elas a LipL32 e a Loa22. Apesar do aparente sucesso obtido com estas vacinas, a literatura deixa claro que ainda não foi encontrado um vetor vacinal ideal. Nesse sentido, as excelentes propriedades probióticas apresentadas pelos *Lactobacillus*, conduziram na sua escolha como adjuvante ou vetor vacinal para os genes (*lipL32* e a *loa22*) de *Leptospira* em uma proposta inovadora, ainda não testada para este microrganismo.

Ressalta-se que as mucosas são as principais vias de infecção por leptospiras patogênicas. Neste aspecto, a vacinação por via oral pode ser a melhor opção de administração devido à imediata atuação pelos mecanismos de defesa celular e estímulo para a formação da imunidade adquirida. Apesar do sucesso já demonstrado pela administração de algumas vacinas orais disponíveis, o número dessas vacinas para uso em homens e animais ainda é bastante limitado.

Além disso, a busca por um vetor vacinal que abriga os benefícios das bactérias comensais, como os *Lactobacillus*, atuando como veículos vacinais para antígenos heterólogos ou mesmo adjuvantes imunológicos de antígenos recombinantes influenciou na decisão de utilizar essas BAL, pois, apesar das características dos agentes patogênicos facilitarem a entrada do vetor bacteriano no corpo e aumentarem a resposta imune do hospedeiro, o equilíbrio entre imunogenicidade e a reatogenicidade deve ser mantido para não levar a efeitos colaterais.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do projeto foi investigar as características probióticas e imunomodulatórias de espécies de *Lactobacillus*, isoladas de cães lactentes, para serem usadas como adjuvantes ou veículos, em vacinas orais contra leptospirose canina baseadas nos antígenos LipL32 e Loa22 recombinantes, de três sorovariedades de *Leptospira* (*Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* e *Grippotyphosa*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Isolamento e identificação de novas linhagens de *Lactobacillus*, a partir de fezes de cães lactentes.
- II. Investigação das características funcionais desejáveis a probióticos nas linhagens de *Lactobacillus* isoladas: tolerância ao ácido estomacal e sais biliares intestinais, superfície celular hidrofóbica, antagonismo contra bactérias patogênicas, produção de substâncias antimicrobianas e susceptibilidade a antibióticos.
- III. Avaliação da capacidade imunomodulatória em hamster das linhagens de *Lactobacillus* isoladas de cães, que apresentaram propriedades fisiológicas desejáveis a um probiótico, pela análise por PCR em tempo real através das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-21, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de regulação de transcrição de células T (FOXP3).
- IV. Amplificação por PCR e clonagem dos genes *lipL32* e *loa22* de *Leptospira* e expressão das proteínas recombinantes, em sistema de expressão heteróloga, em *Escherichia coli*.
- V. Purificação da proteína LipL32, das sorovariedades *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* da espécie *L. interrogans* e *Grippotyphosa*, da espécie *L. kirshneri*.

4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VEÍCULO VACINAL BACTERIANO

4.1.1. Isolamento de bactérias lácticas a partir das fezes de cães lactentes.

Amostras de fezes foram coletadas de cães lactentes, dois da raça Crista Chinês e quatro da raça York Shire, com idade entre 15 e 20 dias, certificando-se que eles e as mães não tenham sido tratados com antimicrobianos. As amostras foram coletadas com todos os cuidados higiênicos em tubo estéril e imediatamente transportadas e submetidas à pesagem, procedendo-se a diluição seriada, em solução salina tamponada.

Para o isolamento, inoculou-se 1,0 ml das diluições (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}), pelo método *pour plate*, em duas repetições de placas de Petri, estéreis, com o meio ágar De Man-Rogosa & Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA), fundido e vertido sobre os inóculos, em temperatura aproximada de 45°C. O conteúdo das placas foi bem homogeneizado e, após solidificarem, foram invertidas e incubadas à 37°C, em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marrietta, USA), contendo uma atmosfera de 85%N₂, 10%H₂ e 5%CO₂, por 48 horas.

As placas que apresentaram visualmente, um número de unidades formadoras de colônias (UFC), próximo a 100 foram escolhidas para contagem e observação macroscópica dos morfotipos coloniais. Colônias com características morfológicas diferentes foram isoladas em placas de Petri contendo ágar MRS, pelo método do estriamento. Essas placas foram invertidas e incubadas em câmara de anaerobiose à 37°C, por 24 horas.

Após o crescimento das colônias foram retiradas amostras e coradas pelo método de Gram. As bactérias Gram-positivo, com morfologia pouco ou muito alongada e semelhante a um bacilo foram selecionadas e repicadas em tubos tipo Falcon contendo 3,0 ml do meio MRS líquido e novamente incubadas por 24 horas nas condições já descritas. Do crescimento em meio líquido, foi retirada assepticamente, uma pequena alíquota para o teste de produção de catalase, realizado com a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio a 30% para observar a ocorrência ou não da formação de pequenas bolhas. Lactobacilos não produzem catalase, assim duas alíquotas de 1,0 ml de cada amostra com resultado negativo foram transferidas para tubos Eppendorf, aos quais foram adicionados 30% de glicerol a 20% v/v, previamente esterilizado. Uma dessas amostras foi armazenada em freezer a -80°C e a outra ficou em -20°C, para uso a seguir.

4.1.2. Identificação molecular dos isolados de bactérias lácticas.

4.1.2.1. Extração do DNA genômico.

Para obter maior número de células e extração do DNA, foi feito um inóculo, em tubos tipo Falcon de 15 ml, contendo 5,0 ml do caldo MRS de 100 µl da cultura de cada amostra previamente armazenada e incubada por 20 horas a 37°C, em câmara de anaerobiose. As culturas foram então centrifugadas a 1.800 x g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 1,0 ml de solução de Cloreto de Lítio a 5 Molar e novamente incubado a 37°C sob agitação, por 1h:30 O material foi novamente centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado, o *pellet* suspenso com salina tamponada (PBS) e centrifugado nas mesmas condições. Após repetir mais uma vez essa lavagem, o *pellet* foi suspenso com 1,0 ml de solução de lisozima (10 mg/ml de Tris 50 mM, EDTA 10 mM – TE, pH 8.0) e incubado a 37°C, em agitação por 1h30. O produto lisado foi transferido para tubos Eppendorf de 2 ml e centrifugado a 22.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ficou preparado para a extração do DNA segundo o protocolo fornecido pelo fabricante do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System-PROMEGA*. Após a extração, 5 µl de cada amostra de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), em gel de agarose corado com brometo de etídio (EtBr). Cada amostra foi quantificada por espectrofotometria no *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000*, para que a densidade de DNA dos isolados, que seriam submetidos aos próximos testes, fosse equilibrada.

4.1.2.2. Identificação molecular dos lactobacilos.

A identificação molecular dos lactobacilos baseou-se na análise de restrição de sequências de DNA, situadas entre os genes 16S e 23S do DNA ribossômico, amplificadas por PCR, de acordo com Moreira et al. (2005). O DNA genômico dos lactobacilos isolados foi utilizado como molde para a reação de PCR-ARDRA. No PCR-ARDRA foram empregados iniciadores que amplificam a região intergênica do RNA ribossômico entre os genes codificadores das subunidades ribossomais 16S e 23S (ITS 1). Para cada tubo de reação, com volume final de 25µl, foram utilizados 100 ng de DNA, 12,5 µl do PCR Master Mix (Promega) concentrado 1x, 0,01 nmol/l dos iniciadores que amplificam o espaçador interno (ITS 1) do DNA ribossômico: 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5'

GGGTTCCCCATTCGGA 3') descrito por Tilsala-Timisjarvi, et al. (1997), completando-se o volume, com água ultra pura estéril.

As ampliações por PCR foram feitas em termociclador *Verity Thermal Cycler* (*Applied Biosystem*) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação 95°C/2,5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C/30 s; 55°C/1 min; 72°C/1 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Após a ciclagem, 5,0 µl do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% contendo EtBr. Utilizou-se um marcador tamanho molecular 1 Kb DNA ladder (PROMEGA) como padrão comparativo para a análise dos fragmentos. O gel foi analisado sob luz UV e fotografado, para documentação dos resultados.

Após análise dos amplicons obtidos da região ITS I do DNA ribossômico, os isolados caracterizados como *Lactobacillus* foram submetidos à restrição com doze enzimas (SphI, NcoI, NheI, SspI, Csp45I, EcoRV, DraI, VspI, HincII, EcoRI, HindIII e AvrII), empregadas de acordo com as especificações do fabricante e incubados por 2 horas a 37° C. O produto resultante foi visualizado em géis de agarose contendo EtBr, sob luz UV. Os perfis foram comparados com o quadro de perfis construído por Moreira et al. (2005), (Anexo 1), e os isolados que não apresentaram perfil identificável foram submetidos a nova amplificação, baseada na região 16S do DNA ribossômico, usando-se os iniciadores: 1492R (59-GGTTACCTTGTTACGACTT- 39) e 27F (59-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-39), descritos por Reysenbach et al. (2000). Essa amplificação ocorreu ao longo de 35 ciclos (95°C/30s, 55°C/1min e 72°C/1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C/2 min) e finalizada pela extensão final (72°C/5 min). Os amplicons foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Madison, WI, USA) e o produto enviado para o sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a diferenciação das espécies pertencentes ao grupo *L. plantarum* (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*) outro método de identificação foi usado baseado na amplificação específica do *locus recA*. Nesse sentido, foram utilizados os iniciadores: paraF (59-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-39), pentF (59-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-39), planF (59-CCG TTT ATGCGG AAC ACC TA-39) e pREV (59-TCG GGA TTA CCA AAC ATCAC-39). A reação foi preparada para um volume final de 20 µl usando-se 10 pmol de cada um dos iniciadores paraF, pentF, pREV e planF como descrito por Torriani et al. (2001). Os parâmetros da amplificação foram: desnaturação inicial (94°C/3 min), 30 ciclos (94°C/30s, 56°C/10s, 72°C por 30s) e finalização com extensão final de 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetate, 1,0 mM EDTA, pH 8.2) e em seguida foram corados com brometo de etídio.

4.1.3. Caracterização funcional e probiótica dos lactobacilos isolados.

4.1.3.1. Teste de crescimento em aerobiose.

Antes dos testes para caracterização das propriedades probióticas, confirmou-se a capacidade de crescimento em aerobiose, à 37°C de todos os isolados, identificados geneticamente como pertencentes à espécie *Lactobacillus*.

4.1.3.2. Teste de sensibilidade ao suco gástrico artificial.

O teste de resistência a ácidos, baseado em Neumann et al. (1991), foi adaptado para microplacas. Culturas de lactobacilos em fase estacionária, foram suspensas em 1,0 ml de solução salina 0,9% pH 7,0 e em 1,0 ml de suco gástrico artificial (NaCl 2,0 g/l ajustado com HCl concentrado para pH 2,5 e pepsina) e incubadas a 37°C por 3 horas. Posteriormente, a solução salina 0,9% e o suco gástrico artificial foram desprezados após centrifugação e os *pellets* suspensos com 1,0 ml de caldo MRS. Dois por cento das culturas em caldo MRS foram inoculados em triplicata em uma microplaca e esta incubada em espectrofotômetro “Microplate Spectrophotometer System-SpectraMax 340” (Molecular Devices, CA, USA) em 37°C por 18 horas. A densidade óptica (OD_{620nm}) foi determinada automaticamente a cada 30 minutos. A porcentagem de inibição foi obtida pelo cálculo da área sob a curva de cada gráfico, usando-se o programa OriginPro 8.5 (OriginLab). Os resultados foram baseados no cálculo da média de três experimentos independentes.

4.1.3.3. Avaliação da susceptibilidade aos sais biliares.

Esta característica foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Walker & Gilliland (1993) e adaptada para microplacas. Inicialmente, os isolados de lactobacilos foram mantidos em fase estacionária e então foi realizado um inóculo de 2% em caldo MRS contendo ou não 0,3% de sais biliares (*oxgall*-Oxoid Co.) em microplacas. A OD_{620nm} foi determinada com intervalos de 30 minutos, durante 18 horas de incubação a 37°C, no *Microplate Spectrophotometer System-SpectraMax 340*. A porcentagem de inibição foi calculada pela área

sob a curva de cada gráfico com o programa OriginPro 8.5 (OriginLab). Tal como no teste anterior, os resultados basearam-se na média de três experimentos independentes.

4.1.3.4. Teste *in vitro* da hidrofobicidade da superfície celular (MATS).

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada através da medida de *Microbial Adhesion to Solvents* (MATS) conforme descrito em Pelletier et al. (1997) e Kos et al. (2003). Um ml de culturas de lactobacilos em fase estacionária foi centrifugado (3500rpm/10minutos), lavadas duas vezes com 1 ml de PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄ e 1,47 mM de KH₂PO₄, pH final de 7,4) e suspenso em 1 ml de solução de KNO₃ (0,1 Molar, pH 6,2). A densidade óptica (600nm) foi ajustada para valores entre 0,5 e 0,6 (A₀) com 0,1M de KNO₃ em pH 6.2. Em seguida, adicionou-se 20 µl de xileno a 120 µl dessa cultura e, após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, as duas fases formadas foram homogeneizadas em vórtex por 2 minutos. Após 30 minutos de repouso, a fase aquosa foi removida e a densidade óptica (OD_{600nm}) estabelecida (A₁). A MATS foi avaliada pela porcentagem de bactérias associadas ao Xilol através da razão de (A₀-A₁) sobre A₀. Os isolados foram classificados como hidrofóbicos para valores de MATS maiores ou iguais a 50%, segundo proposto por Nader-Macías et al. (2008). Os resultados obtidos basearam-se na média de três experimentos.

4.1.3.5. Teste de antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos.

Esse procedimento foi realizado segundo a técnica de difusão em dupla camada, proposta por Branco et al. (2010): placas contendo ágar MRS a 1,5% foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C e, em seguida incubadas durante 12 horas a 37°C. Cinco microlitros da cultura de cada isolado, ativado por dois repiques sucessivos, foram inoculados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS a 1,5% e incubados por 18 horas em anaerobiose a 37°C.

Oito linhagens de bactérias patogênicas foram ativadas para os testes: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica*, sorovariedade Typhimurium, ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25853, foram ativadas com inóculo de 2% em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia) e crescidas em aerobiose a 37°C durante 18 horas,

repetindo-se dois repiques subsequentes. O patógeno *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 foi ativado com um inóculo de 2% em caldo TSB (caldo soja triptona, Oxoid Co.), suplementado com extrato de levedura 0,5% (Acumedia) e incubado em aerobiose a 28-30°C durante 18 horas, também repetindo dois repiques. O patógeno *Leptospira interrogans*, sorovariedade Icterohaemorrhagiae foi cultivado em meio EMJH (Ellinghausen– McCulloch–Johnson & Harris, Difco, BD Biosciences), preparado conforme sugestão do fabricante e suplementado com *Leptospira Enrichment* EMJH (Difco, BD Biosciences). Para o meio semissólido foi acrescido 0,2% de ágar (Bacto Agar, Difco), tornando o meio adequado para a manutenção de culturas (Ellinghausen & Painter, 1976). Um inóculo de 0,5 ml do anel de crescimento (zona de Ringer) formado na superfície do meio foi transferido para o mesmo meio sem o ágar e incubado a 28-30°C por três a cinco dias, tempo suficiente para o crescimento dessa bactéria, observado pela turvação delicada e clara do meio.

Os patógenos ativados em caldo BHI foram inoculados a 0,5% em BHI semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico) e vertidos sobre as placas contendo culturas dos lactobacilos, crescidos e mortos com vapor de clorofórmio (2 ml em papel filtro), formando uma sobre camada e incubados em aerobiose a 37°C por 24 horas. Para *Listeria monocytogenes* e *Leptospira interrogans* sorovariedade Icterohaemorrhagiae foram utilizados o meio TSB semissólido (0,75% de ágar bacteriológico), no qual foram feitos inóculos a 0,5% e meio EMJH semissólido com inóculo a 10% e vertidos nas placas, formando as sobre camadas. As placas contendo os seis patógenos inoculados no meio BHI foram incubadas a 37°C durante 24 horas em aerobiose, as demais placas contendo *Listeria* e *Leptospira* foram incubadas a 28-30°C durante 24 horas para *Listeria* e 3 dias para *Leptospira*, ambas em aerobiose. A atividade antagonista foi avaliada pela medida dos halos de inibição formados, usando-se um paquímetro (DIGIMESS/100.176BL). Foram consideradas positivas as amostras que formaram halos de inibição maiores ou iguais a 10 milímetros.

4.1.3.6. Produção de peróxido de hidrogênio.

Os isolados produtores de peróxido de hidrogênio foram identificados segundo o método colorimétrico sugerido por Rabe & Hillier (2003). Culturas dos *Lactobacillus*, em fase estacionária foram inoculadas em placas contendo meio TMB-plus (Brucella Agar 43,0g, Tetrametilbenzidina Dihidroclorito 0,25g, Amido 20,0g, solução de hemina a 0,05% 10,0 ml, MgSO₄ 0,57g, MgSO₄.H₂O 0,12g, solução de Peroxidase a 0,1% 10,0 ml e soro de equino, 50 ml em 1000 ml de água destilada) e mantidos 18 horas a 37°C em anaerobiose e posteriormente

expostas ao ar durante 30 minutos. Os isolados foram categorizados qualitativamente como produtores de peróxido de hidrogênio quando o inóculo adquiria tons azulados devido à atividade oxidante. A intensidade da coloração foi definida como + + + para azuis intensos, + para azul, + para coloração azul fraca ou somente nas bordas e – sem cor.

4.1.3.7. Teste de resistência a antibióticos.

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão de discos com antibióticos. Os isolados foram mantidos em crescimento em ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) em anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) durante 24 horas a 37°C. Em seguida a turbidez das culturas foi ajustada em salina 0,89% de acordo com o tubo de número 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro. As culturas foram espalhadas em placas de Petri contendo ágar MRS com o auxílio de um *swab* estéril, cobrindo totalmente a superfície do meio. Em seguida, os discos antimicrobianos contendo ampicilina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), eritromicina (15 µg), oxacilina (1 µg), penicillina G (10 U), amicacina (30µg), ciprofloxacina (1 µg) e vancomicina (30 µg), foram depositados sobre a superfície das placas e estas incubadas em anaerobiose durante 48 horas à 37°C. Os halos de inibição de crescimento foram medidos com paquímetro (DIGIMESS/100.176BL) e os isolados foram classificados para cada um dos antibióticos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes, de acordo com Charteris et al. (1998); CLSI (2010).

4.1.3.8. Identificação das linhagens de *L. reuteri* por rep-PCR (GTG)₅.

A técnica rep-PCR (*repetitive extragenic polymorphic-based polymerase chain reaction*) DNA *fingerprinting* possibilitou identificar linhagens diferentes, de acordo com as sequências poli-trinucleotídicas intercaladas (GTG), existentes entre os *Lactobacillus reuteri*, isolados de fezes de cães. O iniciador usado foi: (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') tal como descrito por Versalovic et al. (1995).

As condições da PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico da bactéria, 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 200 pmol do oligonucleotídeo, 0,125 U/µl de Taq DNA polimerase (Promega), 0,001% de gelatina e tampão de reação (pH 8,5). Os ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C/5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 94°C/1 min, 52°C /1 min e 72°C/3 min e finalmente 1 ciclo de 72°C/10

minutos no termociclador *Verity thermal Cycler*. Para a visualização dos padrões de bandas das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida (8%), corado com nitrato de prata.

4.1.4. Avaliação da resposta inflamatória de hamsters, induzida por lactobacilos com propriedades probióticas.

Duas das espécies de *Lactobacillus* isoladas (*L. paraplantarum*, isolado de número 15 e *L. reuteri*, isolado de número dois) que apresentaram bons resultados nos testes para caracterização funcional foram submetidas a análises *in vivo*, para verificar sua capacidade de induzir respostas inflamatórias. O modelo animal selecionado foi o hamster da espécie *Mesocricetus auratus*.

4.1.4.1. Obtenção, manutenção, formação dos grupos experimentais e tratamento dos animais utilizados nos experimentos.

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos de acordo com os protocolos propostos pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006), aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), com a referência 203/2009 em 09/12/2009.

Em todos os experimentos *in vivo* os resultados foram analisados por testes estatísticos e foram consideradas diferenças significativas os valores menores que 5% ($p < 0,05$), tendo sido obtidas as médias, o desvio-padrão e coeficiente de variação de cada conjunto de dados.

Os animais definidos para a pesquisa foram fêmeas de hamsters, da espécie *Mesocricetus auratus* (*Golden Syrian Hamsters*) com idade entre 30 e 40 dias, obtidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. A definição por esse animal foi baseada, principalmente, na sua reconhecida sensibilidade à leptospirose e devido à inexistência de pesquisas avaliando o efeito dos lactobacilos na resposta imunológica da mucosa de hamsters.

Foram realizados três experimentos, em datas diferentes e cada um teve duração de nove dias. Para isso foram organizados três grupos experimentais, constituídos por cinco fêmeas cada. Em seu grupo cada animal foi identificado de acordo com a cor da pelagem (ex.: todo cinza, todo marrom, malhado de marrom e branco, todo branco e apenas a cabeça branca). O

grupo experimental um (G1) foi destinado ao controle negativo e os animais foram inoculados diariamente, por gavagem intragástrica, com 0,1 ml de solução salina; os grupos G2 e G3 receberam diariamente, pela mesma via, 0,1 ml de uma suspensão contendo 10^9 UFC/ml de *L. reuteri* e *L. paraplantarum*, em solução salina a 0,85%, respectivamente. Nas gavagens foram utilizadas agulhas apropriadas ao tamanho do animal e adaptadas para seringas descartáveis.

4.1.4.2. Efeito da administração dos probióticos sobre o peso dos hamsters.

Para avaliar o efeito da administração de probióticos sobre o peso dos hamsters, em função da administração dos lactobacilos, todos os animais foram pesados antes da primeira inoculação e a cada dois dias, inclusive antes da eutanásia, totalizando cinco pesagens. O resultado das pesagens foi analisado estatisticamente pelos testes de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey para verificar se ocorreu variação significativa em relação ao grupo controle.

4.1.4.3. Eutanásia e coleta dos tecidos e fezes dos animais para os testes *ex-vivo* e imunomodulatório.

No nono dia procedeu-se a eutanásia e a coleta dos tecidos e fezes. Os animais foram anestesiados com Quetamina (200 mg/Kg de peso) e Xilasina (4,0 mg/Kg) e posteriormente, foi feito o deslocamento cervical. Os corpos dos animais foram submetidos à laparotomia, em condições assépticas, para coleta de duas porções do baço (1,0 cm), linfonodos (no mínimo quatro) e a remoção do intestino delgado, pelo corte nas junções gastroduodenal e retirada do fluido intestinal ileocecal, foram coletadas duas porções (1,0 cm) das porções anterior, média e distal. Os tecidos foram armazenados a -20°C em 0,2 ml de estabilizador RNA later (Ambion) e congelados a -20° Celsius para posterior extração do RNA total.

Alguns *pellets* de fezes, da porção distal do ceco, foram coletados diretamente para o centro de placas de Petri contendo ágar MRS e papel filtro sob a tampa e mantidas em incubação a 4°C por 48 horas, para o teste de presença de substâncias antagônicas contra patógenos.

4.1.4.4. Teste de produção de substâncias antagônicas contra patógenos (*ex-vivo*)

Esse teste foi executado pelo método de difusão em sobre camada de ágar, segundo indicação de Martins et al. (2010). Sete linhagens de referência de patógenos, obtidos do

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) do ICB/UFMG: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Escherichia coli* ATCC 25723; *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium ATCC 14028; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Bacillus cereus* ATCC 11778, foram ativadas por dois repiques consecutivos em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com inóculo de 2 % e incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas.

Após incubação das fezes por 48 horas, aplicou-se, em ambiente estéril, 1,0 ml de clorofórmio no papel filtro da tampa da placa, mantendo-a na posição invertida por 30 minutos, para que o vapor promovesse a morte das células bacterianas crescidas. Então as placas ficaram semi-abertas por 40 minutos para evaporação total do clorofórmio. A seguir verteu-se sobre cada placa uma sobre camada 3,5 ml do meio de cultivo BHI semi-sólido (contendo 0,75% de ágar bacteriológico) em temperatura até 45°C à qual foi inoculado 0,5% da cultura de cada patógeno. Cada patógeno foi aplicado em duplicata. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas e foi medido o raio do halo de inibição formado.

Com os dados obtidos de duas experimentações foram realizadas análises estatísticas no software BioEstat 5.0. Foram realizados também testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para esses dados. As análises das variâncias das médias, entre os grupos, foram avaliadas pelo teste de Tukey, sendo considerados estatisticamente significativos valores de significância maiores que 95% ($p < 0,05$).

4.1.5. Determinação da expressão de RNAm de citocinas, nos tecidos dos hamsters inoculados por via oral, com lactobacilos.

4.1.5.1. Extração do RNA total dos tecidos coletados nos experimentos com hamsters submetidos aos tratamentos com *L. paraplantarum* (15) e *L. reuteri* (2).

A extração do RNA, nas células de baço, linfonodos e intestino, coletados dos hamsters foi feita com Trizol (Sigma-Aldrich), que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. Durante a extração, o Trizol rompe as células mantendo a integridade do RNA. O acréscimo do clorofórmio separa a solução em fase aquosa e orgânica, sendo que o RNA permanece na fase aquosa. Por fim, o RNA presente na fase aquosa pode ser precipitado com isopropanol (Sigma-Aldrich). Para obter o RNA em bom grau de pureza e integridade usou-se soluções protetoras de degradação por nucleases (RNAase), tais como o

RNA *later* e água miliQ, preparada com dietilpirocarbonato (DEPC). A extração foi realizada em ambiente asséptico e foram usadas toucas, máscaras e luvas livres de talco. As bancadas e fluxo laminar higienizados com etanol a 70%, preparado com água DEPC e todo material utilizado estava estéril.

A trituração dos tecidos foi obtida mecanicamente usando um triturador elétrico, após serem lavados para retirada dos resíduos de RNA *later* e terem permanecido por 10 a 15 minutos imersos em Trizol. Com a adição de clorofórmio ocorreu a separação em fases, retirando-se a fase líquida transparente, contendo o RNA. O produto foi precipitado com isopropanol gelado e, posteriormente, lavado com etanol (Merck), a 70%, em água DEPC. O *pellet* de RNA foi suspenso com 50 a 100 µl de água DEPC, após a secagem do etanol residual e quantificado por espectrometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Foi anotada a relação de absorbância em 260/280 nanômetros (nm) e 260/230 nm, que indicam o grau de pureza. O RNA foi armazenado a -20°C.

4.1.5.2. Produção de cDNA a partir do RNA extraído dos tecidos dos hamsters

Tubos contendo amostras de RNA que apresentaram quantificação acima de 200 ng/µl e relação de A260/A280 entre 1,7 e 2,1 foram retirados do freezer para confecção do DNA complementar. Foi calculado o volume necessário para obtenção de 50 µl, em concentração de 200ng/µl e procedeu-se a diluição e o RNA foi tratado com a enzima Turbo DNAase I da Applied Biosystem, de acordo com a recomendação do fabricante, objetivando-se eliminar algum DNA residual. Em seguida, foi efetuada nova diluição do RNA, adicionando-se 50 µl de água DEPC, resultando 100 µl do produto, contendo 100 ng/ µl de RNA (Quadro 1).

Quadro 1: Volume dos reagentes usados no tratamento com a Turbo DNAse I

Tratamento com Turbo DNAse I -AB		
Amostras	1x	100x
RNA	50 uL a 200ng/uL	
Tampão 10x	5uL	500
Enzima	1uL	100
30' a 37 graus		
Depois 2 µl EDTA 375 mM e 75°C/10 min		

Todo o RNA tratado foi usado para a reação de transcrição reversa (RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction) para produção de cDNA com o kit *High Capacity* (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado 1,0 micrograma (μg) de RNA para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20°C (Quadro 2).

Quadro 2: Mistura de reagentes utilizados para confecção do cDNA

Mix Reação de RT-PCR (High Capacity)		
	1X	100X
Tampão RT 10x	2	200
dNTPS	0,8	80
Random primers	2	200
Multi Scribe	1	100
DDW	4,2	420
RNA (100ng/uL)	10	

4.1.6. Padronização das reações de RT-qPCR com iniciadores para citocinas de hamsters.

A padronização das condições da RT-qPCR bem como a concentração dos iniciadores, eficiência das reações, curva de dissociação e temperatura de anelamento (60°C) foram realizadas de acordo com o sugerido por Steinberg (2012).

Para os ensaios de amplificação dos iniciadores, confeccionados para citocinas e genes normalizadores de hamsters, a padronização foi realizada com o cDNA obtido a partir do RNA extraído dos tecidos dos animais do grupo controle. Os parâmetros utilizados foram concentração dos iniciadores, temperatura de anelamento, diluição das amostras de cDNA. Em cada placa, preparada com triplicatas das variáveis e submetidas a PCR em tempo real foram inseridos os iniciadores para os genes normalizadores (HPRT, β -Actina e γ -Actina). Os iniciadores foram confeccionados por Sigma-Aldrich do Brasil a partir do trabalho de Vernel-Pauillac & Merien, (2006) A e Espitia et al. (2010) B conforme descritos na Tabela 1.

As reações de RT-qPCR foram efetuadas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), pertencente ao Departamento de Biologia Geral-ICB/UFMG, com o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies), em placas ópticas de 96 poços, com selante adesivo óptico (MicroAmp, Applied Biosystems).

Para eliminar efeitos de contaminação com DNA genômico, devido ao método de extração utilizado, foi realizado tratamento das amostras de RNA total com Turbo DNase I (Life Technologies). O tratamento seguiu-se às recomendações do fabricante e o resultado foi comparado por meio de reações de qPCR usando-se como material de amplificação RNA total tratado e não tratado com a enzima Turbo DNase I.

Tabela 1: Sequências de primers usados para quantificar a expressão relativa dos genes de citocinas em hamsters

Gene	Iniciadores	Gene	Iniciadores
TNF α -F (AF046215) TNF α -R	AACGGCATGTCTCTCAA AGTCGGTCACTTTCT	IL4-F IL4-R	ACAGAAAAGGGACACCATGCA GAAGCCCTGCAGATGAGGTCT
IFN γ -F (AF034482) IFN γ -R	GACAACCAGGCCATCC CAAAACAGCACCGACT	IL10-F A (AF046210) IL10-R A	TGGACAACATACTACTCACTG GATGTCAAATTCATTTCATGGC
TGF β -F (AF046214) TGF β -R	ACGGAGAAGAAGCTGCT ACGTAGTACACGATGGG	IL10-F B IL10-R B	GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG TTCACCTGTCCACAGCCTTG
β actin-F (AJ312092) β actin-R	TCTACAACGAGCTGCG CAATTTCCCTCTCGGC	IL-12p40-F IL-12p40-R	AATGCCGAGGCAGCAAATTACTC TGCTCTTGACGTTGAACCTCAAG
HPRT-F (AF047041) HPRT-R	TGCGATGTCATGGTAGAG ATCAAGACATTCTTTCCAGT	IL13-F IL13-R	AAATGGCGGGTTCTGTGC AATATCCTCTGGGTCTTGATAGTG
Yactin-F B (FJ664149) Yactin-R B	CAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG GCCTGAATGGCCACGTACA	IL21-F IL21-R	GGACAGTGGCCATAAAACAAG TTCAACACTGTCTATAAGATGACGAAGTC
IL-2-F IL-2-R	CACCCACTTCAAGCTCT TCCACCACAGTTACTGTC	FOXP3-F (FJ664148) FOXP3-R	GGTCTTCGAGGAGCCAGAAGA GCCTTGCCCTTCTCATCCA

A = iniciadores descritos por Vernel-Pauillac & Merien, (2006); B = iniciadores descritos por Espitia et al. (2010).

As curvas de dissociação foram obtidas a partir de diluições seriadas do cDNA (50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng), para todos os genes de citocinas e de referência.

Os parâmetros de avaliação da qualidade das reações foram: a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação. A eficiência (E) das reações foi calculada através da inclinação da curva de diluição (*slope*), quantidade do cDNA versus Cq (ciclo de quantificação ou Ct), por meio da equação 1:

$$\text{Equação 1: } E (\%) = [(10)^{-1/\text{slope}} - 1] \times 100$$

Os padrões foram estabelecidos para cada um dos genes amplificados, que apresentaram eficiência entre 90-100% e com apenas um pico nas curvas de dissociação.

Em todas as reações de amplificação foram usados programas de ciclagem universal contendo um passo inicial de 50° C/2min; 95° C/10min seguido por 40 ciclos, contendo um passo de 95° C/ 15s e outro, de 60° C/1minuto. A curva de dissociação foi obtida por meio de etapas de aquecimento, resfriamento e aquecimento, sucessivas (95° C/15s, 60° C/15s e 95° C/ 15s), após a reação de amplificação. Para as reações foram utilizadas placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, fechadas com selante MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies).

4.1.7. Quantificação relativa da expressão de citocinas no baço, linfonodos e porções inicial, medial e distal do intestino delgado usando RT-qPCR.

A normalização foi fundamentada nos resultados dos níveis de expressão dos três genes reguladores HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase), Act β (β -Actina) e Act α (alfa-Actina), para obtenção de variações corretas, em termos de quantidade e qualidade. A concentração desconhecida de uma amostra foi calculada pela comparação do seu ponto de cruzamento (Cp), com o correspondente na curva padrão. O número de ciclos no Cp (eixo Y) foi representado graficamente em função do log da quantidade do molde inicial dos padrões (eixo X).

Como calibradores, usaram-se os dados de expressão do grupo controle (salina), dos experimentos. Os resultados foram expressos graficamente usando-se a média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de RNAm de cada citocina, normalizado pelo fator de normalização, este último, obtido da média geométrica das quantidades relativas de RNAm de HPRT, Act β e Act α , para cada grupo experimental.

Após a amplificação, foram realizadas as análises para obtenção da quantificação relativa, que resulta da relação entre o gene da citocina em estudo e o gene de referência, ambos comparados com os resultados obtidos a partir de uma amostra calibradora.

A quantificação relativa da expressão das citocinas de interesse foi realizada mediante amplificação por RT-qPCR do cDNA obtido das amostras de RNA total extraído dos tecidos baço, linfonodos e das porções inicial, medial e distal do intestino delgado, juntas, que foram coletados nos hamsters durante o experimento. As reações foram realizadas a partir de iniciadores, codificados pelos genes das interleucinas IL2, IL4, IL10, IL12p40, IL13, IL21,

fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de regulação de transcrição de células T (FOXP3).

Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE), foi empregado o método derivado do RQ (*relative quantification*) = $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001), descrito por Hellemans et al. (2007) usando a equação 2:

4.1.7.1. Análise estatística dos dados obtidos na quantificação.

Os gráficos e análises estatísticas dos dados foram produzidos com o software GraphPad Prism® 4 (GraphPad Software Inc.). Os valores obtidos foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com a finalidade de verificar a normalidade das distribuições. As amostras paramétricas foram submetidas às análises de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste Student-Newman-Keuls (SNK). O programa utilizado foi o

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}]^{\Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}} \quad \text{Equação 2}$$

BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). Em todos os testes foram considerados como diferenças estatísticas os valores com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$), sendo obtidas as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Diferenças, estatisticamente significativas, entre os grupos experimentais foram identificadas nos gráficos com letras diferentes, localizadas acima da barra de desvio-padrão. Ausências de letras sobre as barras ou presença de letras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

4.2. OBTENÇÃO DOS PATÓGENOS E SEUS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

4.2.1. Origem das linhagens de *Leptospira*

Leptospira interrogans, sorovariedade Canicola, linhagem Hond Utrech V, *L. interrogans*, sorovariedade Icterohaemorrhagiae (RGA) e *L. kirschneri* sorovariedade Grippotyphosa (Moskva IV), originárias do “Pan American Institute for Food Protection and

Zoonosis” (INPPAZ) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Élvio Carlos Moreira¹. As linhagens foram cultivadas e mantidas em meio específico para leptospiros: EMJH (Ellinghausen/MacCullog/Johnson & Harris), adicionado de 10% do suplemento de enriquecimento (DIFCO) acrescido de 0,2% de ágar.

4.2.2. Cultivo e extração do DNA genômico das leptospiros

Para extração do DNA, as linhagens foram repicadas para 10 ml do meio EMJH líquido e incubadas a 28°C por cerca de seis dias. A cultura de cada sorovariedade de leptospiros foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 ml e centrifugada por 30 min em velocidade de 1.811 g. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* suspenso com 1 ml de PBS e novamente centrifugado. A suspensão foi novamente lavada com 1 ml de solução salina tamponada (PBS) e transferida para tubos tipo Eppendorf de 2 ml e centrifugados por 5 min a 22.000 x g. O sobrenadante foi desprezado e a cada tubo adicionou-se 1 ml de solução de lizozima (10 mg/ml em (TE) Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), incubou-se por 1:30 h à 37°C, e centrifugou-se por 2 min à 14.000 rpm, desprezando o sobrenadante. Foi feita a extração do DNA usando o kit *Wizard Genomic DNA Purification System* (PROMEGA) obtendo-se, ao final, 100 µl do produto, que foi quantificado por *nanodrop*, analisado após eletroforese em gel de agarose e estocado à -20°C.

4.2.3. Construção dos iniciadores, amplificação dos genes *lipL32*, *loa22*, preparo do vetor e do inserto para ligação

O vetor escolhido para a transformação e expressão das proteínas foi o pTrcHis-TOPO® (Invitrogen-Life Technologies). A análise do mapa desse vetor, indicou que possui sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III na região de ligação dos insertos. Esses dados serviram de base a construção dos iniciadores para amplificação dos 819 pb de *lipL32* e os 500 pb de *loa22*. Entretanto, a análise *in silico* das sequências desses genes mostrou a existência de um sítio de corte para enzima *Bam*HI. Decidiu-se, então, substituir a sequência de reconhecimento de *Bam*HI, no iniciador senso, pela da endonuclease *Bgl*II que é coesiva à da *Bam*HI. O sítio para *Hind*III foi colocado no iniciador antisense. Os iniciadores foram sintetizados pelo laboratório Sigma-Aldrich. Para amplificar o gene *lipL32* os iniciadores foram

¹ Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

confeccionados a partir de sequências obtidas nos bancos de dados, acrescidas de sítios de restrição de enzimas. Para amplificar a lipoproteína LipL32 os iniciadores foram:

senso *lipL32-Bgl2* 5' AGATCTATGTGGTGCTTCGGTG 3'

antisense *lipL32-Hind3* 5' AAGCTTTTACTTAGTCGCGTCAGAAGCAG 3'.

Para a proteína OmpA-like, Loa22, os iniciadores foram construídos a partir de sequências publicadas por Yan, J. et al. (2010):

senso *Bgl2-loa22* 5' AGATCTACTGATTCTGCTCGGTGCAAT 3'

antisense *Hind3-loa22* 5' AAGCTTTTATTGTTGTGGTGCGGAAG 3'.

O DNA das três sorovarietades de *Leptospira* foi amplificado por PCR com esses iniciadores. As condições de amplificação do gene *lipL32* foram: 2 min a 95°C, seguidos de 35 ciclos 94°C/30s, 69°C/30s e 72°C/2 min e extensão a 72°C por 10 min. Para o gene *loa22* a temperatura de anelamento foi padronizada em 63°C por 30 segundos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel para certificar o tamanho das bandas obtidas, então os mesmos foram purificados com o kit “*PCR Purification* da INVITROGEN” e a concentração dos amplicons estimada por espectrofotometria no Nanodrop. Os amplicons foram preparados e enviados para sequenciamento no Núcleo de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do ICB-UFMG.

As sequências da proteína LipL32 obtidas, foram alinhadas e comparadas entre si e *in silico* com sequências do gene *lipL32* existentes no GenBank. Para o gene *loa22* a comparação foi obtida com dados dos trabalhos de Koizume e Watanabe (2003); Ristow et al. (2007). O alinhamento foi feito com o *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) Version 4.0.

4.2.4. Preparação dos amplicons ligados ao vetor pCR4-TOPO

Os produtos da amplificação de *lipL32* e *loa22* das três sorovarietades de *L. interrogans* (Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippityphosa) foram misturados ao vetor pRC4-TOPO®-INVITROGEN na proporção de 15 ng do vetor e 64 ng do produto de PCR de cada sorovarietade e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos (segundo informações do fabricante). Em seguida, transformado e clonado em *E. coli* DH5 α . Tubos contendo as células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes foram retirados do ultrafreezer para um banho de gelo. Três microlitros de cada mistura vetor/inserto foram transferidos para cada tubo, contendo 100 μ l da cultura da bactéria, homogeneizados delicadamente e incubados por 30 minutos no banho de gelo. Após esse tempo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico por 40 segundos

a 42°C e resfriadas rapidamente em gelo por mais 2 minutos. Adicionaram-se então 400 µl do meio 2xYT líquido, a cada tubo, que foi incubado, por 60 min, em posição horizontal e sob agitação (150 rpm), em estufa a 37°C. Em seguida, alíquotas de 100 µl e 200 µl de cada tubo foram aplicadas em placas de Petri sobre o ágar 2xYT, adicionado de ampicilina (Amp), na concentração final de 50 µg/ml e espalhadas com alça de Drigalsky até a sua completa adsorção ao meio. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C *overnight* em estufa comum. A ligação dos insertos aos vetores foi testada por PCR de colônias. Algumas das colônias, positivas para os insertos, foram selecionadas, transferidas para cultivo isolado em caldo 2xYT + amp. Parte dessas culturas foi distribuída em alíquotas de 1 ml, adicionadas de 30% de glicerol e armazenadas em freezer a -80°C. O restante foi submetido à mini-prep com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega.Co). Os vetores ligados foram submetidos a duas restrições pelas endonucleases (*HindIII* e *BglIII*) respectivamente, para liberação dos amplicons com as extremidades coesivas aos sítios de ligação no vetor de expressão.

4.2.5. Preparação do vetor de expressão pTrcHis-TOPO® para ligação dos insertos

Alguns clones em pTrcHis-TOPO, que estavam armazenados em ultrafreezer foram repicados para caldo 2xYT, contendo ampicilina e incubados a 37°C por 24 horas. Essa cultura foi submetida a miniprep, para separação dos vetores com insertos. Esses vetores foram então, submetidos à restrição pela enzima *HindIII* e, posteriormente, por *BamHI* para retirada do antigo inserto e exposição dos sítios de ligação das enzimas. A fração de 3,9 quilobases (Kb), correspondente ao vetor, foi purificada do gel de agarose com o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega Co.). A concentração do produto foi medida por nanodrop e usada para cálculo do volume de ligação com os insertos de *lipL32* e *loa22*.

4.2.6. Ligação do amplicon de LipL32 ao vetor de expressão pTrcHis-TOPO® e transformação na bactéria *E. coli* Top10

Partindo de uma cultura da bactéria *E. coli* Top 10, adquirida com um kit de vetor (INVITROGEN) foram preparados, seguindo protocolo fornecido por Maniatis et al. (1989), vários tubos da cultura, quimicamente competentes, por cloreto de cálcio.

Para ligação dos amplicons de LipL32 ao vetor pTrcHis-TOPO® previamente preparado, foi calculado o volume para a reação vetor/inserto, com base na concentração de cada produto em nanodrop (relação 1/4). Desse modo, foram usados (40ng do vetor, 40ng do inserto

purificado, 1 µl de T4 DNA ligase e 1 µl do tampão da T4 DNA ligase 10x- Invitrogen), misturados delicadamente e incubados a 4° C *overnight*.

As transformações foram feitas nas culturas de *E. coli* Top10, quimicamente competentes, recém-preparadas. Usou-se o mesmo protocolo da clonagem dos insertos em *E. coli* DH5α (item 1.4.2.4). Confirmou-se a presença dos insertos por miniprep e armazenaram-se em ultrafreezer, alíquotas das culturas positivas para os insertos.

4.2.7. Padronização do tempo de máxima expressão da proteína recombinante

Em tubos contendo 5 ml do meio 2xYT, líquido, contendo ampicilina foram feitos pré-inóculos de 500 µl das culturas de clones, de cada sorovariedade (pTrcHis-LipL32), previamente reativadas e incubou-se *overnight*, sob agitação de 60 x g. Essas culturas foram transferidas para Erlenmeyers, com capacidade para 125 ml, contendo 25 ml do caldo 2xYT+ amp. As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação de 60 x g e sendo feita a contagem óptica do número de células até que alcançou a densidade óptica em 600 nm (OD₆₀₀) igual a ± 0,6. Nesse tempo, foi retirada uma amostra de 1,5 ml para um tubo, identificado como cultura no tempo zero (T=0). Esse tubo foi centrifugado a 4°C por 2 min. O sobrenadante descartado e o *pellet* armazenado em freezer a -20°C. Ao restante da cultura, adicionou-se o indutor de expressão Isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG) na concentração final de 0,6 nmol. As culturas foram novamente incubadas, nas mesmas condições, sendo feitas medidas da OD₆₀₀ após 1 h, 3 h, 4h:30 e 5h:30 até não apresentarem alteração na densidade da cultura. Após cada medida, coletaram-se amostras, calculando-se o volume da coleta em relação à densidade óptica medida, de modo a armazenar sempre o mesmo número de células. Os tubos foram centrifugados por 2 minutos, em temperatura de 4°C, seus sobrenadantes foram desprezados e os *pellets* congelados a -20°C.

Os *pellets* de quatro coletas, antes e após a indução da expressão de LipL32, de cada uma das três sorovariedades clonadas, foram preparados para visualização em gel SDS-PAGE com seguinte protocolo: cada *pellet* foi suspenso com 37,5 µl de água MilliQ estéril e adicionado de 12,5 µl de tampão para proteína, TA 4x (50 mM Tris-HCl; pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 1% β-mercaptoetanol; 12.5 mM EDTA; 0.02 % Azul de Bromofenol). Os tubos foram fervidos por 10 minutos em banho-maria e centrifugados por 1 min a 22.000 x g. O sobrenadante foi aplicado em gel SDS-PAGE junto com um marcador de tamanho molecular para proteínas (Prestained Protein da FERMENTAS). A preparação do gel seguiu os protocolos de Maniatis et al. (1989)

e foi feito em cubas BioRad. A eletroforese correu a 150 V por 60 minutos. Para revelação das bandas, o gel foi corado por Azul de Comassie a 0,1%.

4.2.8. Expressão da proteína LipL32

Anotado o melhor tempo de expressão de LipL32, após a indução, repetiu-se o procedimento, desta vez em erlenmeyers para volume até 1000 ml, contendo 250 ml do caldo 2xYT com ampicilina. Inocularam-se 4,0 ml de pré-culturas *overnight*. Após aproximadamente 3 horas de incubação a OD₆₀₀ estava em 0,59 (o ideal sugerido é até 0,60) retirou-se, então duas alíquotas de 1,5 ml de cada cultura (T= 0), às culturas restantes adicionou-se 0,6 mM de IPTG e as culturas permaneceram incubadas por mais 4h:30, que foi o tempo de maior expressão observada, no teste anterior. Mediu-se a OD₆₀₀ de cada cultura, coletando duas amostras de cada uma, conforme já descrito para padronização e o restante das culturas foi distribuído em tubos tipo Falcon para 50 ml. Todos os tubos foram centrifugados em 2.465 g por 20 min em temperatura de 4,0° C, seus sobrenadantes desprezados e os *pellets* congelados a -20°C. Tal como anteriormente, alíquotas do material no T= 0 e T= 4h:30 foram preparadas e aplicadas em gel SDS-PAGE, corado por Azul de Comassie, para serem visualizadas, confirmando a expressão da proteína LipL32 de 32 kDa.

4.2.8.1 Verificação da forma de expressão da proteína LipL32

Antes da purificação, foi necessário verificar se a proteína induzida é expressa na forma solúvel ou forma corpos de inclusão. Para isso, os tubos contendo os *pellets* das culturas no T= 0 e T= 4h:30 que estavam armazenados, foram suspensos com 1 ml de PBS, adicionados de 50 µl de solução de lisozima a 10mg/ml e incubados por 30 minutos a 4°C. A seguir, foram submetidos, por quatro vezes a choques térmicos, em nitrogênio líquido por 10 segundos seguido de banho-maria a 37°C por mais 10 segundos. Então o material foi centrifugado por 2 min em 22.000 x g e a fase solúvel que estava no sobrenadante, foi transferida para outro tubo. O *pellet* restante, contendo a fase sólida ou porção insolúvel da proteína foi suspenso com 1 ml de PBS. Nessa etapa restavam quatro tubos da proteína LipL32 de cada sorovariedade. Dois representando o T= 0 e T= 4h:30 da fase solúvel e 2 representando o T= 0 e T= 4h:30 da fase insolúvel. Retiraram-se 60 µl de cada tubo, para novos tubos, aos quais, adicionaram-se 20 µl

do TA 4x. Os tubos foram homogeneizados e fervidos em banho-maria por 10 minutos, centrifugados por 1 min a 22.000 x g e 10 µl de cada sobrenadante foi aplicado em gel SDS-PAGE, usando um marcador de proteínas como indicador. A parte mais sólida do gel SDS-PAGE foi preparada com 15% de acrilamida, recomendado devido ao pequeno peso molecular da proteína (32 KDa).

4.2.8.2. Purificação da proteína LipL32 por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A primeira purificação da proteína LipL32 de *Leptospira* por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi realizada no Núcleo de Análise do Genoma (NAGE-ICB), usando o cromatógrafo AKTAPLus da (GE HEALTHCARE), com suporte do técnico responsável pelo uso do aparelho. Após analisar os protocolos existentes e testados para essa etapa, decidiu-se tratar, inicialmente, o produto obtido da LipL32 como solúvel. O sal escolhido para os tampões foi o Imidazol, usado no tampão de ligação e de eluição, variando a concentração. A amostra foi preparada de acordo com o protocolo sugerido por Maniatis *et al.* (1989): preparou-se um tampão base contendo 0,014% de Na₂HPO₄ e 1,4% de NaCl, diluídos em água MilliQ e esterilizado. O tampão foi dividido em alíquotas de 250 ml (A) e de 100 ml (B). Ao tampão A (ligação) acrescentaram-se 20 mM de uma solução a 3M de imidazol; ao tampão B (eluição) acrescentaram-se 500 mM da mesma solução de imidazol. O pH dos tampões foi perfeitamente ajustado para 7.4.

O *pellet* congelado de um dos tubos Falcon de 50 ml da cultura induzida de cada sorovariedade, foi suspenso com 5,0 ml do tampão A, adicionado de 1% da solução de lisozima a 10mg/ml e armazenado a 4°C por 30 minutos. O lisado foi submetido por quatro vezes a choque térmico em nitrogênio líquido por 10 segundos, seguido de banho-maria a 37°C, para rompimento das células das *E. coli*. Para minimizar a viscosidade do conteúdo citoplasmático, usaram-se seringas de 5,0 ml, puxando várias vezes, o conteúdo dos tubos. Em seguida, o lisado foi filtrado em Millipore de 0,45 µm. Para as purificações seguintes, substituiu-se o choque térmico por sonicação para rompimento das células. Foram programados três pulsos de 15 s de ultrassom a 30% da amplitude vibratória do aparelho, com dois intervalos iguais, mantendo os tubos imersos em gelo todo o tempo. O sonicador utilizado foi o Fisher Scientific Ultrasonicator- M-500. Em seguida o lisado foi centrifugado a 11.100 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi separado para aplicação no cromatógrafo.

O software *PrimeView* fornecido com o aparelho oferece a opção de purificação de proteínas sintetizadas com cauda de histidina tal como foi expressa a LipL32. Essa sequência de aminoácidos é codificada pelo vetor e adicionada à porção N-terminal da proteína, durante a transcrição. Nessa purificação foram usadas colunas His-Traptm (GE Healthcare) de capacidade para 1 ml, contendo sepharose e o metal sulfato de níquel, que tem alta afinidade pelas histidinas adicionadas à sequência da proteína pelo vetor pTRcHis. A técnica de purificação foi cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e seguiu rigorosamente o manual do aparelho AKTA-PLUS da GE. O protocolo seguiu orientação do fornecedor das colunas.

Seguiram-se as etapas de lavagem e preparação do AKTA no modo automático do programa *PrimeView* de maneira que o produto final de cada purificação foi liberado em alíquotas de 1,0 ml por tubo. O programa apresenta um cromatograma do processo indicando as etapas e tubos nos quais ocorre eluição da proteína. Esses tubos foram identificados e armazenados a -20°C para uso futuro.

4.2.8.3. Confirmação da purificação de LipL32 em gel SDS-PAGE.

Os géis SDS-PAGE foram preparados em concentração 15% de acrilamida na parte inferior. De cada tubo contendo a proteína LipL32 eluída, retirou-se 12 µl para outro tubo ao qual adicionaram-se 4 µl de TA 4x e deixou-se ferver, em banho-maria, por 10 minutos. Centrifugou-se por 1 min a 22.000 x g e aplicou-se o sobrenadante nos géis e um marcador de tamanho molecular para proteínas. A eletroforese ocorreu a 150 V durante 55 minutos. Esses géis foram corados por prata, seguindo um protocolo que sugere a adição de uma etapa de sensibilização do gel após a fixação.

4.2.8.4. Preparo de anticorpos policlonais anti-*Leptospira*, em camundongos BALB/c.

Para confirmar a proteína LipL32 expressa, por massa molecular, foram preparados anticorpos anti-*Leptospira* total. Para isso, seis camundongos foram inoculados com três doses (de 0,3 ml), em intervalos de 15 dias, de uma bacterina comercial anti-leptospirose, produzida pelo laboratório Fort-Dodge. Essa vacina é composta por cinco sorovarietades diferentes de leptospiros, que incluem (*Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* e *Grippotyphosa*), usadas no trabalho. Dez dias, após a última dose da vacina, os animais foram anestesiados com Xilasina (Dopalen) e Quetamina Rompun, em volumes calculados de acordo com o peso médio dos animais e foi

colhido sangue na veia subclávia, para obtenção do soro. Após o procedimento os animais foram eutanasiados com uma dose letal dos anestésicos. Todo o procedimento foi realizado de acordo com os “Princípios Éticos para o uso de Animais de Experimentação”, do Comité de Ética em Experimentação Animal.

4.2.8.5. Identificação da lipoproteína LipL32 de *L.interrogans* por Western blotting.

A análise do reconhecimento da proteína LipL32 purificada pelo anti-soro anti-leptospira foi avaliada por Western blot, seguindo protocolo sugerido por Maniatis et al. (1989): prepararam-se 10,0 µl de uma cultura de *L. interrogans* sorovariedade Icterohaemorrhagiae, adicionando-se 10,0 µl de solução de lisozima a 10 mg/ml, deixando-se a 37°C por 60 minutos. O mesmo procedimento foi feito com igual alíquota da cultura de *E. coli* Top10 recombinante induzida. Retirou-se 10,0 µl da proteína LipL32 resultante da primeira purificação, de um dos tubos da eluição, com maior densidade da proteína, de acordo com o cromatograma obtido no processo e as três amostras foram tratadas com a adição do tampão de proteínas TA (4x) e todos os tubos fervidos por 10 min, em banho-maria. Os tubos foram centrifugados a 22.000 x g por 5 min e os sobrenadantes foram aplicados em gel SDS-PAGE, junto com um marcador de peso molecular de proteínas. Após a resolução no gel, nas mesmas condições já descritas, as bandas formadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por western blot. A membrana foi imersa em solução contendo o anti-soro anti-*Leptospira* até a ligação às bandas específicas. O produto da ligação foi revelado com anti-soro *anti-mouse*, contendo peroxidase.

4.2.8.6. Cálculo da concentração da proteína LipL32, purificada

O cálculo da densidade da proteína LipL32 purificada foi realizado com o *Kit Total Protein Micro* (Sigma-Aldrich) que é baseado no método de Bradford. Com o kit é fornecida uma proteína padrão (BSA) com massa e volume conhecidos. Foi feita uma diluição seriada em solução salina e foram colocadas quatro µl do padrão puro, e quatro microlitros de cada diluição nos poços verticais. Sobre essas alíquotas, adicionaram-se 200 µl do reagente de Bradford preparado. Nos poços das fileiras horizontais foram adicionados 10 µl da amostra de cada tubo contendo a proteína eluída (em ordem numérica) e acrescentaram-se 40 µl de solução salina e 200 µl do reagente. No 1º poço aplicou-se o padrão branco (40 µl de salina e 200 µl do reagente). Foi feita a leitura em espectrofotômetro, em absorvância de 595 nm, usando o *software* Maxpro.

4.2.8.7. Produção de anticorpos policlonais anti-LipL32 de *L. interrogans*, sorovariedade Icterohaemorrhagiae, em camundongos BALB/c

Para produzir antisoro específico anti-LipL32, oito camundongos BALB/c foram inoculados com três doses de uma solução preparada com a proteína LipL32 purificada, acrescida do adjuvante de Freund. A proteína foi retirada de um dos tubos da eluição (seção 4.2.8.2) após quantificação e cálculo da concentração no volume. Na primeira aplicação foi utilizado o Adjuvante Completo de Freund (APC), e cada animal recebeu 200 µl da mistura de LipL32 (10 µg em 30µl de tampão, igual quantidade de APC e o volume final completado com solução salina). Essa dose foi inoculada, via intradérmica, 100 µl em dois locais diferentes: no pescoço e na pata traseira. Dois camundongos foram usados como controle vacinal, recebendo a mesma dose, apenas do adjuvante. Após 15 dias, foram novamente vacinados e desta vez usou-se o Adjuvante Incompleto de Freund (FIA), 10 µg da LipL32 e o volume final foi de 150 µl, inoculados por via intradérmica, apenas no pescoço. Tal como na primeira dose, os animais controle receberam apenas o adjuvante. Mais uma dose igual à 2ª, foi inoculada após outros 15 dias. Dez dias após a última dose, coletou-se sangue dos animais pela via periorbital com auxílio de uma pipeta Pasteur, de vidro, cuja ponta foi mergulhada em solução de heparina. Mais uma vez o procedimento seguiu os “Princípios Éticos para o uso de Animais de Experimentação”, do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) UFMG. O sangue coletado foi deixado em repouso por 30 min e centrifugado para obtenção do soro, que foi congelado a -20°C para uso posterior.

A verificação da ligação da proteína expressa ao antissoro foi feita pela técnica western blot. Resolveu-se em gel SDS-PAGE, 10 µl de uma amostra da proteína LipL32 purificada, 10 µl de uma amostra da cultura de *E. coli* Top10 induzida, com *lipL32* recombinante e 10 µl de cultura de *Leptospira* lisada, nessa ordem, precedidas por um marcador de peso molecular de proteínas. O produto resolvido em gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e ligado ao anticorpo anti-LipL32, diluído 1/200 em leite em pó desnatado. O produto da ligação anticorpo/proteína LipL32 foi marcado com antissoro anti-mouse contendo peroxidase e revelado por solução de diaminobenzidina, 4-cloro-1-alfa-naftol + peróxido de hidrogênio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VEÍCULO VACINAL

Nos últimos anos, o interesse em estudar as diferentes espécies de Bactérias Ácido-Láticas, entre as quais *Lactobacillus* spp. vem sendo estimulado pelo uso dessas bactérias em produtos considerados como benéficos à saúde do consumidor. Além dos benefícios nutricionais e uma patogenicidade quase nula, alguns trabalhos publicados apontaram que esse microrganismo é em potencial um excelente vetor vacinal devido à capacidade imunomodulatória em seu hospedeiro (Christensen et al, 2002; Mohamadzadeh et al., 2005).

Neste contexto, este estudo foi conduzido no sentido de isolar e identificar linhagens de *Lactobacillus*, a partir de fezes de cães recém-natos, a fim de caracterizá-las quanto ao seu potencial probiótico e possível utilização como adjuvante imune junto a vacinas recombinantes contra a leptospirose canina. Martín et al. (2009) demonstraram que bactérias comensais podem se disseminar do epitélio digestório materno para as glândulas mamárias, por intermédio de rotas endógenas que envolvem as células dendríticas e macrófagos (*enteromammary pathway*). Assim, neste trabalho provavelmente estão sendo estudadas linhagens de lactobacilos oriundas do leite materno e dos cães lactentes.

5.1.1. Isolamento, caracterização morfológica e identificação dos *Lactobacillus* de fezes de cães lactentes.

Das amostras de fezes dos animais, obteve-se 79 isolados que foram selecionados, de acordo com as características morfológicas (Gram e forma bacilar) e fisiológicas (catalase). Destes isolados, 41 foram caracterizados como Gram positivo e catalase negativo, sugestivo de bactérias láticas e, posteriormente, 37 apresentaram no gel de agarose, três espaçadores, nos perfis de restrição, sugerindo pertencerem ao gênero *Lactobacillus* (Figura 4).

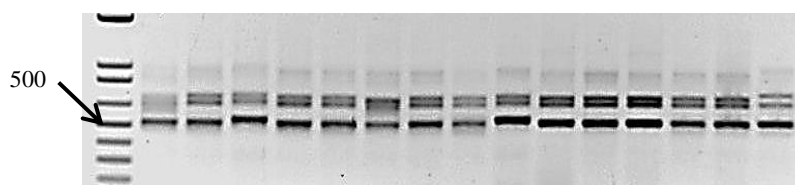


Figura 4: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis resultantes da amplificação por PCR, do espaçador transcrito entre os genes para rRNA 16S e 23S, dos lactobacillus, isolados 1 a 16.

As bactérias com características sugestivas de bactérias lácticas e diferentes morfologias de colônia em ágar MRS foram selecionadas, isoladas e identificadas em nível de espécies pela amplificação das regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S do rRNA e digestão enzimática com endonucleases de restrição dos amplicons (ARDRA). O método se baseia na presença de inserções gênicas para tRNA na região do espaçador transcrito. *Streptococcus* e *Lactococcus* apresentam um único espaçador, *Enterococcus* e *Oenococcus* apresentam dois espaçadores de tamanhos diferentes e *Lactobacillus*, *Weissella* e *Pediococcus* apresentam três espaçadores de tamanhos diferentes (Moreira et al. 2005). Neste estudo, a amplificação dos espaçadores transcritos entre os genes 16S e 23S do RNA ribossômico foi capaz de separar dois grupos de bactérias do ácido láctico, um grupo com dois amplicons, sugestivo de *Enterococcus*, e outro com três amplicons, sugestivo de *Lactobacillus*.

O isolado de número 15 foi preditivamente identificado como pertencente ao agrupamento de *L. plantarum*, uma vez que as espécies pertencentes a esse grupo apresentam o mesmo perfil de digestão enzimática. Após a realização do Multiplex PCR do gene *recA* (Torriani et al., 2001) foi finalmente determinado como pertencente a espécie *L. paraplantarum* (15), por apresentar uma banda de 107 pb, no gel de agarose a 1,5%. O gene *recA* codifica uma proteína de pequeno tamanho (352 aminoácidos) em *E. coli*, cujas funções estão relacionadas à recombinação homóloga e reparo de danos no DNA. Por ter uma função fundamental e ser ubíquo o gene *recA* tem sido utilizado como um marcador filogenético alternativo, para diferenciar bactérias geneticamente relacionadas como estas, pertencentes ao grupo *L. plantarum* (Torriani et al., 2001). As espécies *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* são geneticamente e fisiologicamente muito similares, sendo por esse motivo, integrantes do grupo *L. plantarum*. Para diferenciar espécies deste grupo, o sequenciamento do gene 16S rRNA não é suficiente devido a alta identidade (99%) existente neste locus entre os genes das três espécies. (Figura 6).

Com os perfis de restrição obtidos foi possível identificar seis espécies de *Lactobacillus* com a seguinte distribuição: *L. reuteri* (43%), *L. animalis* (19%), *L. acidophilus* (8%), *L. murinus* (5,5%), *L. sanfranciscensis* (5,5%) e *L. paraplantarum* (3%) (Figura 5 e anexo 1). Entretanto, sete dos isolados não foram identificados através dos perfis de restrição. O isolado número 2 e os isolados números 17 a 22 não mostraram perfis conhecidos e foram submetidos ao sequenciamento da região 16S rDNA (NAGE) tornando possível identificá-los: 2 (*L.*

reuteri), 17 (*L. acidophilus*), 18 (*Enterococcus* sp), 19 (*L. acidophilus*), 20 (*Enterococcus* sp), 21 (*Enterococcus* sp) e 22 (*Enterococcus* sp). Figura 5.

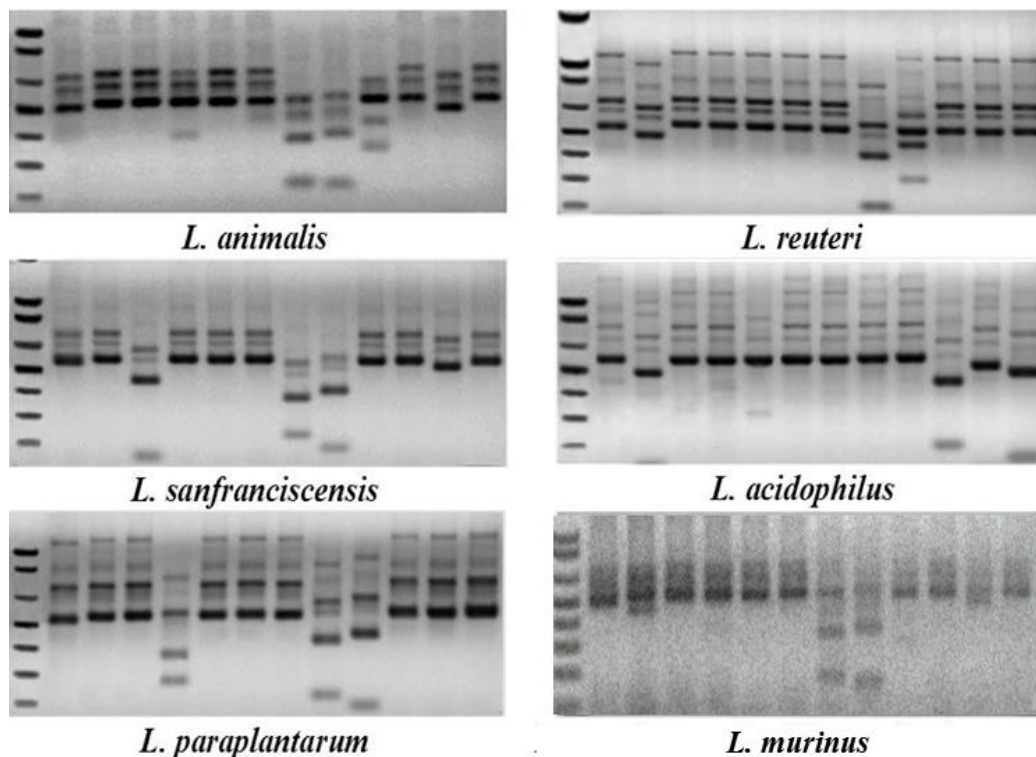


Figura 5: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis de restrição de alguns *Lactobacillus* isolados exibindo as bandas correspondentes aos fragmentos formados pela restrição com as enzimas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*). O marcador de peso molecular é de 100 pb (Promega)

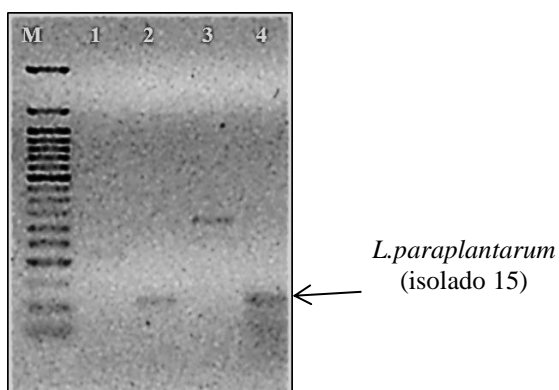


Figura 6: Gel de agarose 2% mostrando o perfil de diferenciação entre espécies de *Lactobacillus* do grupo *L. plantarum* por PCR multiplex do gene *recA*. M - Marcador de tamanho molecular (50 pb DNA ladder), 1 - *L. pentosus* (218 pb), 2 - *L. paraplantarum* (107 pb), 3 - *L. plantarum* (318 pb), 4 - Isolado de número 15.

Todos os isolados, identificados em nível de espécie por PCR-ARDRA ou por sequenciamento estão apresentados no quadro 3.

Quadro 3: Identificação das espécies de bactérias lácticas isoladas das fezes de cães lactentes

Isolado	Espécie	Isolado	Espécie
1	<i>Lactobacillus animalis</i>	20	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	21	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3	<i>Lactobacillus</i>	22	<i>Enterococcus hirae</i>
4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	23	<i>Lactobacillus murinus</i>
5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	24	<i>Lactobacillus murinus</i>
6	<i>Lactobacillus animalis</i>	25	<i>Lactobacillus salivarius</i>
7	<i>Lactobacillus reuteri</i>	26	<i>Lactobacillus reuteri</i>
8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	27	<i>Lactobacillus reuteri</i>
9	<i>Lactobacillus</i>	28	<i>Lactobacillus sakei</i>
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	29	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
11	<i>Lactobacillus reuteri</i>	30	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
12	<i>Lactobacillus reuteri</i>	31	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
13	<i>Lactobacillus reuteri</i>	32	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
14	<i>Lactobacillus reuteri</i>	33	<i>Lactobacillus reuteri</i>
15	<i>Lactobacillus</i>	34	<i>Lactobacillus reuteri</i>
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	35	<i>Lactobacillus reuteri</i>
17	<i>Enterococcus hirae</i>	36	<i>Lactobacillus reuteri</i>
18	<i>Lactobacillus animalis</i>	37	<i>Lactobacillus</i>
19	<i>Enterococcus faecium</i>		

No gráfico a seguir é mostrado o percentual de ocorrência das espécies de *Lactobacillus* isoladas nas fezes de cães lactentes. A espécie predominante foi *L. reuteri* correspondendo a 43% seguida de *L. animalis* com 19% (Figura 7).

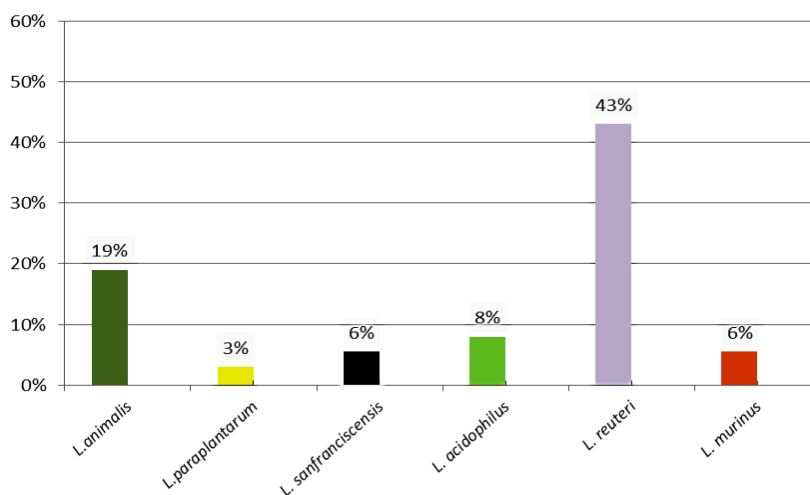


Figura 7: Diversidade de espécies de lactobacilos isoladas nas fezes de cães lactentes.

No trabalho de McCoy e Gilliland (2004), 18 dos 22 lactobacilos isolados de cães eram da espécie *L. reuteri*, representando a maioria das amostras, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. Entretanto, Beasley (2004) fez o isolamento de bactérias lácticas de fezes caninas e a identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA e determinou que 67% das amostras eram BAL sendo 16,2% *Lactobacillus rhamnosus*, 12,6% *L. casei* e 10,8% *Lactobacillus salivarius*, não observando isolados de *L. reuteri*. A espécie *L. reuteri* é considerada a mais prevalente entre os lactobacilos da microbiota intestinal dos humanos, mamíferos e aves. Possui um amplo espectro de hospedeiros, como ovelhas, frangos, suínos e roedores, podendo também ser encontrada em alimentos, como na carne, no leite e seus derivados (Semjonovs *et al.*, 2008). Neste trabalho, 16 dos 37 isolados de bactérias lácticas eram da espécie *L. reuteri*, sendo vários de fezes de um mesmo animal, podendo ser de uma mesma linhagem. A diferenciação entre linhagens de *L. reuteri* foi realizada por fingerprint de seqüências repetitivas intercalares, obtido por PCR com o iniciador GTG₅ segundo Versalovic *et al.* (1994). Este procedimento possibilitou identificar três linhagens diferentes de *L. reuteri* entre os isolados desse trabalho.

5.1.2. Resultados e discussão dos testes de caracterização probiótica

Os mecanismos de ação dos probióticos são divididos basicamente em três: o antagonismo direto contra enteropatógenos, o aumento da função de barreira epitelial do intestino e a imunomodulação local e sistêmica (Lebeer *et al.*, 2008; 2010). Para desempenhar esta ação, as bactérias com potencial probiótico devem apresentar características fisiológicas,

que permitam alcançar níveis populacionais significativos no intestino. Para isto, uma das condições fisiológicas desejáveis é a de resistir e manter a viabilidade nas condições adversas do trato digestório superior dos hospedeiros, até alcançar o intestino.

5.1.2.1. Resistência ao suco gástrico artificial

O primeiro dos desafios que as bactérias devem vencer durante seu trânsito pelo trato digestório é o suco gástrico, que contém as enzimas digestórias que agem em um pH muito baixo, que mata a maioria das bactérias ingeridas (Jin et al., 1998).

Nesse teste, a inibição de *Lactobacillus* spp. em suco gástrico artificial foi calculada pela área sob a curva dos gráficos obtidos pelas medições durante 18 horas de incubação. Quase todos os isolados foram considerados resistentes. Apenas quatro isolados apresentaram taxas de inibição acima de 10% e foram classificados como tolerantes. A maior parte, (35/37) dos isolados, nesse estudo, mostrou uma porcentagem variável de 0 a 13,2% de inibição em pH 2,5, taxas que, podem ser consideradas como suficientes (Strompfová et al., 2004; 2006) (Figura 8, Quadro 4).

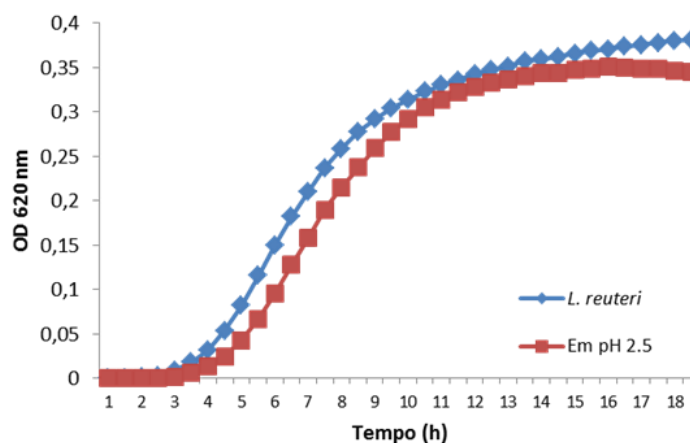


Figura 8: Gráfico representativo do crescimento de um isolado de *L. reuteri* com adição e na ausência de suco gástrico artificial (pH 2.5). As leituras foram feitas cada 30 minutos durante 18 horas e a medida da área, sob a curva desses gráficos foi usada para cálculo do crescimento nas duas condições. A linha azul equivale ao crescimento controle e a vermelha ao crescimento sob o desafio.

Quadro 4: Taxa de inibição de crescimento dos *Lactobacillus* isolados em presença de suco gástrico artificial, calculada pela área sob a curva dos gráficos

Isolado	% Inibição suco gástrico Área	Isolado	% Inibição suco gástrico Área
1	0	20	1,24
2	0,55	21	0,87
3	1,88	22	15,95
4	12,95	23	3,90
5	3,49	24	0
6	0,52	25	0
7	5,29	26	0
8	5,27	27	0,59
9	0,96	28	3,42
10	1,02	29	2,44
11	3,12	30	4,78
12	1,49	31	8,07
13	2,58	32	8,64
14	0,94	33	1,46
15	1,75	34	0
16	4,78	35	0,23
17	2,84	36	11
18	1,19	37	9,78
19	1,09		

Dos 37 isolados das fezes dos cães lactentes apenas três, os isolados 4 (*L. reuteri*), isolado 22 (*Enterococcus*) e isolado 36 (*L. reuteri*) apresentaram uma taxa de inibição de crescimento entre 11% e 16% em suco gástrico artificial após três horas de incubação, sendo os demais considerados resistentes, já que a diminuição do crescimento foi menor que 10%. O resultado obtido corrobora com outros autores que observaram que bactérias de origem intestinal tendem a ser mais resistentes aos ácidos estomacais (Morelli, 2000; Guo et al., 2009).

Guo et al. (2009) analisaram a tolerância de bactérias lácticas ao pH baixo dos sucos gástricos concluindo que poucas bactérias sobrevivem em pH entre 2 e 3 como encontrado no estômago. A maioria das bactérias teve o crescimento inibido em pH 4. Observaram, porém, que muitas das bactérias, que foram tolerantes ao pH 3 e algumas que foram inibidas em pH 4, cresceram rapidamente após restauração para pH 7. Os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia dessas bactérias ainda não foram completamente entendidos, mas já foi provado que

a acidificação interna reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos na síntese de proteínas e replicação do DNA (Lebeer et al., 2008).

Sabe-se que a fisiologia do trato digestório dos cães é diferente em relação a dos seres humanos. No homem, o pH no estômago varia de 0,9 a 3,0, enquanto nos cães é em torno de 3,4 (Zink et al., 2008). Strompfová et al. (2006), verificando a viabilidade de uso de *L. fermentum* AD1 como probiótico para cães saudáveis, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 86,8% da bactéria em pH 3,0 depois de 3 horas de incubação a 37°C, ou seja, uma taxa de inibição de crescimento de 13,2%. A taxa de sobrevivência em pH ácido foi considerada suficiente, entretanto um pouco baixa.

5.1.2.2. Susceptibilidade dos lactobacilos aos sais biliares

Além de tolerar o pH ácido no estômago, os probióticos têm como desafio os sais biliares intestinais. Os sais biliares representam moléculas anfipáticas, com atividade antimicrobiana, agindo como detergentes e rompendo membranas biológicas (Lebeer, et al., 2008). A concentração dos ácidos biliares, no trato intestinal humano é de aproximadamente 0,3% (7,35 μ M), enquanto no trato intestinal de cães as concentrações de bile variam de 2,1 a 7,8 μ M (Kogika et al., 1999). Sabe-se também que a taxa de resistência aos sais biliares tende a variar entre as bactérias do ácido láctico, bem como entre as linhagens de uma mesma espécie (Xanthopoulos, 1999).

Levando-se em consideração o cálculo da área sob a curva dos gráficos de crescimento dos isolados de cães, na presença e na ausência de sais biliares, estes foram classificados como resistentes quando apresentaram: (até 40% de inibição), tolerantes com (40 a 60% de inibição) e sensíveis com (mais de 60%). De acordo com os resultados, 45% dos isolados revelaram-se resistentes ao oxgall 0,3%, 47% tolerantes e apenas 8% mostraram-se sensíveis. Nesse trabalho destacaram-se quatro isolados: nº 10 (*L. reuteri*, 30,6% de inibição), 20 (*Enterococcus*, 29,6%), 23 (*L. murinus*, 30,4%), 26 (*L. reuteri*, 31,9%), 27 (*L. reuteri*, 28,7%) e 28 (*L. murinus*, 31,1%) como os mais resistentes aos sais biliares. A obtenção dos dados está exemplificada na Figura 9 e os dados no Quadro 5.

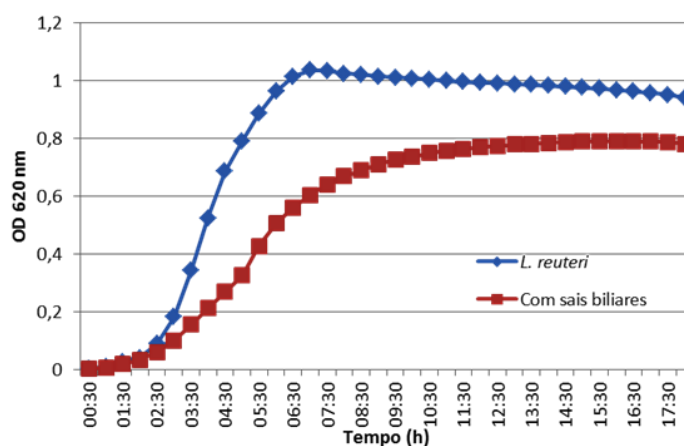


Figura 9: Gráfico representativo do crescimento de um dos *Lactobacillus reuteri* isolados, em presença (em vermelho) e na ausência de sais biliares (em azul). As medições ocorreram a cada 30 minutos, durante 18 horas e a medida da área, sob a curva desse gráfico foi usada para cálculo do crescimento nas duas condições.

Quadro 5: Taxa de inibição do crescimento dos *Lactobacillus* isolados, em presença de 0,3% de sais biliares, calculada pela área sob a curva dos gráficos.

Isolado	% de inibição Área	Isolado	% de inibição Área
1	80,0	20	29,6
2	39,8	21	41,65
3	48,85	22	39
4	42,10	23	30,35
5	39	24	44,3
6	54,05	25	38,5
7	40,9	26	31,9
8	39,10	27	28,70
9	37,8	28	31,05
10	30,6	29	66,2
11	45,35	30	56,6
12	36	31	61,85
13	41,4	32	55,9
14	33,45	33	34,95
15	35,8	34	50,3
16	42,5	35	44,2
17	37	36	37,15
18	42,85	37	46,8
19	43,75		

Se o padrão de concentração de sais biliares de 0,3% fosse levado em consideração nesse estudo, 81% das bactérias testadas seriam consideradas resistentes já que atingiram o

valor de OD_{620nm} de 0,3 em menos de 6 horas de incubação. Entretanto, 19% dos isolados não alcançaram esse valor em tempo e foram considerados tolerantes. Com base no cálculo da área sob a curva de crescimento, resultante das várias medições da densidade óptica durante 18 horas de cultivo, os isolados foram classificados como resistentes quando apresentaram até 40% de inibição, tolerantes de 40% até 60% de inibição e sensíveis com mais de 60% de inibição do crescimento. Baseados neste parâmetro, 17 isolados, do presente estudo foram considerados resistentes aos sais biliares.

No trabalho desenvolvido por Stropfová et al. (2006), a taxa de sobrevivência de *L. fermentum*, linhagem AD1, na presença de 1% de oxgall a 37°C depois de 24 horas de incubação foi de aproximadamente 75,4%, demonstrando uma taxa de inibição de crescimento bacteriano de 24,6%. Os mesmos autores em 2004, avaliando as características probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*, observaram uma taxa de sobrevivência variável entre seis linhagens de lactobacilos em 1% de oxgall a 37°C depois de 24 horas de incubação, com as taxas de sobrevivência bacteriana variando entre 67% (linhagem D1) e 75% (linhagem AD1). As taxas de inibição de crescimento, portanto, variaram de 25% a 33%. Baseados neste parâmetro, cinco isolados no presente estudo foram considerados resistentes aos sais biliares, variando de 28,7% a 31,9%.

Guo et al. (2009) confirmaram que apesar dos padrões existentes considerarem ideal a tolerância a 0,3% de sais biliares, na seleção de linhagens resistentes, nenhum dos 70 isolados de fezes de suínos que testaram sofreu efeitos inibitórios nessa concentração nem em 1,0% de sais biliares. Ao contrário, a maioria cresceu bem nessa concentração de sais. Em trabalho de Mishra e Prasad (2005) no qual testaram a tolerância de sete linhagens de *L. casei* a sais biliares, quatro sobreviveram na concentração de 1% e apenas uma em 2% desses sais.

5.1.2.3. Hidrofobicidade da superfície celular.

A hidrofobicidade da superfície celular relaciona-se diretamente com a capacidade das linhagens aderirem a outras superfícies animadas ou inertes. Uma propriedade essencial das linhagens com potencial probiótico é sua habilidade de aderirem mesmo que temporariamente ao epitélio da mucosa gástrica ou intestinal para que não sejam removidas devido ao peristaltismo (Nueno-Palop e Narbad, 2011; Zhang et al., 2007; Lebeer et al., 2008), sendo também um pré-requisito para colonização e atuação na exclusão competitiva de bactérias

patogênicas (Martin et al., 2005). O potencial de adesão pode ser medida em testes de hidrofobicidade, pois essa capacidade está relacionada aos componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas exercem função importante na adesão das bactérias ao epitélio (Mangoni, 2009). A hidrofobicidade de um dado material é expressa como a energia livre de interação entre dois entes físicos imersos na água. É possível avaliar qualitativamente a polaridade ou apolaridade da superfície bacteriana e sua importância na indicação do potencial de adesão do probiótico às superfícies apolares do epitélio intestinal e vaginal, através do teste de adesão a solventes (MATS). Entretanto, propõe-se que esse teste seja apenas um indicador primário da adesão de microrganismos (Mangoni, 2009).

De acordo com este teste, sete *Lactobacillus*, isolados de cães foram considerados como de alta hidrofobicidade: 1 (*L. animalis*, 69,87%), 4 (*L. reuteri*, 67%), 5 (*L. reuteri*, 67,04%), 7 (*L. reuteri*, 76,59%), 13 (*L. reuteri*, 66,71%), 14 (*L. reuteri*, 69,08%) e 15 (*L. paraplantarum*, 67,90%), representando 19% do total; os de média hidrofobicidade correspondem a aproximadamente 81% dos isolados e nenhum isolado apresentou baixa hidrofobicidade da superfície celular (Quadro 6).

Quadro 6: Proporção de adesão, que representa a hidrofobicidade, exibida pelos lactobacilos isolados, em presença de solvente orgânico apolar (xileno).

Isolado	% de associação	Isolado	% de associação
1	69,87	20	51,81
2	66,11	21	44,71
3	49,75	22	37,88
4	67,04	23	48,83
5	67,73	24	47,84
6	48,03	25	48,11
7	76,59	26	44,04
8	61,50	27	44,65
9	44,55	28	47,24
10	64,47	29	46,78
11	53,02	30	48,99
12	54,50	31	47,70
13	66,71	32	46,66
14	69,08	33	45,76
15	67,90	34	46,76
16	51,18	35	44,66
17	47,26	36	46,19
18	49,13	37	50,57
19	48,60		

As bactérias isoladas no presente trabalho apresentaram atividade antagonista para os patógenos bacterianos Gram-positivo e Gram-negativo testados. Esse efeito inibitório observado pode ser devido à produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas ou a combinação de vários desses compostos. Bacteriocinas são substâncias que agem como antibióticos, diferindo quanto à síntese, espectro microbiano, modo de ação, mecanismos de resistência e toxicidade, de acordo com a linhagem produtora (Nardi et al., 2005). A maioria dos lactobacilos que apresentaram antagonismo aos sete patógenos testados pertence à espécie *L. reuteri*. Já foi mostrado que linhagens de *L. reuteri* são capazes de produzir potentes antimicrobianos, tipo bacteriocinas e ácidos orgânicos. Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, não apresenta componentes protéicos e é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina, β -hydroxypropionaldeido (3-HPA), derivado do glicerol, é expressa em condições de anaerobiose e tem ação antimicrobiana, de amplo espectro, contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como fungos e protozoários (Spinler et al., 2008). A bacteriocina reutericina-6 foi identificada em isolados intestinais de *L. reuteri*. A reuterilcina foi identificada primariamente em linhagens isoladas de cereais. A produção de dois ou mais destes antimicrobianos por uma linhagem de *L. reuteri* ainda não foi descrita (Ganzle, 2004).

McCoy & Gilliland (2007) mostraram que todas as linhagens de *L. reuteri*, isoladas de cães, apresentaram efeito inibitório ao crescimento de *Salmonella enterica*, sorovariedade Typhimurium, que é um dos principais patógenos intestinais que acomete os cães, além de possuir potencial zoonótico (Rinkinen, 2003). Tal como *Salmonella*, *Escherichia coli* é outro patógeno que acomete os cães, podendo causar diarreia e osteomielite (Pereira et al. 2009). Notou-se que a grande maioria, 92% dos isolados de cães, apresentou efeito inibitório a *E. coli*. Em contrapartida, *Bacillus cereus*, foi o patógeno que sofreu menor atividade antagonista aos ácidos e substâncias antimicrobianas dos lactobacilos, não apresentando halo de inibição de crescimento por 16 dos 37 isolados avaliados. Trata-se de um patógeno Gram positivo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, formador de esporos. É causador de síndromes gastrointestinais nos animais e nos homens, estando também associado a infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos. Os *B. cereus* são altamente resistentes ao calor e a agentes químicos o que poderia justificar uma resistência maior deste patógeno aos antimicrobianos produzidos pelos lactobacilos isolados (Drobniewski, 1993). Notou-se também que a maioria das bactérias (89%) apresentou atividade antagonista para o isolado nº 20, *Enterococcus faecalis*, que é considerado uma BAL. Esse resultado sugere a produção de outras substâncias antagonistas por *L. reuteri*, além dos ácidos lático e acético. A bactéria da

espécie *Leptospira interrogans*, que causa leptospirose em cães, não sofreu inibição do crescimento por nenhum dos *Lactobacillus* isolados usados nos testes.

5.1.2.5. Produção de peróxido de hidrogênio.

A grande maioria das bactérias (34/37) dessa pesquisa mostrou produção de peróxido de hidrogênio, (Figura 10).

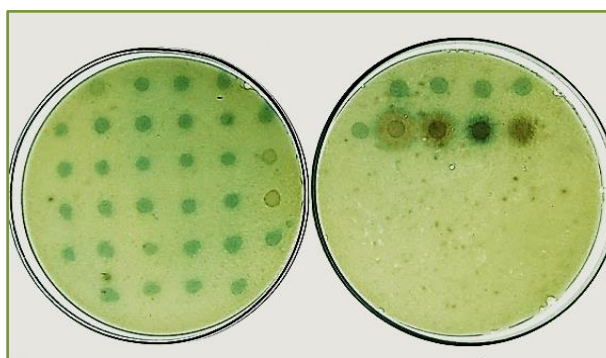


Figura 10: Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio por *Lactobacillus* isolados de fezes caninas. À esquerda mostra-se uma placa com os isolados de 1 a 32, à direita estão os isolados restantes de 33 a 37 e mais quatro amostras controle positivo.

O peróxido de hidrogênio é produzido normalmente por lactobacilos de origem vaginal, podendo também estar associados a lactobacilos intestinais ou que vivem nesse ambiente (Martín et al., 2009). A capacidade de produzir peróxido de hidrogênio está associada à colonização e proteção da mucosa vaginal, sendo importante para a manutenção da homeostase da microbiota, inibindo bactérias patogênicas (Vallor et al., 2001). As principais espécies produtoras de peróxido de hidrogênio são *L. crispatus* e *L. jensenii* (Branco et al., 2010), entretanto já foram encontradas outras espécies capazes de produzir esta substância, como *L. plantarum* (Johnston & Delwiche, 1962), *L. sakei* (Chaillou et al., 2005), *L. acidophilus* (Collins & Aramaki, 1980) e *L. delbrueckii* e também outros gêneros de BAL como *Lactococcus lactis* (Dahiya & Speck, 1968). Ao contrário das linhagens de *L. acidophilus* isoladas de leite desnatado por Collins & Aramaki (1980), o isolado de número 16 (*L. acidophilus*), obtido durante esse trabalho, não apresentou nenhuma produção de peróxido de hidrogênio.

5.1.2.6. Teste de resistência dos *Lactobacillus* isolados, aos antibióticos.

Sete isolados, seis *L. reuteri* e um *L. paraplantarum*, previamente selecionados, por apresentarem propriedades probióticas em potencial, de acordo com os resultados dos outros testes foram submetidos ao antibiograma ou teste de resistência a antibióticos, (Quadro 8).

Quadro 8: Perfil de resistência aos antimicrobianos dos sete isolados de lactobacilos selecionados como melhores probióticos em potencial

Isolados/Antibióticos	AMP	VAN	PEN	OXA	E	CIP	AMI	CRO
2 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
5 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
7 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
8 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
10 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
14 (<i>L. reuteri</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S
15 (<i>L. paraplantarum</i>)	S	R	S	R	R	R	R	S

R = resistente S = sensível; AMP = ampicillin (30 µg), CRO = ceftriaxone (30µg), E = erythromycin (15µg), OXA = oxacillin 1µg) PEN = penicillin G (10 U), AMI = amikacin (30 µg), CIP = ciprofloxacin (1 µg) VAN = vancomycin (30 µg).

Nos testes de resistência a antibióticos, observou-se que os isolados de lactobacilos apresentaram idêntico padrão de resistência/sensibilidade às drogas às quais foram desafiados. Foram resistentes a quatro dos antibióticos testados: vancomicina, ciprofloxacina, amicacina e oxacilina. Esses resultados foram similares aos das frequentes pesquisas que relatam um elevado grau de resistência de gêneros de bactérias do ácido lático aos antibióticos das classes dos glicopeptídeos (vancomicina), aminoglicosídeos (amicacina) e penicilinas resistentes à betalactamase e penicilinase (oxacilina) (Barton, 2000; Ammor, Flórez e Mayo, 2007; Belletti et al., 2009).

Yuksekdag e Beyath (2004) isolaram linhagens de *L. casei* e *L. helveticus* resistentes à penicilina, a partir de laticínios. Nesse estudo, entre 24 espécies de bactérias do ácido lático, dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, 44% eram resistentes à penicilina. A impermeabilidade da parede celular dos *Lactobacillus* pode ser a principal causa

da resistência encontrada nessas bactérias, entretanto, outros mecanismos podem causar diferença de resistência mesmo dentro da mesma espécie (Zdolec et al., 2008).

As bactérias lácticas usadas como probióticos podem ser potenciais reservatórios de genes de resistência a antibióticos, sendo capazes de transferí-los para bactérias patogênicas (Singh; Preet; Rishi, 2011). Entretanto, Ammor et al. (2008) mostraram que a maioria dos lactobacilos possui uma grande resistência natural ou genética a antibióticos, como: bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídico, canamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoina, norfloxacin, estreptomcina, sulfadiazina, trimethoprim/sulfametoxazol, teicoplanina e vancomicina. Entende-se que a resistência aos antibióticos amicacina e oxacilina observada no presente estudo (Jung et al., 2013), é também natural ou intrínseca, porque esse tipo de resistência não é citada na literatura como transferível por plasmídeos conjugativos em lactobacilos (Singh; Preet; Rishi, 2011). Mesmo que, alguns padrões de resistência/sensibilidade a antibióticos sejam espécie ou linhagem-específicos, até agora nenhum modelo foi determinado para bactérias do gênero *Lactobacillus* (Isolauri et al., 2001).

Ainda que plasmídeos que carregam genes de resistência a antibióticos não sejam comuns em lactobacilos, eles podem ocorrer e a segurança destas bactérias para o hospedeiro pode ser comprometida. Linhagens que possuem plasmídeos com genes de resistência não devem ser usadas como probióticos para humanos ou animais. Portanto, trata-se de uma precaução investigar e analisar se o probiótico proposto carrega genes de resistência transferíveis por plasmídeos (Ammor et al., 2008). É necessário, porém, que se saiba separar a resistência adquirida daquela resistência intrínseca, não transferível, em lactobacilos.

5.1.2.7. Isolados com potencial probiótico

No quadro 9 estão sintetizados os resultados dos primeiros testes realizados para a caracterização probiótica dos 37 lactobacilos isolados de fezes caninas.

Na avaliação geral dos lactobacilos isolados de cães lactentes, com características probióticas e possíveis candidatos a adjuvantes ou veículos vacinais orais, destacaram-se seis isolados da espécie *L. reuteri* e um isolado pertencente à espécie *L. paraplantarum*. Todos apresentaram baixa inibição por ácidos, baixa ou moderada inibição por sais biliares, boa capacidade de adesão nos testes *in vitro* e boa atividade antagonista. Eles foram capazes de

inibir todos ou quase todos os patógenos testados, justificando sua capacidade em auxiliar no combate às infecções do trato gastrointestinal.

Quadro 9: Resultado da caracterização probiótica dos lactobacilos isolados em fezes de cães lactentes. Em vermelho, as linhagens selecionadas baseadas nos resultados gerais de caracterização funcional

Isolado	Identificação	Antagonismo	Hidrofobicidade (%)	Inibição em suco gástrico (%) Área	Inibição em Sais biliares (%) Área	Peróxido de Hidrogênio
	Crista Chinês	Bc Ef Sa Lm Ec Se Pa				
1	<i>L. animalis</i>	- + - + + + -	69,9	0	80,0	-
2	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	66,1	0,55	39,8	+
3	<i>L. sanfranciscensis</i>	+ + + + + + -	49,8	1,88	48,9	+
4	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	67,0	12,95	42,1	+
5	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	67,7	3,49	39,0	+
6	<i>L. animalis</i>	+ + + + + - +	48,0	0,52	54,1	+
7	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + - +	76,6	5,29	40,9	+
8	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + - +	61,5	5,27	39,1	+
9	<i>L. sanfranciscensis</i>	+ + + + + + +	44,6	0,96	37,8	+
10	<i>L. reuteri</i>	+ - + + + + +	64,5	1,02	30,6	+
11	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	53,0	3,12	45,4	+
12	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	54,5	1,49	36,0	+
13	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	66,7	2,58	41,4	+
14	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	69,1	0,94	33,5	+
15	<i>L. paraplantarum</i>	+ + - + + + +	67,1	1,75	35,8	+
16	<i>L. acidophilus</i>	+ + + - + + +	51,2	4,78	42,5	-
	Yorkshire Terrier					
17	<i>L. acidophilus</i>	- - + + + + +	47,3	2,84	37,0	+
18	<i>Enterococcus</i>	- - + + + + +	49,1	1,19	42,9	+
19	<i>Enterococcus</i>	- - + + + + +	48,6	1,09	43,8	+
20	<i>E. faecalis</i>	+ + + + + + -	51,8	1,24	29,6	+
21	<i>Enterococcus</i>	- + + + + + +	44,7	0,87	41,7	+
22	<i>Enterococcus</i>	+ + + + + + +	37,9	15,95	39,0	-
23	<i>L. murinus</i>	- + + + + + +	48,8	3,90	30,4	+
24	<i>Enterococcus</i>	- + - + + + -	47,8	0	44,3	+
25	<i>Enterococcus</i>	- + + + + + -	48,1	0	38,5	+
26	<i>L. reuteri</i>	- + - + + + -	44,0	0	31,9	+
27	<i>L. reuteri</i>	- + + + + + -	44,7	0,59	28,7	+
28	<i>L. murinus</i>	+ + + + + + +	47,2	3,42	31,1	+
29	<i>L. animalis</i>	- + - + + + +	46,8	2,44	66,2	+
30	<i>L. animalis</i>	- + + + + + +	49,0	4,78	56,6	+
31	<i>L. animalis</i>	- + + + + + +	47,7	8,07	61,9	+
32	<i>L. animalis</i>	- + + + + + +	46,7	8,64	55,9	+
33	<i>L. reuteri</i>	- + + + + + +	45,8	1,46	35,0	+
34	<i>L. animalis</i>	+ + + + + + +	46,8	0	50,3	+
35	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	44,7	0,23	44,2	+
36	<i>L. reuteri</i>	+ + + + + + +	46,2	11	37,2	+
37	<i>L. reuteri</i>	- + + + + + +	50,6	9,78	46,8	+

Bc (*B. cereus*), Ef (*E. faecalis*), Sa (*S. aureus*), Lm (*L. monocitogenes*), Ec (*E. coli*), Se (*S. enterica*), Pa (*P. aeruginosa*).

5.1.2.8. Caracterização das linhagens diferentes entre *L. reuteri* isolados

Após os testes fisiológicos com os *Latobacillus* isolados foi necessário investigar a ocorrência de diferentes linhagens entre os isolados da espécie *L. reuteri*. Figura 11.

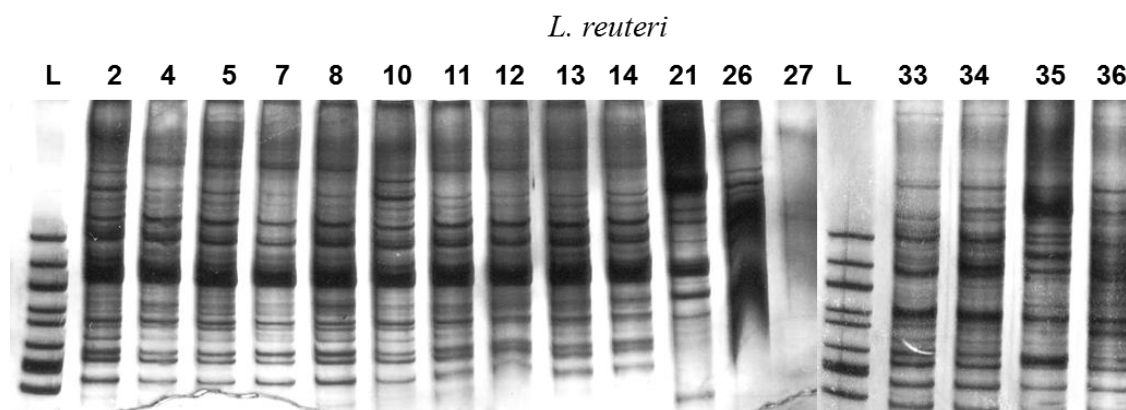


Figura 11: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis de restrição obtidos das sequências amplificadas com o iniciador GTG₅, para identificar linhagens diferentes entre as espécies de *L. reuteri*, isoladas em fezes de cães lactentes. Os isolados 2 e 10 pertencem à mesma linhagem, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 e 14 são de outra linhagem, o isolado 21 é linhagem diferente das demais e não foi possível determinar as linhagens dos isolados 26 e 27.

Após amplificação do DNA dos isolados de *L. reuteri*, utilizando os perfis de sequências repetitivas intercalares, obtidos por PCR de GTG₅, concluiu-se que apresentam três linhagens diferentes: os isolados 2 e 10 pertencem à mesma linhagem, os isolados 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 e 14 pertencem a uma linhagem diferente da primeira e o isolado 21 é de linhagem diferente das demais. A linhagem dos *L. reuteri* isolados, com números 26 e 27 não pode ser definida.

5.1.3. Testes realizados *in vivo*.

5.1.3.1 Avaliação de ganho de peso pelos hamsters suplementados por via oral com as duas espécies de lactobacilos *L. paraplantarum* (isolado 15) e *L. reuteri* (isolado 2).

Em todos os experimentos *in vivo* os resultados foram analisados por testes estatísticos e foram consideradas diferenças significativas os valores menores que 5% ($p < 0,05$), tendo sido obtidas as médias, o desvio-padrão e coeficiente de variação de cada conjunto de dados.

De acordo com os testes estatísticos realizados e os dados das pesagens dos cinco animais de cada grupo, nos três experimentos, não foi constatada nenhuma alteração significativa no ganho de peso dos hamsters, submetidos aos tratamentos com *L. reuteri* (2) e *L. paraplantarum* (15), isolados de fezes de cães lactentes, em relação ao grupo controle. O resultado é mostrado na figura 12.

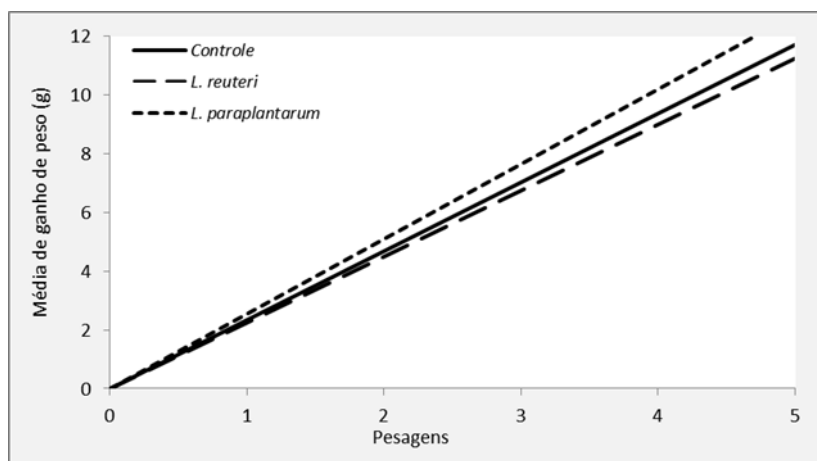


Figura 12: Ganho de peso dos hamsters suplementados com *Lactobacillus reuteri* (2), *L. paraplantarum* (15) e solução salina (controle) durante 9 dias. Foi obtida a média das cinco pesagens em cada uma de três repetições dos testes.

Na avaliação de ganho de peso dos hamsters tratados com as duas espécies de lactobacilos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado. Entretanto quando Fak & Backhed (2012) investigaram a influência de três linhagens diferentes de *L. reuteri*, sobre peso, metabolismo da glicose e arteriosclerose em camundongos *ApoE*^{-/-}, observaram variação na redução da adiposidade entre animais que receberam linhagens diferentes, em relação ao controle, que não foi suplementado com os lactobacilos. Excluíram perda de apetite uma vez que a quantidade de alimento consumida pelos grupos não variou, nem ocorreu diminuição na formação de placas de arteriosclerose. Foi observado também, que nos animais suplementados com a linhagem ATCC de *L. reuteri*, houve maior expressão de *Cpt1a*, uma proteína mitocondrial com função de regular o transporte de ácidos graxos de cadeia longa através das membranas em regiões do fígado, o que pode indicar influência da microbiota intestinal no teor de adipócitos. Curiosamente, um grupo dos mesmos animais, que receberam a bactéria nos bebedouros, exibiram baixos níveis

de insulina no sangue e apresentaram menor índice de gordura hepática. Na suplementação de camundongos *Swiss* com *Weissella mesenteroides* WPK4, isolada de mucosas de suínos, foi observada tendência ao ganho de peso em todos os grupos, mesmo nos animais desafiados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium, indicando alguma proteção contra a perda de peso durante uma infecção (Alvim 2011).

Competindo com patógenos intestinais e outros parasitas ou induzindo a defesa inata nas membranas mucosas, as BAL promovem a homeostase intestinal facilitando a absorção de nutrientes importantes para produção de substâncias essenciais no metabolismo celular. Por isso, é esperado que indivíduos com deficiência de peso alcancem um equilíbrio na medida em que forem suplementados com essas bactérias (Mulder et al., 2009).

5.1.3 2. Teste de antagonismo (*ex-vivo*) contra patógenos.

Os testes *ex-vivo* consistem de uma mensuração indireta dos antimicrobianos produzidos por bactérias residentes durante seu ciclo de vida no intestino e seus resíduos liberados junto com fezes e urina.

Com a formação de halos de inibição do crescimento dos patógenos testados com as fezes dos animais tratados com *L. paraplantarum* (15) e *L. reuteri* (2), observou-se que houve efeito antimicrobiano contra alguns deles. Entretanto quando o diâmetro do halo foi analisado, sob ponto de vista estatístico, essa inibição não foi relevante e considerada normal em relação ao grupo controle. A pequena inibição observada pode ter ocorrido também em função da atividade antimicrobiana de outras bactérias do ambiente intestinal dos hamsters, já que foram observadas também em alguns indivíduos do grupo controle. O resultado é mostrado no gráfico da figura 13.

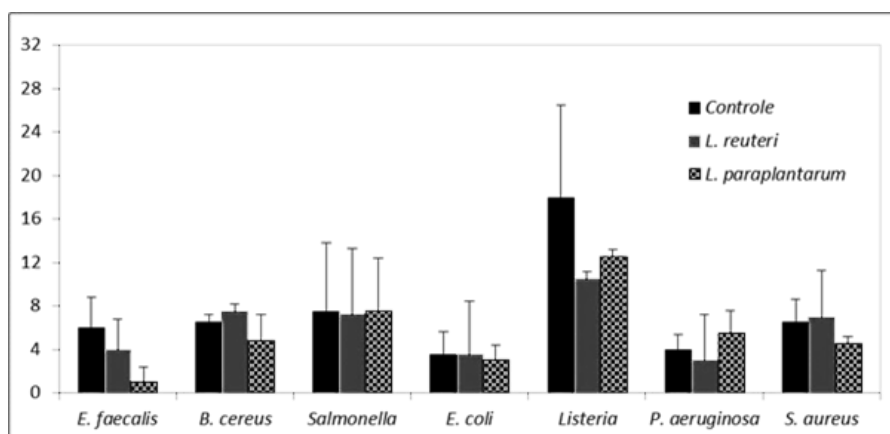


Figura 13: Resultados do antagonismo *ex-vivo* contra patógenos. No eixo de Y estão as medidas dos raios dos halos de inibição formados. Os patógenos testados estão listados no eixo de X e as barras verticais representam os grupos dos tratamentos: controle, *L. reuteri* (2) e *L. paraplantarum* (15).

A microbiota intestinal é sem dúvida, importante apoio para um sistema imunológico funcional, mas equilibrado. Os lactobacilos fornecidos por via oral podem colonizar transitoriamente, o trato gastrointestinal (TGI) e influenciar nesse equilíbrio. É essa atuação das BAL que tem despertado interesse dos pesquisadores na atualidade. É evidente que as bactérias que colonizam o TGI não são simples comensais e têm uma comunicação ativa com o sistema imunológico. Algumas linhagens de lactobacilos podem se translocar passivamente na mucosa, interagir com leucócitos e penetrar na circulação via sistema linfático, influenciando muitos eventos do sistema imunológico. Por outro lado, algumas linhagens de lactobacilos estimulam diretamente as células linfóides da mucosa intestinal (Cross, M.L., 2002).

5.1.3.3. Avaliação da indução de resposta imune em tecidos de hamsters tratados oralmente com lactobacilos das espécies *L. reuteri* (2) e *L. paraplantarum* (3).

O presente trabalho focalizou o efeito das duas linhagens, *L. paraplantarum* (isolado 15) e *L. reuteri* (isolado 2), que apresentaram boas características funcionais, desejáveis para microrganismos probióticos, entre os 37 isolados, na ativação das citocinas pró e anti-inflamatórias nos *Golden Syrian Hamsters*.

Os *Golden Syrian Hamsters* possuem características imunológicas diferenciadas de outros animais de estudos, bem como a susceptibilidade a patógenos, principalmente os intracelulares. Diferente dos camundongos e ratos eles são sensíveis às leptospiroses representando, portanto, o modelo ideal para os estudos relacionados com a leptospirose em humanos e animais. Entretanto estudos imunológicos em hamsters têm sido limitados pela ausência de técnicas adequadas (Espitia et al., 2010).

Em uma infecção experimental com *Leptospiras interrogans*, sorovariedade Icterohaemorrhagiae em *Golden Syrian Hamsters*, Vernel-Pauillac & Merien (2006) compararam os níveis de transcrição de mRNA para citocinas durante 24h nas células mononucleares do sangue periférico (PMBC) e observaram aumento significativo de TNF- α após 1h da infecção, alcançando valores de até 4,8 vezes acima do observado no grupo controle e voltando ao nível basal próximo às 24 horas de investigação. O nível de INF- γ aumentou na 8ª hora pós-infecção em até 2,9 vezes, decrescendo até a 16ª hora, mas só foi observado após o pico de expressão do TNF- α , levando a supor atuação sinérgica sobre INF- γ . Também houve aumento de 1,9 vezes na expressão de IL-12 após 4 horas da infecção, porém esse nível foi próximo ao do grupo controle.

5.1.3.3.1. Verificação de ausência de DNA contaminante nas amostras de RNA total extraído de tecidos de hamsters.

Os ensaios de qPCR realizados com RNA total, tratado e não tratado com a enzima Turbo DNase I confirmou a atividade da enzima, destruindo o DNA remanescente nas amostras do RNA extraído nos tecidos dos hamsters. Já nas amostras não tratadas com a DNase ainda ocorreu amplificação, confirmando que a metodologia que foi usada para obtenção do mRNA total não é eficiente na eliminação dos resíduos de DNA contaminante. O resultado é mostrado na curva de amplificação. Figura 14.

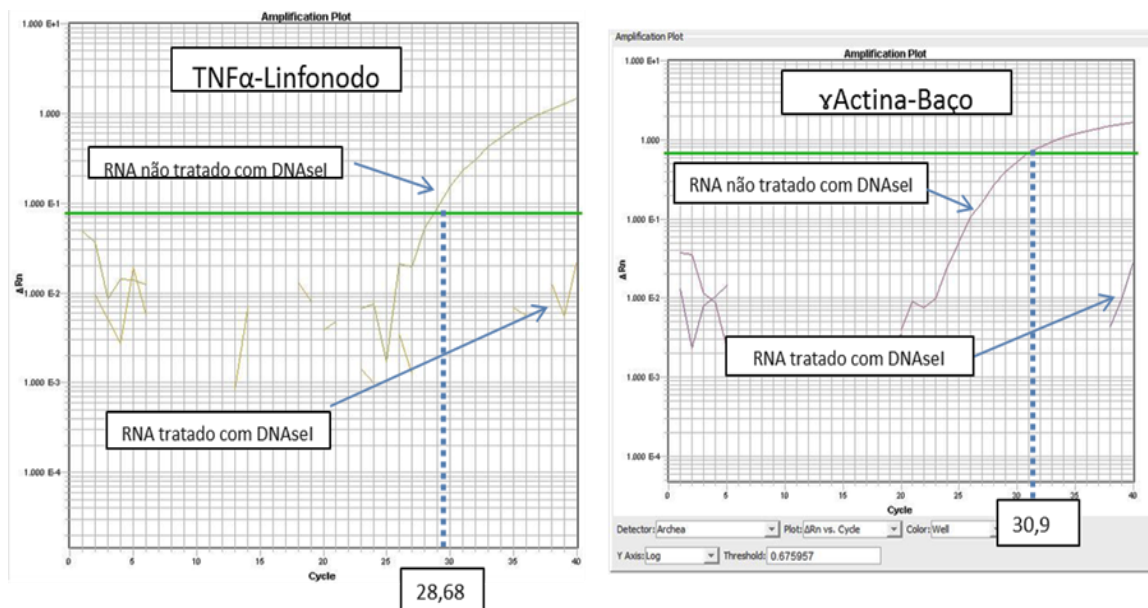


Figura 14: Curva de amplificação na reação de qPCR realizada com amostras de RNA total, tratado e não tratado com DNase I. A linha pontilhada mostra o valor Cq com o qual pode ser calculada a quantidade do DNA residual nas amostras do material não tratado.

5.1.3.3.2. Padronização dos iniciadores

No processo de padronização, a especificidade das reações foi avaliada através das curvas de dissociação produzidas com cDNA, confeccionado a partir do RNA total de baço, linfonodos e intestino delgado de amostras de hamsters do grupo controle. As curvas foram obtidas a partir de diluições seriadas do cDNA para todos os genes de citocinas e de referência usados (IL2, IL4, IL10, IL12p40, IL13, IL21, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , FOXP3, HPRT, β -Actina e γ -Actina). O sistema da plataforma produz gráficos da amplificação, da curva padrão e de dissociação cujos dados foram utilizados nos cálculos que levaram à identificação dos parâmetros ideais para cada iniciador (Figura 15).

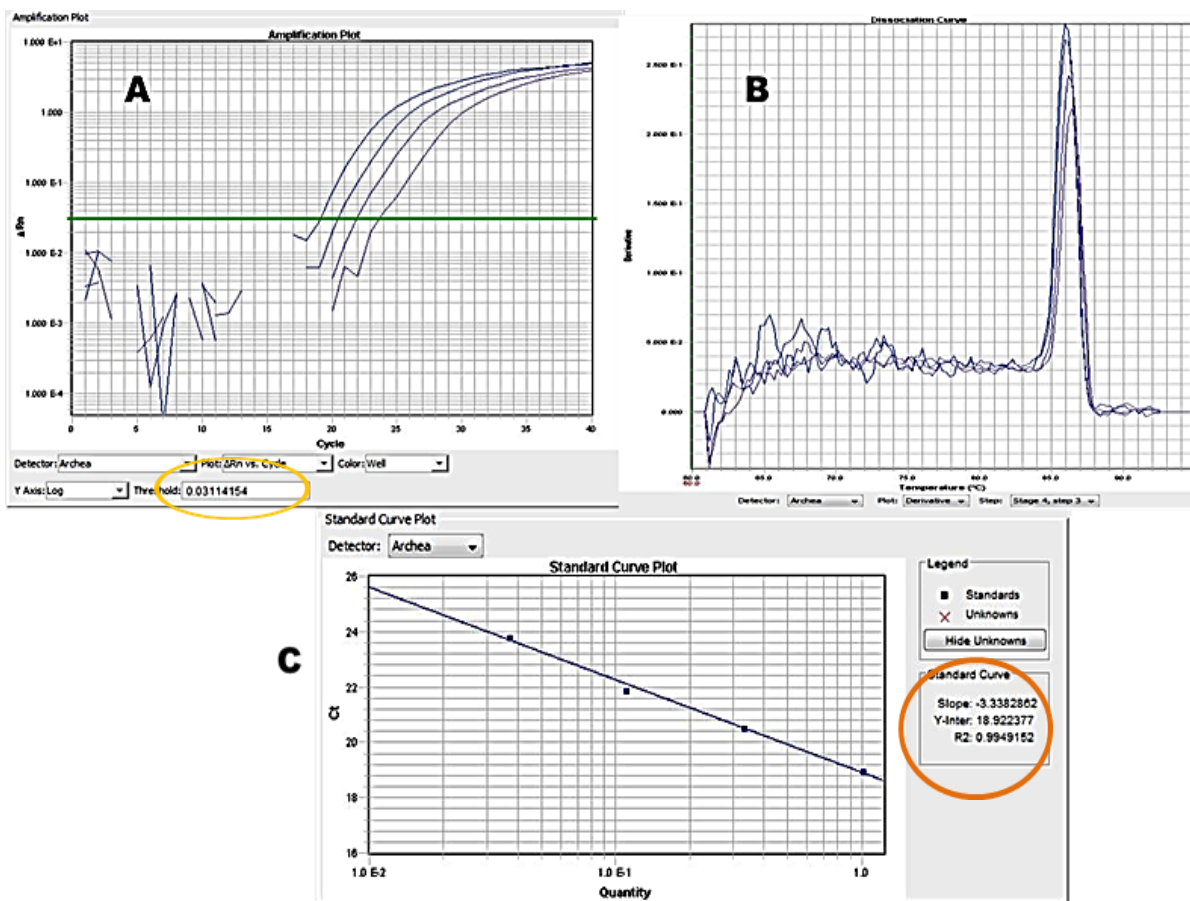


Figura 15: Resultado da PCR em tempo Real mostrando as Curvas de amplificação, dissociação e diluição do cDNA de TGFβ obtido do RNA total, extraído de baço de hamsters, construídas a partir dos dados obtidos do programa SDS 2.4 (Life Technologis). A- Na curva de amplificação as linhas roxas representam as diferentes diluições do cDNA. No eixo do X os ciclos de amplificação no Y os valores ΔRn (fluorescência). A linha verde representa o limiar ou *threshold* de fluorescência para determinação do Cq. B- Na curva de dissociação representando no pico o ponto de dissociação do produto amplificado. Eixo X com valores de temperatura e Y com ΔRn. C- Na curva de diluição do cDNA em relação ao Cq de amplificação de cada diluição. Circulados estão os valores de *threshold* e o *slope* que são os dados usados para calcular o volume inicial e a eficiência da amplificação.

As condições de padronização de cada par de iniciador, no cDNA obtido a partir do RNA total de cada amostra de tecido coletado, bem como a eficiência das reações, temperatura de anelamento e tamanho dos amplicons de cada gene, padronizados para cada tecido coletado, estão resumidos nas tabelas 2, 3 e 4.

Iniciador	[]	Slope	Eficiência	Threshold	Temp. °C	DNASE	Amplicon
TGF-β	20 PMOL	-3,3383	0,993218472	0,03114154	60	AB	245
TNF-α	6PMOL	-3,2471	1,032186323	0,27236962	60	AB	278
β-Act	6PMOL	-3,4959	0,932192149	0,02396179	60	AB	357
IL-10 A	15PMOL	-2,9667	1,173082567*	0,07802171	60	AB	308
HPRT	15PMOL	-3,1568	1,073868039	0,2066343	60	AB	242
INF-γ	10PMOL	-3,2731	1,02077326	0,04518528	60	AB	226
γ-Act	10PMOL	-3,82647	0,8253138*	0,675957	60	AB	70
IL-10 B	6PMOL	-3,5909	0,8988107	0,033264	60	AB	194
IL-21	20PMOL	-3,416	0,9621852	0,075159	60	AB	80
FOXP3	20PMOL	-3,64352	0,8813093*	0,255536	60	AB	72
IL-12 B	6PMOL	-3,31309	1,0037005	0,26984332	62	AB	88

Tabela 2: Condições padronizadas de RT-qPCR e eficiência das reações e tamanho dos amplicons, que foram usados para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas sintetizadas em amostras de baço de hamsters

Tabela 3: Condições padronizadas, dos dados de RT-qPCR e eficiência das reações, usadas para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de linfonodos de hamsters

iniciador	[]	Slope	Eficiência	Threshold	DNase
TGF-β	15 PMOL	-3,1955	1,055605766	0,10751059	FERMENTAS
TNF-α	20 PMOL	-3,5821	0,90181616	0,42420297	FERMENTAS
β-Actina	6 PMOL	-3,340557	0,992284132	0,017692523	FERMENTAS
IL10 A	10 PMOL	-3,21729	1,045595715	0,15169122	FERMENTAS
HPRT	15 PMOL	-3,265269	1,024200154	0,02587357	FERMENTAS
INF-γ	10PMOL	-3,2476	1,031987897	0,1047373	FERMENTAS
γ-Actina	10PMOL	-3,60036	0,895612833	0,8606	FERMENTAS
IL-10 B	10 PMOL	-3,3137	1,003445039	0,0295	FERMENTAS
IL-21	10PMOL	-3,53199	0,919227126	0,3921	FERMENTAS
FOXP3	15PMOL	-3,63777	0,883189307	1,1939	FERMENTAS

Tabela 4: Condições padronizadas, dos dados obtidos do RT-qPCR e eficiência das reações, usadas para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de intestino de hamsters

Iniciador	[]	Slope	Eficiência	Threshold	DNASE
TGF-β	20PMOL	-3,5735	0,904740837	0,22650542	AB
TNF-α	10PMOL	-3,3794	0,976568797	0,08402901	AB
β-Actina	10 PMOL	-3,577413	0,9034065	0,066554	AB
IL-10	15PMOL	-3,3519	0,98765537	0,03992169	AB
HPRT	6PMOL	-3,5587	0,909869878	0,09138923	AB
INF-γ	10PMOL	-3,4218	0,959943141	0,12456434	AB
IL-2	15PMOL	-3,3964	0,96983707	0,0792611	AB
IL-4	15PMOL	-3,3403	0,992408705	0,09095605	AB
γ-Actina	10PMOL	-3,399	0,968690566	0,04912922	AB
IL-4	15PMOL	-3,3403	0,992408705	0,09095605	AB
γ-Actina	10PMOL	-3,399	0,968690566	0,04912922	AB

A mensuração dos níveis de proteínas é o fator mais relevante para entender a imunopatogênese e imunidade nos organismos. A maioria dos genes para citocinas de respostas imunes são regulados transcricionalmente permitindo a quantificação por PCR em tempo real. Assim, nosso interesse foi conhecer o desempenho dos *Lactobacillus* na ativação das respostas imunológicas. Então, os isolados de números (2) de *L. reuteri* e (15) de *L. paraplantarum* foram selecionados para testes de imunomodulação *in vivo* em modelo experimental com hamsters.

Células T auxiliares tipo 1 (Th1) produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α que por sua vez ativam macrófagos e células T citotóxicas, estimulando a defesa celular contra patógenos. Essas células podem secretar IL-3 e o “Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos-Macrófagos” (GM-CSF) para incrementar a produção de mais leucócitos na medula óssea. Células T, tipo 2 (Th2) secretam IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-31, que ativam a produção de IgA pelas células B, promovendo a inflamação pela atração de eosinófilos, mastócitos e células T ativadas (CD4+). Em resposta, as células T regulatórias secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TNF- β , de modo a controlar a produção de IgA e proliferação de células Th1 e Th2 (Kawashima et al., 2011). É aceito que linhagens de lactobacilos são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ , e até as anti-inflamatórias como IL-10, assim como, que o tipo de indução pró ou anti-inflamatória, varia de acordo com a linhagem do lactobacilo (Jung et al., 1995).

Os dados da expressão relativa dos genes normalizadores β -Actina, γ -Actina e HPRT são mostrados nos gráficos obtidos a partir da variação dos níveis relativos de RNAm para esses genes, no baço, linfonodos e intestino delgado de hamsters submetidos ao tratamento com *L. reuteri* (2) e *L. paraplantarum* (15) em relação ao grupo controle. Tal como foi observado, nenhum dos dados apresentou diferença estatística quando a quantidade de produtos desses genes foi analisada no baço, linfonodos e intestino delgado dos hamsters tratados, em relação ao grupo controle (Figura 16).

O resultado da expressão relativa de citocinas em tecidos de hamsters é mostrado nas figuras 17, 18 e 19, em gráficos construídos a partir dos dados da qPCR em tempo real, usando os iniciadores relacionados na tabela 1 (página 50).

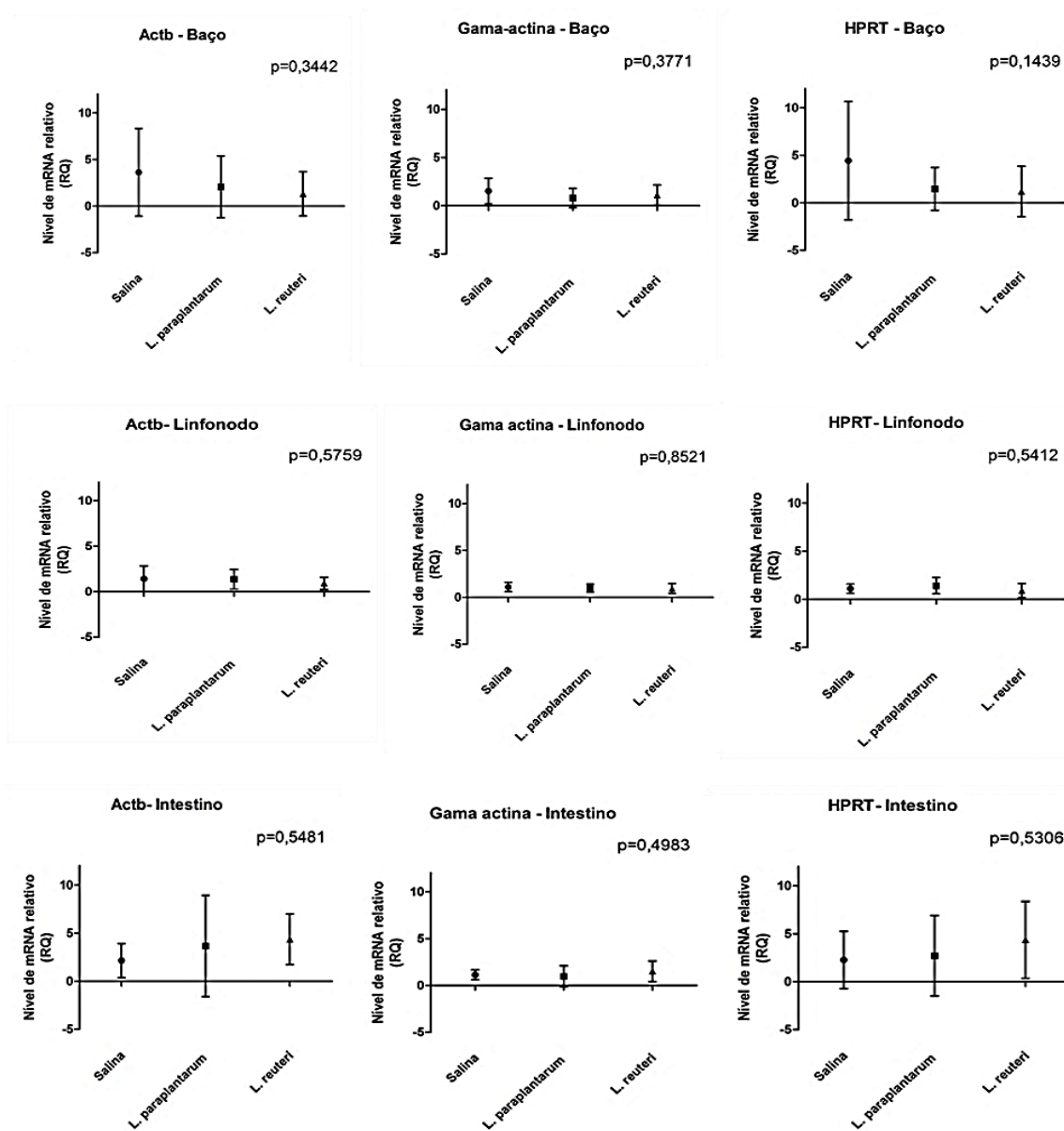


Figura 16: Perfil mostrado na RT-qPCR e análises estatísticas dos dados de níveis relativos de RNAm para os genes normalizadores β -Actina, γ -Actina e HPRT, obtidos nos três tecidos de hamsters testados (baço, linfonodos e intestino delgado), em função dos tratamentos, por via oral, com solução salina (controle), com *L. paraplantarum* (15) e *L. reuteri* (2).

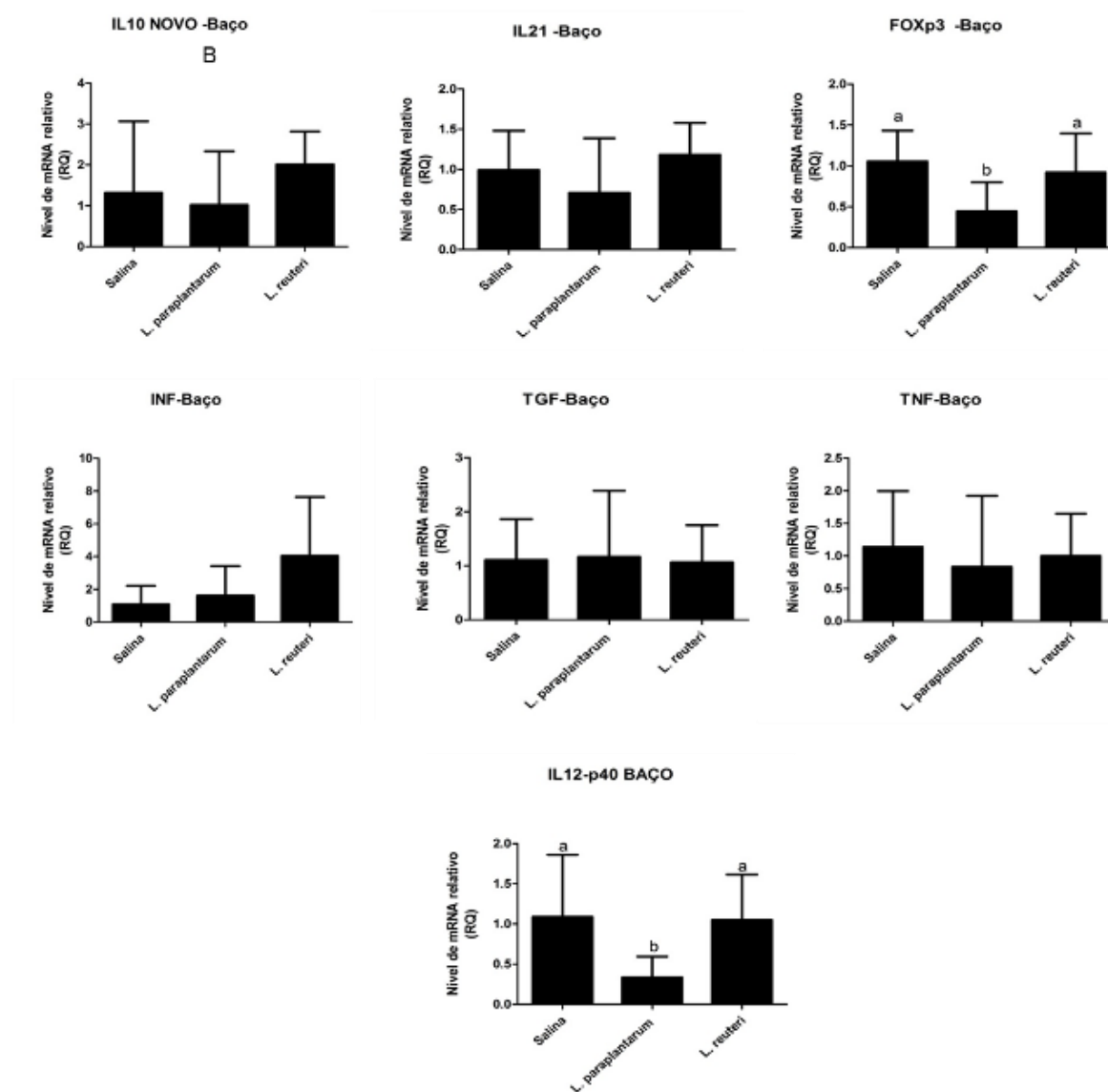


Figura 17: Perfil mostrado na RT-qPCR relativos a expressão de citocinas nos tecidos do baço dos *Golden Syrian Hamsters* submetidos aos tratamentos via oral com *L. paraplantarum* (15) e *L. reuteri* (2), isolados em fezes de cães lactentes. Ausência de letras ou letras iguais, sobre as barras, correspondem à variação não significativa ou $p > 0,05$. Letras diferentes indicam tratamentos nos quais houve diferença na expressão da citocina.

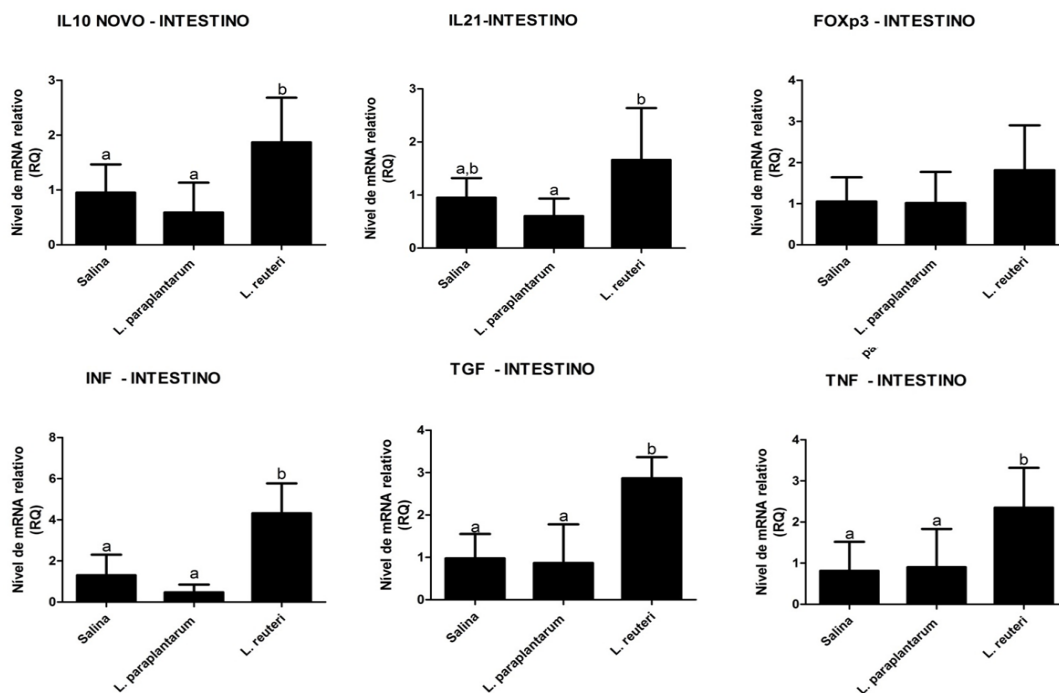


Figura 18: Perfil da RT-qPCR mostrando os dados relativos da expressão de citocinas nos intestino delgado dos *Golden Syrian Hamsters*, submetidos aos tratamentos, via oral com *L. paraplantarium* (15) e *L. reuteri* (2), isolados em fezes de cães lactentes. Ausência de letras sobre as barras, indicam não ocorrência de variação significativa na expressão das citocinas em razão dos tratamentos realizados.

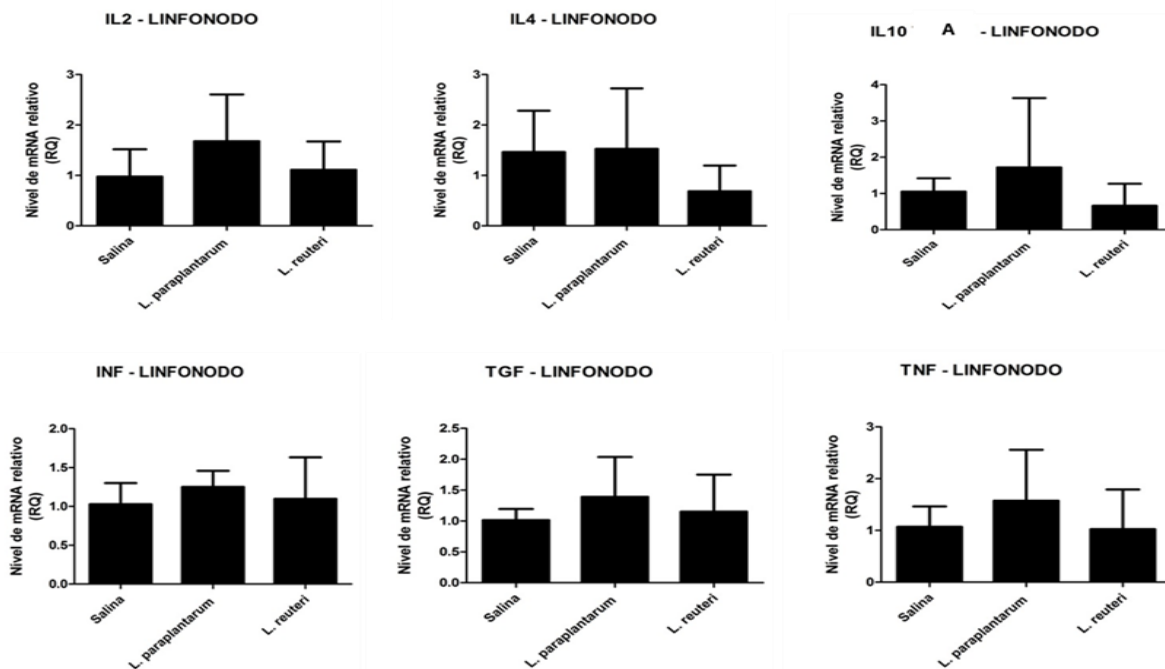


Figura 19: Perfil da RT-qPCR mostrando os dados relativos da expressão de citocinas nos tecidos do linfonodo dos *Golden Syrian Hamsters*, submetidos aos tratamentos via oral com *L. paraplantarium* (15) e *L. reuteri* (2), isolados em fezes de cães lactentes. Ausência de letras ou letras iguais, sobre as barras, correspondem à variação não significativa ou $p > 0,05$. Letras diferentes indicam tratamentos nos quais houve diferença na expressão da citocina.

Não foi detectada a expressão das interleucinas IL-2, IL-4 e IL-13 nos tecidos do baço e intestino delgado dos hamsters tratados com *L. paraplantarum* (15), *L. reuteri* (2) ou no grupo controle mesmo após a utilização de diferentes iniciadores. IL-2 é importante por sua ação citolítica atuando no crescimento de células NK e em células B para produção de anticorpos específicos. A síntese de IL-4 promove a regulação imune estimulando a expressão de moléculas de adesão necessárias para produção de IgE por mastócitos e eosinófilos, além de atuar como fator de diferenciação de células T. Uma vez que não foram detectados em seu nível basal, no grupo controle pode-se deduzir que os iniciadores não tiveram a especificidade necessária.

Nos animais tratados com *L. paraplantarum* (15), somente foi observada diferença estatística na diminuição da expressão relativa de IL-12 e Foxp3, nos tecidos do baço. A IL-12 é sintetizada em resposta a estímulos microbianos e células T auxiliares, por DC e macrófagos. Sua presença incentiva a produção de INF- γ por linfócitos T regulatórios e pelas células NK. É um importante mediador da resposta imune inata e indutor da resposta mediada por células. A Foxp3, também denominada *fork-headboxP3*, é um fator de regulação de transcrição para as células T regulatórias que atuam no reconhecimento de antígenos desconhecidos, evitando respostas auto-imunes. Um aumento na expressão de Foxp3 poderia indicar a ativação da produção de linfócitos T CD4+ (Treg), uma vez que a atividade de Foxp3 é vital na polarização dessas células.

Nos tecidos do intestino delgado dos animais tratados com *L. reuteri* (2) foi observada diferença estatística no aumento da expressão relativa de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL-12. Contudo, nos linfonodos, apesar de haver amplificação do cDNA de IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , os níveis não tiveram significância estatística na comparação com o grupo controle.

A IL-10 foi expressa apenas em tecidos do intestino delgado dos animais tratados com *L. reuteri*. Esta citocina é regulatória e secretada por linfócitos T reg para regular as respostas imunes e reações alérgicas. É também supressora de respostas Th1 e de funções dos macrófagos. Alguns autores sugerem que essa interleucina inibe a produção de IL-12 e TNF- α . Foi detectada expressão significativa de IL-12, e consequente expressão de TNF- α , INF- γ e TGF- β nesse mesmo tecido. TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória e considerada o principal fator mediador da resposta inflamatória aguda contra bactérias Gram-negativo. A citocina INF- γ atua estimulando a produção de TNF- α tendo a atribuição de ativar macrófagos

e neutrófilos, exercendo funções importantes na imunidade inata e adaptativa mediada por células, tais como o reconhecimento de componentes desconhecidos de microrganismos, ativação da expressão de moléculas do MHC classes I e II e diferenciação dos linfócitos T CD4+, para subpopulações Th1, além da inibição da proliferação de células Th2. A TGF- β tem função anti-inflamatória de inibir a ativação e proliferação de linfócitos e outros leucócitos e estimula a produção de IgA por células B.

Portanto *L. reuteri* (isolado 2) estimulou respostas pró-inflamatórias e regulatórias, na mucosa intestinal dos hamsters tratados com esse lactobacilo, demonstrando exercer as atividades imunomodulatórias desejáveis em um bom organismo probiótico.

Não foi observada expressão significativa de IL-21 nos tecidos submetidos à suplementação com os lactobacilos. Essa citocina é normalmente expressa por células T ativadas (CD4+), possui muita homologia com IL-2 e IL-4, mas tem como alvo uma gama muito mais ampla de células. Ela regula funções de células T, B, NK e mielóides, além de ativar a família de proteínas “tirosina quinase (JAK)” para juntas, sinalizarem para o ativador de transcrição (STAT 1 e 3), que media as respostas celulares aos interferons (Leonard & Spolski, 2005).

A expressão das citocinas INF- γ , TNF- α , TGF- e IL-10 nos tecidos do intestino dos hamsters tratados com *L. reuteri* 2 indica que o tempo de duração do experimento foi suficiente para detecção do efeito imunomodulatório. Portanto a atuação de *L. reuteri* 2, no intestino delgado teve ações anti e pró- inflamatórias que são as atividades modulatórias da resposta imune, esperadas de um bom organismo probiótico.

Em um estudo combinado, metabólica e genética bacteriana, investigando o potencial inibitório do TNF- α por *L. reuteri* foi observada a presença de grande quantidade de histamina. A histamina é produzida a partir de L-histidina pela via histidina descarboxilase, por algumas bactérias fermentadoras, inclusive lactobacilos. Com a indução da mutagênese dos genes, envolvidos nessa via foi confirmado o envolvimento de Piruvato de Histidina- Descarboxilase Tipo-A (hdcA) na ativação do fator inibitório de TNF (Thomas et al., 2012).

Em outro estudo, realizado por Mohamadzadeh et al. (2005), a capacidade adjuvante de três espécies de lactobacilos foi investigada em células dendríticas mielóides (MDC) humanas, imaturas e demonstrou-se que as células de lactobacilos induziram sua maturação. As MDC expostas aos lactobacilos secretaram IL-12 bioativa, que é um fator crítico na

polarização de células T para produção de respostas Th1, pró-inflamatórias. Confirmando-se assim que macrófagos tratados com lactobacilos, ativam sinais NFkB e STAT resultando na secreção de IL-12 e IL-18 .

Pesquisando em culturas de células do sangue humano Dong; Rowland & Yaqoob (2012) observaram a ativação de linfócitos T por seis linhagens de *Lactobacillus* spp (*L. casei* Shirota; *L. rhamnosus* GG-ATCC 53103; *L. plantarum* NCIMB 8826; *L. reuteri* NCIMB 11951; *B. longum* SP07/3 e *B. bifidum* MF 20/5). Verificaram ainda, que todas as linhagens das diferentes espécies, compartilharam a habilidade de induzir a expressão de quimiocinas, por DC, monócitos e outros tipos celulares, em resposta às citocinas IL-1, TNF- α e INF- γ , mas influenciando diferencialmente os tipos celulares.

A ausência de expressão de citocinas nos linfonodos provavelmente foi devido à deficiência nas técnicas de coleta e métodos de extração utilizados, uma vez que mesmo os genes normalizadores tiveram uma expressão mínima, observada nesses tecidos mesmo após a variação no tratamento do RNA total com duas diferentes DNAses.

Os resultados da expressão de citocinas, observada no baço, linfonodos e intestino delgado dos hamsters inoculados com duas espécies de *Lactobacillus* (*L. reuteri*-2 e *L. paraplantarum*-15), estão sintetizados no quadro 10.

Quadro 10: Resumo da expressão relativa de citocinas, obtido a partir da qRT-PCR do cDNA, produzido com o RNA total extraído dos tecidos dos hamsters tratados com *L. paraplantarum* e *L. reuteri* isolados em fezes de cães lactentes.

TECIDO	TRATAMENTO	IL-2	IL-4	INF- γ	TNF- α	TGF- β	IL-10 iniciadores A/B*	IL-12p40	IL-21	FOXP3
Baço	Salina/ <i>L. paraplantarum</i>	-	-	-	-	-	B -	↓	-	↓
	Salina/ <i>L. reuteri</i>	-	-	-	-	-	B -	-	-	-
Linfonodos Mesentéricos	Salina/ <i>L. paraplantarum</i>	-	-	-	-	-	B -	-	-	-
	Salina/ <i>L. reuteri</i>	-	-	-	-	-	B -	-	-	-
Intestino Delgado	Salina/ <i>L. paraplantarum</i>	-	-	-	-	-	A -	-	-	-
	Salina/ <i>L. reuteri</i>	-	-	↑	↑	↑	A ↑	↑	-	-

(A = iniciadores de Vernel-Pauillac & Merien, (2006). B = iniciadores de Espitia et al. (2010).

↑ = AUMENTO ↓ = DIMINUIÇÃO

SIGNIFICATIVO = <0,05

5.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS VACINAIS

Devido à necessidade de se desenvolver nova vacina anti-leptospirose e também ao surgimento de novas “ferramentas” genéticas passou-se a analisar as propriedades das proteínas da superfície da *Leptospira* spp tentando encontrar fatores de adesão ao hospedeiro e assim justificar a especificidade de algumas sorovariedades. Adler & de La Pena Moctezuma, (2010); Zuerner et al., (2000) entre outros, buscaram um o imunógeno ideal ou seja, uma proteína, lipoproteína, lipopolissacarídeo ou outros produtos dessa bactéria, com papel fundamental na doença. Na atualidade, muitas pesquisas estão direcionadas a investigar e entender a participação de LipL32, Loa22 e outras proteínas de *Leptospira*, nos processos de infecção e doença.

LipL32 tem sido descrita como a principal e mais abundante proteína da membrana externa, entre outras lipoproteínas. É ancorada por ácidos graxos que modificam a cisteína amino terminal (Zuerner et al., 2000). Tornou-se a principal candidata ao desenvolvimento de uma vacina anti-leptospirose e vem sendo estudada há vários anos, devido sua capacidade imunomodulatória e à constatação de ser uma proteína exclusiva de leptospiros patogênicas, em análises do seu comportamento e contribuição nas etapas de infecção e doença (Nally et al., 2007).

5.2.1. Amplificação e análise da sequência de DNA de *lipL32* das sorovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa

O perfil resultante da amplificação, do segmento de cerca de 800 pares de bases, correspondentes ao gene *lipL32*, por PCR do DNA das três sorovariedades de *Leptospira* testadas nesse trabalho foi visualizado em gel de agarose (Figura 20).

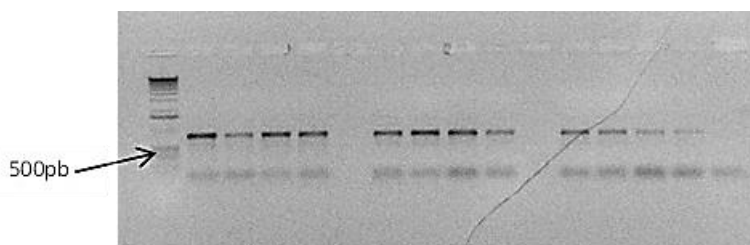


Figura 20: Gel de agarose 1% mostrando o perfil de amplificação do gene *lipL32* de *Leptospira* das sorovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa, respectivamente. Na 1ª canaleta o marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA ladder (PROMEGA) e na última um controle negativo dos reagentes utilizados nas reações de PCR.

A fim de acessar o grau de homologia dos genes *lipL32* e da *loa 22* o DNA das três sorovariedades (Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippytyphosa) foi sequenciado e analisado *in silico* com utilização do software ClustalW2.

Para o gene *lipL32*, inicialmente as sequências obtidas foram alinhadas entre si e resultado mostrou que existe alto grau de identidade entre as sequências de *lipL32* das três sorovariedades. Essas sequências foram então alinhadas com sequências de várias sorovariedades de diferentes espécies, de *Leptospira* disponíveis no Genbank confirmando-se que existe alta similaridade entre elas. A sequência de *lipL32* da sorovariedade Grippytyphosa, que pertence à espécie *L. kirschneri* exibe as mesmas alterações existentes entre as sorovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae, pertencentes à espécie *L. interrogans*. A maior parte das diferenças encontradas entre os genes são pontuais e resultaram das substituições de um nucleotídeo em algumas posições, principalmente da sorovariedade Canicola de *L. interrogans*. Posteriormente, o resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos que formam o polipeptídeo de LipL32 das três sorovariedades, alinhadas com sequências das mesmas sorovariedades obtidas do banco de dados, evidenciou a substituição de um aminoácido na posição 164, na sorovariedade Canicola, correspondendo à alteração de uma base verificada na posição 493, do gene. As demais diferenças de nucleotídeos observadas foram silenciosas. A alteração na sequência peptídica com a substituição do aminoácido Ácido Aspártico pelo aminoácido Asparagina, na posição 164 da sequência de LipL32 da sorovariedade Canicola foi devido à substituição de uma única base. Importante é que são dois aminoácidos semelhantes, mas a Asparagina é polar e sem carga elétrica enquanto o Ácido Aspártico também é polar, mas possui carga negativa (Yoshida, A., 1967). (Figura 21).

```

IcteroLip MKKLSILAI SVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLS EDTIPGTNETVKTLLPYGSVINYY 60
GripptoLip MKKLSILAI SVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLS EDTIPGTNETVKTLLPYGSVINYY 60
CanicoLip MKKLSILAI SVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLS EDTIPGTNETVKTLLPYGSVINYY 60
*****

IcteroLip GYVKPGQAPDGLVDGNKKAYLYVWI PAVIAEMGVRMI SPTGEIGEPGDGLVSDAFKAA 120
GripptoLip GYVKPGQAPDGLVDGNKKAYLYVWI PAVIAEMGVRMI SPTGEIGEPGDGLVSDAFKAA 120
CanicoLip GYVKPGQAPDGLVDGNKKAYLYVWI PAVIAEMGVRMI SPTGEIGEPGDGLVSDAFKAA 120
*****

IcteroLip TPEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDI IAKAAKAKPVQKLD DDDDDGDDTYKEERHNKYN S 180
GripptoLip TPEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDI IAKAAKAKPVQKLD DDDDDGDDTYKEERHNKYN S 180
CanicoLip TPEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDI IAKAAKAKPVQKLD DDDDDGDDTYKEERHNKYN S 180
*****
(164)*****

IcteroLip LTRIKIPNPPKSFDDLKNI DT KLLVRGLYRISFTTYKPEVKGSFVASVGLLFPFGIPG 240
GripptoLip LTRIKIPNPPKSFDDLKNI DT KLLVRGLYRISFTTYKPEVKGSFVASVGLLFPFGIPG 240
CanicoLip LTRIKIPNPPKSFDDLKNI DT KLLVRGLYRISFTTYKPEVKGSFVASVGLLFPFGIPG 240
*****

IcteroLip VSPLIHSNPEELQKQATAAEESLKKAASDATKYL 274
GripptoLip VSPLIHSNPEELQKQATAAEESLKKAASDATK-- 272
CanicoLip VSPLIHSNPEELQKQATAAEESLKKAASDATK-- 272
*****

```

Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoácidos da lipoproteína LipL32 dos sorovariedade, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippytyphosa de *Leptospira*. Observa-se alteração de um aminoácido na posição 164 nessa sequência gênica da sorovariedade Canicola

Comparando as sequências imunogênicas encontradas no trabalho de Lottersberg, com as sequências obtidas de LipL32 das três sorovarietades do presente estudo, observou-se que ambas se ajustam às proteínas LipL32 das sorovarietades Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, inclusive na região da sorovarietade Canicola, alterada pela substituição do aminoácido Ácido aspártico por Asparagina.

Denvenson Lucas et al. (2011) fusionaram, clonaram e expressaram cassetes formados com segmentos correspondentes aos aminoácidos da posição 155 a 200, da proteína LipL32, com os seis domínios similares da Imunoglobulina A, na porção carboxi-terminal (NI) (*ligA*). *LigA* não é normalmente expressa *in vitro* mas é expressa durante a infecção, sendo altamente imunogênica. Não observaram proteção *in vivo* de uma vacina resultante da fusão dessas proteínas (LipL32LigANI), recombinantes, nem da região da proteína LipL32 (aa 155-200), quando comparadas ao efeito vacinal de uma vacina produzida com *Leptospira* integral, da mesma sorovarietade. Entretanto, a proteína resultante da região 155-200 aa, de LipL32 foi reconhecida em membrana após western blot, por soros obtidos de pacientes convalescentes de leptospirose. Assim ficou demonstrado que as frações da sequência da proteína LipL32, que exercem funções imunogênicas, correspondem à região entre 155 e 200 aminoácidos, confirmando a publicação de Lottersberger et al. (2009) que analisaram a reação imune de duas regiões da proteína LipL32, selecionadas de acordo com a intensidade de brilho dos *spots* fluorescentes formados. Essas regiões situam-se entre os aminoácidos 151 e 177 e entre os aminoácidos 181 e 204 de sequências (AAKAKPVQKLDDDDDGDDTYKEERHNK) e (LTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKL). Essas sequências foram amplificadas, clonadas, expressas e a reatividade das proteínas resultantes, foi testada por ELISA com vários soros de pacientes de leptospirose, confirmando serem as porções imunodominantes da proteína.

A mutação que causou a substituição do aminoácido Ácido Aspártico por Asparagina, na sorovarietade Canicola, está localizada na mesma região. Entretanto, não foi possível inferir se a proteína produzida a partir da sorovarietade Canicola exerce idêntica atividade imune. A alteração encontrada na sequência de LipL32, da sorovarietade Canicola despertou o interesse em se pesquisar a influência da substituição de um aminoácido na estrutura da proteína LipL32. Neste sentido, o software *SwissModel* foi utilizado *in silico*, para construir os modelos presumidos das estruturas terciárias da LipL32 das três sorovarietades. A Figura 22 mostra que não foi possível observar diferença estrutural em função da substituição do aminoácido Ácido aspártico por Asparagina, na posição 164 da sequência de LipL32 da sorovarietade Canicola (Figura 22).

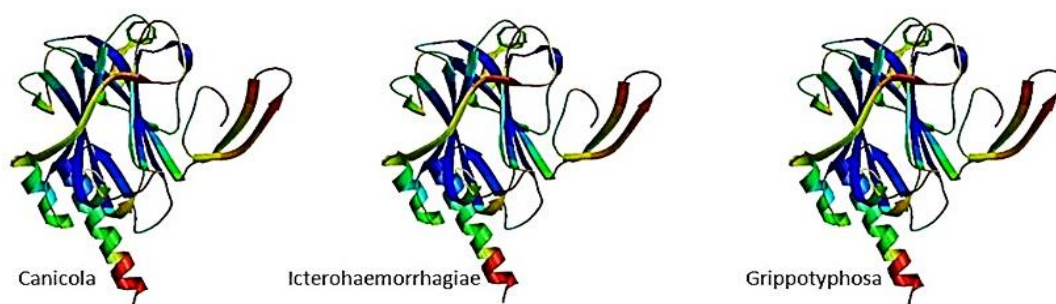


Figura 22: Estrutura terciária presumida de LipL32. Obtidas com o software *SwissModel*, baseada nas sequências de aminoácidos geradas a partir do sequenciamento do gene com os iniciadores construídos para gene *lipL32* das sorovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae de *Leptospira interrogans* e Grippotyphosa, de *L. kirchneri*.

Zhang, X.Y. et al. (2005) compararam as lipoproteínas LipL32, LipL41 e OmpL1, de diferentes espécies de *Leptospira*, após clonagem e sequenciamento, encontrando alto grau de similaridade entre elas. Ao testar a reação imune de um cassete de LipL32 e OmpL1, pela técnica ELISA, contra soros de pacientes infectados com *L. interrogans* sorovariedade Lai, obtiveram alta reatividade contra as proteínas. Amutha et al. (2007), clonaram e sequenciaram o gene *lipL32* de seis sorovariedade patogênicos de *Leptospira* confirmando os 756 pb, que após alinhamento, revelaram pequena porcentagem de divergência, apenas entre as quatro sorovariedades testados.

Em 2009^{a,b}, Murray e colaboradores comprovaram que a proteína LipL32 não é diretamente responsável pela virulência das leptospiros. Construíram *L. interrogans* sorovariedade Manilae mutante para o gene *lipL32* usando um transposon *mariner1* carregado por um vetor. A linhagem mutante ficou indistinguível da normal. Inocularam um grupo de *Golden Syrian Hamsters* com leptospiros do tipo selvagem e outro grupo com as mutantes. Entre 7 e 9 dias após, todos os hamsters inoculados estavam doentes. Com esse experimento provaram que LipL32 não é diretamente responsável pela virulência de leptospiros.

Posteriormente, Habarta et al. (2011) observaram que grupos de cinco fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com a proteína de fusão toxina B do cólera e LipL32 (CTB-LipL32) desenvolveram resposta imune específica, com títulos bem mais altos, quando comparados com os obtidos nos controles positivos, onde inocularam a CTB pura e LipL32

pura. Essa pesquisa indicou a utilização da toxina B do cólera como proteína de fusão a imunógenos de *Leptospira* sp ou como adjuvante. Nessa pesquisa e em várias outras, LipL32 demonstrou que é fortemente imunogênica mas, sua real função, na leptospirose, continua desconhecida.

Apesar da imunogenicidade de LipL32, a eficácia de vacinas baseadas nessa proteína não tem sido convincente, com baixos níveis de proteção ou nenhuma proteção observada na maioria dos estudos. Um progresso significativo já foi feito no sentido de determinar algumas das funções de LipL32, mas essas funções não parecem justificar o custo de recursos bacterianos para produzir esta proteína em larga escala, especialmente em face à aparente redundância funcional observada (Murray, 2013).

5.2.2. Clonagem e expressão de LipL32 recombinante.

A preparação dos antígenos que foram utilizados no trabalho seguiu a metodologia descrita por Haake et al. (1999), Zhang et al. (2005), Amutha et al. (2007), Cerqueira & Picardeau, (2009) entre muitos outros, com pequenas adaptações.

A clonagem do gene *lipL32* foi realizada no vetor pCR4-TOPO e *E. coli* DH5 α . O resultado foi constatado pela amplificação por PCR do DNA de algumas colônias, escolhidas aleatoriamente e usando os mesmos iniciadores da amplificação dos insertos de *lipL32*. A Figura 23 mostra o perfil dos clones amplificados.

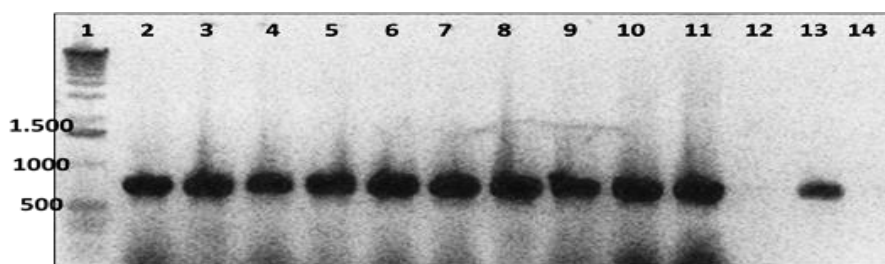


Figura 23: Gel de agarose 1,2% mostrando os produtos da PCR de colônias de *E. coli* DH5 α , contendo o gene *lipL32* ligado ao vetor pCR4-TOPO. Canaleta 1, marcador de tamanho molecular de 1 kb (Promega). Canaletas 2 a 11, produto dos clones contendo inserto de *lipL32*, Canaleta 12, controle dos reagentes utilizados na reação de PCR e Canaleta 13 o controle positivo com um segmento de *lipL32* amplificado e purificado.

Restrições enzimáticas foram feitas para se confirmar a ligação dos insertos, para tal, foi utilizado o DNA extraído por miniprep dos vetores clonados. O inserto contém nas extremidades os sítios de restrição para duas enzimas, *Bgl*III e *Hind*III, de forma que a sequência se posicione *in frame*, no vetor de expressão. As etapas de separação do inserto do vetor de clonagem e a purificação do produto a partir do gel foram realizadas com sucesso. Na mensuração por nanodrop, o inserto purificado apresentou alta concentração. Na figura 24, podem ser observadas as etapas de preparo do segmento de LipL32 por restrição com *Bgl*III e *Hind*III e purificação do gel, de modo a expor os sítios coesivos para as enzimas *Bam*HI (= *Bgl*III) e *Hind*III, presentes também no vetor de clonagem (pTRcHis TOPO-INVITROGEN).

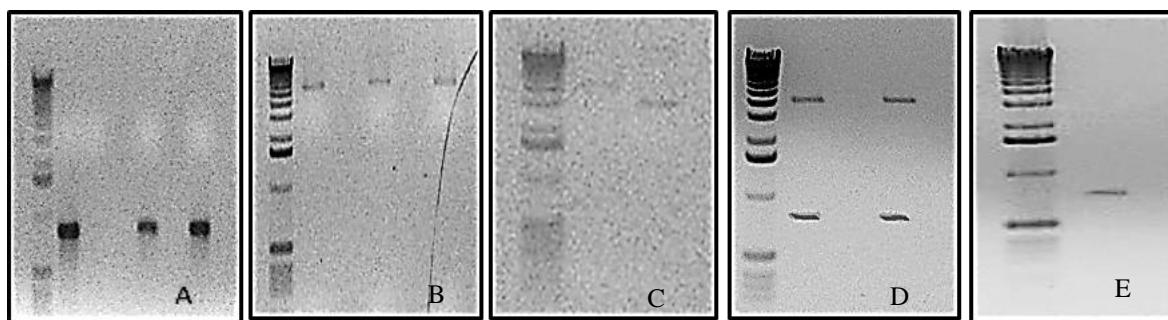


Figura 24: Géis de agarose a 1% mostrando etapas do preparo da ORF *lipL32* para ligação ao vetor de expressão. A) foto exibe o gel com os 3 segmentos amplificados de *lipL32*, utilizando os iniciadores *Bgl*III-LipL32-Fw e *Hind*III-LipL32-Rv a partir do DNA genômico das sorovarietades estudadas; B) foto dos vetores Topo4 TA purificados contendo o inserto de interesse; C) observa-se um dos clones após restrição por *Bgl*III, tendo na 2ª coluna um vetor fechado como controle; na foto D) observa-se a separação vetor-inserto após a restrição por *Bgl*III e *Hind*III; E) o inserto *lipL32-Bgl*III-*Hind*III, após purificação do gel.

No presente estudo, durante a preparação do inserto, a enzima *Bam*HI não foi usada. A razão é que análises *in silico* indicaram que na sequência de *lipL32* existe um sítio de restrição para essa enzima. Entretanto isso não constituiu um problema já que havia disponível outra endonuclease (*Bgl*III), com sítio diferente, porém tendo uma porção coesiva com a *Bam*HI.

Nesse aspecto, a decisão de expressar e purificar a proteína LipL32 foi mantida. Apesar dos resultados de Murray et al. (2009^b), outros pesquisadores (Haake et al., 2000; Amutha et al., 2005; Boonyod et al., 2005; Bomfim et al., 2006; Hauk et al., 2008; Lin et al., 2010; Habarta et al., 2011) têm comprovado a alta imunogenicidade dessa proteína, o que

indica sua possível utilização como adjuvante imune. LipL32 é o antígeno que ocorre em maior número e somente em leptospiras patogênicas. Por isso, sua função, no processo de infecção e virulência das leptospiras, precisa ser mais investigada.

Em estudos recentes, Pinne & Haake (2013), apresentaram fortes evidências de que a proteína LipL32 está localizada abaixo da superfície da membrana das leptospiras. Esse fato certamente irá direcionar as análises relacionadas à atividade imunestimulatória da LipL32, para regiões específicas da sua estrutura, bem como na sua conformação *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados dos procedimentos de preparação do vetor pTRcHis por meio de restrições com as endonucleases *Hind*III e *Bam*HI, são mostrados em gel de agarose (Figura 25).

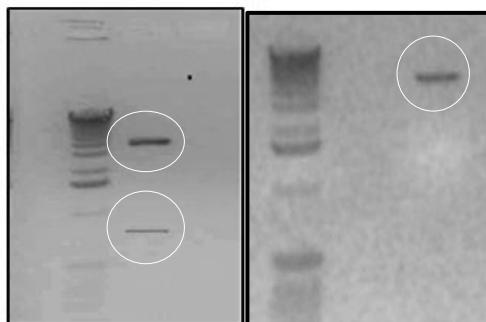


Figura 25 - Géis de agarose 1% mostrando o processo de preparação do vetor de clonagem e expressão. Nos dois géis, as etapas da preparação do vetor pTRcHis. No primeiro gel pode ser observada a separação do antigo inserto, por restrições nos sítios para *Bam*HI e *Hind*III (situados no *polylinker* do vetor), de maneira a exibir extremidades coesivas para posterior ligação à sequência de *lip*L32. No segundo gel o vetor preparado e purificado.

5.2.3. Resultado do processo de ligação ao vetor pTRcHis TOPO e clonagem em *E. coli* Top10

A competência das células de *E. coli* Top10 foi previamente testada, transformando-a com 1,0 µl de um vetor fechado, de concentração conhecida. O resultado foi obtido pela contagem do número de colônias crescidas nas placas aplicadas com 100 µl da mistura bactéria-vetor, resultando na obtenção de 10⁶ colônias em média. De acordo com Maniatis et al.(1989) o ideal seria obter entre 10⁷ e 10⁸ colônias. A transformação em *E. coli* Top10,

quimiocompetente, gerou muitas colônias contendo clones e a presença dos insertos foi testada, obtendo 100% de positividade.

5.2.4. Padronização do melhor tempo de expressão da proteína LipL32

O tempo demandado desde a indução (T=0) até a expressão máxima da proteína LipL32 foi de 4h:30h. O tempo de crescimento até a $OD_{600} = 0,6$ ou T=0, foi de 3 horas, a 37°C, sob agitação de 120 rpm. As alíquotas retiradas, em cada tempo escolhido após a indução foram analisadas em gel SDS-PAGE, corado por azul de Comassie, comparando com as bandas de um marcador específico para proteínas. (Figura 26).

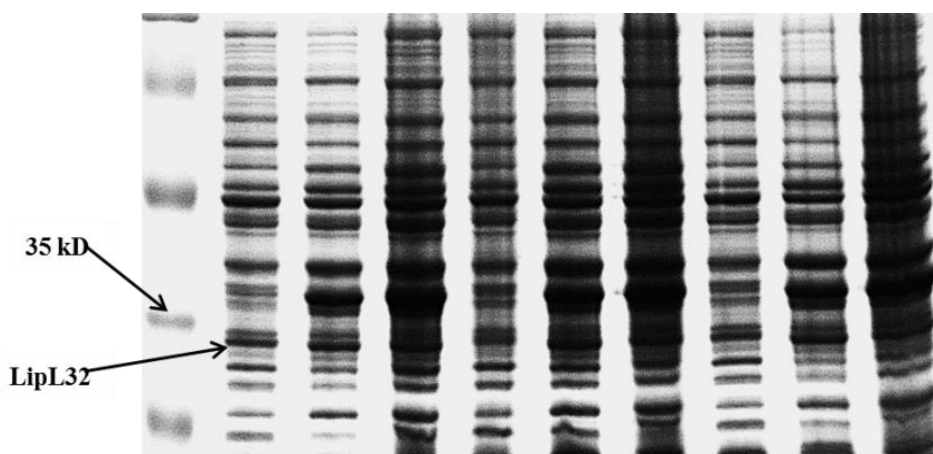


Figura 26: Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie mostrando os resultados dos procedimentos de padronização para a obtenção do melhor tempo de expressão de LipL32. Canaleta 1, marcador de peso molecular de proteínas (*Prestained Protein Ladder* -FERMENTAS), 2 a 4, perfis da LipL32 sorovariedade Canicola, nos tempos T=0, T=3h e T=4:30hs, respectivamente. Canaletas, 5 a 7, perfil de expressão da sorovariedade Icterohaemorrhagiae, nos T=0, T=3h e T= 4:30hs, respectivamente. Canaletas, 8 a 10, perfil de expressão da sorovariedade Grippytyphosa, T=0, T=3h e T=4:30hs, respectivamente.

5.2.5. Verificação da forma de expressão da proteína LipL32.

Os testes efetuados para verificar se a proteína LipL32 é expressa na forma solúvel ou insolúvel, formando corpos de inclusão, indicaram que ela é expressa nas duas fases, em quantidade aparentemente iguais conforme mostrado na figura 27.

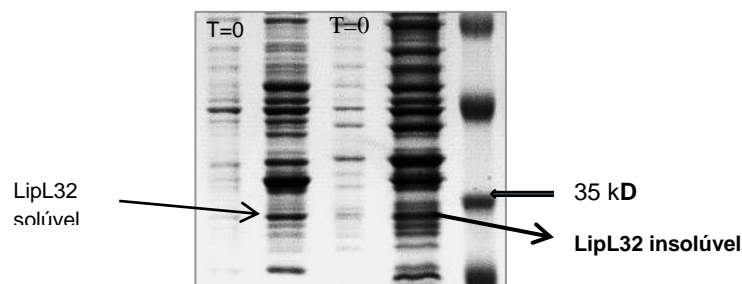
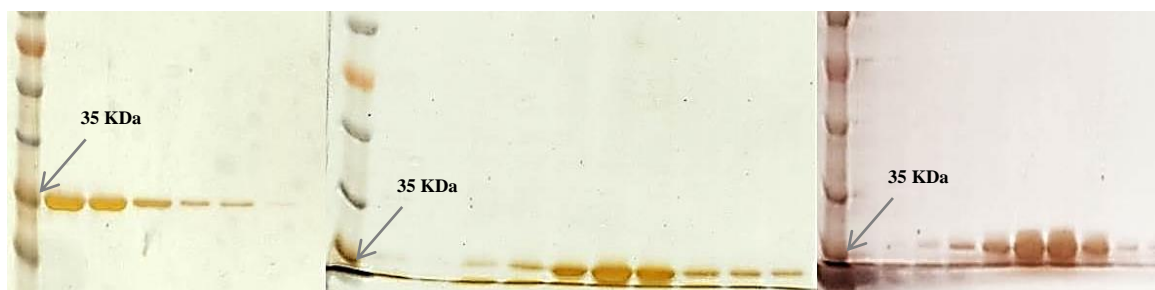


Figura 27: Gel SDS-PAGE 15%, corado com comassie mostrando os perfis da LipL32 recombinante nas Fases solúvel e insolúvel. Canaletas 1 e 2, expressão na forma solúvel no T=0 e T=4h30 respectivamente. Canaletas, 3 e 4, fase insolúvel no T=0 e T= 4h30, respectivamente. Na última canaleta está o marcador de massa molecular (*Prestained Protein Ladder*- FERMENTAS).

5.2.6. Purificação da proteína LipL32 sintetizada em *E. coli* Top10.

A purificação da proteína sintetizada foi um passo importante para obtenção do grau de pureza necessário para os testes envolvendo esse antígeno (Figura 28). A figura 29 mostra um dos cromatogramas obtidos do processo de purificação da proteína LipL32 por HPLC, no AKTA-PLUS da GE Healthcare.

Figura 28: Géis SDS-PAGE 15%, corados por prata, mostrando o grau de pureza obtido com 50 ml da



cultura induzida, de LipL32 recombinante. Em todas as canaletas amostras de LipL32 purificada em coluna HisTrap contendo NiSO₄, precedidas por marcador de peso molecular (*Prestained Protein Ladder*- FERMENTAS).

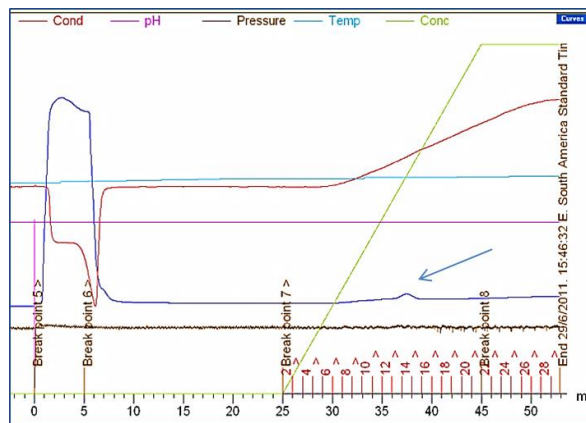


Figura 29: Cromatograma gerado no AKTA-Plus durante o processo de purificação da proteína LipL32 de *Leptospira*, sorovariedade Icterohaemorrhagiae. No gráfico a seta indica o pico corresponde ao tubo 14 onde foi eluída maior concentração da proteína

5.2.7. Confirmação de LipL32 por Western blotting com soro anti-leptospira.

O anti-soro anti-leptospiras, obtido após inoculação da bactéria comercial (Fort-Dodge) nos camundongos, foi usado no Western blot, para confirmar o tamanho da proteína LipL32 expressa e a banda correspondente na leptospira integral. Na foto mostrada na figura 30 foram aplicados um marcador de peso molecular de proteínas (FERMENTAS), 10 µl de cultura de leptospira lisada, a proteína LipL32 recombinante purificada e cultura da *E. coli* Top10 após indução da expressão de LipL32 e desnaturação por fervura, da fração proteica. Pode ser observada a banda equivalente à LipL32 com 32 kDa na canaleta aplicada com a cultura de leptospiras. (Figura 30).

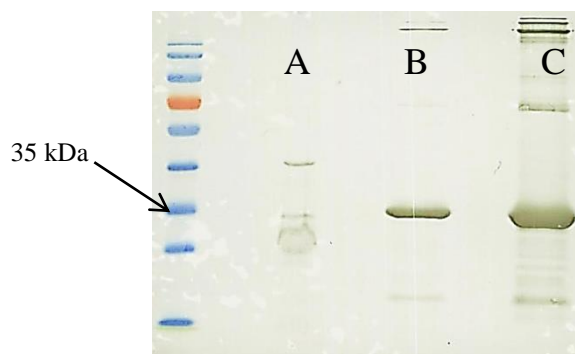


Figura 30: Western blot resultante da confirmação de LipL32, revelada pela ligação ao anti-soro anti-leptospira total. Da esquerda: o marcador de peso molecular, A- o produto da lise de leptospira integral, B- a proteína LipL32 purificada e C- o produto da *E. coli* recombinante induzida. A revelação ocorreu com a ligação ao anti-soro anti-leptospira, produzido em camundongos, revelado pela ligação ao antissoro anti-mouse contendo peroxidase. A seta indica a posição da banda de 35 kDa do marcador de proteínas (FERMENTAS)

A clonagem e expressão de LipL32 em *E. coli* Top10 foi obtida com sucesso. O produto testado por Western blot confirmou o peso molecular da fração de LipL32, e foi comparado com uma banda de mesmo tamanho obtida da leptospira lisada, aplicada no gel e da bactéria recombinante com LipL32 induzida. Dessa proteína purificada, foi obtido um soro específico, em camundongos BALB/c, para reconhecer os produtos proteicos de LipL32, nas próximas induções.

5.2.8. Determinação da concentração da proteína LipL32 purificada, pelo método de Bradford.

Com o volume de 50 ml de cultura induzida, foram obtidos, em média, 398 µg da proteína purificada, correspondendo à média de 7,96 mg/litro. No quadro 11, a seguir estão dados referentes à leitura óptica das frações obtidas na eluição da proteína LipL32 e uma proteína padrão (BSA-0,3 µg/µl) após a purificação no AKTA Plus.

Quadro 11 - Cálculo da concentração de LipL32 purificada. Os tubos contendo a proteína LipL32 resultante de duas purificações por HPLC, tiveram sua quantidade proteica calculada, por absorbância em 595 nm, usando o reagente de Bradford, em relação ao padrão (soro-albumina bovina-BSA a 3,0 µg/µl).

Tubo com produto da eluição	Absorbância em 595nm	Concentração µg/µl	Volume contendo 10 µg
13A	0,061	0,0135	769,0 ul
14A	0,173	0,0453	222,0 ul
15A	0,130	0,331	30,0 ul
16A	0,030	0,0047	
17A	0,015	0,0041	
18A	0,028	0,0041	
13B	0,128	0,033	303,0 ul
14B	0,654	0,182	55,5 ul
15B	0,169	0,044	227,0 ul
16B	0,069	0,016	
17B	0,023	0,0027	
18B	0,024	0,003	

Haake et al. (2000) expressaram essa lipoproteína ligada ao vetor pRSETc, (que tal como o pTrcHis, adiciona 6 histidinas à porção N-terminal da proteína), em *E. coli* BLR(DE3)pLysS. Purificaram por cromatografia de afinidade em colunas de níquel, solubilizando-a em 6 M de hidrocloreto de guanidina e dialisando-a, para depois cortá-la do gel SDS-PAGE e dessecá-la. Com essa técnica obtiveram 150 µg de LipL32 purificada. Os autores não informam o volume de cultura usado na purificação.

Huang et al. (2008), expressaram LipL32 com o mesmo vetor que Haake et al. (2000) e obtiveram a proteína na forma insolúvel. Usaram alta concentração de ureia para obtenção da proteína ao natural e purificaram-na com o mesmo tipo de coluna de níquel que foi usada nessa pesquisa. Os autores afirmam que por western blot, com antissoro específico, observaram alto nível de expressão de LipL32.

Luo et al. (2009) clonaram sequências de vários genes *lipL32* em pET42a, em *E. coli* BL21, induziram com IPTG e não as obtiveram na forma solúvel. Purificaram-nas por cromatografia, em colunas de afinidade contendo níquel, eluindo-as em tampão com gradiente decrescente do hidrocloreto de guanidina, renaturando-a, no final, com a concentração mínima desse sal (0,5M). Conseguiram 1 mg/ml de proteína purificada, que corresponde a 79,6 vezes a quantidade que foi obtida nesse trabalho.

Habarta & Abreu (2011) obtiveram 20-30 mg por litro de cultura induzida, de LipL32-CTB, expressa em fusão com CTB (*Cholera toxin*), por cromatografia em coluna de afinidade (Ni²⁺). Essa quantidade é quatro vezes maior que a conseguida nesse trabalho, entretanto, Chalayon et al. (2011), purificaram várias lipoproteínas de *Leptospira* usando protocolos semelhantes mas não conseguiram grande quantidade das proteínas LipL32 e LipL41, purificada, apesar de terem testado 8 M de tampão de ureia para solubilização e purificado com imidazol em colunas His-Trap com (Ni²⁺).

Considerando a quantidade de proteína LipL32 obtida, na maioria dos trabalhos citados, observou-se que o que foi obtido de LipL32 nessa pesquisa, está na faixa normal, uma vez que vem sendo purificada apenas a fração solúvel do produto expresso. O *pellet*, contendo a fração insolúvel está sendo mantido sob-congelamento, podendo ser utilizado, eventualmente. Mais importante foi o grau de pureza obtido no processo, sem haver necessidade do uso de tampões desnaturantes.

Para sua administração por via oral é necessário que as proteínas sejam protegidas do pH ácido estomacal. Essa etapa poderá ser contornada com o encapsulamento dos antígenos, para que sejam liberados apenas no duodeno ou protegendo-os pelo envolvimento em géis emulsificantes, tal como são feitos com algumas vitaminas e fármacos sensíveis aos ácidos estomacais, além disso, para que possa ser usada nos testes, como adjuvante imune, LipL32 purificada ainda deverá ser dialisada e dessecada.

5.2.9. Produção de antissoro policlonal, específico para LipL32

O soro anti-LipL32, produzido em camundongos BALB/c, foi testado por Western blot e o resultado está mostrado na Figura 31. No gel SDS-PAGE foi aplicada uma alíquota da proteína LipL32 purificada, uma amostra da cultura de *E. coli* Top10 contendo LipL32 induzida e igual volume da *Leptospira* integral lisada, nessa ordem, precedidas de um marcador de peso molecular de proteínas. As bandas obtidas confirmam o tamanho da proteína purificada que é compatível com a proteína correspondente na *Leptospira* integral e com o produto expresso na *E. coli* Top10.

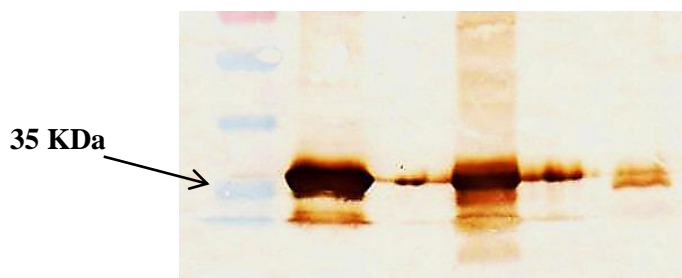


Figura 31: Gel de SDS-PAGE 15% mostrando os produtos da confirmação por Western blot do antissoro anti-LipL32, produzido em camundongos. Partindo da esquerda o marcador de tamanho molecular de proteínas (FERMENTAS), nas canaletas 2, 4 e 6 canaletas: a proteína purificada, *E. coli* Top10 com LipL32 recombinante e a *Leptospira* integral lisada, respectivamente.

Esse soro específico, anti-LipL32, será usado para confirmação da expressão da proteína em novos cultivos e expressão.

5.2.10. Obtenção das sequências da proteína Loa22 de *Leptospira*.

Como principal imunógeno, para testar o efeito vacinal, escolheu-se a proteína Loa22, pouco estudada, mas que já teve confirmada sua participação direta na virulência das

leptospiras (Ristow et al., 2007). A lipoproteína LipL32 deverá participar como adjuvante imune de vacina da proteína sintética Loa22 ou expressa fusionada à proteína Loa22.

Os iniciadores construídos para amplificação da sequência de Loa 22 foram testados inicialmente em três temperaturas diferentes de anelamento. No gel abaixo, estão as bandas correspondentes a aproximadamente 580 pb de cada um, das três sorovariedades amplificadas, contendo sítios de restrição para as endonucleases *Bgl*III e *Hind*III. O comprimento das sequências obtidas está de acordo com o publicado por Ristow *et al.*, (2007) e Koizumi e Watanabe (2003), para essa proteína, correspondendo a 575 pares de bases. (Figura 32).

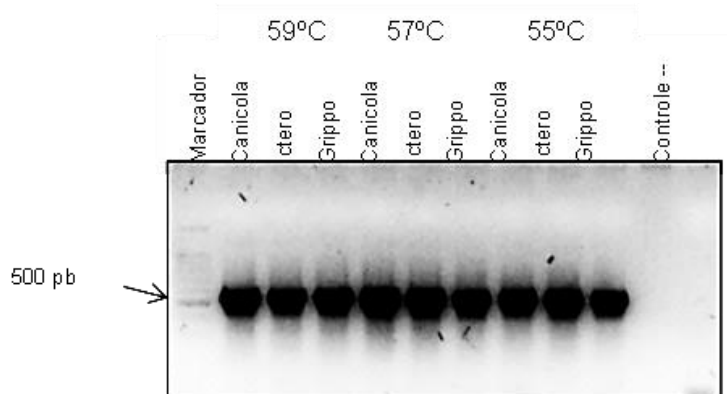


Figura 32: Gel de agarose 1,5% mostrando o resultado do teste de amplificação do gene para a *OmpA like protein* (Loa22). As sequências da proteína das três sorovariedades do estudo (Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa), amplificaram bem nas três temperaturas de anelamento testadas. A seta indica a posição de 500 pb do marcador usado.

O sequenciamento do gene *loa22*, obtido a partir da amplificação resultou algumas sequências incompletas e alinhadas entre si exibiram um grau de homologia que variou de 94 a 98%. Porém, quando as sequências obtidas neste estudo foram alinhadas com as duas únicas sequências de *loa22* existentes no *Genbank* (sorovariedades Manilae e Copenhageni), confirmou-se a identidade do segmento e foi encontrado um grau de homologia de 98,5%. Anexo 3, 4 e 5.

Loa22 é uma proteína pouco investigada, por isso ainda não estão disponíveis, muitas sequências desse gene. A partir do genoma total, de quatro sorovariedades patogênicas publicadas, foram obtidas algumas com correspondência, que foram comparadas por alinhamento (anexos 3, 4 e 5).

Tal como foi observado para LipL32, o resultado do alinhamento da sequência parcial de Loa22, já confirma que ela é bastante conservada evolutivamente, assegurando que sua função é realmente essencial no ciclo de vida das leptospiros o que a torna uma provável candidata como principal antígeno. Interessante é a existência de um gene ortólogo para essa proteína, nas leptospiros saprofíticas.

Na Figura 33, é mostrado o gel obtido após clonagem, miniprep, purificação e linearização, por restrição com *Hind*III, dos gene Loa22, das três sosrovariedades testadas nesse estudo, ligadas ao vetor pRC4-TOPO.

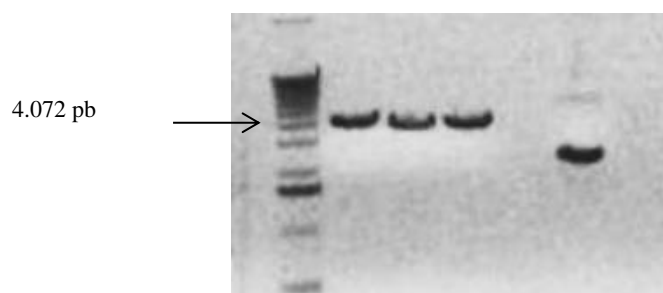


Figura 33: Gel de agarose 0.8% mostrando o vetor pRC4TOPO recombinante contendo os três insertos de *loa22*, após restrição com a endonuclease *Hind*III, que linearizou os vetores. Na última canaleta foi aplicada amostra de um dos clones não submetido à restrição.

Com a construção de novos iniciadores para amplificar o gene de *loa22*, contendo os sítios de restrição para *Bgl*II e *Hind*III, tal como foi realizado para a clonagem de LipL32, foram obtidas as sequências, feita a clonagem e preparação dos insertos, de modo a ligarem *in frame* no vetor de expressão. Os clones no vetor pCR4 TOPO foram obtidos, com sucesso e digeridos com as endonucleases *Hind*III e *Bgl*II .

6. CONCLUSÕES

Tentando-se aliar a busca por um antígeno protetor contra leptospirose às pesquisas atuais em imunologia, que têm demonstrado a importância da resposta imune inata das membranas mucosas na proteção contra patógenos, vários pesquisadores avaliam o estímulo de diferentes antígenos, quando inoculados via mucosa, em várias regiões do corpo. Além disso, estudos sugerem a substituição dos microrganismos patogênicos atenuados por bactérias da microbiota autóctone, como adjuvantes ou carreadores de vacinas genéticas, para contornar o risco de reversão da patogenicidade.

O isolamento e testes de caracterização probiótica dos lactobacilos, isolados das fezes de cães lactentes, resultaram em duas espécies com bom potencial probiótico. A linhagem *L. reuteri* testada foi eficiente em modular a resposta imune com a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, provando ser um bom microorganismo probiótico. A resposta imunomodulatória de *L. paraplantarum* (isolado 15) não apresentou a intensidade desejada para ser bom probiótico ou adjuvante imune. Assim os isolados 5, 7, 8, 10 e 14, que apresentaram bom potencial nos testes *in vitro*, devem ser testados em sua capacidade imunomodulatória com o objetivo de encontrar a eficiência pró-inflamatória desejada para um adjuvante imunológico e terem sua eficiência comparada durante a infecção experimental com *Leptospira*.

Da mesma forma, a escolha do antígeno vacinal contra a leptospirose tem exigido muita pesquisa envolvendo a função das proteínas de leptospira que ainda são pouco conhecidas. Um antígeno que induza uma resposta protetora contra essa doença deve possuir forte identidade na sua sequência com as do mesmo antígeno, de sorovares diferentes, para que o efeito vacinal não seja sorovar específico. Atualmente, busca-se na interação entre dois ou mais antígenos, o efeito imunológico protetor desejado. A escolha I de LipL32 teve lógica das respostas obtidas por muitos pesquisadores, em relação ao potencial imunogênico dessa lipoproteína. Mesmo tendo sido comprovado que LipL32 não é responsável pela virulência essa proteína é um potencial adjuvante, enquanto, a seleção da proteína Loa 22 teve lógica na comprovação de que leptospiras mutantes, para essa proteína, não causam a doença e no desafio de testar uma proteína que ainda é pouco estudada, investigando sua atuação na indução de uma resposta imune com potencial vacinal.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. (2011). *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7ª ed. Rio de Janeiro, 592p.
- Adler, B., Chappel, R. J., & Faine, S. (1982). The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 252(3), 405-413.
- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 287-296.
- Adler, B., Lo, M., Seemann, T., & Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol*, 153(1-2), 73-81.
- Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 3906-3912.
- Alvim, L. B. (2011). Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. (2011). Dissertação de Mestrado em Genética. ICB/UFMG.
- Ammor, M. S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A. H., de Los Reyes-Gavilán, C. G., et al. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet (L) and chromosomally located transposon-associated tet (M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Appl Environ Microbiol*, 74(5), 1394-1401.
- Ammor, M. S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci*, 76(1), 138-146.
- Amutha, R., Chaudhury, P., Garg, A. P., Vasan, P., Cheema, P. S., & Srivastava, S. K. (2007). Cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL32 of *Leptospira interrogans* serovar Sejroe. *Vet Res Commun*, 31(5), 513-519.
- Atkins, H. S., Morton, M., Griffin, K. F., Stokes, M. G., Nataro, J. P., & Titball, R. W. (2006). Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefence. *Vaccine*, 24(15), 2710-2717.
- Ayres, M., M. Ayres Júnior, D. L. Ayres; A. A. Santos. (2007). BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, v. 5, 324p.
- Barbosa, A. S., Abreu, P. A., Neves, F. O., Atzingen, M. V., Watanabe, M. M., Vieira, M. L., et al. (2006). A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun*, 74(11), 6356-6364.
- Barocchi, M. A., Ko, A. I., Reis, M. G., McDonald, K. L., & Riley, L. W. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. *Infect Immun*, 70(12), 6926-6932.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev*, 13(2), 279-299.
- Beasley, S. S., Takala, T. M., Reunanen, J., Apajalahti, J., & Saris, P. E. (2004). Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus crispatus* isolated from chicken crop and intestine. *Poult Sci*, 83(1), 45-48.
- Becher, D., Deutscher, M. E., Simpfendorfer, K. R., Wijburg, O. L., Pederson, J. S., Lew, A. M., et al. (2010). Local recall responses in the stomach involving reduced regulation and expanded help mediate vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* in mice. *Eur J Immunol*, 40(10), 2778-2790.
- Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G., & Gardini, F. (2009). Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *J Food Prot*, 72(10), 2162-2169.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 4(11), 430-435.

- Bergey, D.H.; Harrison, F. C.; Breed, R.S.; Hammer, B. W.; Huntoon, F. M. (1998). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, 2, p.29-34.
- Bermúdez-Humarán, L. G., Kharrat, P., Chatel, J. M., & Langella, P. (2011). Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb Cell Fact*, 10 Suppl 1, S4.
- Bharti, A. R., & Nally, J. E. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 757-770.
- Blazius, R. D., Romão, P. R., Blazius, E. M., & da Silva, O. S. (2005). Occurrence of *Leptospira* spp. seropositive stray dogs in Itapema, Santa Catarina, Brazil. *Cad Saude Publica*, 21(6), 1952-1956.
- Bomfim, M. R. Q., & Koury, M. C. (2006). Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4), 278-288.
- Boonyod, D., Poovorawan, Y., Bhattarakosol, P., & Chirathaworn, C. (2005). LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 23(2-3), 133-141.
- Branco, K. M., Nardi, R. M., Moreira, J. L., Nunes, A. C., Farias, L. M., Nicoli, J. R., et al. (2010). Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. *Braz J Med Biol Res*, 43(4), 338-344.
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, 25(30), 5467-5484.
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*, 70(6), 505-515.
- Brandtzaeg, P., Baekkevold, E. S., Farstad, I. N., Jahnsen, F. L., Johansen, F. E., Nilsen, E. M., et al. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*, 20(3), 141-151.
- Branger, C., Chatrenet, B., Gauvrit, A., Aviat, F., Aubert, A., Bach, J. M., et al. (2005). Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun*, 73(7), 4062-4069.
- Branger, C., Sonrier, C., Chatrenet, B., Klonjowski, B., Ruvoen-Clouet, N., Aubert, A., et al. (2001). Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun*, 69(11), 6831-6838.
- Brod, C. S., Aleixo, J. A., Jouglard, S. D., Fernandes, C. P. H., Teixeira, J. L., Dellagostin, O. A. (2005). Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38, 294-300.
- Brown, K. a. P., J. (2008.). Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *Can Med Assoc*, 178, 339-401.
- Brown, P. D., & Levett, P. N. (1997). Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J Med Microbiol*, 46(2), 173-181.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., & Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol*, 34(1), 1-16.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28(4), 281-370.

- Castro, J. R., Salaberry, S. R., Souza, M. A., & Lima-Ribeiro, A. M. (2011). Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44(2), 217-222.
- Cerqueira, G., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing- Review. *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 9, pp. 760-768). Pelotas, Brazil and Paris, France: *Science Direct*.
- Chaemchuen, S., Rungpragayphan, S., Poovorawan, Y., & Patarakul, K. (2011). Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. *Vet Microbiol*, 153(1-2), 178-185.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M. C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A. M., Dudez, A. M., Martin, V., et al. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol*, 23(12), 1527-1533.
- Chalayan, P., Chanket, P., Boonchawalit, T., Chattanadee, S., Srimanote, P., & Kalambaheti, T. (2011). Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105(5), 289-297.
- Chang, T. L., Chang, C. H., Simpson, D. A., Xu, Q., Martin, P. K., Lagenaur, L. A., et al. (2003). Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11672-11677.
- Chapola, E. G., dos Santos, M., Bessa, T. A., & de Oliveira, M. L. (2005). Human and canine leptospirosis: serological data of São Paulo City, Brazil, 2000 to 2003. *Rev Cubana Med Trop*, 57(1), 61-62.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 84(5), 759-768.
- Chassin, C., Picardeau, M., Goujon, J. M., Bourhy, P., Quellard, N., Darche, S., et al. (2009). TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*, 183(4), 2669-2677.
- Chervinets, I. V., Bondarenko, V. M., Shabanova, N. A., Samoukina, A. M., & Chervinets, V. M. (2006). Bacteriocinogenic highly antagonistic strains of lactobacilli. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(7), 78-82.
- Chou, L. S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, 82(1), 23-31.
- Christensen, H. R., Frøkiaer, H., & Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*, 168(1), 171-178.
- Chung, J. Y., Sung, E. J., Cho, C. G., Seo, K. W., Lee, J. S., Bhang, D. H., et al. (2009). Effect of recombinant *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF on immune function in dogs. *J Microbiol Biotechnol*, 19(11), 1401-1407.
- Claesson, M. J., Li, Y., Leahy, S., Canchaya, C., van Pijkeren, J. P., Cerdeño-Tárraga, A. M., et al. (2006). Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17), 6718-6723.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, 71(1), 1-20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-2010) M100-S20-U de junho de 2010.
- Collins, E. B., & Aramaki, K. (1980). Production of Hydrogen-Peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v.63(n.3), p. 353-357.

- Collins, J. W., Coldham, N. G., Salguero, F. J., Cooley, W. A., Newell, W. R., Rastall, R. A., et al. (2010). Response of porcine intestinal in vitro organ culture tissues following exposure to *Lactobacillus plantarum* JC1 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344. *Appl Environ Microbiol*, 76(19), 6645-6657.
- Collins, M. D., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*, 69(5), 1052S-1057S.
- Confalonieri, U. (2003.). Variabilidade climática, vulnerabilidade social e saúde no Brasil. São Paulo: *Fundação Oswaldo Cruz*.
- Corthésy, B., Boris, S., Isler, P., Grangette, C., & Mercenier, A. (2005). Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing Helicobacter pylori urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis*, 192(8), 1441-1449.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10), 777-788.
- Cremonesi, P., Chessa, S., & Castiglioni, B. (2012). Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol*, 3, 435.
- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34(4), 245-253.
- Cross, M. L. (2004). Immune-signalling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17(2), 127-134.
- CSA, B., CJ, A., SA, V., ZM, M., IJ, C., FAL, A., et al. (2005). Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in dogs from Campina Grande, State of Paraíba, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 57(2), 179-185.
- Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A. I., Haake, D. A., et al. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun*, 73(8), 4853-4863.
- Dahiya, R. S., & Speck, M. L. (1968.). Hydrogen Peroxide Formation by lactobacilli and its Effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Science*, v. 51(n.10), 1568-1572.
- de Figueiredo, C. M., Mourão, A. C., de Oliveira, M. A., Alves, W. R., Ooteman, M. C., Chamone, C. B., et al. (2001). [Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34(4), 331-338.
- de Lima, S. C., Sakata, E. E., Santo, C. E., Yasuda, P. H., Stiliano, S. V., & Ribeiro, F. A. (1990). Outbreak of human leptospirosis by recreational activity in the municipality of São José dos Campos, São Paulo. Seroepidemiological study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 32(6), 474-479.
- Delcenserie, V; Martel, D; Lamoureux, M; Amiot, J; Boutin, Y; Roy, D. (2007). Immunomodulatory Effects of probiotics in the Intestinal Tract. *Cur. Issues Mol Biol*, 10, p-37-54.
- de Souza Júnior, M. F., Lobato, Z. I., Lobato, F. C., Moreira, E. C., de Oliveira, R. R., Leite, G. G., et al. (2006). Presence of IgM antibodies for *Leptospira interrogans* in wild animals from Tocantins State, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39(3), 292-294.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J Gen Microbiol*, 138(3), 571-578.
- Del Rio, B., Dattwyler, R. J., Aroso, M., Neves, V., Meirelles, L., Seegers, J. F., et al. (2008). Oral immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol*, 15(9), 1429-1435.

- Dey, S., Mohan, C. M., Ramadass, P., & Nachimuthu, K. (2007). Phylogenetic analysis of LipL32 gene sequence of different pathogenic serovars of *Leptospira*. *Veterinary Research Communications*, 31(5), 509-511.
- Dhama, K., Mahendran, M., Gupta, P. K., & Rai, A. (2008). DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Vet Res Commun*, 32(5), 341-356.
- Dobrogosz, W. J., Peacock, T. J., & Hassan, H. M. (2010). Evolution of the probiotic concept from conception to validation and acceptance in medical science. *Adv Appl Microbiol*, 72, 1-41.
- Dong, H., Rowland, I., & Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br J Nutr*, 108(3), 459-470.
- Dorjee, S., Heuer, C., Jackson, R., West, D. M., Collins-Emerson, J. M., Midwinter, A. C., et al. (2009). Are white-spot lesions in kidneys in sheep associated with leptospirosis? *N Z Vet J*, 57(1), 28-33.
- Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev*, 6(4), 324-338.
- Dunham, S. P. (2002). The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci*, 73(1), 9-16.
- Dziedzic, J. (2000). Canine systemic bacterial infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30(5), 1103-1117.
- Ellinghausen, H. C., & McCullough, W. G. (1965). NUTRITION OF *LEPTOSPIRA POMONA* AND GROWTH OF 13 OTHER SEROTYPES: A SERUM-FREE MEDIUM EMPLOYING OLEIC ALBUMIN COMPLEX. *Am J Vet Res*, 26, 39-44.
- Epstein, P. R. (1995). Emerging diseases and ecosystem instability: new threats to public health. *Am J Public Health*, 85(2), 168-172.
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., et al. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*, 27(2), 251-256.
- Espitia, C. M., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L. M., Cappello, M., et al. (2010). Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol*, 11, 31.
- Euzéby, J. (2011). Notification that new names and new combinations have appeared in volume 60, part 12, of the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 3), 477-478.
- Evangelista, K. V., & Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*, 5(9), 1413-1425.
- Everard, C. O., Hayes, R. J., & Fraser-Chanpong, G. M. (1985). A serosurvey for leptospirosis in Trinidad among urban and rural dwellers and persons occupationally at risk. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79(1), 96-105.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., & Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect*, 13(7), 657-664.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol*, 8(2), 44-61.
- Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F. P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E. D., et al. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 39(9), 3303-3310.
- Fonzar, U. J., & Langoni, H. (2012). Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the city of Maringá, state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45(1), 100-105.

- Foster, N., Berndt, A., Lalmanach, A. C., Methner, U., Pasquali, P., Rychlik, I., et al. (2012). Emergency and therapeutic vaccination--is stimulating innate immunity an option? *Res Vet Sci*, 93(1), 7-12.
- Freitas JC, S. F., Oliveira RC, Delbem ACB, Muller EE, Alves LA, Teles PS. (2004). Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. *Ciência Rural-Santa Maria*, 34, 853-856.
- Freytag, L. C., & Clements, J. D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine*, 23(15), 1804-1813.
- Fuller, R., & Gibson, G. R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 222, 28-31.
- FUNASA - Boletim eletrônico Epidemiológico. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf
- Fåk, F., & Bäckhed, F. (2012). *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. *PLoS One*, 7(10), e46837.
- Gackowska, L., Michalkiewicz, J., Krotkiewski, M., Helmin-Basa, A., Kubiszewska, I., & Dzierzanowska, D. (2006). Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 9, 13-21.
- Gibson, G. R., & Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*, 77(4), 412-420.
- Girons, I. S., Bourhy, P., Ottone, C., Picardeau, M., Yelton, D., Hendrix, R. W., et al. (2000). The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol*, 182(20), 5700-5705.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386-401.
- Gonçalves, D. D., Teles, P. S., dos Reis, C. R., Lopes, F. M., Freire, R. L., Navarro, I. T., et al. (2006). Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48(3), 135-140.
- Gordon, P. J. (2002). Control of leptospirosis by vaccination. *Vet Rec*, 150(13), 420.
- Granette, C., Müller-Alouf, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M. C., Turneer, M., & Mercenier, A. (2001). Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun*, 69(3), 1547-1553.
- Guerra, N. P., & Castro, L. P. (2003). Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultures. *Biotechnol Appl Biochem*, 38(Pt 2), 157-167.
- Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galvão Reis, M., et al. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*, 69(8), 4958-4968.
- Guerrero, R. (2001). Bergey's manuals and the classification of prokaryotes. *Int Microbiol*, 4(2), 103-109.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., & Park, S. Y. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Gupta, V., Garg, R. (2009). Probiotics. *Ind Jour Med Microbiol*. v. 27(3) p. 202-209.
- Gänzle, M. G. (2004). Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(3), 326-332.
- Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146 (Pt 7), 1491-1504.

- Haake, D. A., Champion, C. I., Martinich, C., Shang, E. S., Blanco, D. R., Miller, J. N., et al. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol*, 175(13), 4225-4234.
- Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L., Barnett, J. K., Barnett, D., Mazel, M., et al. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, 68(4), 2276-2285.
- Haake, D. A., Martinich, C., Summers, T. A., Shang, E. S., Pruetz, J. D., McCoy, A. M., et al. (1998). Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun*, 66(4), 1579-1587.
- Haake, D. A., & Matsunaga, J. (2002). Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun*, 70(9), 4936-4945.
- Haake, D. A., Mazel, M. K., McCoy, A. M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., et al. (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*, 67(12), 6572-6582.
- Habarta, A., Abreu, P. A., Olivera, N., Hauk, P., Cédola, M. T., Ferrer, M. F., et al. (2011). Increased immunogenicity to LipL32 of *Leptospira interrogans* when expressed as a fusion protein with the cholera toxin B subunit. *Curr Microbiol*, 62(2), 526-531.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). The Genera *Lactobacillus* and *Corynebacterium*. In *The Prokaryotes*. In A. E. F. t. m. *Community*. (Ed.).
- Han, K. S., Kim, Y., Kim, S. H., & Oh, S. (2007). Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *J Microbiol Biotechnol*, 17(5), 774-783.
- Hauk, P., Barbosa, A. S., Ho, P. L., & Farah, C. S. (2012). Calcium-binding to *Leptospira* outer membrane antigen LipL32 is not necessary for its interaction with plasma fibronectin, collagen type IV and plasminogen. *J Biol Chem*.
- Hauk, P., Carvalho, E., & Ho, P. L. (2011). Expression and purification of the non-tagged LipL32 of pathogenic *Leptospira*. *Braz J Med Biol Res*, 44(4), 297-302.
- Hauk, P., Guzzo, C. R., Ho, P. L., & Farah, C. S. (2009a). Crystallization and preliminary X-ray analysis of LipL32 from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 65(Pt 3), 307-309.
- Hauk, P., Guzzo, C. R., Roman Ramos, H., Ho, P. L., & Farah, C. S. (2009b). Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *J Mol Biol*, 390(4), 722-736.
- Hauk, P., Macedo, F., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., de Moraes, Z. M., Barbosa, A. S., et al. (2008). In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun*, 76(6), 2642-2650.
- Hellems, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8(2), R19.
- Ho, P. S., Kwang, J., & Lee, Y. K. (2005). Intra-gastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine*, 23(11), 1335-1342.
- Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., & Lebranchu, Y. (2006). Supernatant of *Bifidobacterium brevis* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol*, 117(3), 696-702.

- Holmgren, J., & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*, 11(4 Suppl), S45-53.
- Homem, V. S., Heinemann, M. B., Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., Ferreira, F., & Ferreira Neto, J. S. (2001). Epidemiologic study of bovine and human leptospirosis in eastern Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34(2), 173-180.
- Huang, B., Bao, L., Zhong, Q., Shang, Z. L., Zhang, H. D., & Zhang, Y. (2008). Construction of the eukaryotic recombinant vector and expression of the outer membrane protein LipL32 gene from *Leptospira* serovar Lai. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 24(2), 109-112.
- Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kaneko, R., & Ito, H. (1916). THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTEROHAEMORRHAGICA). *J Exp Med*, 23(3), 377-402.
- Indaram, A. V., Nandi, S., Weissman, S., Lam, S., Bailey, B., Blumstein, M., et al. (2000). Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 6(1), 49-52.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*, 73(2 Suppl), 444S-450S.
- Jahnsen, F. L., Farstad, I. N., Aanesen, J. P., & Brandtzaeg, P. (1998). Phenotypic distribution of T cells in human nasal mucosa differs from that in the gut. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(3), 392-401.
- Jansen, A., Luge, E., Guerra, B., Wittschen, P., Gruber, A. D., Loddenkemper, C., et al. (2007). Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis*, 13(5), 739-742.
- Jennifer E. Stokes, D., DACVIM, John B. Kaneene, D., MPH, PhD, William D. Schall, D., MS, DACVIM, John M. Kruger, D., PhD, DACVIM, RoseAnn Miller, M., Lana Kaiser, M., DVM, et al. (2007). Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *Jour Am Vet Med Assoc.*, 230(11), 1657-1664.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol*, 27(3), 183-185.
- Johansen, F. E., Baekkevold, E. S., Carlsen, H. S., Farstad, I. N., Soler, D., & Brandtzaeg, P. (2005). Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood*, 106(2), 593-600.
- Johnson, R.C & Faine, S. (1984) Family II Leptospiraceae . In: N.R.Krieg and J.G.Holt (Ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, *The Williams and Wilkins Co.*, p.62-67.
- Johnston, M. A., & Delwiche, E. A. (1962.). Catalase of Lactobacillaceae. *Journal of Bacteriology*. v. 83(n.4), p.936.
- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., et al. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*, 95(1), 55-65.
- Jung, L. R*, Silva, B. C*, Sandes, S. H., Alvim, L. B., Bomfim, M. R., Nicoli, J. R., et al. (2013). *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef Microbes*. 4(3): 267-275.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*. *Immunol Cell Biol*, 78(1), 80-88.
- Kajikawa, A., Satoh, E., Leer, R. J., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2007). Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine*, 25(18), 3599-3605.

- Kawashima, T., Hayashi, K., Kosaka, A., Kawashima, M., Igarashi, T., Tsutsui, H., et al. (2011). *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. *Int Immunopharmacol*, 11(12), 2017-2024.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1990-1995.
- Ko, A. I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C. M., Johnson, W. D., & Riley, L. W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*, 354(9181), 820-825.
- Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 736-747.
- Koizumi, N., & Watanabe, H. (2003). Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. *J Med Microbiol*, 52(Pt 7), 585-589.
- Koizumi, N., & Watanabe, H. (2005). Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med*, 51(3), 210-214.
- Koo, O. K., Amalaradjou, M. A., & Bhunia, A. K. (2012). Recombinant Probiotic Expressing *Listeria* Adhesion Protein Attenuates *Listeria monocytogenes* Virulence *in vitro*. *PLoS One*, 7(1), e29277.
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., & Matosić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol*, 94(6), 981-987.
- Kozłowski, P. A., Williams, S. B., Lynch, R. M., Flanigan, T. P., Patterson, R. R., Cu-Uvin, S., et al. (2002). Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol*, 169(1), 566-574.
- Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., et al. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38(2), 165-172.
- Lamphear, B. J., Streatfield, S. J., Jilka, J. M., Brooks, C. A., Barker, D. K., Turner, D. D., et al. (2002). Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control Release*, 85(1-3), 169-180.
- Langhendries, J. P., Detry, J., Van Hees, J., Lamboray, J. M., Darimont, J., Mozin, M. J., et al. (1995). Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 21(2), 177-181.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(4), 728-764.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 8(3), 171-184.
- Lee, P. (2010). Biocontainment strategies for live lactic acid bacteria vaccine vectors. *Bioeng Bugs*, 1(1), 75-77.
- Leonard, W. J., & Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol*, 5(9), 688-698.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2), 296-326.
- Li, X., Xia, C., & Li, Y. (2009). [Induced expression of alpha-toxin gene of *Clostridium perfringens* in recombinant *Lactobacillus casei* and their immunoprotective in mice]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49(8), 1115-1120.

- Lilburn, T. G., & Garrity, G. M. (2004). Exploring prokaryotic taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 1), 7-13.
- Lin, X., Zhao, J., Qian, J., Mao, Y., Pan, J., Li, L., et al. (2010). Identification of immunodominant B- and T-cell combined epitopes in outer membrane lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clin Vaccine Immunol*, 17(5), 778-783.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Logan, J., Edwards, K., & Saunders, N. (2009). Real-time PCR: Current Technology and Applications. Unpublished manuscript, Norfolk, UK.
- Lotterberger, J., Guerrero, S. A., Tonarelli, G. G., Frank, R., Tarabla, H., & Vanasco, N. B. (2009). Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol*, 49(5), 641-645.
- Lucas, D. S., Cullen, P. A., Lo, M., Srikrum, A., Sermswan, R. W., & Adler, B. (2011). Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*, 29(18), 3413-3418.
- Luo, D., Xue, F., Ojcius, D. M., Zhao, J., Mao, Y., Li, L., et al. (2009). Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. *Vaccine*, 28(1), 243-255.
- Maassen, C. B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., den Bak-Glashouwer, M. J., Leer, R. J., Laman, J. D., et al. (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, 18(23), 2613-2623.
- Macfarlane, G. T., & Cummings, J. H. (2002). Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis*, 15(5), 501-506.
- Mack, D. R., Ahme, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, v.52(n.6), 827-833.
- Macpherson, A. J., Geuking, M. B., & McCoy, K. D. (2005). Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*, 115(2), 153-162.
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4(6), 478-485.
- Malago, J. J., Nemeth, E., Koninkx, J. F., Tooten, P. C., Fajdiga, S., & van Dijk, J. E. (2010). Microbial products from probiotic bacteria inhibit *Salmonella enteritidis* 857-induced IL-8 synthesis in Caco-2 cells. *Folia Microbiol (Praha)*, 55(4), 401-408.
- Malmström, J., Beck, M., Schmidt, A., Lange, V., Deutsch, E. W., & Aebersold, R. (2009). Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*, 460(7256), 762-765.
- Maneewatch, S., Sakolvaree, Y., Saengjaruk, P., Srimanote, P., Tapchaisri, P., Tongtawe, P., et al. (2008). Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous *Leptospira* spp. challenge. *Hybridoma (Larchmt)*, 27(6), 453-465.
- Maniatis, T., Fritsch, E. E. F., & Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor*, 2nd Ed, 3.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S., & Michalek, S. M. (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*, 6(8), 777-784.

- Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., elina Torre, C., Leonides Fernández, L., & Rodríguez, J. (2009). Identification and Evaluation of the Probiotic Potencial of Lactobacilli Isolated from Canine Milk. *Vet. Jour.*
- Martins, A. K. S.; Martins, F. S.; Gomes, D. A.; Elian, S. D. A.; Vieira, A. T.; Teixeira, M. M.; Cara, D. C.; Nardi, R. M. D.; Nicoli, J. R. (2010). Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. lactis. *Archives of Microbiology*, v. 192, p. 995-1003.
- Mathieu & Weil. (1886). Typhus hépatique bénin rechute guérison. *Rev. Méd.* 6 :6333-6338.
- Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., et al. (2003). Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(2), 259-266.
- Matsunaga, J., Barocchi, M. A., Croda, J., Young, T. A., Sanchez, Y., Siqueira, I., et al. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, 49(4), 929-945.
- McBride, A. J., Cerqueira, G. M., Suchard, M. A., Moreira, A. N., Zuerner, R. L., Reis, M. G., et al. (2009). Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol*, 9(2), 196-205.
- McCafferty, D. M., & Zeitlin, I. J. (1989). Short chain fatty acid-induced colitis in mice. *Int J Tissue React*, 11(4), 165-168.
- McCoy, S., & Gilliland, S. E. (2007). Isolation and characterization of *Lactobacillus* species having potential for use as probiotic cultures for dogs. *J Food Sci*, 72(3), M94-97.
- Mendez, S; Valenzuela, J. G; Wu, W; Hotez, P. J. (2006). Real-Time Reverse Transcription-PCR Quantification of Cytokine mRNA Expression in golden Syrian Hamster Infected with *Leishmania infantum* and Treated with a new Amphotericin B formulation. *Antimicrob Ag Chemot.* p.1195-1201.
- Merien, F., Truccolo, J., Rougier, Y., Baranton, G., & Perolat, P. (1998). *In vivo* apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett*, 169(1), 95-102.
- Minke, J. M., Bey, R., Tronel, J. P., Latour, S., Colombet, G., Yvorel, J., et al. (2009). Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol*, 137(1-2), 137-145.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., et al. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2880-2885.
- Moreira, J. L., Mota, R. M., Horta, M. F., Teixeira, S. M., Neumann, E., Nicoli, J. R., et al. (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol*, 5, 15.
- Morelli, L. (2000). *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol*, 1(2), 59-67.
- Mulder, I., Schmidt, B., Stokes, C., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R., et al. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol*, 7, 79.
- Murray, G. L. (2013a). The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*, 162(2-4), 305-314.

- Murray, G. L., Morel, V., Cerqueira, G. M., Croda, J., Srikram, A., Henry, R., et al. (2009a). Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*, 77(2), 810-816.
- Murray, G. L., Srikram, A., Henry, R., Hartskeerl, R. A., Sermswan, R. W., & Adler, B. (2010). Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*, 78(3), 701-709.
- Murray, G. L., Srikram, A., Hoke, D. E., Wunder, E. A., Henry, R., Lo, M., et al. (2009b). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 77(3), 952-958.
- Nader-Macías, M. E., Otero, M. C., Espeche, M. C., & Maldonado, N. C. (2008). Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35(11), 1387-1395.
- Nally, J. E., Whitelegge, J. P., Bassilian, S., Blanco, D. R., & Lovett, M. A. (2007). Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun*, 75(2), 766-773.
- Nardi, M., Sextius, P., Bonnarme, P., Spinnler, H. E., Monnet, V., & Irlinger, F. (2005). Genetic transformation of *Brevibacterium linens* strains producing high amounts of diverse sulphur compounds. *J Dairy Res*, 72(2), 179-187.
- Nascimento, A. L. T. O., Ko, A. I., Martins, E. A. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Ho, P. L., Haake, D. A., et al. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2164-2172.
- Natarajaseenivasan, K., Vijayachari, P., Sugunan, A. P., Sharma, S., & Sehgal, S. C. (2004). Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. *Indian J Med Res*, 120(3), 151-159.
- Nemcová, R. (1997). [Criteria for selection of lactobacilli for probiotic use]. *Vet Med (Praha)*, 42(1), 19-27.
- Neumann, E. (1991). Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Neutra, M. R., & Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*, 6(2), 148-158.
- Nicoli, J. R.; Vieira, L. Q. (2004). Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: Castro, L. P.; Coelho; L. G. V. (Org.). *Gastroenterologia*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 1037-1047.
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, 15(2), 300-310.
- Nishitani, Y., Sasaki, E., Fujisawa, T., & Osawa, R. (2004). Genotypic analyses of lactobacilli with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented foods. *Syst Appl Microbiol*, 27(1), 109-117.
- Noguchi, H. (1917). SPIROCHAETA ICTEROHAEMORRHAGIAE IN AMERICAN WILD RATS AND ITS RELATION TO THE JAPANESE AND EUROPEAN STRAINS : FIRST PAPER. *J Exp Med*, 25(5), 755-763.
- Noguchi, H., & Akatsu, S. (1917a). IMMUNOLOGICAL STUDIES ON PURE CULTURES OF VARIOUS SPIROCHETES. *J Exp Med*, 25(6), 765-788.
- Nueno-Palop, C., & Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *Int J Food Microbiol*, 145(2-3), 390-394.

- Oliveira Lavinsky, M., Said, R. A., Strenzel, G. M., & Langoni, H. (2012). Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. *Prev Vet Med*, 106(1), 79-84.
- Oliveira, M. L., Arêas, A. P., Campos, I. B., Monedero, V., Perez-Martínez, G., Miyaji, E. N., et al. (2006). Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect*, 8(4), 1016-1024.
- Otte, J. M., & Podolsky, D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(4), G613-626.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., & Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(1), 184-186.
- Palaniappan, R. U., Chang, Y. F., Jusuf, S. S., Artiushin, S., Timoney, J. F., McDonough, S. P., et al. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 70(11), 5924-5930.
- Palaniappan, R. U., Ramanujam, S., & Chang, Y. F. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*, 20(3), 284-292.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*, 100(6), 1171-1185.
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci*, 82(4), 627-631.
- PC., B. C. a. S. (2001). The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro., 17, 59-67.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., & Bellon-Fontaine, M. N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol*, 63(5), 1725-1731.
- Perdigón, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J. C., & Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr*, 56 Suppl 4, S21-26.
- Pereira, C. S., Barros, P. R., Silva, P. M., & Rodrigues, D. P. (2009). Patógenos isolados do trato gastrointestinal de cães saudáveis no Rio de Janeiro., *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* (Vol. v.61, pp. p. 1000-1001.).
- Pereira, M. M., Matsuo, M. G., Bauab, A. R., Vasconcelos, S. A., Moraes, Z. M., Baranton, G., et al. (2000). A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J Clin Microbiol*, 38(1), 450-452.
- Perolat, P., Chappel, R. J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D. M., Billingham, M. L., et al. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 3, 851-858.
- Picardeau, M., Brenot, A., & Saint Girons, I. (2001). First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol. Microbiol.*, 40(1), 189-199.
- Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., et al. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*, 3(2), e1607.
- Pinne, M., & Haake, D. A. (2013). LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One*, 8(1), e51025.

- Possas, C. A. (2000). Urbanização, ecologia e emergência de formas graves da leptospirose: análise comparativa de dados secundários nacionais. Paper presented at the Anais do evento comemorativo do centenário do Instituto Oswaldo Cruz e da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Pouwels, P.H., Leer, R. J., Boersma, W.J.A. (1996). The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *Jour Biotech*, 44(1-3), p. 183-192.
- Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. D., Smit, E., et al. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol*, 41(2), 155-167.
- Pridmore, R. D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A. C., et al. (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2512-2517.
- Rabe, L. K., & Hillier, S. L. (2003). Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J Clin Microbiol*, 41(7), 3260-3264.
- Ramadass, P. J., B. D. W. Comer, R. J. Penny, D. Marshall, R. B. , & (1992). Genetic Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by DNA Hybridization. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 215-219.
- Rama Iñiguez, S; Dea-Ayuela, M. A; Sanchez-Brunete, J.A; Torrado, J. J; Alunda, J. M; Bolas-Fernández, F.(2006). Real-Time Reverse Transcription-PCR quantification of Cytokine mRNA Expression in Golden Syrian Hamster Infected with *Leishmania infantum* and Treated with a New Amphotericin B Formulation. *Anti. Agen Chemot*, apr. p.1195-1201.
- Rathinam, S. R. (2005). Ocular manifestations of leptospirosis. *J Postgrad Med*, 51(3), 189-194.
- Resende, F. C. B., Passold, J., Ferreira, S. I. A. C., Zanetti, C. R., & Lima, H. C. (2004). Vaccine adjuvants: possibilities for use in humans or animals. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, 27(03), 116-124.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K., & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 3798-3806.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet Microbiol*, 92(1-2), 111-119.
- Ristow, P., Bourhy, P., da Cruz McBride, F. W., Figueira, C. P., Huerre, M., Ave, P., et al. (2007). The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3(7), e97.
- Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*, 130(2S Suppl), 396S-402S.
- Rossi, M., & Bot, A. (2011). Celiac disease: progress towards diagnosis and definition of pathogenic mechanisms. *Int Rev Immunol*, 30(4), 183-184.
- Ryan, E. J., Daly, L. M., & Mills, K. H. (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol*, 19(8), 293-304.
- Sandes, S. H. C. (2013). Seleção de Bactérias Láticas com Potencial Probiótico para uso como Promotor de Crescimento ou como Adjuvante Imune em Vacinas de Mucosa an Pecuária Bovina. Dissertação de mestrado em genética; ICB/UFMG.

- Sanders, E. J., Rigau-Pérez, J. G., Smits, H. L., Deseda, C. C., Vorndam, V. A., Aye, T., et al. (1999). Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg*, 61(3), 399-404.
- Sarkar, U., Nascimento, S. F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalofonos, I., et al. (2002). Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*, 66(5), 605-610.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis*, 6(6), 374-382.
- Saúde., O. M. (Sep. 2010). The Leptospirosis Burden Epidemiology. In W. L. C.-i.-P. Data (Ed.), IN: *Second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group*. Geneve.
- Scheerlinck, J., Y. (2001). Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, 19, 2647-2656.
- Scheppler, L., Vogel, M., Zuercher, A. W., Zuercher, M., Germond, J. E., Miescher, S. M., et al. (2002). Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 20(23-24), 2913-2920.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73(2 Suppl), 361S-364S.
- Schroppel, B., & He, J. C. (2006). Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. *Kidney Int*, 69(5), 785-787.
- Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, Portal da Saúde. (2010). *Guia de Vigilância Epidemiológica*, 7ª ed, caderno 8. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1562>
- Seegers, J. F. M. L.(2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *TRENDS Biotech*, v.20(12).
- Seixas, F. K., Fernandes, C. H., Hartwig, D. D., Conceição, F. R., Aleixo, J. A., & Dellagostin, O. A. (2007). Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can J Microbiol*, 53(4), 472-479.
- Semjonovs, P., Jasko, J., Auzina, L., & Zikmanis, P. (2008.). The use of Exopolysaccharide-producing of Lactic Acid Bacteria to Improve Functional Value to Fermented Foods. *Jour Food Technol*, 6(2), 101-109.
- Seth, A., Yan, F., Polk, D. B., & Rao, R. K. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(4), G1060-1069.
- Shang, E. S., Exner, M. M., Summers, T. A., Martinich, C., Champion, C. I., Hancock, R. E., et al. (1995). The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun*, 63(8), 3174-3181.
- Silva, E. F., Cerqueira, G. M., Seyffert, N., Seixas, F. K., Hartwig, D. D., Athanazio, D. A., et al. (2009). *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis*, 15(4), 621-623.
- Singh, A. P., Preet, S., & Rishi, P. (2011). Augmentation of antimicrobial activity of conventional antibiotics by cell-free extract of *L. plantarum*. *J Antibiot (Tokyo)*, 64(12), 795-798.
- Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (BVS.) Disponível em : <bvsms.saude.gov.br/bvs/.../sistema_nacional_vigilancia_saude_df_5ed.>
- Slack, A. (2010). Leptospirosis. *Aust Fam Physician*, 39(7), 495-498.

- Spinler, J. K., Taweechoitipatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14(3), 166-171.
- Steinberg, R.S. (2012). Avaliação da Capacidade Imunomodulatória de Isolados de *Lactobacillus* Bovinos (L38 E L36) em Modelo Experimental Murino Desafiado por *Salmonella enterica* Subsp. Enterica Sorovar Typhimurium. Dissertação de Mestrado em Genética. ICB/UFMG.
- Strasser, A., May, B., Teltscher, A., Wistrela, E., & Niedermüller, H. (2003). Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 94(3-4), 113-121.
- Strompfová, V., Lauková, A., & Ouwehand, A. C. (2004). Lactobacilli and enterococci—potential probiotics for dogs. *Folia Microbiol* (Praha), 49(2), 203-207.
- Strompfová, V., Marcináková, M., Simonová, M., Bogovic-Matijasić, B., & Lauková, A. (2006). Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*, 12(2), 75-79.
- Strugnell, R. A., & Wijburg, O. L. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 656-667.
- Tagg, J. R., & Dierksen, K. P. (2007). Bacterial replacement therapy: adapting "germ warfare" to infection prevention. *Trends in Biotechnology*, 12(2), 217-223.
- Tannock, G. W. (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 1(1-2), 53-64.
- Tassinari, W. e. S., Pellegrini, D. a. C., Sabroza, P. C., & Carvalho, M. S. (2004). Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996-1999. *Cad Saude Publica*, 20(6), 1721-1729.
- Thomas, C. M., Hong, T., van Pijkeren, J. P., Hemarajata, P., Trinh, D. V., Hu, W., et al. (2012). Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One*, 7(2), e31951.
- Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol*, 35(1), 49-56.
- Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., & Kersters, K. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst Appl Microbiol*, 24(4), 554-560.
- Vajdy, M., Srivastava, I., Polo, J., Donnelly, J., O'Hagan, D., & Singh, M. (2004). Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol*, 82(6), 617-627.
- Vallor, A. C., Antonio, M. A., Hawes, S. E., & Hillier, S. L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. 184(11), 1431-1436.
- Vanasco N.B., S. M. F., Lottersberger J., Costa F., Ko A.I Tarabla, H. D. C. (2008.). Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). 107, 255-258.
- Verma, A., Artiushin, S., Matsunaga, J., Haake, D. A., & Timoney, J. F. (2005). LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect Immun*, 73(11), 7259-7266.
- Verma, A., Matsunaga, J., Artiushin, S., Pinne, M., Houwers, D. J., Haake, D. A., et al. (2012). Antibodies to a novel leptospiral protein, LruC, in the eye fluids and sera of horses with *Leptospira*-associated uveitis. *Clin Vaccine Immunol*, 19(3), 452-456.

- Vernel-Pauillac, F., & Merien, F. (2006). Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 74(7), 4172-4179.
- Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G. H., Whittam, T. S., Musser, J. M., et al. (1995). DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med*, 119(1), 23-29.
- Vijayachari, P., Sugunan, A. P., & Shriram, A. N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*, 33(4), 557-569.
- Vinh, T., Faine, S., Handley, C. J., & Adler, B. (1994). Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8(2), 99-107.
- Vivian, J. P., Beddoe, T., McAlister, A. D., Wilce, M. C., Zaker-Tabrizi, L., Troy, S., et al. (2009). Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Mol Biol*, 387(5), 1229-1238.
- Vizoso Pinto, M; Gómez, M. R; Seifert, S; Waltzl, B; Holzapfel, W. H; Franz, C, M. A. P. (2009) Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells *in vitro*. *Int jour Food Microbiol*, 133, p.86-93.
- Walker, D. K., & Gilliland, S. E. (1993). Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, 76(4), 956-961.
- Wang, Z., Jin, L., & Wegrzyn, A. (2007). Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact*, 6, 39.
- Wen, L. J., Hou, X. L., Wang, G. H., Yu, L. Y., Wei, X. M., Liu, J. K., et al. (2011). Immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains producing K99, K88 fimbrial protein protects mice against enterotoxigenic Escherichia coli. *Vaccine*.
- Winkler, P., Ghadimi, D., Schrezenmeir, J., & Kraehenbuhl, J. P. (2007). Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr*, 137(3 Suppl 2), 756S-772S.
- Wolff, J. W., & Broom, J. C. (1954). The genus *Leptospira Noguchi*, 1917; problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. *Doc Med Geogr Trop*, 6(1), 78-95.
- Wolgemuth, C. W., Charon, N. W., Goldstein, S. F., & Goldstein, R. E. (2006). The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 11(3-5), 221-227.
- Xanthopoulos, V., Ztaliou, I., Gaier, W., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (1999). Differentiation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *J Appl Microbiol*, 87(5), 743-749.
- Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol*, 27(6), 496-501.
- Yan, J. (2008). [Advance in research of pathogenic mechanism and novel genetic engineering vaccines of *Leptospira interrogans* and bacterial drug resistance]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 37(6), 537-543.
- Yan, W., Faisal, S. M., McDonough, S. P., Chang, C. F., Pan, M. J., Akey, B., et al. (2010). Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine*, 28(11), 2277-2283.
- Yang, C. W., Wu, M. S., Pan, M. J., Hsieh, W. J., Vandewalle, A., & Huang, C. C. (2002). The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 13(8), 2037-2045.

- Yang, H. L., Zhu, Y. Z., Qin, J. H., He, P., Jiang, X. C., Zhao, G. P., et al. (2006). *In silico* and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. *Bmc Genomics*, 7.
- Yasuda, P. H., Steigerwalt, A. G., Sulzer, K. R., Kaufmann, A. F., Rogers, F., & Brenner, D. J. (1999). Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 407-415.
- Yoder, J. S., Hlavsa, M. C., Craun, G. F., Hill, V., Roberts, V., Yu, P. A., et al. (2008). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events--United States, 2005-2006. *MMWR Surveill Summ*, 57(9), 1-29.
- Yoshida, A. (1967). A single amino Acid substitution (asparagine to aspartic Acid) between normal (b+) and the common negro variant (a+) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57(3), 835-840.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyath, Y., & Aslim, B. (2004). Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung*, 48(3), 218-220.
- Zaki, S. R., & Shieh, W. J. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. *Lancet*, 347(9000), 535-536.
- Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Z., Filipović, I., Skrivanko, M., et al. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Sci*, 80(2), 480-487.
- Zhang, M., Liu, B., Zhang, Y., Wei, H., Lei, Y., & Zhao, L. (2007). Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*, 45(2), 496-500.
- Zhang, X. Y., Yu, Y., He, P., Zhang, Y. X., Hu, B. Y., Yang, Y., et al. (2005). Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 37(10), 649-656.
- Zhang, Y., Bao, L., Zhu, H., Huang, B., & Zhang, H. (2010). OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(1), 70-79.
- Zink, R., Reniero, R., Rochat, F., Cavadini, C., Der, V., T, W., et al. (2008). Novel Probiotic Strains for Pets (ed.17 jul).
- Zuerner, R., Haake, D., Adler, B., & Segers, R. (2000). Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2(4), 455-462.
- Zunino M, E., & Pizarro P, R. (2007). Leptospirosis: a literature review. *Rev Chilena Infectol*, 24(3), 220-226.

ANEXO 1 - Perfis de restrição usados na identificação por PCR-ARDRA, da região do espaçador transcrito entre os genes 16S e 23S do RNA ribossômico, de *Lactobacillus spp.* As cruzes representam as bandas do espaçador transcrito que foram cortadas pelas endonucleases.

Endonucleases												Espécies
<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>Csp45I</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. gastricus</i>
+++	+	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	+++	<i>L. farciminis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. antri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. reuteri</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+	---	---	---	<i>L. vaginalis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. vaginalis</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
+++	---	+	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	---	+	---	---	---	<i>L. satsumensis</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. mali</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum</i>
+++	---	---	+++	+	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. kefirii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. parafarraginis</i>
+++	---	---	---	+	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	+++	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	+++	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	+	---	+++	---	<i>L. rossiae</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	+	---	---	<i>L. vini</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. diolivorans</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
---	+++	+	---	+	---	+	---	---	---	+++	---	<i>L. kalbvensis</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
---	+++	---	---	+	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
---	+++	---	---	+	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. kefiranosciens</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+	---	---	+++	<i>L. iners</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	+++	<i>L. gasseri</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+	---	<i>L. johnsonii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	---	---	---	+	---	+++	+++	<i>L. perolers</i>

ANEXO 2:

Alinhamento das sequências do gene *lipL32* das leptospiros dos sorovariades Canicola, linhagem Hond Utrech e Icterohaemorrhagiae, linhagem RGA de *L. interrogans* e Grippotyphosa, linhagem Moskva V de *L. Kirschneri*.

```

Can-Lip      ATGAAAAAATTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACCTTTTGCAAGCATTACCGCTTGT 60
Ictero-Lip  ATGAAAAAATTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACCTTTTGCAAGCATTACCGCTTGT 60
Grippe-Lip  ATGAAAAAATTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACCTTTTGCAAGCATTACCGCTTGT 60
*****

Can-Lip      GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC 120
Ictero-Lip  GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC 120
Grippe-Lip  GGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATC 120
*****

Can-Lip      CCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC 180
Ictero-Lip  CCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC 180
Grippe-Lip  CCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTAC 180
*****

Can-Lip      GGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATAAC 240
Ictero-Lip  GGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATAAC 240
Grippe-Lip  GGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGACGGTTTAGTCGATGGAACAAAAAGCATAAC 240
*****

Can-Lip      TATCTCTATGTTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCA 300
Ictero-Lip  TATCTCTATGTTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCA 300
Grippe-Lip  TATCTCTATGTTTGGATTCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTTCGTATGATTTCCCCA 300
*****

Can-Lip      ACAGGCGAAATCGGTGAACCGGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT 360
Ictero-Lip  ACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT 360
Grippe-Lip  ACAGGCGAAATCGGTGAACCGGACGGAGACTTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCT 360
*****|*****|*****

Can-Lip      ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAAATG 420
Ictero-Lip  ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAAATG 420
Grippe-Lip  ACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGGATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAAATG 420
*****

Can-Lip      TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTTG 480
Ictero-Lip  TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTTG 480
Grippe-Lip  TCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTTG 480
*****|*****

Can-Lip      GACGATGATGATAATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT 540
Ictero-Lip  GACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT 540
Grippe-Lip  GACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCT 540
*****|*****|*****

Can-Lip      CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC 600
Ictero-Lip  CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC 600
Grippe-Lip  CTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGAC 600
*****|*****

Can-Lip      ACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCAAAACCAGGT 660
Ictero-Lip  ACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCAAAACCAGGT 660
Grippe-Lip  ACTAAAAAATTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACCTACCAAAACCAGGT 660
*****

Can-Lip      GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATCCAGGT 720
Ictero-Lip  GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATCCAGGT 720
Grippe-Lip  GAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTCCACCAGGTATCCAGGT 720
*****|*****

Can-Lip      GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA 780
Ictero-Lip  GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA 780
Grippe-Lip  GTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAATTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAA 780
*****

Can-Lip      GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA 819
Ictero-Lip  GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCT----- 800
Grippe-Lip  GAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACTAAGTAA 819
*****

```

ANEXO 3:

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de *loa22* dos sorovarietade Canicola, linhagem Hond Utrech e Icterohaemorrhagiae, linhagem RGA de *L. interrogans* e Grippotyphosa, linhagem Moskva V de *L. Kirschneri*, usando o software ClustalW.

```

Loa2IcteroFW      ---TCACAT--GTCTGCTCCTCTGCTGAATTAATAA-AGGAATCCGCAGCTCCTGAGCCT
Loa3GripptoFW     FWTTTNTATCCATCTGCTCCTCTGCTGAAAAAAAAA-AGGAATCCGCAGCTCCTGAGCCT
Loa1CanFW         -----CTGN---TCTGCTC-CTGCTGAATAAAAAAGAGGAATCCGCAGCTCCTGAGCCT
                   *****
Loa2IcteroFW      TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAATGTT-ACGTCAATTCTCCGGAAGC
Loa3GripptoFW     TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAACGTT-ACGTCAATTCTCCGGAAGC
Loa1CanFW         CAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAACGTTTACGCTCAATTCTCCGGAAGC
                   *****
Loa2IcteroFW      ATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGATATCCAGACGGTTTAACTCG
Loa3GripptoFW     ATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGGTATCCAGACGGTTTAACTCG
Loa1CanFW         ATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGGTATCCAGACGGTTTAACTCG
                   *****
Loa2IcteroFW      CCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTTTCAGCGAGTGGTCTAA
Loa3GripptoFW     CCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTTTCAGCGAGTGGTCTAA
Loa1CanFW         CCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTTTCAGCGAGTGGTCTAA
                   *****
Loa2IcteroFW      AACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAAG-----GTC--TTGGAAAA-----TTCCAG-
Loa3GripptoFW     AACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAAG-----GTC--TTGGAAAA-----TTCCAG-
Loa1CanFW         ACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAAGGGGTCCTTTGGGAAAAAACCTTTTCCAGG
                   *****
Loa2IcteroFW      -ATAGG--TTTA--CCGCCTTCCTT--AGAATTTACATGTGGACCAACCACCCCGGAAT
Loa3GripptoFW     -ATAG--TTTA--C-GCT--CTT--GGAAATTTACAGG--GACCAACAACCC-GGA-
Loa1CanFW         AATAAGGTTTTAACCGGCCTTCCTTTNGAAAAATTTACCAG-GACCAACAACCCGGAA-
                   *****
Loa2IcteroFW      TTGCCNGAATCCCGGGGCTCCCCCGGAAA-CAAAGGCCAAG-AGGGGTTGGCTTAAA
Loa3GripptoFW     TTGCCGA--TCCGGG--TTCCCCGGAAA-CAAAGGCCAAGG-AAGGG--GGCTTAAA
Loa1CanFW         TGCCGGAA-TCCGGG--CCCCCGGAAAACCAAAGGCCAAGGAAAAGGGTTGCTTAAA
                   *****
Loa2IcteroFW      AGGGGGGAAACTTATTTTTTAACTTCCTTGGAAGCCTTTCGGTTGGCCCAATNGCC
Loa3GripptoFW     AAGGGAA----TTATTTTTT-AACTTCCTTGAAGGCCNT-CCGT--GCC--AATTCC-
Loa1CanFW         AAAGGGAAA--TTATTTTTT-AACT-CCTTG-AAGCCTT-CGGTGGCCAACATTGCC-
                   *****
Loa2IcteroFW      AGGTTAAAACCAAAGGCCTTTTTTAAATCCGAAGAAACACAACGG-AATTTCCCGAGGC
Loa3GripptoFW     -GGTTTAAACCAA-GGCNTTTT---ATTCC-----AAC-CAATGGCGAATCTCC--GGC
Loa1CanFW         -GGTTTAAACCAA-GGCCTTTT---ATCC-----AAGCCAG-GGCGAATTCC--GGC
                   *****
Loa2IcteroFW      AAAATTCGGTTATTCGGGTTTANCTTCAAAGTGTTGNCANGGGTTTCCTTTTCCCC
Loa3GripptoFW     CAAAATNC--GTTATTC--GTTTACCTT---AAG-----
Loa1CanFW         CAAATN-----
                   *****

```

ANEXO 4:

Alinhamento das sequências de *loa22*, dos sorovariedades Canicola, linhagem Hond Utrecht e Icterohaemorrhagiae, linhagem RGA de *L. interrogans* e Grippotyphosa, linhagem Moskva V de *L. Kirschneri*, desse trabalho, com a sequência do gene correspondente em *L. interrogans*, sorovariedade Copenhageni (GenBank: AE016823.1).

CanicolaFW	6	TCTGCTCCTCTGCTGAATTA AAAAGAGGAATCCGGCAGCTCCTGAGCCTTCAACGCAAGA	65
Sbjct	221289	TCTGCTCCTCTGCTGAA-AAAAAAGAGGAATCC-GCAGCTCCTGAGCCTTCAACGCAAGA	221232
Query	66	GCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAATGTTGACGTCAATTCTCCGGAAGCGATCGCAGATTC	125
Sbjct	221231	GCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAATGTTGACGTCAATTCTCCGGAAGCGATCGCAGATTC	221172
Query	126	TTTAAACGAAAACTAAAAGATTCCGATATCCAGACGGTTTAACTCGTCTGGATTAG	185
Sbjct	221171	TTTAAACGAAAACTAAAAGATTCCGATATCCAGACGGTTTAACTCGTCTGGATTAG	221112
Query	186	TTATAAAAAAGCGGATGTTACCCTGGTGATTTACGCGAGTGGTCTAAAAACAAACGCTCC	245
Sbjct	221111	TTATAAAAAAGCGGATGTTACCCTGGTGATTTACGCGAGTGGTCTAAAAACAAACGCTCC	221052
Query	246	TGTAATCAAAGAAGGCTTTGGAAAACCTCCAGATAGGTTTACGCTCTTTGGAAAATTTAC	305
Sbjct	221051	TGTAATCAAAGAAGGCTTTGGAAAACCTCCAGATAG-TT-ACGCTCTT-G-AAA-TT-AC	220998
Query	306	AGG	308
Sbjct	220997	AGG	220995
IcteroFW	61	CCTGT-AA-TTT-C-AAGAGCGT-AA-CTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATT	114
Sbjct	308	CCTGTAAATTTTCCAAGAGCGTAAACCTATCTGGAAGTTTTCCAAGACCTTCTTTGATT	249
Query	115	ACAGGAGCGTTTGTGTTTAGACCACTCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTA	174
Sbjct	248	ACAGGAGCGTTTGTGTTTAGACCACTCGCTGAAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTA	189
Query	175	TAACTAAATCCAGGACGAGTTAAACCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTT	234
Sbjct	188	TAACTAAATCCAGGACGAGTTAAACCGTCTGGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTT	129
Query	235	AAAGAATCTGCGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTTGCAGCTGCGGAT	294
Sbjct	128	AAAGAATCTGCGATCGCTTCCGGAGAATTGACGTCAACATTTCTGTTTGCAGCTGCGGAT	69
Query	295	TGCTCTTGCGTTGAAGGCTCAGGAGCTGC-GGATTCCTCttttttt-ttCAGCAGAGGAGC	352
Sbjct	68	TGCTCTTGCGTTGAAGGCTCAGGAGCTGCCGGATTCTCTTTTTAATTCAGCAGAGGAGC	9
Query	353	AGA	355
Sbjct	8	AGA	
GrippoFW	1	TAAAAAAT-ATTT-CCTTTTTT-AGC-A-CC-TT-CT-G-C-TTG-TT-C-GGGA-CC-G	45
Sbjct	394	TAAAAAATAATTTCCCTTTTTTAAGCAACCCTTTCCTGGCCTTTGTTTCCGGGACCCGG	335
Query	46	A-TC-GC-AT-C-GG-TGT-GT-C-CTGT-AA-TTTC-AA-GAG-CGT-AACT-ATCT-G	88
Sbjct	334	ATTCGGCAATCCGGGTTGTGGTCCGCTGTAAATTTTCAAAGGAGCCGTAACCTAATCTGG	275
Query	89	G-AAG--TTTTC-CAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGTTTGTGTTTAGACCACTCGCTG	144
Sbjct	274	GAAAGTTTTTTCGAAGACCTTCTTTGATTACAGGAGCGTTTGTGTTTAGACCACTCGCTG	215
Query	145	AAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATCCAGGACGAGTTAAACCGTCT	204
Sbjct	214	AAATCACCAGGGGTAACATCCGCTTTTTTATAACTAAATCCAGGACGAGTTAAACCGTCT	155
Query	205	GGATATCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTGCGATCGCTTCCGGAGAATTG	264
Sbjct	154	GGATACCGGAAATCTTTTAGTTTTTCGTTTAAAGAATCTGCGATCGCTTCCGGAGAATTG	95
Query	265	ACGTCAACATTTCTGTTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCCTTGAAGGCTCAGGAGCTGCG	324
Sbjct	94	ACGTCAACGTTTCTGTTTGCAGCTGCGGATTGCTCTTGCCTTGAAGGCTCAGGAGCTGCG	35
Query	325	GATTCCTCttttttttCAGCAGAGGAGCAGAGA	357
Sbjct	34	GATTCCTCTTTTAAATCAGCAGAGGAGCAGAGA	2

ANEXO 5:

Alinhamento das seqüências de loa22 dos sorovarietade Canicola, linhagem Hond Hutrech, Icterohaemorrhagiae, linhagem RGA de L. interrogans e Grippotyphosa, linhagem Moskva V de L. Kirschneri, desse trabalho com loa22 do sorovarietade Manilae (gi|30984126), descrito por Koizumi e Watanabe, (2003).

gi|30984126 TTTTCATTCACTCTCTGCTCCTCTGCTGAA-AAAAAGAGGAATCCGCAGCTCCTGAGCC
seq1Canicola -----TCTGCTC-CTGCTGAATAAAAAAGAGGAATCCGCAGCTCCTGAGCC
seq2IcteroFW -----TCTGCTCCTCTGCTGAATTAATA-AGGAATCCGCAGCTCCTGAGCC
seq3GrippofW -----TCTGCTCCTCTGCTGAA-AAAAAGAGGAATCCGCAGCTCCTGAGCC

TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAACGTT-ACGTCAATTCTCCGGAAG
TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAACGTTTACGTCAATTCTCCGGAAG
TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAATGTT-ACGTCAATTCTCCGGAAG
TCAACGCAAGAGCAATCCGCAGCTGCAAAACAGAAACGTT-ACGTCAATTCTCCGGAAG

GATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGTATCCAGACGGTTAACTC
GATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGTATCCAGACGGTTAACTC
GATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGTATCCAGACGGTTAACTC
GATCGCAGATTCTTTAAACGAAAACTAAAAGATTTCGGTATCCAGACGGTTAACTC

CCCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTCAGCGAGTGGTCTA
TCCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTCAGCGAGTGGTCTA
TCCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTCAGCGAGTGGTCTA
TCCTGGATTTAGTTATAAAAAAGCGGATGTTACCCCTGGTGATTCAGCGAGTGGTCTA

AAACTAACGCCCTGTAATCAAAGAA-----GGTC--TTGGAAAA-----TTCCAG
AACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAAAGGAAAGGGTCTTTGGGAAAAACCTTTCCAG
AAACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAA-----GGTC--TTGGAAAA-----TTCCAG
AAACAAACGCTCCTGTAATCAAAGAA-----GGTC--TTGGAAAA-----TTCCAG

--ATA--GTTA---CGCTCTT-----AAATTACAGGACACACCGATGCGATCGGT
GAATAAGGTTTTAACCGGCTTCTCTTNGAAAAATTACCAG-----GGAC-AACCAAC
--ATA--GGTTT--ACCG--CCTTCTT--GAGAATTACATGT-----GGAC-AACCACC
--ATA--GTTT---ACGCTCTT-----GGAAATTACAGG-----GAC-CAAC-AC
*** **
CCGAACAAGCAGAAGGTGCTAAAAAGGAAATATTTTTACTCTGAGCTTCGTGCAAAT
CCGGAATT-GCCGGA-ATCC-----GGGG-----TC-CCCCGAAA-----CCAAA
CCGGAATTGCGNGA-ATCC-----GGGG-----TCTCCCGGAA-----CAAAA
CCGGA--TTGCGG--ATCC-----GGG-----TT--CCCCGAAA-----CCAAA
** **
GCAGTTAAA---AGGCTTAAATCAAACAAGGGATTCCAGCAAATCGTATCGTTACTAAA
G--GCCAAGGAAAAGGGTTG-CTTAAAAAGGGA-----AA---TTATTTTT--T-A
G--GCCAAG--AAGGGTGGCTTAAAAAGGGG-----GAACTTATTTTT--TAA
G--GCAAGG--AAGGGTGG-CTTAAAAAGGGA-----TTATTTTT--T-A
* * *
GGTGCCGGTTCTTCCGA-GCCAGTTTCTGGTCTTGATGCGAAAGATGCTAAAAATAGAAG
C-----TCCTT--GAAGCC--TT-CCGGTG-----GCCAATATGCC--GGTTTAAA-
C-----TTCCTTGAAGCC--TTTCCGTTG-----GCCAAATNGCCAGTTAAAA-
C-----TTCCTTGAAGGCC--NT-CCGT-----GCCAA--TTCC--GGTTTAAA-
* * *
AGTCACTTCCGTTTTGCGACTTC--CGCACCACAACAATAATT--ATTAATCGAAAATA
--CCAA-GGCC-TTTT---ATCC-----AAGC-CAGGGCGAATT--CCCAGGCCAAATN-
--CCAAAGGCC-TTTTTTAATTCCGAAGAAACACACCGGAATTTCGCCAGGCAAAAATT
--CCAA-GGCN-TTT---ATTCC-----AACCAATGGCGAATC--TCCAGGCCAAATN
** *
CAATTCGATCT--TTCAAAGGCCGATGATTTTTTCATCGGCTTTTTTTATTTAGGGAATT

CCGGTTATTCGGTTTTANCCTTCAAAGTGGTTGNCANGGGTTTTCTTTTCCCGAAGGA-
C--GTTATTC--GTTTACCTT---AAG-----

***In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics**

B.C. Silva^{1*}, L.R.C. Jung^{1*}, S.H.C. Sandes¹, L.B. Alvim¹, M.R.Q. Bomfim^{2,3}, J.R. Nicoli², E. Neumann² and A.C. Nunes¹

¹Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil; ³Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Núcleo de Biologia Parasitária, Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA), São Luís, MA, Brazil; * Both authors contributed equally to this work; cantini@icb.ufmg.br

Received: 10 September 2012 / Accepted: 23 December 2012

© 2013 Wageningen Academic Publishers

RESEARCH PAPER

Abstract

Lactic acid bacteria were isolated and identified in the faeces of Chinese Crested and Yorkshire terrier pups and their probiotic features were investigated *in vitro*. Thirty seven isolates were identified as *Lactobacillus* or *Enterococcus*. Out of these isolates, 31 were lactic acid bacteria (LAB) and belonged to the species *Lactobacillus reuteri* (16/37; 43.3%), *Lactobacillus animalis* (7/37; 18.9%), *Lactobacillus acidophilus* (3/37; 8.1%), *Lactobacillus sanfranciscensis* (2/37; 5.4%), *Lactobacillus murinus* (2/37; 5.4%), and *Lactobacillus paraplantarum* (1/37; 2.7%), while six other LAB isolates were *Enterococcus* spp. (6/37; 16.2%). Strains were tested for resistance to gastric acidity (pH 2.5 for 3 h) and bile salts (0.3% ox gall), cell surface hydrophobicity by microbial adhesion to solvents, antagonism against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes*), production of hydrogen peroxide, and antibiotic susceptibility. Thirty four strains were highly resistant to acidic conditions with slight (18 strains) to moderate (16 strains) growth inhibition by bile salts. Seven isolates had highly hydrophobic cellular surfaces and 28 strains exhibited strong antagonism against the bacterial pathogens tested, although 8 isolates tested against *Leptospira interrogans* had no effect on pathogen growth. All isolates produced low rates of hydrogen peroxide. Based on these results, two *Lactobacillus* strains showed promising probiotic-related features and merit investigation as probiotics for dogs.

Keywords: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, dog, probiotic characterisation, faecal microbiota

1. Introduction

Probiotics are defined as ‘Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host’ (FAO/WHO, 2001). Probiotics are believed to play an important role in the control of host intestinal microbiota and the modulation of host immune responses when ingested in sufficient numbers. Both local and systemic immune responses can be modulated via the production of cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-12, and nitric oxide (Fuller, 1997). Probiotic bacteria are used in a variety of food preparations including dairy, meat and vegetables.

Most of the probiotic preparations that are currently studied or commercialised contain lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria (McCoy and Gilliland, 2004). LAB form part of the intestinal microbiota of mammals where they ferment a variety of nutrients, yielding lactic acid as the main final product. The main LAB genera are *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera* and *Oenococcus* (Carr *et al.*, 2002). *Lactobacillus* species are the most commonly used LAB because of their potential beneficial properties as probiotics. Their well-known nutritional attributes and almost null pathogenicity mean that LAB are often used

as food supplements. However, LAB also show promise as bacterial systems for expressing heterologous proteins or as vehicles for carrying immunising antigens after genetic modification (Hanniffy *et al.*, 2004; Seegers, 2002).

The criteria for screening of LAB strains to be used as probiotics include functional characteristics such as the ability to resist environmental conditions found in the digestive tract (low gastric pH and bile salts), and the ability to antagonise or competitively exclude pathogens via the secretion of antimicrobial substances or competition for nutrients and epithelial adhesion sites. LAB produce different antimicrobial components such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon peroxide, diacetyl, low molecular weight antimicrobial substances, bacteriocins, and adhesion inhibitors (Servin, 2004). The production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus* spp. is considered an important ecological factor that facilitates their dominance of ecosystems such as the human vagina (Reid and Burton, 2002). The adhesiveness of LAB may involve passive forces, electrostatic interactions, hydrophobic steric forces, lipoteichoic acids, and lectins (Servin, 2004). The hydrophobic nature of the outermost surface of microorganisms facilitates the adhesion of bacteria to the host epithelium, thereby conferring competitive advantages during the colonisation of the gastrointestinal tract (Vinderola and Reinheimer, 2003). The antimicrobial susceptibility of intestinal microorganisms is an important criterion for the selection of probiotic strains, probably due to the possibility of lateral gene transfer to potentially pathogenic or commensal bacteria that inhabit the gastrointestinal tract (Mathur and Singh, 2005).

Probiotics are also considered useful in maintaining the gastrointestinal or vaginal health of dogs (Biourge *et al.*, 1998; Delucchi *et al.*, 2008). Dogs may also be asymptomatic reservoirs of pathogenic bacteria, such as *Salmonella* and *Leptospira* (Brod *et al.*, 2005; Fukata *et al.*, 2002). The close association between people and dogs could pose a risk from direct contact. The aim of the current study was to isolate, identify, and characterise new strains of LAB for potential use as probiotics in dogs. Putative probiotic LAB strains were of canine intestinal origin, as some authors pointed out that strains exhibit some degree of host specificity (Beasley *et al.*, 2006; Guinane *et al.*, 2011). However, others authors showed that this requirement is not necessary, because microorganisms isolated from different species are also able to temporarily colonise and exert their beneficial effects (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2011; Rinkinen *et al.*, 2003).

2. Material and methods

Lactic acid bacteria isolation

LAB strains were isolated from faecal specimens of two Chinese Crested pups and four Yorkshire Terrier pups, which were about 20 days old and suckled. This choice was made because lactobacilli, bifidobacteria and enterococci normally found in gut microbiota of suckling newborns play an important role in the colonisation of the gut. Puppies and nursing bitches were not treated with any type of medication and mothers were eating only commercial food with no pre- or probiotics supplementation. Under a laminar flow hood, samples were homogenised using a glass rod in sterile tubes containing 0.9% saline. Serial saline dilutions were plated onto De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Difco, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated for 48 h at 37 °C in an anaerobic chamber (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA) containing an atmosphere of 85% N₂, 10% H₂, and 5% CO₂. Bacterial isolates were morphologically identified by Gram-staining and biochemically tested to determine their catalase reaction. The strains were cultured by inoculating MRS broth with 1% of a fresh stationary culture and incubating under anaerobic conditions.

DNA extraction

DNA was isolated from LAB cultivated overnight in 10 ml of MRS broth at 37 °C. After washing the cells with 10 ml of deionised water, the pellet was suspended in 1 ml of 5 M LiCl and incubated for 1 h at room temperature with constant shaking. Cells were washed once more with 1 ml of deionised water and the pellet was suspended in 1 ml of TES buffer (25 mM sucrose, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) with 10 mg/ml of lysozyme, before incubating for 1 h at 37 °C. The sample was centrifuged and genomic DNA was obtained using a NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co., Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Lactic acid bacteria identification

Lactobacillus isolates were identified to the species level by 16S-23S rRNA PCR-ARDRA according to the method of Moreira *et al.* (2005), using universal primers that annealed to conserved regions of the 16S and 23S rRNA genes (Tilsala *et al.* 1997). PCR amplicons were digested using a set of 12 restriction enzymes (*Sph*I, *Nco*I, *Nhe*I, *Ssp*I, *Sfu*I, *Eco*RV, *Dra*I, *Vsp*I, *Hinc*II, *Eco*RI, *Hind*III and *Avr*II) before electrophoresis on 1.4% agarose gel followed by visualisation with UV transillumination after ethidium bromide staining. All restriction enzymes were purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Rep-PCR genomic fingerprinting was performed with (GTG)₅ repetitive sequence and used to differentiate the LAB

isolates from each other. Reactions were carried out as described by Gevers *et al.* (2001); amplification products were separated in 8% polyacrylamide gel and silver stained.

Screening for physiological characteristics

Gastric juice susceptibility

Lactobacillus stationary phase cells were suspended in either 0.9% saline solution (pH 7) or simulated gastric juice (NaCl 2 g/l, pepsin 3.2 g/l, adjusted to pH 2.5 with concentrated HCl) and incubated at 37 °C for 3 h. Solutions were discarded and the pellets were suspended in MRS broth. Bacterial viability was evaluated by inoculating MRS broth with 2% v/v of control cells in saline and artificial gastric juice-treated cells onto microplates in triplicate, before incubating them in a Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) at 37 °C for 18 h. OD_{620nm} was recorded at 30 min intervals. The percentage of growth inhibition was calculated as $(1 - \text{area}_{\text{AGJ}}/\text{area}_{\text{CT}}) \times 100$, where area_{AGJ} and area_{CT} are the areas under the growth curve for the simulated gastric juice and control, respectively. The total area under the curve was calculated by definite integration using the OriginPro 8.5 program (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The results were based on the average of three independent assays.

Susceptibility to bile salts

The sensitivity to bile salts was evaluated according to the method of Walker and Gilliland (1993) that was adapted for microtiter plates. Briefly, *Lactobacillus* strains were grown to an OD_{620nm} of 0.6 and 2% v/v was inoculated in MRS broth with or without 0.3% ox gall (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) in a microtiter plate. The OD_{620nm} was recorded at 30 min intervals while incubating at 37 °C for 18 h in a microplate reader. The percentage of growth inhibition was calculated as $(1 - \text{area}_{\text{BS}}/\text{area}_{\text{CT}}) \times 100$, where area_{BS} and area_{CT} are the areas under the growth curve for bile salt and control cells, respectively. The total area under the curve was calculated by definite integration using the OriginPro 8.5 program. Isolates were considered to be resistant if they exhibited inhibition rates of <40%, moderately resistant if the inhibition rates ranged from 40-60%, and sensitive if the inhibition rates were >60%. The results were based on the average of three independent assays.

Cell surface hydrophobicity

The microbial adhesion to solvents (MATS) method was used to evaluate the hydrophobic/hydrophilic cell surface properties of *Lactobacillus* isolates and for comparison with other probiotic bacteria (Mangoni, 2009; Pelletier *et al.* 1997). Bacterial adhesion to xylene at a high ionic strength reflects the cell surface hydrophobicity or hydrophilicity,

because electrostatic interactions are absent. *Lactobacillus* stationary phase cultures were centrifuged, washed twice, and adjusted to an OD_{600 nm} of 0.6 with 0.1M KNO₃, pH 6.2 (A₀). Next, 0.2 ml of xylene was added to 1.2 ml of cell suspension followed by 10 min pre-incubation at room temperature. The two-phase system was then mixed on a vortex for 2 min. The aqueous phase was removed after 30 min and its OD_{600nm} was measured (A₁). The percentage of MATS was calculated as $(1 - A_1/A_0) \times 100$. Percentage MATS values <33% were considered as low hydrophobicity, values ≥33% and <66% as medium hydrophobicity, whereas values ≥66% were highly hydrophobic, as suggested by Nader-Macías *et al.* (2008). The results were based on the average of three independent assays.

Antagonistic activity against bacterial pathogens

Bacterial isolates were cultured in MRS broth for 24 h at 37 °C in an anaerobic chamber. 5 µl aliquot of the culture was then spotted onto MRS agar. After incubation at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions, the cells were killed by exposure to chloroform for 20 min. Residual chloroform was allowed to evaporate and Petri dishes were overlaid with 3.5 ml of a soft agar containing brain heart infusion broth (Acumedia, Neogen Co., Lansing, MI, USA), tryptone soy broth (Difco) supplemented with 0.5% yeast extract (Acumedia), or Ellinghausen-McCulloch-Johnson-Harris broth with *Leptospira* enrichment EMJH (Difco) that had been inoculated with 0.2 ml of a 24 h culture of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 or *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. After incubating at 37 °C for 24 h under aerobic or anaerobic conditions, depending on the indicator strain, the antagonistic activity was determined based on the presence of a growth inhibition zone, using the method of Tagg as modified by Branco *et al.* (2010).

Hydrogen peroxide production

H₂O₂-producing strains were identified using an agar medium assay that was optimised to detect H₂O₂ according to the method of Rabe and Hillier (2003). Briefly, 2 µl of *Lactobacillus* stationary phase cultures were spotted onto the surface of TMB-Plus agar supplemented with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and horseradish peroxidase before incubating for 18 h at 37 °C in an anaerobic chamber. Then, plates were exposed to air for 30 min and a blue pigment was apparent if H₂O₂ was produced; the intensity ranging from dark blue (almost black) to bluish (generally with a blue border). Blue color was absent when no H₂O₂ was produced. All strains were tested twice.

Microbial susceptibility to antibiotics

An antibiogram for LAB isolates was produced using antibiotic diffusion discs (Oxoid). Bacteria were inoculated in MRS broth and incubated overnight at 37 °C. Solutions of 10⁸ viable cells (McFarland scale) were prepared from the colonies in 3.5 ml of 0.9% buffered saline. The diluted culture (100 µl) was streaked onto MRS agar and antibiotic discs were applied to the surface using an antibiotic disc dispenser. The antibiotics were tested at the following disk contents: ampicillin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), erythromycin (10 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 U), amikacin (30 µg), ciprofloxacin (1 µg), and vancomycin (30 µg). Plates were incubated at 37 °C under anaerobic conditions and examined after 24 h. The inhibition zones around the discs were measured using a digital pachymeter. The results were interpreted according to the cut-off levels proposed by Charteris *et al.* (1998).

Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and repeated at least three times. Graphs and statistical analysis of data was performed with GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) and consisted of one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test to determine significant differences ($P < 0.05$). The results are presented as the mean value, and the standard deviation and coefficient of variation for each data set was calculated.

3. Results

37 LAB isolates were obtained from the puppies' faecal samples and they were confirmed as Gram-positive, non-sporulating, catalase-negative rods with a diverse range of sizes. Species identification by 16S-23S rRNA RFLP identified six different lactobacilli species (Figure 1), in the following order of abundance: 16 *Lactobacillus reuteri* (43%), 7 *Lactobacillus animalis* (19%), 3 *Lactobacillus acidophilus* (8%), 2 *Lactobacillus sanfranciscensis* (5%), 2 *Lactobacillus murinus* (5%) and one *Lactobacillus paraplantarum* (3%) (Table 1). Six isolates were identified as *Enterococcus* spp. (16%). *L. reuteri* was the most frequently isolated species in the dog faeces.

The strains were *in vitro* screened based on the following desirable physiological criteria: artificial gastric juice and bile salt resistance, cell surface hydrophobicity, antagonistic activity against pathogens, production of H₂O₂ and antibiotic resistance pattern. Table 1 summarises the characteristics of these isolates. Thirty four strains (92%) were highly resistant to acidic pH, with little (less than 10%) or no decrease in the viable cell numbers after a 3 h incubation at pH 2.5. The other 3 isolates (8%) were found to be moderately susceptible to acidic pH. In contrast, the resistance to bile salts varied markedly between strains,

even within the same species (Table 1, Figure 2). Eighteen of the isolates (49%) exhibited little or no growth inhibition in MRS broth supplemented with 0.3% ox gall (<40% inhibition) and they were considered resistant. However, 43% were moderately susceptible to bile salts (40% ≤ inhibition ≤ 60%), whereas 8% were highly susceptible or sensitive to 0.3% ox gall (>60% inhibition).

Furthermore, our results indicated that 27% of LAB isolates had highly hydrophobic surfaces (≥66% adhesion to xylene), whereas the remaining 73% were considered as moderately hydrophobic (33% ≤ adhesion <66%) (Table 1). The results also showed a strong antagonistic activity against the seven bacterial pathogens tested (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes*) (Table 1). However, the 8 isolates of *Lactobacillus* spp. (isolates 1/b to 1/p) that were tested against *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae exhibited no zone of pathogen growth inhibition. Most of the LAB strains (92%) produced a low amount of H₂O₂ (data not shown). Three isolates produced no H₂O₂, i.e. *L. animalis* 1/b, *L. acidophilus* 2/7 and *Enterococcus* spp. A2/4.

Seven isolates that were considered to be the most promising probiotic candidates based on the screening tests, i.e. high resistance to acidic pH and bile salts, hydrophobic cell surface, strong antagonism against bacterial Gram-negative and Gram-positive pathogens, were evaluated for their resistance or sensitivity to antibiotics. The bacteria tested were strains 1/d, 1/j, 1/n, 1/p, 1/t and 1/2z of *L. reuteri* and strain 2/3 of *L. paraplantarum*. All isolates exhibited the same antimicrobial susceptibility pattern. All were resistant to vancomycin (no inhibition zone), oxacillin (zone of inhibition diameter 9 to 10 mm), ciprofloxacin (9 to 11 mm) and amikacin (10 to 12 mm), but sensitive to erythromycin (zone of inhibition diameter between 28 to 30 mm), ampicillin (28 to 32 mm), penicillin (31 to 39 mm) and ceftriaxone (33 to 36 mm).

4. Discussion

Molecular identification of LAB isolates to the genus and species level was conducted by 16S DNA sequencing or PCR-ARDRA, according to the method of Moreira *et al.* (2005). The ITS-1 amplification can establish three groups of LAB genera: *Streptococcus/Lactococcus* with one amplicon, *Enterococcus/Oenococcus* with two amplicons of different sizes and *Lactobacillus/Weissella/Pediococcus* with three amplicons of different sizes. ARDRA can distinguish 41 of the 106 valid species of *Lactobacillus* (Felis and Dellaglio, 2007), based on the presence of polymorphisms in the internal transcribed spacer between the 16S and 23S rRNA genes (ITS-1). Of the 37 LAB isolates, 33 had three amplicons and belonged to *Lactobacillus*, being typed at the species level by ARDRA, whereas four had two amplicons and belonged to *Enterococcus*, being identified at the species

Table 1. Probiotic properties of lactic acid bacterial strains isolated from dog faeces.

LAB strain ¹	Antagonism ²							Probiotic features ³		
	Bc	Ef	Sa	Lm	Ec	Se	Pa	AGJ	BS	MATS
Chinese crested pups										
<i>Lactobacillus animalis</i> 1/b	-	+	-	+	+	+	-	0	80.0	69.9
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/d	+	+	+	+	+	+	+	0.55	39.8	66.1
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> 1/e	+	+	+	+	+	+	-	1.88	48.9	49.8
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/g	+	+	+	+	+	+	+	12.9	42.1	67.0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/j	+	+	+	+	+	+	+	3.49	39.0	67.7
<i>Lactobacillus animalis</i> 1/m	+	+	+	+	-	+	+	0.52	54.1	48.0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/n	+	+	+	+	-	+	+	5.29	40.9	76.6
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/p	+	+	+	+	-	+	+	5.27	39.1	61.5
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> 1/s	+	+	+	+	+	+	+	0.96	37.8	44.6
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/t	+	-	+	+	+	+	+	1.02	30.6	64.5
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/u	+	+	+	+	+	+	+	3.12	45.4	53.0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/x	+	+	+	+	+	+	+	1.49	36.0	54.5
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/y	+	+	+	+	+	+	+	2.58	41.4	66.7
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1/z	+	+	+	+	+	+	+	0.94	33.5	69.1
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> 2/3	+	+	-	+	+	+	+	1.75	35.8	67.9
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 2/7	+	+	+	-	+	+	+	4.78	42.5	51.2
Yorkshire terrier pups										
<i>Lactobacillus acidophilus</i> A1/1	-	-	+	+	+	+	+	2.84	37.0	47.3
<i>Enterococcus</i> A1/2	-	-	+	+	+	+	+	1.19	42.9	49.1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> A1/3	-	-	+	+	+	+	+	1.09	43.8	48.6
<i>Enterococcus</i> A1/4	+	+	+	+	+	+	-	1.24	29.6	51.8
<i>Enterococcus</i> A2/3	-	+	+	+	+	+	+	0.87	41.7	44.7
<i>Enterococcus</i> A2/4	+	+	+	+	+	+	+	15.9	39.0	37.9
<i>Lactobacillus murinus</i> A2/6	-	+	+	+	+	+	+	3.90	30.4	48.8
<i>Enterococcus</i> A2/10-1	-	+	-	+	+	+	-	0	44.3	47.8
<i>Enterococcus</i> A2/10-2	-	+	+	+	+	+	-	0	38.5	48.1
<i>Lactobacillus reuteri</i> S1/1	-	+	-	+	+	+	-	0	31.9	44.0
<i>Lactobacillus reuteri</i> S1/2	-	+	+	+	+	+	-	0.59	28.7	44.7
<i>Lactobacillus murinus</i> S1/3	+	+	+	+	+	+	+	3.42	31.1	47.2
<i>Lactobacillus animalis</i> S2/1	-	+	-	+	+	+	+	2.44	66.2	46.8
<i>Lactobacillus animalis</i> S2/2	-	+	+	+	+	+	+	4.78	56.6	49.0
<i>Lactobacillus animalis</i> S2/3	-	+	+	+	+	+	+	8.07	61.9	47.7
<i>Lactobacillus animalis</i> S2/5	-	+	+	+	+	+	+	8.64	55.9	46.7
<i>Lactobacillus reuteri</i> S2/7	-	+	+	+	+	+	+	1.46	35.0	45.8
<i>Lactobacillus animalis</i> S2/8	+	+	+	+	+	+	+	0	50.3	46.8
<i>Lactobacillus reuteri</i> S2/9	+	+	+	+	+	+	+	0.23	44.2	44.7
<i>Lactobacillus reuteri</i> S2/10	+	+	+	+	+	+	+	11.0	37.2	46.2
<i>Lactobacillus reuteri</i> S2/11	-	+	+	+	+	+	+	9.78	46.8	50.6

¹ Lactobacilli isolates typed by 16S-23S rRNA ARDRA; *L. plantarum* / *L. pentosus* / *L. paraplantarum* differentiated by multiplex PCR of *recA* gene; other LABs identified by DNA sequencing of the 16S rRNA gene.

² Microbial antagonism: Bc = *Bacillus cereus*; Ef = *Enterococcus faecalis*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Lm = *Listeria monocytogenes*; Ec = *Escherichia coli*; Se = *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; Pa = *Pseudomonas aeruginosa*. + = inhibition haloes >25 mm; - = inhibition haloes <10 mm.

³ Probiotic features: AGJ = artificial gastric juice inhibition; BS = bile salts inhibition; MATS = surface hydrophobicity (adhesion to xylene).

level by DNA sequencing of 16S rRNA gene. *L. reuteri* was the most prevalent species, corroborating previous studies where 18 out of 22 lactobacilli isolated from dog

faeces were also *L. reuteri* (McCoy and Gilliland, 2004). *L. reuteri* was shown to be an abundant *Lactobacillus* species present in the intestinal microbiota of most mammals

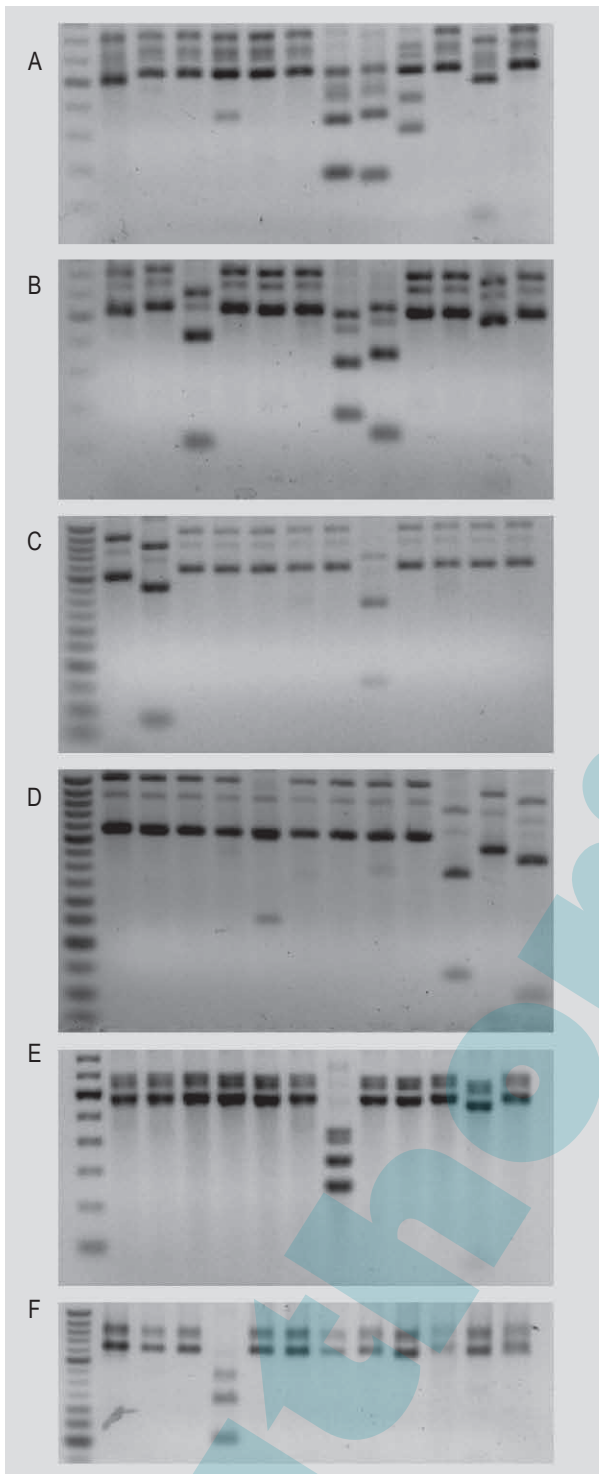


Figure 1. Restriction digestion of 16S-23S rRNA intergenic transcribed sequences (ITS-1) of (A) *Lactobacillus animalis*, (B) *Lactobacillus sanfranciscensis*, (C) *Lactobacillus acidophilus*, (D) *Lactobacillus reuteri*, (E) *Lactobacillus murinus*, (F) *Enterococcus* spp. PCR amplicons were digested with restriction enzymes *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfiI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII*, and *AvrII*, from left to right side, respectively) and separated by agarose gel electrophoresis. First lane, 100 bp ladder for sizing DNA amplicons (stronger band corresponds to the 500 bp fragment).

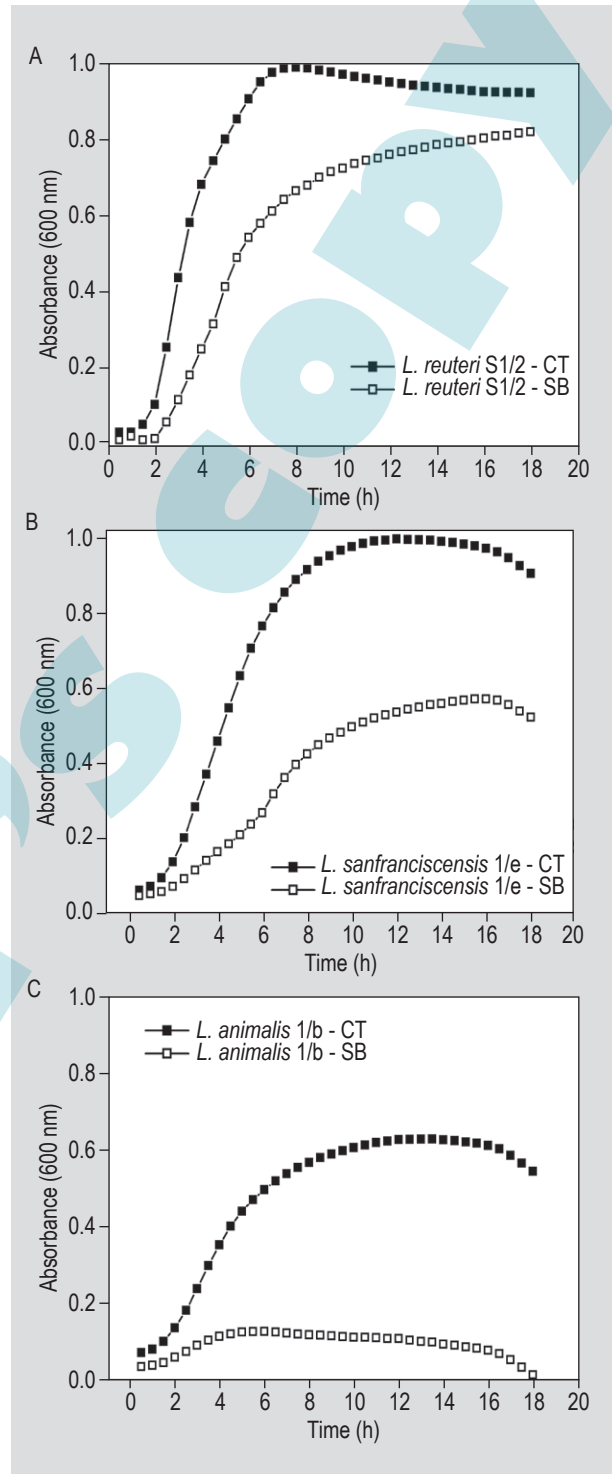


Figure 2. Growth curve of *Lactobacillus* strains in broth supplemented with or without 0.3% ox gall. Representative plots of bile-resistant isolates with (A) slight growth inhibition, (B) a tolerant strain with moderate growth inhibition and (C) a sensitive strain with strong growth inhibition.

and birds, including man. LAB have a wide range of hosts including sheep, chicken, pigs and rodents, and they are also found in foods such as meat, milk and its derivatives (Semjonovs *et al.*, 2008). Of the species identified in this work, *L. reuteri* and *L. murinus* were previously detected in dog faeces by other authors (Fujisawa and Mitsuoka, 1996; Greetham *et al.*, 2002).

Cell viability is probably the most fundamental test of the efficacy of LAB as probiotics. Bacteria that enter the gastrointestinal tract must be able to resist local stresses such as gastric pH and small intestine bile salts. Thus, the stress resistance characteristics of LAB isolated in the present study are very important for bacteria if they are to exert effective therapeutic benefits. Most bacteria survive poorly at low pH values (Jin *et al.*, 1998). The exact effects of acid stress on bacterial physiology are not fully understood. Lowering the intracellular pH reduces the transmembrane pH difference, which determines the proton motive force that is used as an energy source in numerous transmembrane transport processes. Internal acidification also reduces the activity of acid-sensitive enzymes and damages proteins and DNA (Lebeer *et al.*, 2008). Stropfová *et al.* (2006) tested the feasibility of using *L. fermentum* AD1 as a probiotic for healthy dogs and they reported a survival rate of approximately 87% after bacterial incubation at pH 3.0 for 3 h at 37 °C. The survival rate was considered adequate, although it may be lower at a more acidic pH. Most of the isolates in the current study (34/37 or 92%) showed <10% of inhibition at pH 2.5. This rate of inhibition may be considered adequate, based on the work of Stropfová *et al.* (2006). This agrees with other authors who have found that bacteria with an intestinal origin tend to be more resistant to stomach acids (Morelli, 2000).

The toxic effects of bile on bacterial cells are not well understood, but bile salts are surface-active, amphipathic molecules with a potent antimicrobial activity and they act as detergents that disrupt biological membranes (Lebeer *et al.*, 2008). The mean bile concentration in the human small intestine is 0.3% w/v, but there is little information regarding this parameter in the canine intestine (Stropfová *et al.*, 2006). The percentage of resistance to bile salts also tends to vary among LAB and even between strains of the same species (Xanthopoulos *et al.*, 1997). Stropfová *et al.* (2006) reported that the survival rate of *L. fermentum* AD1 of canine origin was approximately 75% in the presence of 1% ox gall after 24 h of incubation at 37 °C, which indicates 25% of bacterial growth inhibition. These authors also evaluated different genera of lactobacilli and enterococci that could be used as probiotics in dogs and they reported a survival rate ranging from 67 to 75% for six strains of lactobacilli in 1% ox gall after 24 h of incubation at 37 °C. Therefore, the rate of growth inhibition ranged from 25% to 33%. Five isolates were considered resistant or moderately resistant to bile salts according to this criterion in the current study.

The hydrophobicity is directly related to the ability of strains to adhere to surfaces. This ability is determined by hydrophobic components present in the outer membrane of microorganisms. It is known that hydrophobic interactions have an important role in the adhesion of bacteria to the epithelium (Mangoni, 2009). Probiotic lactobacilli isolated from cattle were previously tested for the adherence to hydrocarbons to determine their hydrophobicity by Nader-Macías *et al.* (2008). In that study, >92% of samples had relatively low hydrophobicity (0 to 33% adhesion). According to these criteria, 27% of the isolates in our study were considered as highly hydrophobic, whereas the remaining 73% were moderately hydrophobic.

Thirteen out of the 37 isolates, mainly *L. reuteri* (67%), showed antagonistic activity against the seven pathogens tested (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. enteritica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes*). Strains of *L. reuteri* produce potent antimicrobials other than bacteriocins and organic acids. For example, reuterin is produced during the anaerobic metabolism of glycerol and can inhibit bacteria from several genera including *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* (Axelsson *et al.*, 1989). The bacteriocin reuterin 6 was identified in lactobacilli isolated from the intestine, while reutericyclin was identified primarily in strains isolated from cereals. The production of two or more of these antimicrobials by a single strain has not yet been described (Ganzle, 2004). Eight *Lactobacillus* isolates were also tested to determine their antagonistic activity against *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. None produced a zone of inhibition of pathogen growth, indicating the absence of antagonistic activity. It was found that 89% of isolates exhibited antagonistic activity against *E. faecalis*, which is another LAB. This suggested that substances other than lactic acid act as antagonists.

Hydrogen peroxide is normally produced by vaginal lactobacilli isolates, but it may also be associated with intestinal lactobacilli or those living in the environment (Martín and Suarez, 2010). In this study, the vast majority of strains (92%) were characterised as low level producers of hydrogen peroxide.

The 7 LAB isolates selected after the functional analysis, 6 of *L. reuteri* and one of *L. paraplantarum*, with the more desirable characteristics of putative probiotics, shared the same resistance or susceptibility pattern to antimicrobials. This result was expected because these seven isolates came from the same source. Some resistance patterns appeared to be strain- or species-specific, but no pattern appropriate for lactobacilli classification has emerged (Salminen *et al.*, 1998). LAB that are widely used as probiotics or in starter cultures have the potential to possess antibiotic resistance genes, thereby presenting a risk of transferring such genes to many lactic acid bacteria

and other pathogenic bacteria (Mathur and Singh, 2005). Plasmid-linked antibiotic resistance is not very common among LAB, but it does occur and safety implications should be taken into consideration. Strains harbouring resistance plasmids should not be used as human or animal probiotics. Most lactobacilli have a high natural resistance to bacitracin, cefoxitin, ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim plus sulphamethoxazole and vancomycin (Danielsen and Wind, 2003). The current study found that *Lactobacillus* isolates were resistant to four of the antibiotics that were tested, i.e. vancomycin, ciprofloxacin, amikacin and oxacillin. Resistance to vancomycin and ciprofloxacin may be considered intrinsically inherited or natural resistance, because there is no risk of these resistance genes transferring to pathogenic bacteria (resistance genes located in the bacterial chromosome). We assumed that resistance to amikacin and oxacillin was also intrinsically inherited, because this antibiotic resistance trait is not cited in literature as being transmitted via a common conjugative plasmid in LAB (Mathur and Singh, 2005).

There was a possibility that the selected *L. reuteri* strains were clonally related because the six isolates came from the same animal. This was verified by rep-PCR genomic fingerprinting. The band pattern obtained was practically identical for these isolates and we considered them as the same strain, although some physiological differences were observed during the functional screening (data not shown).

In conclusion, it was considered that *L. reuteri* 1/2z and *L. paraplantarum* 2/3 have interesting physiological characteristics desirable for a potential probiotic microorganism, i.e. high resistance to acidic pH and bile salts, cell surface greatly hydrophobic, strong antagonism against selected bacterial Gram-negative and Gram-positive pathogens and resistance to antibiotics chromosomally coded and not transferable. This enables them to be used as probiotic food supplements.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and PRPq/UFMG. The authors acknowledge the team of the Laboratory of Microorganism Ecology and Physiology for helping with the bacterial isolation and probiotic characterisation assays.

References

- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2: 131-136.
- Beasley, S.H., Manninen, T.J.K. and Saris, P.E.J., 2006. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology* 101: 131-138.
- Bourge, V., Vallet, C., Levesque, A., Sergheraert, R., Chevalier, S. and Robertson, J.L., 1998. The use of probiotics in the diet of dogs. *Journal of Nutrition* 128 Suppl. 12: 2730S-2732S.
- Branco, K.M.G.R., Nardi, R.M., Moreira, J.L., Nunes, A.C., Farias, L.M., Nicoli, J.R. and Carvalho, M.A., 2010. Identification and *in vitro* production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 4: 338-344.
- Brod, C.S., Aleixo, J.A., Jouglard, S.D., Fernandes, C.P., Teixeira, J.L. and Dellagostin, O.A., 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 294-300.
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 281-370.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K., 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84: 759-768.
- Danielsen, M. and Wind, A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82: 1-11.
- Delucchi, L., Fraga, M., Perelmuter, K., Cidade, E. and Zunino, P., 2008. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of *in vitro* probiotic activity of selected isolates. *Canadian Veterinary Journal* 49: 991-994.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO), 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- Felis, G.E. and Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8: 44-61.
- Fuller, R., 1997. Introduction. In: Fuller, R., (ed.) *Probiotics 2: applications and practical aspects*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 1-9.
- Fujisawa, T. and Mitsuoka, T., 1996. Homofermentative *Lactobacillus* species predominantly isolated from canine feces. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 591-593.
- Fukata, T., Naito, E., Yoshida, N., Yamaguchi, T., Mizumura, Y. and Hirai, K., 2002. Incidence of *Salmonella* infection in healthy dogs in Gifu Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 1079-1080.

- Ganzle, M.G., 2000. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 326-332.
- Garcia-Mazcorro, J.F., Lanerie, D.J., Dowd, S.E., Paddock, C.G., Grütznert, N., Steiner, J.M., Ivanek, R. and Suchodolski, J.S., 2011. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 542-554.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205: 31-36.
- Greetham, H.L., Giffard, C., Hutson, R.A., Collins, M.D. and Gibson, G.R., 2002. Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach. *Journal of Applied Microbiology* 93: 640-646.
- Guinane, C.M., Kent, R.M., Norberg, S., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. and Ross, R.P., 2011. Host specific diversity in *Lactobacillus johnsonii* as evidenced by a major chromosomal inversion and phage resistance mechanisms. *PLoS ONE* 6: e18740.
- Hanniffy, S., Wiedermann, U., Repa A., Mercenier, A., Daniel, C., Fioramonti, J., Tlaskolova, H., Kozakova, H., Israelsen, H., Madsen, S., Vrang, A., Hols, P., Delcour, J., Bron, P., Kleerebezem, M. and Wells, J., 2004. Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Advances in Applied Microbiology* 56: 1-64.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S., 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology* 27: 183-185.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker S.C., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 728-764.
- Mangoni, J., 2009. Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Marechal Cândido Rondon, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brazil.
- Martin, R. and Suarez, J.E., 2010. Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 400-405.
- Mathur, S. and Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *International Journal of Food Microbiology* 105: 281-295.
- McCoy, S. and Gilliland, S.E., 2007. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species having potential for use as probiotic cultures for dogs. *Journal of Food Science* 72: M94-97.
- Moreira, J.L.S., Mota R.M., Horta M.F., Teixeira S.M.R., Neumann E., Nicolli J.R. and Nunes, A.C., 2005. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology* 5: 15.
- Morelli, L., 2000. *in vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1: 59-67.
- Nader-Macias, M.E.F., Otero, M.C., Espeche, M.C. and Maldonado, N.C., 2008. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1387-1395.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P. and Bellon-Fontaine, M.N., 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1725-1731.
- Rabe, L.K. and Hillier, S.L., 2003. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 3260-3264.
- Reid, G. and Burton, J., 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 4: 319-324.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A.C., 2003. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology* 97: 55-61.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W.M., Fonde'N, R., Saxelin, N., Collins, D., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Sandholm, T.M., 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93-106.
- Seegers, J.F.M.L., 2002. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology* 20: 508-515.
- Semjonovs, P., Jasko, J., Auzina, L. and Zikmanis, P., 2008. The use of exopolysaccharide producing cultures of lactic acid bacteria to improve the functional values of fermented foods. *Journal of Food Technology* 6: 101-109.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 405-440.
- Strompfová, V., Lauková, A. and Ouwehand, A.C., 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology* 100: 107-114.
- Strompfová, V., Marcináková, M., Simonová, M., Bogovic-Matijasić, B. and Lauková, A., 2006. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe* 12: 75-79.
- Tilsala-Timisjarvi, A. and Alatosava, T., 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 35: 49-56.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Walker, D.K. and Gilliland, S.E., 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76: 956-961.
- Xanthopoulos, V., Lipoulou-Tzanetaki, E. Tzanetakis, N., 1997. *in vitro* study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal. In: Lactic acid bacteria. Actes du Colloque Lactique 97, 10-12 September 1997, Caen, France. Presses Universitaires de Caen, Caen, France.

Author's copy