

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Genética

Raphael Steinberg da Silva

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE ISOLADOS DE
LACTOBACILLUS BOVINOS (L38 E L36) EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO DESAFIADO POR *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA*
SOROVAR TYPHIMURIUM**

Belo Horizonte
2012

Raphael Steinberg da Silva

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Genética.

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

Co-orientadores:
Prof. Dr. Anderson Miyoshi
Universidade Federal de Minas Gerais.

Profa. Dra. Elisabeth Neumann
Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte
2012



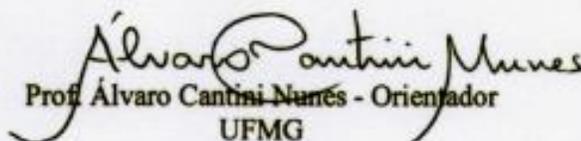
Pós-Graduação em Genética
 Departamento de Biologia Geral, ICB
 Universidade Federal de Minas Gerais
 Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

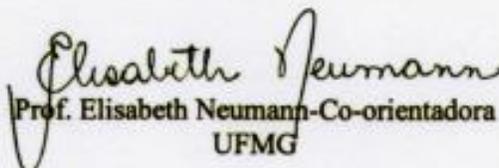


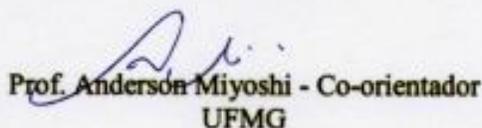
**"Avaliação da capacidade imunomodulatória de isolados de
 Lactobacillus bovinos (L38 e L36) em modelo experimental murino
 desafiado por Salmonella enterica subsp. enterica sorovar
 Typhimurium"**

Raphael Steinberg da Silva

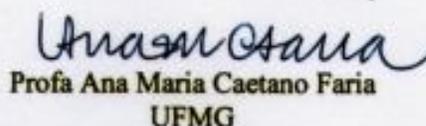
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


 Prof. Álvaro Cantini Nunes - Orientador
 UFMG


 Prof. Elisabeth Neumann - Co-orientadora
 UFMG


 Prof. Anderson Miyoshi - Co-orientador
 UFMG


 Prof.ª Adriana Abalen Martins Dias
 UFMG


 Profa. Ana Maria Caetano Faria
 UFMG

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2012.

Aos meus pais, Antônio e Lourdes, pelo apoio incondicional a todas minhas ideias e em todas as minhas escolhas.

Ao meu avô, Antônio Ferreira Evangelista (*in memoriam*), por seu legado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pai amoroso e fonte de tudo aquilo que existe. Este que foi meu eterno ajudante e fonte de vida, energia, paciência, perseverança, determinação e inspiração, todas estas, características essenciais para a execução de qualquer trabalho, principalmente o científico.

Aos meus pais, Antônio Ferreira e Maria de Lourdes, pelo seu apoio e incentivo, não só ao meu Mestrado, mas em todas as escolhas que faço em minha vida. Pela oportunidade de viver e pela convivência diária regada com largas doses de paciência para com o meu temperamento e minhas excentricidades. Por seu amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes e minha co-orientadora Profa. Dra. Elisabeth Neumann. Primeiramente, pelo convite de integrar o seu grupo de pesquisa e pela confiança depositada em minha capacidade intelectual e de trabalho. Pela amizade desenvolvida nesses dois anos e, aos ensinamentos e discussões, além do constante incentivo e abertura que, tornaram o desenvolvimento deste trabalho um ato prazeroso e de constante aprendizado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Mioyshi pelo apoio depositado em minha pessoa em momentos difíceis vividos durante o mestrado, pela ajuda na revisão deste trabalho, bem como pela viabilização do fácil acesso ao equipamento de PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli. Pela abertura do laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos ao meu trabalho e por acreditar em minha capacidade. Pela confiança depositada em minha pessoa e pela ajuda, irrestrita à execução deste trabalho, em termos de insumos e recursos financeiros. Pelo exemplo de profissional competente, comprometido com o crescimento científico de seu grupo de pesquisa e da comunidade científica brasileira. Por sua contribuição para a formação de minha identidade profissional e postura ética.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Maria Caetano Faria e Profa. Dra. Adriana A. M. Dias pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pelas valiosas contribuições.

À Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, pela colaboração nas análises histopatológicas e nos experimentos de imunofluorescência de marcação de células produtoras de IgA.

À Profa. Dra. Leda Quercia Vieira pela colaboração constante nos experimentos em animais e nas análises imunológicas.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios, Prof. Dr. Luiz Macedo Farias, Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos e Profa. Dra. Maria Auxiliadora Roque Carvalho, pela disponibilização de seus equipamentos para execução de alguns dos experimentos deste trabalho.

À Profa. Dra. Sílvia Moura Beleza, pela convivência diária e extremamente prazerosa que tornou a execução deste trabalho mais fácil. Pelas conversas diversas, cafés deliciosos, sobremesas divinas e pelo bom humor contagiante, além da amizade construída ao longo deste tempo.

À Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond e ao Prof. Dr. Luiz Simeão, pelo apoio e incentivo constante.

Às Profa. Dra. Maria Raquel dos Santos Carvalho e Dra. Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, orientadoras de minha iniciação científica. Pela sua contribuição para a construção do meu pensamento científico, pela disponibilidade e pela confiança de me acolher em uma fase tão juvenil de minha formação acadêmica.

À Marlene de Miranda e à Clélia, pelos ensinamentos técnicos e de boa administração laboratorial e pela constante amizade.

Aos meus alunos de iniciação científica, Maurício Teixeira Lima, Ana Laura e Nayara Lane, pela oportunidade de exercer minha capacidade de ensinar, por terem paciência com meu temperamento e compulsão com organização, mas acima de tudo pelo empenho e esmero na ajuda empregada na execução deste trabalho, bem como pela convivência pacífica e constante.

Às colegas do NIPE, Vânia Aparecida N. Silva, Luiza da Silva Miranda, Luciana Abreu e Silva e Dra. Christiane Teixeira Cartelle, pela divertida ajuda nos experimentos de imunofluorescência e pela doce convivência.

Aos colegas do Laboratório de Imunobiologia, Ms. C. Archimedes Barbosa de Castro Junior, Ms C. Rafael Pires de Oliveira e Dra. Ana Cristina Gomes Santos, pela ajuda nos experimentos de dosagem por ELISA, discussões científicas e por suportarem meu semi-analfabetismo imunológico, grande parte reduzido por nossas discussões.

Aos colegas do LEFM, Adriano, Bárbara, Bianca, Elisa, Quésia, Cristiane, Rafaela, Rafael, Patrick, Sílvia Crispim, Silvia Pietra, Jéssica, Karla e Fábio pela convivência diária.

Aos colegas do LGMPP, Luige, Igor, Débora, Bruno, Lenice, Márcia Helena e Cinara pela convivência e ajuda nos momentos de aperto.

Aos meus amigos eternos, Fernanda Alvarenga, Jacqueline Rodrigues, Moara Machado, Ingrid Martins, Pablo Couto, María Florência, María Cristina Guamán, Mario Abatemarco, Michelle Miranda, Cíntia, Juliana Gomes, Gabriela Silva, Livia e, em especial à Grazielle Teixeira, Izinara Rosse e André Martinez por tornarem a minha travessia, não só pelo mestrado, mas pela vida, muito mais feliz.

À Vitória Cristina Benevides, pelo incentivo em continuar meus estudos e por cultivar em mim o amor pelas Ciências Biológicas.

À Dra. Tássia Costa Souza, pela amizade construída durante estes anos. Pela ajuda incondicional, atemporal e às vezes irreal em todas as fases de execução desse trabalho. Pela paciência com minha pessoa e com meu jeito, às vezes, insuportável. Pelo exemplo de vida e de comportamento que, com toda certeza, foram importantes para este trabalho e para minha pessoa.

À Ms. C. Karine Cachoeira Rodrigues, pela ajuda nos experimentos de cultivo celular em plenos finais de semana ou durante a noite e, pelo apoio nos momentos difíceis pelos quais passei.

À Ms. C. Marcella Lobato Dias Consoli, pela amizade e ajuda nas discussões sobre PCR em tempo real, além da convivência alegre e marcante que tornaram meus dias no laboratório mais produtivos.

Às agências de fomento CAPES, financiadora de minha bolsa de Mestrado e FAPEMIG e CNPq, financiadoras dos projetos de pesquisa que forneceram recursos para execução deste trabalho.

Ao povo brasileiro, grande financiador, não só deste, mas de todos os trabalhos de pesquisa público de nosso país.

Aos animais experimentais que muito contribuíram com os achados aqui relatados sem se beneficiar com eles.

Ao Google, por responder boa parte das minhas perguntas.

A paciência é amarga, mas seu fruto é doce.
(ROUSSEAU, 2012)

Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.
(ROSA, 2012)

RESUMO

Países desenvolvidos têm imposto fortes restrições ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na pecuária bovina. Neste cenário, os probióticos se destacam como potenciais substitutos para esses tradicionais promotores de crescimento. Probióticos são “micro-organismos vivos que, quando são administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Seus mecanismos de ação são: antagonismo direto contra patógenos, aumento da eficiência de barreira intestinal e imunomodulação, tendo importantes efeitos protetores contra diferentes doenças, como a salmonelose que representa uma das principais causas de perdas econômicas na pecuária. Vários são os gêneros bacterianos com capacidade probiótica, com destaque para os lactobacilos. Como a maior parte das preparações probióticas para nutrição animal possui linhagens probióticas humanas não se sabe o efeito de bactérias potencialmente probióticas de origem bovina sobre a saúde do hospedeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de colonização e o efeito imunomodulador dos isolados L36 (*L. acidophilus*) e L38 (*L. salivarius*), obtidos de fezes de bezerros. Para avaliar a capacidade de colonização e efeito imunomodulador, foram obtidos camundongos gnotobióticos pela monoassociação dos isolados L36 ou L38 em animais *germ-free* e acompanhados os níveis populacionais nas fezes ao longo de dez dias. O efeito protetor e imunomodulador dos isolados foram também avaliados em animais convencionais tratados com L36 ou L38 e desafiados com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Foram avaliados parâmetros gerais de saúde (variação de peso, índice hepático e esplênico), produção de IgA na mucosa intestinal, aspectos da histologia geral do intestino e fígado e perfil de expressão das citocinas (IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa) ao longo do intestino, por RT-qPCR. Os isolados L36 e L38 foram capazes de colonizar a mucosa intestinal de animais isentos de germes, apresentados altos níveis populacionais nas fezes (8,87±0,38 Log UFC/g de fezes para L38 e 8,39 ±0,83 Log UFC/g de fezes para L36). Além disso, em animais gnotobióticos, L36 parece estimular a resposta, na mucosa intestinal, do tipo T_H17, pois leva a aumentos significativos ($p<0,05$) dos níveis de expressão de IL6, IL17a, Tgfb1 e Tnfa. Os isolados L36 e L38 apresentaram-se seguros, pois não causaram mudanças nos parâmetros avaliados que são indicativos de infecção local ou sistêmica. Ambos os isolados não foram capazes de estimular a produção de IgA na mucosa, tanto em animais gnotobióticos quanto convencionais, mas reduziram a produção de IgA em animais desafiados com *Salmonella*. Porém, L38 produziu um perfil de citocinas (aumento de IL5, IL10, IL12b, IL17a, Ifng e Tgfb1) no intestino indicativo de um balanço entre respostas T_H e T_{reg}. Não houve proteção conferida pelos isolados contra infecção por *Salmonella*. Entretanto, L38 em animais desafiados levou a produção elevada de IL10 ao longo de todo o intestino. Portanto, L36 e L38 se apresentaram seguros e produzem perfis imunomodulatórios diferentes na mucosa.

Palavras-chave: Probióticos, *Lactobacillus*, *Salmonella*, RT-qPCR, Imunomodulação.

ABSTRACT

Developed countries have imposed severe restrictions on the use of antibiotics as growth promoters in cattle. In this scenario, probiotics stand out as potential substitutes for these traditional growth promoters. Probiotics are "live microorganisms which when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host." Their mechanisms of action are: direct antagonism against pathogens, increased efficiency of intestinal barrier and immunomodulation. In addition, probiotics have important protective effects against various diseases, such as salmonellosis which represents a major cause of economic losses in livestock production. There are several bacterial genera with probiotic effect, especially *Lactobacillus*. As most of the probiotic preparations for animal nutrition uses human probiotic strains there are few knowlegment of the effect of potentially probiotic bacteria of bovine origin on the host health. Therefore, the objective of this study was to evaluate the ability of colonization and immunomodulatory effect of isolates L36 (*L. acidophilus*) and L38 (*L. salivarius*), obtained from feces of calves. To evaluate the ability of colonization and immunomodulatory effect, gnotobiotic mice were obtained by monoassociation of isolates L36 and L38 in germ-free animals and accompanied population levels in the faeces over ten days. The protective immunomodulatory effect of the isolates were evaluated in conventional animals treated with L36 and L38 and challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. It was evaluated general health parameters (weight variation, hepatic and splenic indexis), production of IgA in the intestinal mucosa, histological aspect of bowel and liver and cytokine profile (IL5, IL6, IL10, IL -12-p40, IL17a, Ifng, Tgfb1 and Tnfa) along the intestine portions by RT-qPCR. The isolates L36 and L38 were able to colonize the intestinal mucosa of germ-free animals, presented high population levels in feces (8.87 ± 0.38 log CFU / g of feces for L38 and 8.39 ± 0.83 log CFU / g of feces for L36). Furthermore, in gnotobiotic animals, L36 appears to stimulate a cellular response in the intestinal mucosa, type T_H17 , it leads to significant increases ($p < 0.05$) of expression levels of IL6, IL17a, Tgfb1 and Tnfa. However, L38 produced a cytokine profile (increased IL5, IL10, IL12b, IL17a, Ifng and Tgfb1) in the intestine indicative of a balance between T_H and T_{reg} type responses. The isolates L36 and L38 showed up safe due to the absence of parameters that are indicative of local or systemic infection. Both isolates were unable to stimulate the production of IgA in the mucosa, both in gnotobiotic and conventional animals but they decreased IgA production in *Salmonella*-challenged animals. There was no protection afforded by isolates against *Salmonella* infection. However, in *Salmonella*-challenged animals, L38 led to high production of IL10 along all the intestine. Therefore, L36 and L38 showed up safe and produce different immunomodulatory profiles in the mucosal.

Key-words: Probiotics, *Lactobacillus*, *Salmonella*, RT-qPCR, Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representativo do tecido linfoide associado ao intestino (GALT) de mamíferos.....	34
FIGURA 2 – Mini-isoladores ALESCO Modelo ALE.MIL.01.03 adaptados com revestimento de lã de vidro para manutenção de animais isentos de germes.....	61
FIGURA 3A – Esquema de monoassociação dos animais isentos de germes para avaliação da capacidade de adesão e imunomodulação <i>in vivo</i> dos isolados L36 e L38.....	65
FIGURA 3B – Esquema de tratamento com <i>Lactobacillus</i> e desafio com <i>Salmonella</i> dos animais convencionais	66
FIGURA 4 – Esquema da anatomia interna do camundongo.....	71
FIGURA 5 – Teste de amplificação de RNA total tratado e não-tratado com Turbo DNase I e de cDNA obtidos de RNA total tratado e não-tratado para avaliar o efeito da remoção de DNA gênomico sobre os resultados de amplificação por RT-qPCR.....	76
FIGURA 6 – Curvas de amplificação, dissociação e de diluição de cDNA de Tgfb1 amplificado em amostras de cDNA obtidas de RNA total de amostras de intestino murino.....	78
FIGURA 7 - Níveis populacionais nas fezes e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados L38 e L36 em animais gnotobióticos nas diferentes porções do intestino delgado e grosso.	83
FIGURA 8 - Produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados com L38 ou L36.....	84
FIGURA 9 – Avaliação do efeito dos tratamentos de monoassociação com L38 e L36 sobre a expressão relativa de Gapdh e Actb em animais isentos de germes.....	86
FIGURA 10 - Expressão relativa das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongos monoassociados com L38 ou L36, usando RT-qPCR.....	88

FIGURA 11 – Resumo esquemático do efeito de L36 e L38 na expressão de citocinas em animais gnotobióticos.....	93
FIGURA 12- Indicadores gerais de saúde (variação de peso corporal e índices hepático e esplênico) em animais CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	95
FIGURA 13 - Produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	96
FIGURA 14 – Fotomicrografias obtidas de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) do íleo distal, cólon e fígado de camundongos CV tratados com L36 ou L38 e desafiados com <i>Salomonella</i>	99
FIGURA 15 – Proporção da área de células produtoras de IgA (células IgA ⁺) no íleo distal de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	101
FIGURA 16 – Fotomicrografias obtidas de lâminas histológicas de íleo distal através de marcação de células produtoras de IgA (células IgA ⁺) por imunofluorescência direta usando anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado com FITC.....	102
FIGURA 17 – Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais de tratamento com L38 ou L36 e de infecção por <i>Salmonella</i> sobre a expressão relativa de Gapdh e Actb em animais convencionais.....	104
FIGURA 18 - Expressão relativa das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i> , usando RT-qPCR	106
FIGURA 19 – Resumo esquemático do efeito de L36 e L38 na expressão de citocinas em animais CV desafiados ou não com <i>Salmonella</i>	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Testes <i>in vitro</i> de propriedades probióticas dos isolados L38 e L36 de <i>Lactobacillus</i>	63
TABELA 2 – Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de intestino de camundongos CV e gnotobióticos.....	75
TABELA 3 – Resumo esquemático do perfil de expressão de citocinas (IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa) expressos no intestino delgado e grosso.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. - antes de Cristo

Actb- Beta-actina

AAD – *antibiotic-associated diarrhoea*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC- Antimicrobianos como promotores de crescimento

ATP- Adenosina-5'-trifosfato

BAL - Bactéria do ácido láctico

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

C_q- *Cycle quantification*

CS - Componente secretório

C_t - *Cycle Threshold*

CV- convencional

DFM- *Direct-fed microbials*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EtBr- Brometo de Etídeo

FAE- *follicle associated epithelium*

FAO/WHO - *Food and Agricultural Organization/ World Health Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

Gapdh- *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GALT- *gut-associated lymphoid tissue*

GF- *germ free*

GM-CSF- *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GRAS - Geralmente reconhecidas como seguras

H&E – Hematoxilina e Eosina

IBD- *inflammatory bowel disease*

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL - Interleucina

IgA+ - Células produtoras de IgA

Ig - Imunoglobulina

Inf - Interferon

LPS - Lipopolissacárideo

MALT- *mucosal-associated lymphoid tissue*

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCP- *monocyte chemoattractant protein*

MDR - *Multidrug-resistant*

MIQE- *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NRE- nível relativo de expressão

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC- *peripheral blood mononuclear cell*

PBS - Salina tampão fosfato

PCR - *Polymerase chain reaction*

PPC- placa de Peyer contínua

PPD- Placas de Peyer discretas

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

RQ - Quatificação relativa

RT-PCR- *Reverse transcription polymerase chain reaction*

RT-qPCR- *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

SP1 - Ilha de patogenicidade -1

sIgA - Imunoglobulina A secretória

qPCR- PCR quantitativa

Tgf - Fator de transformação do crescimento

TLRs - Receptores *Toll-like*

Tnf - Fator de necrose tumoral

T3SS - Sistema de secreção do tipo III

UE- União Europeia

UFC - Unidades formadoras de colônias

USDA- *United States Department of Agriculture*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Pecuária: importância no Brasil e no mundo	19
1.2 Antibióticos como promotores de crescimento	21
1.3 A Microbiota gastrointestinal de bovinos: importância, instalação, composição e função	24
1.4 O epitélio intestinal e o Tecido linfóide associado à mucosa do intestino (GALT).....	29
1.5 Probióticos	35
1.5.1 Definição e histórico	35
1.5.2 Efeitos benéficos da utilização de probióticos	38
1.5.3 Mecanismos de ação dos probióticos	39
1.5.4 Probióticos na dieta animal	41
1.6 O gênero <i>Lactobacillus</i>	42
1.7 Diarreia e <i>Salmonella</i>	46
1.8 Modelos animais experimentais	49
1.9 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo (qPCR) em tempo real.....	52
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	57
3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1 Animais	61
4.1.1 Manejo dos animais	62
4.2 Micro-organismos	62
4.2.1 Linhagens bacterianas (origem e manutenção)	62
4.3 Tratamentos e desafio dos animais	64
4.3.1 Tratamento dos animais GF	64
4.3.2 Tratamento dos animais CV	64
4.3.3 Desafio dos animais CV	65
4.4 Avaliação dos níveis populacionais e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados de <i>Lactobacillus</i> em animais gnotobióticos.....	66
4.5 Determinação do efeito dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre índice hepático e esplênico e variação de peso em animais CV desafiados com <i>Salmonella</i>	67
4.6 Determinação do efeito dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados e CV desafiados com <i>Salmonella</i>	68
4.7 Determinação do efeito de isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a área de células produtoras de IgA (células IgA ⁺) no íleo de camundongos CV desafiados com <i>Salmonella</i>	69
4.8 Determinação dos efeitos sobre aspectos histológico do fígado, íleo distal e cólon de animais CV tratados com isolados de <i>Lactobacillus</i> e desafiados com <i>Salmonella</i>	70

4.9 Extração de RNA total, tratamento para remoção de DNA gênomico e produção de cDNA a partir de tecido das porções do intestino de animais CV e gnotobióticos.....	70
4.10 Padronização da quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongo CV e gnotobióticos usando RT-qPCR	72
4.11 Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais em animais gnotobióticos e CV sobre a expressão relativa dos genes de referência Gapdh e Actb	79
4.12 Quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de animais CV e gnotobióticos usando RT-qPCR	80
4.13 Análise Estatística dos dados	80
5. RESULTADOS	82
5.1 Experimentos com animais gnotobióticos monoassociados com um isolado de lactobacilos	82
5.1.1 Níveis populacionais e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados de <i>Lactobacillus</i> em animais gnotobióticos	82
5.1.2 Efeito dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados com L38 ou L36.....	84
5.1.3 Efeito dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a expressão de citocinas em porções do intestino de camundongos monoassociados com L38 ou L36 usando RT-qPCR	85
5.2 Experimentos com animais convencionais.....	93
5.2.1 Efeitos dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre os indicadores gerais de saúde em animais CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	93
5.2.2 Efeito dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	96
5.2.3 Efeitos dos isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre aspectos histológicos do fígado, íleo distal e cólon de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com <i>Salmonella</i>	97
5.2.4 Efeito de isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a área de células produtoras de IgA (células IgA ⁺) no íleo distal de animais CV desafiados com <i>Salmonella</i>	98
5.2.5 Efeitos de isolados de <i>Lactobacillus</i> sobre a expressão de citocinas nas porções do intestino de camundongos CV desafiados com <i>Salmonella</i> , avaliados por RT-qPCR	103
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÕES	140
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pecuária: importância no Brasil e no mundo

Ruminantes e seres humanos tem compartilhado uma longa história de convivência. Caçadores pré-históricos, frequentemente nômades, perceberam que poderiam explorar o potencial fotossintético das gramíneas para domesticação dos ruminantes e, subsequentemente, incrementar sua alimentação. Essa atividade culminou com o estabelecimento de comunidades estáveis e fixas. Uma passagem do Velho Testamento da Bíblia reconhece o valor dos ruminantes para a alimentação humana, em Levítico 11:3, “Vocês poderão comer todo animal que tem casco fendido, partido em duas unhas, e que rumina” (HUNGATE, 1966).

Os sistemas pecuários ocupam cerca de 30% da superfície terrestre que é livre de gelo. Além disso, este setor está cada vez mais organizado em cadeias produtivas que empregam, aproximadamente, 1,3 bilhões de pessoas em todo o mundo. A pecuária fornece diretamente meios de subsistência para 600 milhões de pequenos agricultores nos países em desenvolvimento (THORNTON, 2010). A produção animal é, portanto, um componente chave da agricultura mundial. Na verdade, em todo o mundo, as populações humanas dependem em grande parte dos animais domésticos para um grande número de finalidades como a produção de carne, leite, gordura, ovos, fibras (lã ou *cashmere*), transporte e fornecimento de fertilizantes (SEJIAN et al., 2012).

A pecuária tem importante contribuição no fornecimento de calorias e proteína para a dieta humana. Embora os produtos de origem animal não sejam absolutamente essenciais, eles têm seu consumo indicado e desejado. Carne, leite e ovos, em quantidades adequadas, são fontes valiosas de proteínas de fácil digestibilidade e de micronutrientes essenciais (FAO, 2011). Alimentos de origem animal contribuem diretamente com cerca de 12,9% das calorias totais e 27,9% da quantidade de proteína bruta da dieta humana (FAO, 2011). Além da sua importância como fonte de aminoácidos essenciais, esses produtos são fontes de micronutrientes (ferro, zinco, vitamina A e B12 e cálcio). Mesmo em pequenas quantidades, os alimentos de origem animal podem desempenhar um papel importante na melhoria do estado nutricional das famílias de baixa renda, particularmente para crianças, gestantes e lactantes. Pequenas porções de carne na

dieta, por exemplo, fornecem quantidades adequadas de ferro na forma absorvível (BENDER, 1992) o que, contribui na prevenção da anemia. Adicionando-se uma pequena quantidade de alimentos de origem animal na dieta de crianças desnutridas pode-se aumentar sua capacidade cognitiva de forma significativa (NEUMANN et al., 2010).

O rebanho mundial bovino é estimado em 1,3 bilhões de cabeças (USDA, 2011). O Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo, perdendo apenas para a Índia. O rebanho brasileiro, em 2009, era de aproximadamente 205,3 milhões de cabeças, maior que a população nacional, estimada naquele ano em 191,5 milhões de habitantes. Minas Gerais participa com 22,5 milhões de cabeças, o que contabiliza 10,9% do rebanho nacional (IBGE, 2010).

O maior produtor de carne bovina do mundo são os Estados Unidos, com uma produção de 11,9 milhões de toneladas em 2011 (USDA, 2011). O Brasil figura como segundo maior produtor mundial, com 9,4 milhões de toneladas produzidas e, maior exportador, com 2,3 milhões de toneladas exportadas em 2011 (USDA, 2011). Os principais destinos da carne bovina brasileira foram Rússia, Hong Kong e Irã. O maior consumidor mundial de carne bovina foi os Estados Unidos, seguidos pela União Europeia e o Brasil, este último, com um consumo *per capita* em torno de 34,7 kg por habitante/ano. (IBGE, 2010).

Os Estados Unidos lideram o *ranking* dos países produtores de leite com mais de 86 bilhões de litros produzidos em 2008. O Brasil aparece como o sexto maior produtor mundial, produzindo 29,1 bilhões de litros no ano de 2009 (IBGE 2010). A região Sudeste contribuiu com a maior parte (36%) da produção nacional. Com um crescimento de 32% no período de 1999 a 2008, Minas Gerais, o maior produtor de leite do país, é responsável por 25% da produção brasileira ou mais de 7 bilhões de litros. O consumo *per capita* brasileiro, no ano de 2009, foi de 152 litros de leite por habitante (IBGE, 2010).

Além da importância econômica, a pecuária também tem uma forte relevância social no Brasil. Entre os agricultores familiares, a pecuária de leite é uma das principais atividades desenvolvidas, estando presente em 36% dos estabelecimentos classificados como de economia familiar, além de responderem por 52% do Valor Bruto da Produção total, oriundos do leite. As estatísticas mais recentes mostram que o país conta com 4,8 milhões de estabelecimentos rurais,

destes, 85% podem ser considerados de produção familiar e geram cerca de 14 milhões de empregos no meio rural (ZOCCAL et al., 2012).

1.2 Antibióticos como promotores de crescimento

O desenvolvimento da agropecuária na segunda metade do século XX foi marcado principalmente pela utilização de defensivos agrícolas e de suplementos alimentares, muitos dos quais atuam como promotores de crescimento. Nesse sentido, os antimicrobianos começaram a ser ofertados em doses subterapêuticas na alimentação animal com o objetivo de atuarem como promotores de crescimento. Em suínos o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento começou em 1940 (AARESTRUP, 2012). Em aves, a origem desta prática remonta a 1946, com a observação de que aves criadas em confinamento tinham maior eficiência alimentar quando recebiam antimicrobianos promotores de crescimento (APC). Diante disto, APC passaram a ser usados como estimulantes do crescimento, desenvolvimento e da produtividade animal (PARDI et al., 2001; EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005).

Problemas na digestão e absorção de nutrientes em animais domésticos de produção são geralmente resultados da perturbação digestiva, principalmente devido ao crescimento de micro-organismos no intestino. Bactérias Gram (-) dos gêneros *Salmonella* e *Escherichia* estão envolvidas no desenvolvimento dos principais problemas que acometem o intestino. Na tentativa de evitar a proliferação dessas bactérias e sintomas associados ao seu crescimento tais como perda de peso, desidratação e mortalidade, passou a ser uma prática corriqueira o uso de APC na pecuária (VITAMEX, 2011).

Agentes antimicrobianos são compostos que, em baixas concentrações, reduzem ou inibem o crescimento de micro-organismos (CROMWELL, 2004). Esta categoria inclui antibióticos (substâncias naturalmente produzidas por leveduras, fungos filamentosos e outros organismos), quimioterápicos (substâncias quimicamente sintetizadas), bem como altas concentrações de cobre e zinco.

Diferentes mecanismos de ação explicam a promoção de crescimento obtida quando os antibióticos são utilizados como APC. Esses mecanismos envolvem: a ativação do anabolismo proteico, o aumento da concentração de somatomedina C, a redução da desaminação e descarboxilação, levando a menores níveis de amônia no intestino (RUTZ & LIMA, 2001). Portanto, a utilização de APC resulta na redução

da carga de bactérias patogênicas e, por consequência a parede intestinal torna-se mais delgada, com menor taxa de renovação de enterócitos, fatores estes que, em conjunto, facilitam a absorção de nutrientes (HENDERICKX et al., 1981; ANADÓN & LARRANAGA, 1999). Foi observado aumento de 9% na absorção de aminoácidos livres em suínos criados com ração suplementada com doses subterapêuticas de virginamicina (DIERICK et al., 1986).

Entretanto, o mecanismo de ação mais aceito dos APC é o controle de doenças subclínicas. A exposição contínua dos animais de produção a um ambiente de elevada carga de bactérias patogênicas, bem como de estresse, ocasionam aumento na incidência de doenças. O uso de APC reduz a chance de invasão e multiplicação de micro-organismos patogênicos no trato gastrointestinal, permitindo com que os nutrientes sejam mais bem aproveitados para o desenvolvimento muscular, ao invés de serem gastos em respostas imunes contra patógenos invasores (CORNELI, 2004; ARAÚJO et. al., 2007). Isto permite que o animal expresse o máximo de seu potencial genético, devido a melhores condições de saúde e bem-estar (RUTZ & LIMA, 2001). O efeito benéfico dos antibióticos é mais acentuado em animais jovens, devido a uma proteção imunológica imatura, fato que causa elevada mortalidade em neonatos.

Após a aprovação do emprego dos primeiros antimicrobianos para uso nas dietas animais como promotores de crescimento pelo “*Food and Drug Administration*” (FDA), surgiram preocupações sobre seus efeitos na saúde humana, principalmente em decorrência da presença de resíduos dos antimicrobianos nos produtos de origem animal e da seleção de bactérias resistentes (MENTEM, 2001). Para atuarem como APC, os antibióticos são oferecidos na alimentação animal em doses baixas e por longos períodos, duas condições sabidamente promotoras de seleção de genes codificadores de resistência aos antibióticos (GOULD & MACKENZIE, 2002).

Ao mesmo tempo em que assistimos uma intensificação do uso de antimicrobianos, observamos também um aumento da resistência expressa por certas linhagens bacterianas à ação destas drogas. A resistência aos antibióticos aumenta a dificuldade de controle das doenças e severidade dos sintomas, fatores que elevam o custo de tratamento. Diante do surgimento de linhagens bacterianas multi-resistentes, um dos questionamentos importantes é se o uso de antibióticos na

nutrição animal contribui para a seleção destas linhagens, causando, desta forma, um grave problema de saúde pública (RUTZ & LIMA, 2001). Nas décadas de 70-80 ocorreram vários casos de infecção por *Salmonella spp.* causados por linhagens resistentes ao cloranfenicol, droga preferida para o tratamento da salmonelose (SPIKA et al., 1987). O cloranfenicol é um antibiótico proibido para dietas animais, mas veterinários o utilizaram de forma ilegal em bezerras leiteiras, fato este que, de acordo com o autor, facilitou a seleção de linhagens resistentes. Além disso, evidências têm sido acumuladas indicando que há uma associação entre o risco de doenças zoonóticas e utilização de antibióticos como APC em aves e bovinos (EDENS, 2003).

A primeira ação efetiva no sentido de restringir a utilização de antibióticos na pecuária ocorreu na Inglaterra no início dos anos 70 (CROMWELL, 2004). Naquela ocasião, certos antibióticos (aqueles usados em medicina humana e os capazes de induzir resistência cruzada com drogas utilizadas na mesma) foram reservados somente para prescrição veterinária. Ao longo dos últimos anos, a União Europeia (UE) tem feito grandes esforços para reduzir o uso de antibióticos. Esses esforços culminaram na Diretiva 1831/2003/EC (UE, 2012) a qual proibiu o uso de qualquer antibiótico como APC em animais de produção. A legislação norte-americana está também evoluindo no sentido de restringir o uso de antibióticos como APC. As orientações GFI#209 e GFI#213, do FDA, indicam o uso de antibióticos apenas em situações terapêuticas, mediante supervisão de um médico veterinário e, implementam a retirada da indicação de aumento de desempenho produtivo veiculada nos rótulos de antibióticos usados como APC (FDA, 2012). O Brasil, seguindo as diretrizes impostas pela UE, tem proibido a utilização de diversos tipos de antibióticos na pecuária. Alguns exemplos são a proibição de avoparcina (Of. Circular DFPA número 047/98); cloranfenicol e nitrofuranos (Instrução Normativa 09, 27/06/2003); penicilina, tetraciclinas, sulfonamidas sistêmicas (Portaria 193, 12/05/1998); olaquinox (Instrução Normativa 11, 24/11/2004); violeta genciana (Instrução Normativa 34, 13/09/2007) e carbadox (Instrução normativa 35, 14/11/2005) (MAPA, 2012).

Diante da proibição, pela UE, do uso de APC, os pecuaristas de países exportadores de produtos de origem animal (carne, leite e ovos) enfrentam um dilema: perder milhões de dólares na exportação de seus produtos para o vasto e exigente mercado europeu ou desistir das drogas proibidas e incorrer em maiores

custos de produção. Portanto, diante desta situação torna-se extremamente importante à busca de alternativas aos APC, que devem ser empregadas na tentativa de influenciar de forma gradativa a ecologia microbiana do sistema digestivo (MENTEM, 2001). Neste sentido, tem sido empregadas modificações no manejo nutricional e suplementação alimentar com óxido zinco ácidos orgânicos, probióticos, manoligossacarídeos, sulfato de cobre e enzimas (RUTZ & LIMA, 2001).

1.3A Microbiota gastrointestinal de bovinos: importância, instalação, composição e função

Louis Pasteur, no século XIX, desenvolveu a teoria microbiológica da doença. Além disso, ele foi um dos primeiros a afirmar que a saúde está diretamente relacionada com a vida dos micro-organismos não patogênicos residentes no hospedeiro (SCHOTTELIUS, 1902). De fato, em termos de números de células, os seres humanos adultos são mais procariotos que eucariotos pois, 90% das células de um adulto são bactérias (SAVAGE, 1977).

A presença dessa diversa população microbiológica indica uma relação simbiótica entre os micro-organismos e o indivíduo que os alberga. Os micro-organismos presentes no hospedeiro são responsáveis por várias funções: a resistência à colonização (inibem a multiplicação de patógenos alóctones e autóctones oportunistas); imunomodulação (permitem uma resposta imune mais rápida e adequada durante uma agressão infecciosa, além de ser peça chave no desenvolvimento do sistema imune adaptativo); contribuição nutricional (atuam no fornecimento de vitaminas e substratos energéticos como ácidos butírico, propiônico e acético) e desenvolvimento da mucosa intestinal (garantem o adequado desenvolvimento do epitélio intestinal e do GALT: *gut-associated lymphoid tissue*) bem como sua vascularização (BERG, 1996; MOREAU & GABORIAU-ROUTHIAU, 2000; NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT et al., 2006; WALL et al., 2009; STECHER & HARDT, 2011). Em troca, membros dessa microbiota encontram um nicho protegido e rico em nutrientes, no qual podem se multiplicar e atingir elevadas densidades populacionais (HOOPER et al., 2002). Portanto, qualquer perturbação dessa relação pode resultar em condições patológicas (ISOLAURI et al., 2001; GUARNER & MALAGELADA, 2003).

O termo “microbiota” foi cunhado originalmente por Savage (1977) como a população de micro-organismos presentes nas superfícies mucosas de um indivíduo. Com o advento das modernas técnicas de biologia molecular, o termo “microbioma”, o qual se refere ao conjunto de genes presentes no genoma de espécies pertencentes a uma microbiota (HOOPER & GORDON, 2001), tem sido amplamente difundido. Por exemplo, a microbiota mais abundante é a do intestino grosso de mamíferos, cujas densidades populacionais atingem valores da ordem de 10^{11} organismos / g de conteúdo intestinal (TANI et al., 1998; SIMMERING, et al., 1999). Em humanos, pelo menos 500 espécies bacterianas colonizam o intestino adulto, com aproximadamente 30 a 40 espécies compreendendo até 99% da população total, que em conjunto compõem a denominada microbiota dominante (MOORE & HOLDEMAN, 1974; HOOPER et al., 2002).

O trato gastrointestinal de ruminantes compreende um tubo que começa na boca e é composto pelo esôfago; um estômago poligástrico formado por rúmen, retículo, omaso e abomaso; intestino delgado; intestino grosso; reto e ânus. Esse tubo abriga um ecossistema complexo que associa componentes bióticos, como a microbiota residente, e componentes abióticos, como o alimento ingerido. Tradicionalmente métodos baseados em cultivo de micro-organismos têm sido empregados na identificação e enumeração de membros comensais da microbiota gastrointestinal. Essa abordagem, além de ser extremamente demorada, apresenta uma importante limitação, pois apenas cerca de 1% das bactérias do intestino podem ser cultivadas em meios de cultura sólidos (NOCKER et al., 2007), sendo, por esse motivo, considerada extremamente tendenciosa. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, pesquisadores puderam utilizar novas ferramentas para analisar a microbiota do trato gastrointestinal, através das abordagens independentes de cultivo (DAHLLOF, 2002). As abordagens moleculares clássicas envolvendo PCR, clonagem e sequenciamento de primeira geração permitem a detecção de organismos viáveis e não viáveis, sendo por isso uma ferramenta poderosa na avaliação de microbiomas residentes em animais (FARRELLY et al., 1995; SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; RADA et al., 2006).

Metodologias independentes de cultivo são baseadas na exploração de regiões variáveis do genoma, tais como o gene codificador do RNA ribossomal (rRNA) 16S. A sistemática bacteriológica tem sofrido uma revolução nos últimos anos devido ao advento deste marcador molecular (WOESE, 1987). Atualmente, a

disponibilização de plataformas de sequenciamento de segunda e terceira geração, rápidas e automatizadas, aliadas às tradicionais metodologias moleculares ganham status de “padrão ouro” na caracterização de microbiotas (LIU et al., 2007; DOWD et al., 2008^a).

O tubo digestivo de mamíferos e aves é, ao nascimento, livre de micro-organismos. A colonização do sistema digestivo é um processo complexo, que envolve sucessão microbiana, bem como interações entre os micro-organismos e o hospedeiro (SIERRA et al., 2010). Esse processo inicia-se imediatamente após o nascimento, sendo os primeiros micro-organismos a colonizar o intestino aqueles oriundos da mãe (durante o parto e amamentação) e do ambiente que circunda o bezerro (TANNOCK, 1995; MARTÍN et al., 2003; JIMÉNEZ et al., 2005; PÉREZ et al., 2007). A colonização bacteriana começa, geralmente, com bactérias anaeróbicas facultativas, tais como *E. coli* e enterococos, pois o potencial de óxido-redução positivo no intestino do bezerro propicia a instalação desse tipo de bactéria (CONWAY, 1997). O consumo de oxigênio, pelo metabolismo dos micro-organismos pioneiros, altera gradualmente a atmosfera do ambiente intestinal, tornando-o mais reduzido, o que garante condições de subsequente crescimento para anaeróbicos estritos (PENDERS et al., 2006).

Enquanto em recém-nascidos humanos as bifidobactérias são os organismos dominantes (MITSUOKA, 1992) em outros animais como camundongo, suínos e galinha, os lactobacilos são predominantes (SCHAEDLER et al., 1965; BARROW, 1992; MOUGHAN et al., 1992). Embora os lactobacilos sejam, usualmente, considerados o grupo de bactérias dominantes no intestino de bezerros, atingindo populações de 7-9 Log UFC (Unidades Formadoras de Colônia) /g de fezes na primeira semana de vida (KARNEY et al., 1986), bifidobactérias tem sido frequentemente isoladas de fezes de animais jovens, e em alguns estudos, apresentam contagens maiores que as observadas para lactobacilos, na ordem de 100X (WALLACE & NEWBOLD, 1992; RADA et al., 2006). O aumento nas contagens de anaeróbios estritos, ao longo das primeiras fases da colonização (3-7 dias) do trato intestinal de bovinos, é acompanhado por redução das contagens de *E. coli*, porém no período de 7-21 dias, as populações de anaeróbios estritos começam a cair enquanto as contagens de *E. coli* voltam a aumentar. Essas mudanças podem estar relacionadas com alterações na dieta dos bezerros, que mesmo se alimentando principalmente de leite nos primeiros meses de vida,

começam precocemente a ingesta de forragens, o que contribui de forma direta para alterar a constituição da microbiota intestinal (RADA et al., 2006).

As contagens bacterianas no rúmen são muito elevadas ($>10^{10}$ UFC/ g de conteúdo ruminal). Micro-organismos formam uma ativa comunidade no rúmen que compreende um conjunto diverso de eubactérias, arqueias, protozoários e fungos filamentosos (STEWART et al., 1997). A estrutura da comunidade microbiológica ruminal é influenciada por uma série de fatores, incluindo dieta, raça e variações diárias no metabolismo (DEHORITY & ORPIN, 1997; GUAN et al., 2008). As dietas mais comuns para bovinos, baseadas em alimentos de origem vegetal, são ricas em polissacarídeos complexos, como a celulose, e enriquecem, no rúmen, a comunidade de micro-organismos que são capazes de degradar esses componentes poliméricos (KRAUSE et al., 2003). A microbiota ruminal está envolvida nas primeiras etapas da quebra da biomassa do rúmen, bem como na fermentação e na quebra dos seus produtos. Alguns ácidos orgânicos produzidos tais como o propionato e o butirato, podem ser absorvidos diretamente através da parede do intestino bovino e servem como fonte de energia para o animal. O hidrogênio produzido é usado por arqueias presentes nesta microbiota para a produção de metano (STEWART et al., 1997).

No ecossistema ruminal as bactérias desempenham um papel fundamental no processo da fermentação no rúmen (HUNGATE, 1966). Abordagens dependentes de cultivo e técnicas moleculares mais tradicionais têm indicado que a comunidade bacteriana do rúmen de bovinos é dominada por *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, que parecem constituir os componentes dominantes da microbiota ruminal, representando 80% do total de bactérias presentes neste ecossistema (MENEZES et al., 2011). Entre as bactérias tipicamente encontradas no rúmen pode-se incluir: as degradadoras de celulose/fibras tais como, *Fibrobacter* spp. e *Ruminococcus* spp.; bactérias que facilmente metabolizam carboidratos tais como, *Prevotella* spp. e *Ruminobacter* spp.; e aquelas que fermentam e convertem diferentes ácidos graxos tais como, os membros dos gêneros *Megasphaera*, *Succinivibrio* e *Treponema* (STEWART et al., 1997; WALLACE, 2008). Protozoários que habitam o rúmen atingem números tão altos quanto 10^6 células/ grama de conteúdo ruminal, e respondem pela metade da massa de micro-organismos presentes no rúmen. Sua importância está relacionada também à degradação de

matéria orgânica, já que são responsáveis por 1/3 da digestão de celulose (RUSSELL & RYCHLIK, 2001).

A presença de fungos filamentosos no rúmen está relacionada principalmente às dietas com forrageiras de qualidade inferior, que fazem com que a população fúngica aumente sua densidade, chegando a representar, em alguns casos, 8% da biomassa ruminal. Estudos *in vitro* indicam que as bactérias ruminais, envolvidas na digestão de fibra vegetal, produzem bacteriocinas que inibem o crescimento de fungos filamentosos, o que poderia explicar o baixo número de fungos em ruminantes alimentados com dietas com forrageiras de boa qualidade nutricional (DEHORITY & TIRABASSO, 2000).

Acidose ruminal e produção de metano são importantes exemplos de interações entre o metabolismo da microbiota ruminal e a influência da dieta na *performance* produtiva (KHAFIPOUR et al., 2009; FERNANDO et al., 2010). O conhecimento da ecologia da microbiota do rúmen é essencial para o desenvolvimento de sistemas de alimentação que permitam melhora na produtividade animal e saúde, além de redução na produção de metano pelo gado. Uma preocupação importante nos últimos anos é a produção de metano, um dos grandes vilões do efeito estufa, pela pecuária bovina. Parece que a produção deste gás tem relação direta com a dieta e, portanto, com a constituição da microbiota do rúmen. Foi observado que vacas alimentadas a pasto têm redução de 11% na produção de metano (O'NEILL et al., 2011). A alimentação a pasto está correlacionada a maior abundância, no rúmen, de membros das famílias *Prevotellaceae*, *Veillonellaceae* e *Erysipelotrichaceae*. As famílias *Prevotellaceae* e *Veillonellaceae* são caracterizadas pela produção de propionato durante a fermentação, produto associado a menores índices de emissão de metano em animais (MENEZES et al., 2011).

A população bacteriana que reside no intestino de animais é diversa, frequentemente excedendo 10^{11} UFC/ g de fezes (HUNGATE, 1966; YOKOYAMA & JOHNSON, 1988). A microbiota intestinal de bovinos adultos é marcadamente dominada por anaeróbios estritos, tais como *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e principalmente *Bifidobacterium* spp.. Além desses, são gêneros pertencentes à microbiota dominante do intestino bovino: *Porphyromonas*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, *Lachnospiraceae*, *Prevotella*, *Lachnospira*, *Bacteroidales*, *Akkermansia*, e *Enterococcus* (DOWD, et al., 2008^b). Os anaeróbios facultativos, tais como as

enterobactérias (ex.: *E. coli*), são tipicamente encontrados em número 100x menor que os anaeróbios estritos, mas, muitas vezes são superestimados devido a sua facilidade de cultivo em ágar (DRASAR & BARROW, 1985).

A maioria das bactérias pertencentes à microbiota do trato gastrointestinal de bovinos é vital para a manutenção da saúde dos animais. Pequenas perturbações nessas populações são desencadeadoras de mudanças drásticas na fisiologia e bem-estar e podem afetar diretamente a produtividade animal (CANIBE et al., 2005; DUNKLEY et al., 2007). Diversos fatores podem interferir no processo de instalação da microbiota normal após o nascimento (tipo e condições de nascimento; tempo de gestação; tipo de amamentação; origem do leite ingerido; medidas de higiene excessivas e uso de antimicrobianos) ou na sua evolução em indivíduos adultos (uso de antimicrobianos; alterações na dieta e estresse), provocando atraso na sua implantação ou desordem de suas funções (NICOLI & VIEIRA, 2000; PENDERS et al., 2005; PENDERS et al., 2006; WALL et al., 2009). Esses dados reforçam a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos à utilização de antimicrobianos a serem empregados na prevenção e/ou no tratamento de infecções microbianas, em humanos e animais, como, por exemplo, o emprego dos probióticos.

1.4 O epitélio intestinal e o Tecido linfoide associado à mucosa do intestino (GALT).

A mucosa intestinal representa um ecossistema complexo que engloba as células epiteliais e do sistema imune, em franca exposição à microbiota indígena (MCCRACKEN & LORENZ, 2001). A exposição a diferentes micro-organismos patogênicos faz com que a mucosa funcione como uma barreira física e química contra esses patógenos. Essa função de barreira é principalmente atribuída às características do epitélio intestinal (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

O tecido epitelial intestinal constitui uma barreira física que protege o indivíduo contra infecção (LOUVARD et al., 1992; KEDINGER et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1999). Este epitélio, devido ao elevado trânsito de material intestinal, apresenta uma elevada taxa de renovação tissular (“turnover” celular). Basicamente, o epitélio intestinal é constituído por quatro tipos celulares epiteliais: os enterócitos, que apresentam na membrana apical microvilosidades, que em

conjunto formam a borda em escova e, representam mais de 80% das células deste tecido; as células enteroendócrinas, contendo grânulos com diferentes hormônios; as células caliciformes produtoras de muco e as células de Paneth, com grânulos apicais contendo compostos com atividade antimicrobiana. Além disso, o epitélio associado aos folículos linfoides do intestino possui um tipo celular epitelial caracterizado por apresentar microvilosidades e microdobras pequenas, espaçadas e irregulares na superfície apical, e invaginações na superfície basal, geralmente associadas às células do sistema imune. Essas células são chamadas de células multi-fenestradas ou células M (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

O epitélio intestinal protege o hospedeiro da infecção fornecendo uma eficiente barreira física. A eficiência dessa barreira é assegurada pela integridade deste epitélio. As células do epitélio intestinal são mantidas juntas por junções serreadas, junções aderentes e desmossomas. As junções serreadas, presentes no polo mais apical do complexo juncional, propiciam uma barreira de permeabilidade, já que apresentam semipermeabilidade característica (SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004). Entretanto, diferentes patógenos modulam a atividade destas junções, alterando a permeabilidade intestinal, fato que facilita a sua penetração na mucosa (FASANO & NATARO, 2004). Outros patógenos utilizam as células M como rota de passagem para os tecidos mais profundos da parede intestinal (NEUTRA et al., 2001). Além de funcionar como uma barreira física, o epitélio intestinal impede a invasão de organismos patogênicos pela produção de uma variedade de substâncias antimicrobianas, tais como muco e defensinas. Em adição, citocinas e quimiocinas (IL (interleucina) 1a, IL1b, IL6, IL8 em humanos ou Cxcl15 em camundongos, IL10, Ccl2 (“*chemokine (C-C motif) ligand 2*” ou MCP-1 “*monocyte chemoattractant protein 1*”), Csf2 (“*colony stimulating factor 2*” ou GM-CSF “*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”), Tnfa (“*tumor necrosis factor α* ”) e Tgfb1 (“*transforming growth factor β* ”)) tem papel importante no fortalecimento da barreira intestinal (MCCRACKEN & GASKINS, 1999).

O epitélio intestinal permite a colonização bacteriana, mesmo que a mucosa intestinal exiba um nível mínimo de inflamação em resposta aos componentes da microbiota indígena. O intestino diferencia a microbiota normal dos microorganismos patogênicos utilizando receptores altamente especializados de detecção de antígenos. Tais receptores distinguem padrões associados ao próprio (microbiota

indígena) daqueles relacionados às estruturas moleculares não próprias, encontradas nos patógenos, estas últimas conhecidas como motivos moleculares associados aos patógenos, PAMP (ALDRIDGE et al., 2005; JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Os receptores Toll-like (TLRs) e as proteínas NOD (“*nucleotide-binding oligomerization domain*”), são clássicos sistemas de reconhecimento de moléculas associadas aos patógenos (ECKMANN, 2005; KAWAI & AKIRA, 2005).

O tecido linfoide associado à mucosa (MALT: *mucosal-associated lymphoid tissue*) forma estruturas especializadas, que no intestino recebem o nome de tecido linfoide associado ao intestino (GALT). De uma maneira geral, o GALT é muito similar entre as diferentes espécies de mamíferos. O GALT no intestino delgado de bovinos consiste de 18 a 40 Placas de Peyer discretas (PPD) localizadas no duodeno e no jejuno e uma única placa de Peyer contínua (PPC) que se estende do íleo terminal até o ceco. A involução da PPC começa logo após o nascimento e apenas folículos isolados permanecem na região anteriormente ocupada pela PPC no animal adulto. Essa involução também ocorre em ovelhas e, tem sido proposto que essa estrutura, em ruminantes, é equivalente a “Bursa de Fabricius” das aves, local onde ocorre geração primária de células B (PARSONS et al., 1991). No intestino grosso de bovinos ocorrem folículos linfoides isolados no ceco, cólon e na ampola retal. Além disso, placas de tecido linfoide, similares aos PPD do intestino delgado, são encontradas no ceco, cólon proximal e no reto terminal (LIEBLER et al., 1988). Essas estruturas tem relação importante com o desenvolvimento de doenças intestinais em bovinos, pois são locais de dano tecidual na diarreia viral bovina e na infecção por *Cryptosporidium* sp. (RAMSEY, 1956; POHLENZ et al., 1984).

As placas de Peyer são compostas de folículos contendo células B e áreas intrafoliculares contendo células T, além de outras células, tais como células dendríticas e macrófagos. Vilosidades em forma de folha cobrem a superfície das PPD e PPC enquanto que vilosidades típicas, em forma de dedo, estão presentes no resto do intestino, sendo ambas capazes de promover absorção de partículas (PARSONS et al., 1991). No intestino delgado bovino, em meio às inúmeras vilosidades normais de absorção, cada folículo se estende em direção ao lúmen formando uma região de cúpula, chamada de “*dome villus*”, que é recoberta por um

epitélio especializado, chamado de epitélio associado ao folículo (FAE – *follicle associated epithelium*). O FAE é desprovido de células caliciformes (LANDSVERK, 1987). Na superfície de PPD ocorre presença abundante de células M espalhadas entre os enterócitos. O FAE das PPC, além de não apresentar células caliciformes não possui enterócitos, consistindo de uma população homogênea de células especializadas, arredondadas, que possuem pequenas e esparsas microvilosidades e microdobras, centralmente localizadas e dobras concêntricas localizadas na periferia. Além disso, esse epitélio apresenta profundas fendas nas junções entre células (PARSONS et al., 1991).

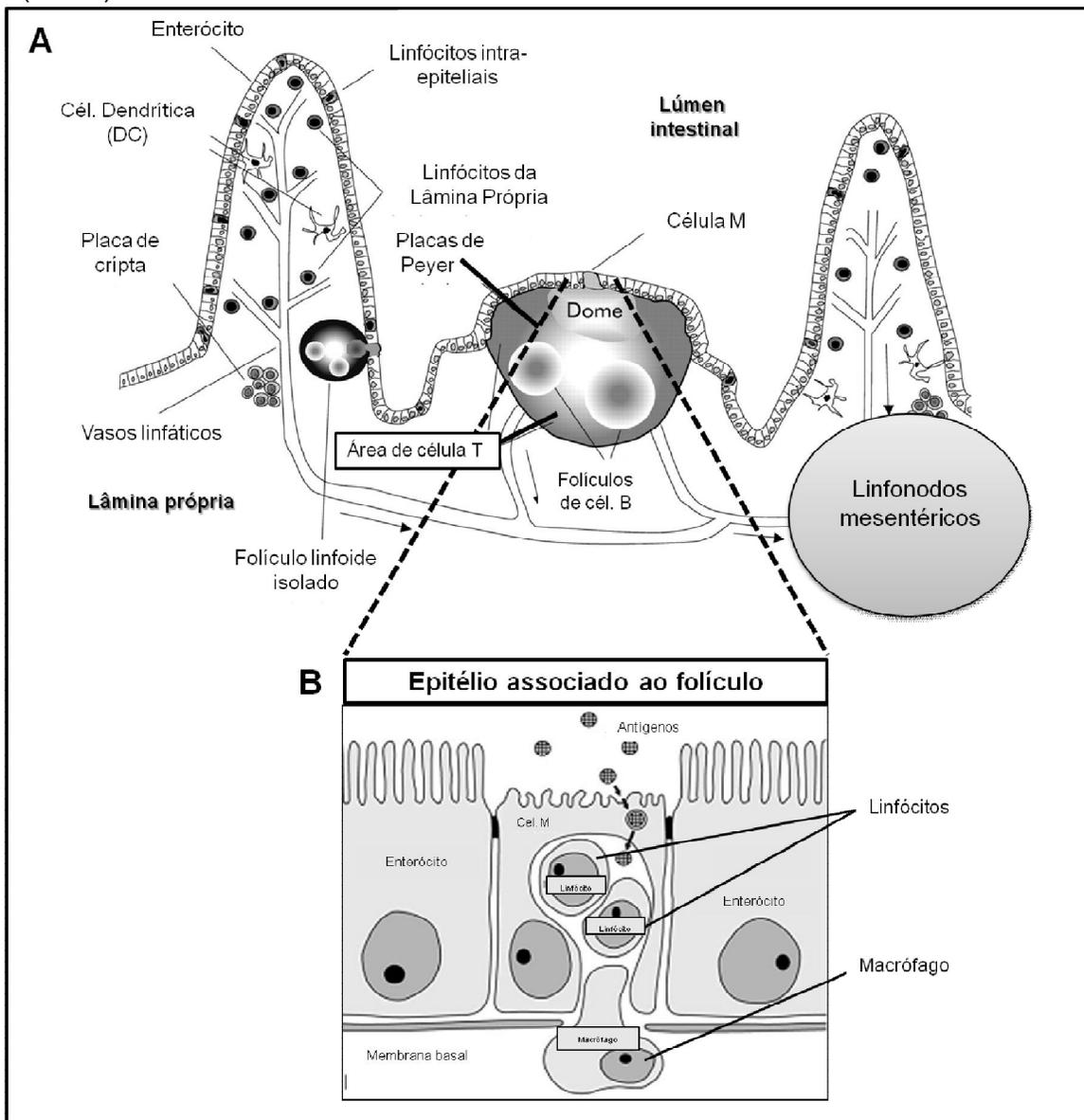
No intestino grosso (ceco e cólon proximal) de bovinos existem estruturas linfoides similares às placas de Peyer do intestino delgado. As placas de Peyer do intestino grosso apresentam duas formas morfológicas: complexos linfo-glandulares e nódulos da lâmina própria. O primeiro pode se estender para dentro da submucosa ultrapassando a muscular da mucosa, enquanto o segundo tem sua extensão restrita à lâmina própria e forma áreas de cúpula na superfície da mucosa. Estudos em animais criados em condição isenta de germes (*germ free*) indicam que o tamanho das estruturas linfoides e dos centros germinais, neles presentes, são influenciados pela presença de antígenos bacterianos (LIEBLER, et al., 1988). A variação citológica observada entre os diferentes tipos de células especializadas presentes nas diversas estruturas do FAE bovino, pode revelar variações existentes entre diferentes populações de células M, que podem estar dispersas entre enterócitos ou formar epitélios inteiros (PARSONS et al., 1991). Um resumo esquemático da estrutura geral do GALT em mamíferos está representado na FIGURA 1.

A quantidade de GALT pode ser responsável por diferenças individuais na resistência às doenças. O percentual ocupado pelo GALT na massa total do intestino bovino é de 8,6% no intestino delgado (LIEBLER, 1985) e 7,8% no intestino grosso (LIEBLER et al., 1988), demonstrando a significativa importância imunológica do intestino delgado e grosso para o hospedeiro. Quantidades reduzidas de GALT podem causar aumento na suscetibilidade às doenças e predisposição às reações alérgicas (CEBRA et al., 1980; NGAN & KIND, 1978). Entretanto, o FAE é considerado um importante canal de infecção, pois alguns patógenos, como a *Salmonella*, exploram mecanismos de captação de antígenos do hospedeiro, por

meio de células M e da reação inflamatória, como parte de sua estratégia de invasão (JEPSON & CLARK, 2001). Diante desta perspectiva, quantidades reduzidas de GALT poderiam ser associadas à redução da incidência de infecção (OWEN, 1983).

Tradicionalmente, o epitélio intestinal, junto com a microbiota e o sistema imune associado à mucosa, são descritos como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de organismos potencialmente patogênicos (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006). Atualmente, porém, vem sendo relatado que o epitélio intestinal funciona mais como uma interface entre a microbiota e o hospedeiro. A relação dos membros da microbiota e o sistema imune do hospedeiro produz um balanço de mediadores da resposta imunológica que podem estar relacionados a um estado de homeostase ou de doença. Nesse sentido, abre-se espaço para a busca de meios para melhorar o balanço entre os diversos mediadores da resposta imunológica na mucosa intestinal, como é o caso da manipulação da constituição da microbiota indígena pela ação dos probióticos.

FIGURA 1 – Esquema representativo do tecido linfoide associado ao intestino (GALT) de mamíferos.



Fonte: Criado pelo autor e adaptado de JEPSON & CLARK, 2001 e SPAHN & KUCHARZIK, 2004.

Legenda: **A** – Esquema geral da estrutura do tecido linfoide associado ao intestino (GALT) de mamíferos, mostrando o epitélio intestinal, basicamente constituído de uma camada de enterócitos, recobrendo as vilosidades em forma de dedos e o epitélio associado ao folículo, recobrendo as Placas de Peyer e os Foliculos linfoides isolados. Na submucosa, estão evidenciados os vasos linfáticos que drenam a linfa de todos os pontos da mucosa em direção aos linfonodos mesentéricos. Várias células do sistema imune estão presentes na camada submucosa, intimamente associadas ao epitélio intestinal, com destaque para as células dendríticas, macrófagos, células B e células T. As células do sistema imune estão organizadas, também, em duas estruturas linfoides típicas na mucosa intestinal, as Placas de Peyer e os Foliculos linfoides isolados.

B - Esquema representando o Epitélio associado ao folículo linfoide, que recobre as Placas de Peyer e os Foliculos linfoides isolados. Esse epitélio é composto por enterócitos, mas também é rico em células M (células multifrenestradas) que possuem perfil de microvilosidades diferentes na superfície apical e microdobras na superfície basal, nas quais estão presentes células do sistema imune como linfócitos e macrófagos residentes na submucosa. As células M representam uma das principais rotas para passagem de antígenos luminiais para dentro da mucosa intestinal.

1.5 Probióticos

1.5.1 Definição e histórico

Há mais de um século, a crença do professor Elie Metchnikoff, de que microorganismos “amigáveis”, presentes em leites fermentados, poderiam contribuir positivamente para a saúde humana, é defendida por microbiologistas (GORDON, 2008). Ele foi o primeiro pesquisador a sugerir que a utilização de bactérias poderia beneficiar a microbiota do trato gastrointestinal e, conferir longevidade aos seus usuários (METCHNIKOFF, 1908). Sua teoria foi baseada na constatação de que camponeses da Bulgária tinham uma média de vida superior à da população europeia, conferida, provavelmente, pela utilização de leites fermentados. Diante deste fato, Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina de 1908, propôs que os lactobacilos eram importantes para a saúde e passou a defender o uso de iogurtes e alimentos fermentados. Entretanto, foi somente nas três últimas décadas que o papel dessas bactérias “amigáveis” passou a ser compreendido (CROSS, 2002).

O uso de bactérias “amigáveis” na alimentação humana tem uma longa história. Os primeiros relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação datam da versão Persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que descreve que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de coalhada”. Plínio, um filósofo romano, recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de doenças intestinais, já em 76 a.C. (TEITELBAUM & WALKER, 2002). Em 1906, Henry Tissier, recomendou a administração de bifidobactérias para modular a microbiota de crianças com diarreia, afirmando que estas bactérias poderiam competir com bactérias indesejáveis, eliminando-as e tornando-se dominantes no intestino (SHORTT, 1999; NICOLI & VIEIRA, 2000).

A palavra probiótico deriva-se do grego e significa “a favor da vida”. O termo probiótico foi originalmente usado para descrever suplementos alimentares microbianos que estimulavam o crescimento de animais domésticos em fazendas (GALDEANO et al., 2007). Há mais de 20 anos atrás, a produção de substâncias que inibiam o crescimento de patógenos na superfície de meios sólidos e a habilidade de reduzir a aderência de patógenos em ensaios *in vitro* definiam os probióticos (CHAN et al., 1985). Fuller (1989) define probióticos de forma mais

abrangente como “suplemento alimentar com micro-organismos vivos que, afetam benéficamente o hospedeiro através do melhoramento do balanço da microbiota intestinal”. A FAO/WHO, em nível internacional, define probióticos como “micro-organismos vivos que, quando são administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002), sendo esta, a definição atualmente mais aceita.

Os micro-organismos mais reconhecidos como sendo probióticos são as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), as quais são encontradas em altos níveis no intestino do homem e de animais saudáveis. Essas bactérias são consideradas pelo FDA como possuidoras do status GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras). A maior parte das bactérias utilizadas em preparações probióticas é Gram (+) pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* (*Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasserii*), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Streptococcus* (*Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*) e *Lactococcus* (*Lactococcus lactis*) além, de algumas linhagens de leveduras (*Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*) (NAIDU et al., 1999). Entretanto, existem preparações probióticas comerciais incluindo bactérias Gram (-), tais como as linhagens *E. coli* EMO e *E. coli* Nissle 1917 (NISSLE, 1959; SCHULTZ et al., 2004). Culturas simples ou mistas de micro-organismos vivos são usadas em preparações probióticas, em diferentes formulações tecnológicas, incluídas na dieta humana e animal (BERG, 1998, VAUGHAN et al., 1999).

Para conseguir o status de probiótico “ideal” uma dada linhagem bacteriana deve: exercer efeitos benéficos para o hospedeiro; apresentar capacidade de induzir melhora na resposta imune do intestino (sem modificar a homeostase desse ecossistema, interagindo e enviando sinais para células do sistema imune); não ser patogênica e nem tóxica; conter um grande número de células viáveis; ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal superior (portanto, deve tolerar o pH ácido do estômago e resistir à ação dos sais biliares e das enzimas digestivas); permanecer viável no intestino (deve, portanto, colonizar a mucosa intestinal, mesmo que temporariamente); aderir ao epitélio ou muco intestinal (para anular os efeitos de expulsão causados pelo peristaltismo); apresentar atividade antagonista contra uma variedade de patógenos; permanecer viável no produto a ser consumido

durante o tempo de estocagem até o uso; exibir boas propriedades sensoriais no produto a ser consumido; ser cultivável em escala industrial e ser isolada a partir da espécie ao qual se destina (fato que garante sua adaptabilidade às condições que serão encontradas no seu destino final de atuação) (PEARCE, 1974; FULLER, 1989; FULLER, 1992; GONZALEZ et al., 1995; SAAVEDRA, 1995; GIBSON & ROBERFROID, 1995; DUNNE et al., 2001; GALDEANO et al., 2007).

A FAO/WHO tem gerado protocolos para avaliação e seleção de probióticos que incluem ensaios *in vitro* para uma série de características desejáveis bem como, demonstrações *in vivo* de seus efeitos biológicos. A avaliação da segurança de um dado probiótico deve incluir: estudo do risco de invasão (infectividade); averiguação de possíveis efeitos tóxicos, incluindo a produção de metabólitos deterioradores no ambiente intestinal, bem como providenciar dados epidemiológicos que atestam seu uso seguro (LEE & SALMINEN, 1995). Em tais protocolos, aspectos gerais, que incluem origem, identificação, segurança e resistência aos antibióticos são considerados de extrema importância para utilização de probióticos na nutrição humana e animal (FAO/WHO, 2002).

As propriedades desejáveis dos probióticos são dependentes de sua capacidade de permanecer viáveis e de colonizar o intestino. Para isso, um número suficiente de bactérias viáveis deve estar presente nos produtos no momento do consumo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, estabelece que para um produto probiótico apresentar a alegação de promoção da saúde, a quantidade mínima viável do micro-organismo probiótico deve estar situada entre 10^8 - 10^9 UFC / dose diária do produto final, conforme a indicação de consumo pelo fabricante (BRASIL, 2007). O consumo de 10^8 - 10^9 UFC/dia é necessário para garantir que as bactérias probióticas cheguem ao intestino em níveis populacionais semelhantes aos da microbiota dominante (OUWEHAND et al. 2002^a) permitindo, desta maneira, o desenvolvimento de algum efeito benéfico (GILLILAND, 1986; SELLARS, 1991). A busca por formulações farmacêuticas ou terapêuticas que garantam a viabilidade das bactérias, por longos períodos, é um dos grandes desafios atuais dos pesquisadores da área de alimentos funcionais (LEE & SALMINEN, 1995).

1.5.2 Efeitos benéficos da utilização de probióticos

O interesse em probióticos, durante os últimos anos, levou a um aumento do número de publicações reportando os efeitos benéficos de diferentes linhagens bacterianas (BRON et al., 2012). Vários são os benefícios à saúde conferidos pela administração de probióticos, dentre os quais podem-se citar: prevenção de doenças infecciosas intestinais (AXELSSON et al., 1989, BERNET-CAMARD et al., 1997; SILVA et al., 1999); prevenção e tratamento de diarreias associadas ao uso terapêutico de antibióticos (AAD – *antibiotic-associated diarrhoea*) (ELMER et al. 1996; MCFARLAND & BERNASCONI, 1993); melhora dos sintomas de diarreia associada à imunodeficiência, em pacientes portadores do vírus HIV (NEUTRA et al., 1996); tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995); papel coadjuvante no tratamento de úlceras causadas por *Helicobacter pylori* (AIBA et al., 1998); melhoraria das alergias alimentares (MAJAMAA et al., 1997; PELTO et al., 1998); redução do colesterol sérico (FUKUSHIMA & NAKANO, 1996; ROOS & KATAN, 2000); atividade anticarcinogênica (REDDY, 1999; DE MORENO DE LEBLANC & PERDIGÓN, 2004; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2006; ISHIKAWA et al., 2005); estabilização e reforço da barreira da mucosa intestinal (SALMINEN et al., 1996); propriedades imunes adjuvantes (YASUI et al., 1999; ROOS & KATAN, 2000; ISOLAURI et al., 2001; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2006; DI GIACINTO et al., 2005); alívio dos sintomas da síndrome do intestino irritável (SCHULTZ & SARTOR, 2000; HERÍAS et al., 2005); prevenção de doenças inflamatórias intestinais (IBDs) (SARTOR, 2004); melhora na digestão da lactose em indivíduos intolerantes (KOPP-HOOLIHAN, 2001) e alívio dos sintomas de constipação (GUERRA et al., 2011).

É amplamente conhecido o efeito antagonista de bactérias probióticas contra patógenos (bactérias, vírus e protozoários). Algumas linhagens probióticas são capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas como, por exemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e *Helicobacter* (SERVIN, 2004; SGOURAS et al., 2004). O potencial de prevenção de infecção, de crescimento de tumores e outras patologias, inclui os efeitos em locais distantes da mucosa intestinal, tais como os tratos respiratório (PERDIGÓN et al., 1999) e urogenital (VINTIÑI et al., 2004) e a glândula mamária (DE MORENO DE LEBLANC et al., 2006). Esses benefícios à distância demonstram que o efeito dos probióticos é sistêmico. Além

disso, bactérias probióticas causam alteração no volume e composição das fezes e no estoque de gás no intestino, levando ao aumento da produção de muco, características que, em conjunto, facilitam a manipulação do conteúdo ao longo do intestino e, por isso, modulam sintomas associados à prisão de ventre ou à diarreia (JIANG & SAVAIANO, 1997; OUWEHAND et al., 2002^b).

Entretanto, alguns efeitos adversos podem ser associados ao consumo de probióticos. Entre eles encontram-se a alteração da permeabilidade intestinal que, pode levar ao risco de aumento da translocação bacteriana (processo que envolve passagem de bactérias viáveis da microbiota do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos e outros locais fora do intestino) (BERG & GARLINGTON, 1979). Portanto, a alteração da permeabilidade intestinal que pode ser causada por probióticos, bem como a resistência intrínseca dessas bactérias “amigáveis” aos antibióticos, devem ser cuidadosamente avaliadas (BRASSART & SCHIFFRIN, 1997).

1.5.3 Mecanismos de ação dos probióticos

Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são, basicamente, os mesmos atribuídos à microbiota intestinal e podem ser divididos em três linhas de ação: atividade antimicrobiana, reforço da função da barreira intestinal e imunomodulação (PARVEZ et al., 2006; NG et al., 2009).

A atividade antimicrobiana de bactérias probióticas está relacionada com a redução do pH intestinal pela estimulação da produção de ácido lático pela microbiota residente (LANGHENDRIES et al., 1995); antagonismo direto contra patógenos através da produção de bacteriocinas e indução da secreção de defensinas por células do hospedeiro (DE VUYST & VANDAMME, 1994; GIBSON & WANG, 1994); competição pela ligação aos receptores específicos que são usados por patógenos durante sua fixação e/ou invasão da mucosa, mecanismo este denominado exclusão competitiva (FUJIWARA et al., 1997) e competição por nutrientes e por outros fatores de crescimento disponíveis (COLLINS & GIBSON, 1999). Essa atividade antimicrobiana permite aos probióticos alterar a composição da microbiota intestinal através do aumento de organismos comensais e eliminação/redução dos níveis daqueles que são patogênicos (KING et al., 1998).

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. Esse mecanismo ocorre através da preservação da arquitetura do citoesqueleto e da regulação da permeabilidade, pela fosforilação de proteínas das junções intra-celulares (NG et al., 2009). Outro mecanismo envolvido no reforço da barreira intestinal é o aumento da expressão de proteínas MUC2, MUC3 e MUC5AC em células intestinais, que levam a um aumento da produção de muco (OTTE & PODOLSKY, 2004).

Por fim, a ativação de respostas imunes é um dos mecanismos mais importantes na determinação do efeito probiótico. Tem sido demonstrado que algumas bactérias probióticas são capazes de modular a liberação de citocinas por células do GALT e aumentar o número de células produtoras de IgA (Imunoglobulina do tipo A) na lâmina própria, fato que tem sido postulado como uma importante ferramenta para melhorar as respostas desencadeadas por vacinas orais (MAASSEN et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2002; PERDIGÓN et al., 2002). Além disso, diferentes bactérias probióticas possuem efeitos benéficos mediados pela regulação do sistema imune, particularmente através da estabilização e manutenção do balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias e entre populações de células T ($T_H1/T_H2/T_H17/T_{reg}$) (ISOLAURI et al., 2001; GACKOWSKA et al., 2006; WINKLER et al., 2007). Os efeitos imunes de probióticos podem ser exercidos diretamente pelas células vivas, como a definição de probióticos preconiza, mas também por componentes estruturais da célula (peptídeoglicanos, ácidos lipoproteicos e DNA), bem como compostos secretados (LAMMERS et al., 2003; MATSUGUCHI et al., 2003; HOARAU et al., 2006).

Componentes da parede celular de bactérias Gram (+) podem levar, nas células do hospedeiro, à transdução do fator nuclear κ -B e sinais mediados por STAT através da interação de receptores de leucócitos com PAMPs (“*pathogen-associated molecular pattern*”). Essas interações de antígenos bacterianos com receptores podem gerar, nas células do sistema imune, respostas tais como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Tnfa, IL12 e interferon - I γ), como é o caso de *Lactobacillus casei* Shirota (KATO et al., 1999), ou a produção de citocinas anti-inflamatórias/regulatórias (Tgfb1 e IL10), como é característico de algumas espécies de bifidobactérias (RIGBY et al., 2002). Portanto, não é exagero afirmar que a ingestão de probióticos representa um meio seguro e não farmacológico para

combater micro-organismos patogênicos sendo que a modulação prévia do sistema imune por bactérias benéficas é o principal contribuinte para este efeito protetor (CROSS, 2002).

1.5.4 Probióticos na dieta animal

É bem conhecido, em animais, que a adição de um “pool” de micro-organismos (poliprobióticos ou *Direct-fed microbials* - DFM) vivos, incorporados através da dieta, previne doenças do trato digestivo, melhorando a digestibilidade, levando à melhor utilização de nutrientes e ocasionando maior desempenho zootécnico (FULLER, 1992). Diferentes suplementos microbianos contendo leveduras, fungos filamentosos e bactérias são usados na manipulação da fermentação ruminal e no ecossistema microbiano do trato gastrointestinal de animais (WALLACE & MEWBOLD, 1993; BLACKMAN, 2000; CONWAY & WANG, 2000).

Em frangos, foi demonstrado que probióticos promovem alguma digestão de fibras e que alguns *Lactobacillus* secretam amilase, protease e lipase no intestino, melhorando a eficiência digestiva (JIN et al. 1997; LEEDLE, 2000). A incorporação do probiótico *Bacillus subtilis* em granjas de frango produziu um aumento na musculatura e uma diminuição da quantidade de gordura, além de uma redução na porcentagem de isolamento de *Salmonella* de 60 para 20%. Em outro ensaio, foi obtida uma diminuição significativa no número de coliformes fecais, em frangos de corte, utilizando o probiótico *B. natto* (FERREIRA & KUSSAKAWA, 1999).

Em suínos, Huaynate et al., (2006) observaram que a administração da preparação comercial Bacsol-vt® (*Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *E. faecalis*, *S. termophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*) levou à redução da incidência de diarreia e melhor adaptação ao sistema de confinamento, observado pelo maior consumo de ração. A empresa Christian Hansen S/A que comercializa o produto BioPlus 2B® (*Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*) afirma que esta preparação, em mais de 40 estudos, melhora significativamente a produção de suínos. Quando administrado aos leitões, BioPlus 2B® melhora a conversão alimentar e aumenta o ganho de peso em 10% (CHR. HANSEN S/A, 2012).

Na dieta de ruminantes usa-se com frequência a levedura *S. cerevisiae*. Ela estimula a atividade dos micro-organismos benéficos do trato gastrointestinal aumentando, deste modo, a digestibilidade de nutrientes e o potencial de produção dos animais. Nesses animais, ainda são efeitos benéficos associados ao uso desse probiótico o aumento da digestibilidade das fibras; a redução dos níveis de amônia ruminal; a maior ingestão de matéria seca; a estabilidade nos processos digestivos; a antecipação da ruminação em bezerros e a redução de diarreias em neonatos. (WALLACE, 1994; NEWBOLD et al., 1995; SINGH et al., 1995; WOHLT et al., 1998). As bactérias metabolizadoras de celulose do rúmen parecem ser especialmente sensíveis ao teor de oxigênio dissolvido e respondem favoravelmente à presença da levedura que, devido ao seu elevado metabolismo, produz drástica redução do oxigênio dissolvido neste ambiente (NEWBOLD et al., 1995).

1.6 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico (BAL), que é caracterizado por micro-organismos Gram (+), não esporulados, majoritariamente catalase-negativos, desprovidos de citocromos, aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos. Porém, a principal característica do grupo é a capacidade de produzir ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (HOLZAPFEL et al., 2001, AXELSSON, 2004). Os *Lactobacillus*, descritos por Beijerinck em 1901, são bactérias Gram (+), não formadoras de esporos, com morfologia bacilar ou cocobacilar, fermentadoras, microaerófilas e quimio-organotróficas, que requerem meios ricos para seu crescimento. Além disso, são catalase-negativas, entretanto atividade de pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens. De forma geral, o genoma dos lactobacilos tem conteúdo GC menor que 54 mols% (FELIS & DELLAGLIO, 2007).

De acordo com o *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* (GARRITY et al., 2004), o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacilales*, família *Lactobacillaceae*, que engloba também os gêneros *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. Até o momento da redação desta dissertação, o gênero apresentava 182 espécies e 27 subespécies descritas (EUZÉBY, 2012).

A divisão clássica do gênero está baseada em suas características metabólicas, na qual o tipo de fermentação pode ser classificado em: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório (AXELSSON, 2004). Vários lactobacilos homofermentativos obrigatórios e heterofermentativos facultativos e, alguns obrigatórios, são utilizados em alimentos fermentados. Entretanto, esse último grupo é rotineiramente associado à deterioração alimentar. Os lactobacilos homofermentativos obrigatórios incluem aqueles que fermentam glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato. Os heterofermentativos obrigatórios englobam os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás, a partir da glicose, é uma característica marcante desses micro-organismos. Os heterofermentativos facultativos incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido-láctico e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses micro-organismos também fermentam pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético. (VÁSQUEZ et al., 2005)

Os *Lactobacillus* são micro-organismos ubíquos, sendo encontrados em uma variedade de ambientes nos quais existem carboidratos disponíveis para seu metabolismo. Entre os ambientes nos quais os *Lactobacillus* são abundantes podem-se citar: alimentos (produtos lácteos, carne fermentada, massas, vegetais, frutas e bebidas) trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário, esgotos, entre outros (FELIS & DELLAGLIO, 2007).

No intestino, os *Lactobacillus* contribuem com todas as funções benéficas da microbiota indígena para o hospedeiro (descritas no item 1.3). Além disso, a redução da população de *Lactobacillus* na microbiota intestinal está associada ao envelhecimento e à disbiose, sendo esta redução fator para desenvolvimento de IBDs (WOODMANSEY, 2007). Portanto, os *Lactobacillus* estão intimamente associados à promoção da saúde e do bem-estar do hospedeiro.

O interesse científico pela presença dos *Lactobacillus* na dieta humana começou a ser desvendado no início do século XX, quando Elie Metchnikoff associou o uso desses micro-organismos com bacterio-profilaxia e bacterio-terapia (STILES et al., 1997). Em 1930, Minoru Shirota, que aceitava a importância da modulação da microbiota intestinal para uma boa prática médica preventiva, isolou, no Japão, uma linhagem de *Lactobacillus* capaz de sobreviver à passagem pelo

trato gastrointestinal superior e de colonizar o intestino. Esta linhagem, denominada *Lactobacillus casei* linhagem Shirota, foi usada para produção do leite fermentado Yakult®, que é comercializado em todo o mundo (MATSUZAKI, 1998).

A frequência de ocorrência de bactérias do ácido lático e, portanto, de *Lactobacillus*, como bactérias oportunistas é extremamente rara. Além disso, não foram descritas associações dessas bactérias com fatores de virulência conhecidos (LEE & SALMINEN, 1995). A *International Union of Microbiological Societies* concluiu que não existem dados substanciais que relacionam *Lactobacillus* como organismos que representam risco a saúde do hospedeiro (LEE & SALMINEN, 1995). Esses dados, somados ao uso corriqueiro desses micro-organismos na alimentação humana, levaram os *Lactobacillus* a adquirirem o status GRAS. Diante disso, e da constatação de efeitos benéficos advindos do uso de *Lactobacillus* na dieta, vários estudos apontam bactérias desse gênero como possuidoras de propriedades probióticas.

Várias linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram isoladas e, tem tido seu potencial probiótico intensamente caracterizado, sendo publicados vários efeitos benéficos advindos da sua utilização. Por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* LC1 (ATCC 53103) possui capacidade de aumentar a imunidade natural; *L. rhamnosus* GG está associado à prevenção de diarreia após tratamento com antibióticos, tratamento de diarreia relacionada com a infecção por *Clostridium difficile*, redução dos sintomas da doença de Crohn e possui atividade de adjuvante imune; *L. casei* Shirota tem efeitos descritos na prevenção de distúrbios intestinais além de efeitos anticarcinogênicos (LEE & SALMINEN, 1995). Os *Lactobacillus* apresentam antagonismo contra uma variedade de patógenos, tais como *Salmonella enterica* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157 (CROSS, 2002). Atividade pró-inflamatória tem sido correlacionada à administração de diferentes linhagens, como por exemplo, *L. casei* Shirota, *L. gasseri* e *L. johnsonii*. Entretanto, efeitos anti-inflamatórios (como redução da produção de IL12, IL6 e Tnfa) têm sido observados na associação de *L. reuteri* com células dendríticas *in vitro* (NG et al., 2009). Além disso, os efeitos benéficos associados ao uso de probióticos (item 1.4) em sua maioria, também estão associados ao uso de *Lactobacillus*.

Os *Lactobacillus* têm sido usados como suplementos alimentares na pecuária. Entretanto, a maior parte dos suplementos usados na nutrição animal são preparações probióticas mistas constituídas de diferentes linhagens de leveduras e

bactérias. No Brasil, são comercializadas várias preparações probióticas (Yea-Sacc®; Beef-Sacc®; Biosaf®; Procreatin®; Levucell LC®; Proenzime®; Bioplus 2B®; Biocampo Probiotic® e Milk –Sacc®) porém, nenhuma delas é composta apenas por bactérias do gênero *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, por exemplo, faz parte da composição das preparações Biocampo Probiotic® e Proenzime®). Assim como as preparações comerciais, os estudos do efeito da administração de *Lactobacillus* na pecuária bovina envolvem administração de preparações contendo várias linhagens bacterianas e algumas vezes de prebióticos. Mesmo que tais preparações permitam melhoraria na qualidade de vida dos animais e aumento da produção, o uso de suplementos de constituição complexa (com diferentes linhagens de microorganismos, prebióticos e simbióticos) dificulta a identificação dos efeitos benéficos isolados associados à administração das linhagens específicas de *Lactobacillus*.

No entanto, alguns estudos administrando exclusivamente linhagens de *Lactobacillus* fornecem alguns esclarecimentos sobre seus efeitos em bovinos. Um suplemento alimentar composto de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *L. jugarti*, administrado em bezerros criados a pasto, levou a um aumento de 21% no ganho de peso mesmo com redução de 14% na ingestão de alimentos, o que caracteriza uma melhora no índice de conversão alimentar e na digestibilidade de matéria seca. Além disso, fatores de saúde e bem-estar animal foram melhorados devido à administração dos *Lactobacillus* (KHUNTIA & CHAUDHARY, 2002). Neste mesmo estudo, o índice e a severidade de eventos de diarreia foram reduzidos nos animais que receberam a preparação mista de *Lactobacillus*, levando à melhoria na produtividade animal. Esses mesmos achados foram também encontrados em bezerros que receberam suplementação de *L. acidophilus* (ABE et al., 1995). Entretanto, a origem das bactérias administradas nesses estudos não foi descritas nas publicações. Outro ensaio observou redução na eliminação da linhagem enteropatogênica *E. coli* O157:H7 em bovinos confinados que receberam suplementação, na água, com *L. acidophilus* NP51 (PETERSON et al., 2007), um dos componentes da preparação comercial Bovamine® que contém também *Propionibacterium freudenreichii* NP24. Bovamine®, comercializado em países de primeiro mundo, garante efeitos benéficos na conversão alimentar e aumento da *performance* produtiva de bovinos (NPC, 2012).

1.7 Diarreia e *Salmonella*

Na medicina humana, diarreia caracteriza-se por um aumento no número das dejeções, assim como o aumento de volume (>10mL/kg/dia) e diminuição da consistência das fezes (CARVALHO et al., 2010). Esse quadro é causado por diversos fatores sendo os principais, infecção por ação de bactérias (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* 01 e 0139, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* e principalmente *Salmonella*), vírus (*Astrovírus*, *Calicivírus*, *Virus Norwalk*, *Adenovírus entérico*, *Citomegalovírus* e principalmente *Rotavírus*) e protozoários (*Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis* e principalmente *Giardia lamblia*).

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias pertencentes à classe γ -Proteobacteria, família *Enterobacteriaceae*. São bacilos anaeróbios facultativos, Gram (-), fermentadores de glicose, redutores de nitrato a nitrito e possuem flagelos peritríquios (com exceção de *S. Pullorum*) (BERGEY' MANUAL, 2005). *Salmonella* foi originalmente isolada em 1885, por Daniel Salmon, um veterinário norte-americano e atualmente são conhecidos mais de 2500 sorovares diferentes desse gênero (LAYTON & GALYOV, 2007; WHO, 2012).

Salmonella enterica, uma das principais bactérias causadoras de quadros de diarreia, é capaz de infectar uma variedade de hospedeiros como resultado do consumo de alimentos e água contaminados ou através do contato direto com outros animais e ambientes infectados (MASTROENI & GRANT, 2011). Existem duas principais manifestações clínicas associadas com a infecção por *S. enterica*: a febre tifoide (doença sistêmica) e a salmonelose não-tifoide (uma doença gastrointestinal conhecida como enterite aguda) (LAYTON & GALYOV, 2007). *S. enterica* sorovar Typhi e Paratyphi são sorovares que apresentam infectividade restrita aos primatas e causam a febre tifoide. Os sintomas associados a essa patologia são febre progressiva, dor abdominal, diarreia não-sanguinolenta e sudorese. *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis causam, em humanos, gastroenterites não-tifoides. Porém, a infectividade destes sorovares não é restrita aos primatas, sendo capazes de

colonizar diferentes hospedeiros. A gastroenterite em humanos apresenta como sintomas dores abdominais, vômitos e diarreia inflamatória (MASTROENI & GRANT, 2011). No ano 2000, foi estimado um número de 21,7 milhões de casos de febre tifoide com 217.000 mortos em todo o mundo (CRUMP et al., 2004). Por isso, infecções causadas por *Salmonella* são consideradas um grave problema de saúde pública, principalmente em regiões onde o acesso ao saneamento básico é precário (JIMÉNEZ & CASTRO, 2003; SALEZ & MALO, 2004).

S. enterica infecta o hospedeiro usualmente através da rota oral. No intestino delgado, *Salmonella* invade principalmente as células M, coloniza placas de Peyer e ganha acesso ao GALT. Outras rotas de invasão são usadas pela *Salmonella*, através da invasão de enterócitos e células dendríticas. Atingindo o tecido linfóide associado, *Salmonella* invade principalmente os fagócitos residentes, nos quais a bactéria sobrevive e se replica. Essas células alvo acabam servindo também como veículos, através dos quais a *Salmonella* se espalha pelo corpo (RAUPACH & KAUFMANN, 2001). Além de ser um problema de saúde pública, *S. enterica* pode causar doenças fatais em animais domésticos, gerando perdas econômicas. Somado a isso, a bactéria pode ainda persistir em alimentos de origem animal, causando sérios problemas ao homem devido à presença de toxinas alimentares (MASTROENI & GRANT, 2011).

Embora bovinos possam ser infectados por diferentes sorovares, a salmonelose nesses animais é causada principalmente por *S. enterica* Typhimurium e Dublin (HUGHES et al., 1971; SOJKA & WRAY, 1975). Nesses ruminantes, uma das principais doenças causadas por *Salmonella* é a síndrome da diarreia neonatal, que tem sido apontada como a mais importante enfermidade de bezerros (BRUNING-FANN & KANEENE, 1992; VIRTALA et al., 1996; BARRINGTON et al., 2002). Os efeitos prejudiciais da diarreia infecciosa, em bovinos, incluem a redução da produção de leite e do desempenho reprodutivo, retardo do crescimento, aumento da ocorrência de outras doenças, redução da produtividade e aumento da mortalidade entre os animais jovens. Já em 1990, o custo global do tratamento de doenças entéricas, que atingiam bovinos, era estimado em aproximadamente US\$ 33,46 bezerro/ ano (KANEENE & HURD, 1990). Estima-se um prejuízo entre 20% e 52% na pecuária leiteira devido à diarreia em todo o mundo (BACHMANN, 1977; MORTEO et al., 1990). Estimativas mais recentes apontam uma perda entre 10-40 milhões de dólares / milhão de partos decorrentes dos prejuízos atribuídos à diarreia

infeciosa (HOUE, 2003). Os problemas gerados pela salmonelose acarretam aumento dos custos de produção, graças ao tratamento de animais doentes e também às mudanças na alimentação devido à redução na taxa de conversão alimentar causada pela patologia (RUSHTON, 2009).

O tratamento da salmonelose, classicamente, envolve a utilização de antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas. Porém, o uso terapêutico e como promotor de crescimento de fluoroquinolonas em animais de produção, acarretou aumento do número de infecções em seres humanos. Além disso, constatou-se que a resistência ao tratamento com esta droga começou a se tornar frequente. O posterior aparecimento de linhagens de *Salmonella* multi-resistentes, MDR (*multidrug-resistant*) agravou a situação, devido à limitação de tratamento contra as infecções em seres humanos (WHO, 2012).

Diante deste cenário, o uso de probióticos tem sido apontado como uma possível bacterio-profilaxia contra a infecção por *Salmonella*, devido ao efeito protetor conferido por algumas linhagens probióticas frente ao desafio, em camundongos, com *Salmonella* (CROSS, 2002). Uma vasta quantidade de estudos utilizando modelos animais aponta que probióticos como *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *E. coli* EMO, *B. longum*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *E. faecium* e *L. bulgaricus* conferem efeito protetor aos camundongos desafiados (RODRIGUES et al., 1996; SILVA et al., 1999; FILHO-LIMA et al., 2000; MAIA et al., 2001; SILVA et al., 2004; MARTINS et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2011).

A proteção conferida pelos probióticos, no modelo experimental de salmonelose murina é provavelmente atribuída à combinação de dois mecanismos: a produção de substâncias antibacterianas contra *Salmonella* e o aumento da resposta imune do hospedeiro contra a infecção, observada pelo incremento da produção de anticorpos IgA específicos contra o patógeno na mucosa intestinal, bem como aumento da atividade de células do sistema imune (PERDIGÓN et al., 1990^a; BERNET-CAMARD et al., 1997). A utilização da mistura *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei* causou efetiva redução na translocação do patógeno para o fígado e o baço, o que levou à sobrevivência de todos os animais desafiados (PERDIGÓN et al., 1990^b). Resultados similares foram encontrados por Gill et al., (2001), com efeito protetor conferido pelo pré-tratamento com *L. rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium lactis* HN019 contra o desafio oral de camundongos por *Salmonella*.

1.8 Modelos animais experimentais

A utilização de animais em pesquisa surgiu principalmente por questões econômicas. Mesmo com o refinamento dos métodos alternativos (estudos *in vitro*, cultura de células, etc.), os modelos animais ainda apresentam, como principal vantagem, a capacidade de fornecer informações sobre o organismo como um todo (SNITKOFF, 2004). Vários animais têm sido utilizados em pesquisa científica, mas o camundongo, é o mais intensamente explorado e conhecido e, se transformou, no século XIX, em uma importante ferramenta de laboratório (CHORILLI et al., 2007). Sua introdução como animal de laboratório esta relacionada ao fato de ser pequeno, prolífero, ter curto período de gestação e ser de fácil domesticação e manutenção (SANTOS, 2002).

Em 1892, Loeffler descreveu o agente causador de uma doença em camundongos que produzia lesões muito semelhantes àquelas observadas em vítimas da febre tifoide humana. Esse agente causador foi descrito, originalmente, como *Bacillus typhi*, mas atualmente é conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (LOEFFLER, 1892). O sorovar Typhimurium (que em humanos causa enterite) é patógeno natural dos roedores e as interações dessa bactéria com seu hospedeiro natural são consideradas o melhor modelo experimental para estudo da febre tifoide humana (EDWARDS & BRUNER, 1943; O'BRIEN, 1982).

O modelo animal de febre tifoide é caracterizado pelo desafio oral de camundongos com *S. Typhimurium*. Após o desafio, ocorre aumento da temperatura corporal dos animais e enrugamento da pele, entre 4-8 dias após a administração de *S. Typhimurium*, entretanto a diarreia não se desenvolve. Ao nível intestinal, enterite difusa está presente, caracterizada por infiltrados inflamatórios de leucócitos mononucleares bem como, edema e destruição da arquitetura das vilosidades e descamação do epitélio. Essas lesões são mais pronunciadas na região terminal do íleo (SHIRAI et al., 1979).

No íleo distal e no ceco, *S. Typhimurium* invade células epiteliais, células M e células dendríticas usando o sistema de secreção do tipo III (T3SS) codificado por genes pertencentes à ilha de patogenicidade I de *Salmonella* (SP1-1), considerada um dos seus principais fatores de virulência (HARAGGA et al., 2008). O mecanismo de entrada nas células do hospedeiro é caracterizado por rearranjo do citoesqueleto, que permite a migração bacteriana da superfície apical em direção à basal. O

processo de invasão leva a produção de IL1b e IL18, bem como das quimiocinas Cxcl1 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*”), Cxcl3 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 3*”), Cxcl15 e Cxcl5 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 5*”), que recrutam fagócitos e iniciam a inflamação da mucosa intestinal (RAUPACH et al., 2006). Uma vez que tenha atingido a submucosa, células dendríticas sub-epiteliais nas placas de Peyer e macrófagos residentes no GALT tornam-se alvos de *S. Typhimurium* (HOPKINS et al., 2000). Algumas bactérias são capturadas e mortas por macrófagos residentes, porém, uma fração delas escapa da morte pelos fagócitos através da indução de apoptose mediada por caspase-1 que é induzida pelo sistema T3SS (HERSH et al., 1999). Após a invasão do intestino, *Salmonella* espalha-se a partir do trato gastrointestinal pela corrente sanguínea para todo o corpo (MASTROENI & GRANT, 2011).

Camundongos desafiados desenvolvem uma doença sistêmica, cuja cinética de infecção é, classicamente, dividida em quatro fases. A primeira se traduz pela rápida eliminação de bactérias séricas. Ao longo da primeira semana após a infecção, *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocíticas. Essa segunda fase é caracterizada por uma rápida multiplicação bacteriana no fígado e baço atingindo taxas de crescimento de 0,5-1,5 Log UFC/dia (MAW & MEYNELL, 1968; HORMAECHE, 1980), o que resulta em hepato e esplenomegalia, respectivamente. Após uma semana, se estabelece uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento de bactérias pelo sistema imune inato (através de PAMPs), por intermédio das células fagocíticas. Isso resulta na produção de várias citocinas pró-inflamatórias (Tnfa, IL1, IL6, IL12, Ifng) bem como na infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos nos locais de inflamação. O crescimento bacteriano nesses locais, principalmente no fígado e baço, leva a formação de abscessos contendo predominantemente leucócitos polimorfonucleares, lesões estas que acabam por adquirir forma de granulomas com área central de necrose (NAKONECZNA & HSU, 1980). Nessas lesões, *S. Typhimurium* reside intracelularmente dentro de macrófagos (RICHTER-DAHLFORS et al., 1997). Na quarta fase do processo infeccioso mecanismos efetores da imunidade adaptativa são gerados, e os títulos de anticorpos anti-*Salmonella* aumentam, além da produção de citocinas pró-inflamatórias com destaque para o Ifng (SALEZ & MALO, 2004; GRASSL & FINLAY, 2008). A morte dos camundongos é, provavelmente, resultado das lesões hepáticas desencadeadas pela produção de citocinas pró-

inflamatórias e pela indução de síntese de óxido nítrico elicitada pelo lipídio A (KHAN et al., 1998).

Embora bovinos possam ser infectados por diferentes sorovares de *Salmonella*, *S. Typhimurium* é considerada uma das principais causadoras de enterite nesses ruminantes, sendo frequentemente isolada de animais doentes (WELLS et al., 1998). Por isso, a infecção experimental de bezerros com *S. Typhimurium* resulta em uma doença entérica com características patogênicas e clínicas similares às observadas na gastroenterite humana e tem sido usada como um modelo experimental da enterite induzida por *Salmonella* (SANTOS et al., 2001).

Após a infecção oral com *S. Typhimurium*, bezerros desenvolvem sinais clínicos dentro de 12-48h (TSOLIS et al., 1999), que incluem diarreia, anorexia, febre, desidratação e prostração (WRAY & SOJKA, 1978; SMITH et al., 1979). Do ponto de vista hematológico, a principal mudança em bezerros infectados é a leucopenia e neutropenia transientes nos estágios iniciais da infecção, que refletem um influxo de leucócitos polimorfonucleares para a mucosa intestinal. Os níveis plasmáticos de sódio e cálcio são reduzidos, possivelmente, como resultado da perda de eletrólitos durante a diarreia, sendo também observada acidose metabólica (TSOLIS et al., 2000). As alterações patológicas observadas em bezerros infectados são restritas ao intestino, com aumento dos linfonodos mesentéricos além de distensão e congestionamento da porção final do intestino delgado, devido ao acúmulo de fluido (WRAY & SOJKA, 1978; TSOLIS et al., 1999). Além disso, severa infiltração de leucócitos polimorfonucleares associados com necrose na superfície da mucosa é observada em intestinos de animais infectados. A letalidade da infecção está relacionada à carga bacteriana no desafio e idade do hospedeiro (SANTOS et al., 2001).

Os modelos animais de desafio com *Salmonella* são extremamente importantes para compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos nas doenças causadas por esta bactéria. Por outro lado, eles permitiram a identificação de fatores de virulência e viabilizam a avaliação de possíveis formas de prevenção (vacinas) e tratamento da salmonelose (SANTOS et al., 2001). O efeito imunomodulador contra enteropatógenos de algumas linhagens probióticas tem sido investigado com sucesso através da utilização de modelos animais infectados/desafiados (CROSS, 2002). Um grande número de pesquisas nessa área tem focado no uso do modelo murino desafiado com *S. Typhimurium* e vários resultados

apontam efeito protetor de probióticos contra essa infecção (como descrito no item 1.7).

Para o estudo dos mecanismos imunes envolvidos na salmonelose, bem como aqueles produzidos pela administração de probióticos, técnicas que permitem a dosagem de mediadores da resposta imunológica são empregadas. Ao longo dos anos, a maior parte do conhecimento adquirido sobre as respostas imunológicas foi obtido através da avaliação do perfil de citocinas pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Entretanto, devido às limitações desta abordagem, alternativas para a dosagem de mediadores da resposta imune vêm sendo empregadas, como o uso da PCR quantitativa em tempo real.

1.9 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo (qPCR) em tempo real

Originalmente, a amplificação e detecção simultânea de sequências específicas de DNA por PCR era realizada através da adição de brometo de etídio (EtBr) à reação, de modo que o acúmulo de produto de PCR poderia ser visualizado em cada ciclo de amplificação (LOGAN et al., 2009). Assim, o princípio da qPCR (PCR quantitativa) envolvia a mensuração do produto acumulado durante a fase exponencial de amplificação pela interrupção da PCR em um ciclo. Essa abordagem inicial de quantificação foi chamada de qPCR “*end-point*”. Os resultados nesse caso eram semi-quantitativos e envolviam laboriosas manipulações pós-PCR para mensuração da quantidade dos produtos. Tais procedimentos envolviam eletroforese em gel de agarose usando EtBr, marcação com sondas fluorescentes em gel de poliacrilamida e marcação com sondas radioativas usando transferência de *Southern* que, em conjunto, representam um risco potencial de contaminação para o laboratório e para a saúde do operador.

Refinamentos subsequentes da técnica agregaram maior especificidade para as reações de qPCR. Os mais importantes avanços foram alcançados pela adição de fluoróforos à reação (sendo eles agentes intercalantes de DNA ou sondas de hidrólise marcadas com fluorescência) e pela integração de sistemas de detecção ótica de fluorescência (câmeras e lasers) aos termocicladores que permitiram acompanhar, em tempo real, a cinética da reação. Esses dois avanços viabilizaram a quantificação do produto acumulado em cada ciclo de amplificação (LOGAN et al., 2009). Essa nova abordagem embutiu maior precisão quantitativa e agilidade na

execução da quantificação em comparação com os métodos anteriores sem a necessidade de manipulações pós-PCR (GIULIETTI et al., 2001). Esses progressos significativos da técnica de qPCR permitiram o desenvolvimento de uma nova geração de plataformas e de reagentes. Essa nova abordagem é conhecida como qPCR em tempo real baseada em fluorescência (HIGUCHI et al., 1992; HIGUCHI et al., 1993; WITTWER et al., 1997).

Diante da versatilidade da técnica, vários instrumentos (ABI Prism 7700 SDS, 7900 HT SDS, oCycler iQ, LightCycler) e diferentes químicas de detecção dos produtos (sondas de hidrólise TaqMan, *Molecular Beacons*, sondas de hibridização e SYBR Green I) foram desenvolvidas. Uma das mais usadas, devido à facilidade e custo reduzido, é o SYBR Green I que consiste em um corante fluorescente o qual é incorporado ao DNA dupla fita durante a amplificação. Esse agente só é detectável na sua forma incorporada e não na forma livre (uma das mais importantes vantagens de seu uso universal) (GIULIETTI et al., 2001). Entretanto, SYBR Green I apresenta especificidade reduzida devido ao acúmulo de dímeros de *primer* e à geração de produtos inespecíficos, ambos capazes de incorporar o corante e serem detectados como produto de amplificação. Para contornar essas desvantagens, a utilização de curvas de dissociação, após o término da amplificação, e uma padronização acurada das reações deve ser empregada para tornar o uso do SYBR Green I reproduzível e confiável (GIULIETTI et al., 2001).

O princípio subjacente à qPCR em tempo real baseada em fluorescência define o acompanhamento do sinal de fluorescência de ciclo-a-ciclo, que permite a mensuração do produto gerado em qualquer ponto durante a fase exponencial de amplificação. A quantidade de produto mensurada pode ser usada para determinar a quantidade de ácido nucléico original adicionada à reação, pois quanto mais moléculas alvo existirem no início, menos ciclos serão gastos para se obter uma determinada quantidade de produto detectável em uma faixa arbitrária de fluorescência (*threshold*). Esse princípio pode ser usado para quantificar moléculas de DNA e RNA, sendo este último melhor avaliado depois da associação de reações de transcrição reversa (RT-PCR) para produção de cDNA, antes das reações de qPCR (LOGAN et al., 2009).

Existem duas abordagens de quantificação usando o método de RT-qPCR (qPCR associado com reações de transcrição reversa para quantificação de RNA). A primeira delas é conhecida como quantificação absoluta e emprega o uso de curva

padrão. Essa abordagem envolve o uso de um padrão molecular purificado do RNA (cDNA) alvo de quantificação para permitir a avaliação do número de cópias do alvo presente em uma amostra (GIULIETTI et al., 2001). Entretanto, a dificuldade de obtenção de um padrão molecular purificado torna, muitas vezes, a utilização desta abordagem inviável. Como alternativa, a quantificação relativa é indicada para estudos nos quais a quantidade absoluta do RNA não é importante, mas sim a comparação do nível de expressão entre diferentes grupos amostrais (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001).

A abordagem da quantificação relativa emprega o método da comparação de C_q (ciclo de quantificação, também conhecido como C_t), descrito originalmente por Livak & Shimittgen (2001). Nesta abordagem fórmulas aritméticas são usadas para calcular o nível de expressão relativa em relação a uma amostra (ou grupo de amostras) chamada de calibradora, que pode ser um controle não tratado ou o tempo 0 em um experimento de cinética. As quantidades do gene alvo são normalizadas usando dados de expressão de um gene de referência (gene expresso em nível constante em diferentes tecidos, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ter sua expressão afetada pelo tratamento experimental). Essa normalização tem como objetivo corrigir as variações experimentais embutidas no método, como variação na quantidade de RNA adicionada às reações, erros de pipetagem e eficiência da reação de RT-PCR (GIULIETTI et al., 2001).

A expressão do gene alvo na amostra teste é normalizada e relativizada pelos dados de expressão da amostra calibradora usando a expressão $2^{-\Delta\Delta C_q}$, onde $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q$ (amostra teste) - ΔC_q (calibrador) e ΔC_q é definido como $(C_{q_{\text{gene alvo}}} - C_{q_{\text{gene referência}}})$. Essa abordagem tem como principal vantagem a não necessidade de construção de curva padrão. Entretanto, apresenta um pressuposto importante no qual a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência devem ser semelhantes e próximas de 100% (90-110%) (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). No entanto, a utilização do método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ não permite emprego de mais de um gene de referência para normalização, prática esta que vem sendo preconizada. Refinamentos dessa abordagem foram desenvolvidos para permitir utilização simultânea de dados de expressão de mais de um gene de referência e do valor real de eficiência de amplificação do gene alvo de quantificação e, também, dos genes de referência. Portanto, atualmente tem sido empregada uma nova abordagem para

cálculo da expressão relativa do gene alvo em uma amostra teste descrita na equação (1) (HELLEMANS et al., 2007).

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}]^{\Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}} \quad (\text{Equação 1})$$

A Equação 1 descreve o cálculo do nível relativo de expressão (NRE) do gene hipotético x através do valor de eficiência de amplificação do gene x (E_x) elevado ao ΔCq_x dividido pelo fator de normalização da expressão do gene x, este último obtido pela raiz *enésima* da média geométrica dos n valores de eficiência de amplificação de cada gene de referência (E_{ref}) elevados pelos seus respectivos ΔCq_{ref} , sendo n o número de genes de referência usados no cálculo de NRE_x .

Assim, RT-qPCR tem demonstrado ser um poderoso método para estudo da expressão gênica em tecidos de mamíferos (PEINNEQUIN et al., 2004). Além de ser uma poderosa ferramenta para a pesquisa, RT-qPCR tem aplicações no diagnóstico molecular de doenças, determinação do número de cópias de genes multi-cópias, identificação de transgenes em alimentos possivelmente modificados geneticamente e no uso forense (BERNARD & WITTEWER, 2002; MACKAY, 2002; MACKAY, 2004; BUSTIN & MUELLER, 2005; BUSTIN & MUELLER, 2006; VAN DEN BERG et al., 2007).

A quantificação de mRNA de citocinas foi um dos primeiros exemplos do emprego da qPCR para estudos da expressão gênica (GILLILAND et al., 1990). O conhecimento do padrão de citocinas é essencial para elucidação de mecanismos imunológicos envolvidos em respostas imunes relacionadas às doenças infecciosas, reações autoimunes e administração de probióticos. Entretanto, a detecção em nível proteico das citocinas por técnicas tradicionais, como ELISA, somente permite a mensuração de um número limitado destas moléculas a partir de uma única amostra, pois necessitam de grande quantidade de material biológico principalmente devido à baixa sensibilidade do método (GIULIETTI et al., 2001). Portanto, amostras de tecido são frequentemente pequenas para permitir a quantificação de um número grande de citocinas.

Felizmente, o desenvolvimento da qPCR disponibilizou uma ferramenta sensível para avaliação concomitante de um número grande de citocinas em uma

mesma amostra, através da quantificação do mRNA das citocinas. Entretanto, devido aos mecanismos de regulação pós-transcricionais (controle da meia vida do mRNA no citoplasma, taxa de tradução, meia vida proteica, vias de exportação de proteínas, etc.) o mRNA permite apenas uma estimativa do perfil de citocinas produzido em nível proteico. Apesar da variedade de métodos que são usados para quantificar a expressão de mRNA, RT-qPCR é atualmente o método mais preciso para quantificação de mRNA de citocinas, que são frequentemente expressas em baixos níveis na célula (GIULIETTI et al., 2001). Esse método permite a avaliação de um conjunto variado de muitas citocinas em uma única amostra e requer uma pequena quantidade de material biológico, o que o torna extremamente atrativo (PEINNEQUIN et al., 2004).

Atualmente, existe uma falta de consenso dentro da comunidade científica sobre a melhor forma de interpretar os dados obtidos em experimentos que empregam RT-qPCR. O problema está relacionado, principalmente, com a disponibilização reduzida, nos artigos, dos detalhes experimentais envolvidos nos estudos (BUSTIN et al., 2009). Essa prática impede que o leitor possa avaliar criticamente os resultados, bem como a qualidade com que os mesmos foram obtidos. Esse problema dificulta a comparação de achados entre diferentes grupos de pesquisa e tem alimentado críticas contra a técnica. Diante disso, Bustin et al., (2009) publicaram um protocolo para padronização das publicações de experimentos utilizando RT-qPCR no intuito de melhorar a comunicação dos resultados. Esse protocolo foi chamado de *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* - MIQE. Nessa publicação, a descrição da forma de obtenção e armazenamento das amostras, quantificação e avaliação da integridade do RNA e detalhes da reação de RT-PCR, bem como da eficiência da qPCR são colocados em destaque. Com o objetivo de garantir a relevância, acurácia e reprodutibilidade dos resultados apresentados nesta dissertação, foram obedecidos os princípios determinados no MIQE.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A pecuária representa uma das atividades mais importantes para a economia mundial. Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo. Existem projeções de forte aumento na produção nacional de carne nos próximos anos. A previsão é que o país produza 52,6 milhões de toneladas em 2050, o que caracteriza um aumento de 98% em relação à produção de 2011 (26,5 milhões de toneladas) (MAPA, 2011). Porém, devido principalmente aos problemas sanitários e de manejo, o ganho de peso de animais pode ficar comprometido. Várias são as causas de perda de peso, sendo uma das principais a diarreia em neonatos. Nesse sentido, a utilização de medidas profiláticas para redução da incidência e, portanto, do impacto da diarreia sobre a produção são necessárias.

Recentes pesquisas têm relacionado à fisiologia do hospedeiro com populações bacterianas do intestino. Essas relações tem provocado interesse sobre a compreensão do microbioma intestinal (LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006). Estudos, em humanos, apontam que populações de clostrídios intestinais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de autismo (BOLTE, 1998; FINEGOLD et al., 2002). Essa discussão tem levantado questões pertinentes como: existe um perfil de microbiota, em animais de produção, que aumenta sua produtividade, qualidade dos produtos e segurança dos alimentos gerados? Essa questão tem sido trabalhada principalmente através de estudos com probióticos que afetam benéficamente a comunidade microbiana gastrointestinal, podendo melhorar a *performance* animal e prevenir a colonização por agentes patogênicos (VANBELLE et al., 1990; RICKE & PILLAI, 1999; DUNKLEY et al., 2007).

Atualmente, os probióticos que são usados para melhorar os indicadores gerais de saúde em bovinos são de origem humana. Os efeitos colaterais do uso de probióticos humanos na alimentação do gado ainda não estão esclarecidos. Além disso, muitas das preparações probióticas usadas em animais são uma mistura de diferentes linhagens e o efeito benéfico atribuído a cada uma delas ainda não é bem esclarecido. Aliado a isto, a pressão de agências regulamentadoras internacionais sobre o uso profilático de antibióticos como APC gera a necessidade de encontrar alternativas para melhorar a qualidade de vida dos animais e o valor biológico dos

produtos comercializados. Neste cenário, a identificação de linhagens bacterianas probióticas de origem bovina constitui uma alternativa promissora.

Embora seja admitido que certos probióticos exerçam efeitos benéficos, o conhecimento sobre os mecanismos subjacentes a esses efeitos ainda é pequeno (ZOUMPOPOULOU et al., 2008). Diversos efeitos probióticos são mediados através da regulação do sistema imune, particularmente através da estabilização e manutenção do balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias (ISOLAURI et al., 2001). Desta forma, o estudo das propriedades imunomodulatórias de novas bactérias com potencial probiótico tem alta prioridade. Devido aos poucos estudos do potencial imunomodulatório de isolados de *Lactobacillus* de origem bovina em modelos animais e da necessidade emergente de novos isolados potencialmente probióticos para uso como promotores de crescimento em gado, faz-se necessária a caracterização de isolados capazes de combater ou prevenir patologias negativamente impactantes sobre a pecuária, como é a salmonelose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a capacidade de colonização do trato intestinal e o perfil imunomodulador de isolados de *Lactobacillus* bovinos (L36 e L38) em modelo experimental murino desafiado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium.

3.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar a capacidade de colonização *in vivo* dos isolados L36 e L38 do trato gastrointestinal em camundongos isentos de germes (GF- “*germ free*”);
- B) Desafiar camundongos convencionais (CV) Swiss NIH com 4-5 semanas de idade tratados com *Lactobacillus* utilizando *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium;
- C) Avaliar parâmetros relacionados ao desenvolvimento ponderal, índice hepático e esplênico em animais CV tratados com isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella*;
- D) Avaliar padrões histológicos de lesão e infecção no fígado, íleo e cólon em animais CV tratados com isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella*;
- E) Quantificar a produção de Imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) em fluido intestinal de animais tratados com os isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella* e em animais monoassociados com os isolados de *Lactobacillus* ;
- F) Detectar células produtoras de IgA (células IgA⁺) no íleo de camundongos CV tratados com isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella* e quantificar a área produtora de células IgA⁺ nos diferentes grupos experimentais de animais CV;
- G) Padronizar reações de RT-qPCR para quantificação de expressão gênica de citocinas (IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa) utilizando como genes normalizadores Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e Actb (Beta-actina) em amostras de RNA total das porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongos CV tratados com os isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella* e em camundongos monoassociados com os isolados de *Lactobacillus*;

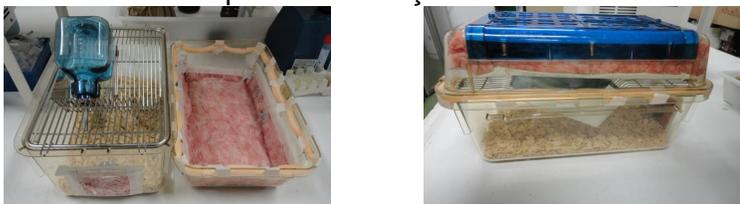
H) Quantificar a expressão relativa do mRNA das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa em diferentes porções do intestino (delgado inicial, medial e distal; ceco e cólon) com o objetivo de construir um mapa de expressão das mesmas e comparar os níveis de expressão entre grupos experimentais e controles em modelo de desafio com *Salmonella* realizado em camundongos CV e em modelo de monoassociação utilizando animais GF.

4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isentos de germes (GF) e convencionais (CV) da linhagem Swiss NIH, com 4-5 semanas de idade, de ambos os sexos. Os animais GF foram provenientes de matrizes da TACONIC (Germantown, NY, USA). Estes receberam água e ração comercial (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) *ad libitum*, esterilizadas por calor úmido, sendo manuseados assepticamente (PLEASANTS, 1974) e foram mantidos em isoladores tipo Trexler (Standard Safety Equipment Co., Pallatine, IL, USA) até o desmame. Os animais GF foram, então, transferidos para mini-isoladores Alesco (Modelo ALE.MIL.01.03- Monte Mor, SP, Brasil) adaptados com revestimento de lã de vidro esterelizados para realização dos experimentos, como exemplificado na FIGURA 2. Os mini-isoladores adaptados foram trocados a cada 2 dias para permitir a troca de ar e impedir o acúmulo de amônia. As matrizes CV foram convencionalizadas a partir de animais GF, já descritos, pela administração de diluições fecais de outros camundongos convencionais e propagadas em condições de manejo de colônias *outbred*, sendo usados nos experimentos animais obtidos a partir da segunda geração pós a convencionalização. Os animais CV foram mantidos em mini-isoladores Alesco (Modelo ALE.MIL.01.03) no biotério NB2 do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG, onde receberam ração comercial (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água autoclavada *ad libitum* e foram mantidos em estantes ventiladas Alesco (Modelo ALERKD-70). Foram utilizados grupos de 3 fêmeas (para animais GF) e 5 machos e 5 fêmeas (para animais CV), com pesos variando de 15-25 g, para cada grupo experimental. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério.

FIGURA 2 – Mini-isoladores ALESCO Modelo ALE.MIL.01.03 adaptados com revestimento de lã de vidro para manutenção de animais isentos de germes.



Fonte: Fotos do autor.

4.1.1 Manejo dos animais

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando os protocolos propostos pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006). Essa dissertação compõe um subprojeto de um projeto mais abrangente intitulado: “Determinação do potencial imunomodulatório de lactobacilos, frações da parede bacteriana e proteína S recombinantes de novos isolados com potencial probiótico” que foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com a referência 203/2009 em 09/12/2009.

4.2 Micro-organismos

4.2.1 Linhagens bacterianas (origem e manutenção)

Com o objetivo de identificar *Lactobacillus* de origem bovina com possíveis propriedades probióticas, nosso grupo de pesquisa realizou o isolamento e identificação de *Lactobacillus*. As linhagens de *Lactobacillus* foram isoladas e identificadas a partir de amostras de fezes de bezerros de até 30 dias de idade, que não receberam suplementação com antibióticos. O isolamento foi realizado em ágar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA), incubação em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, EUA), contendo uma atmosfera de 85%N₂, 10%H₂ e 5%CO₂, e a identificação foi feita por PCR-ARDRA. Além disso, foram realizados testes *in vitro* de possíveis propriedades probióticas (hidrofobicidade, tolerância ao suco gástrico e sais biliares, antagonismo contra enteropatôgenos, antibiograma e produção de peróxido) para eleição dos isolados que apresentassem melhor potencial probiótico (SANDES et al., comunicação pessoal). Após esta caracterização fenotípica, dois isolados de *Lactobacillus* isolados de fezes, denominados L36 (*L. acidophilus*) e L38 (*L. salivarius*), foram escolhidos para estudos *in vivo*, por apresentarem características distintas nos testes *in vitro*. Os resultados da avaliação *in vitro* do potencial probiótico destes isolados estão resumidos na TABELA 1.

TABELA 1 – Testes *in vitro* de propriedades probióticas dos isolados L38 e L36 de *Lactobacillus*.

Isolado	Identificação	Antagonismo contra enteropatógenos							HID (%)	S. gástrico (% inib.)
		<i>B.cer.</i>	<i>L. mono.</i>	<i>Sta. aur.</i>	<i>Ent. faec.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Sal. en.</i>	<i>P. aer.</i>		
L36	<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	-	+	+	70,28	3,64
L38	<i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	99,85	15,91

Isolado	Identificação	Antibiograma usando discos de difusão							S. biliar (% inib.)	H ₂ O ₂
		AMI	AMP	CLO	ERI	PEN	OXA	VAN		
L36	<i>L. acidophilus</i>	R	S	S	S	S	R	R	68,12	Não
L38	<i>L. salivarius</i>	R	S	S	S	S	R	R	100	Sim

Legenda: + presença / - ausência de antagonismo. R: resistente / S: sensível ao antibiótico.
B. cer.: *Bacillus cereus* / *Sta. aur.:* *Staphylococcus aureus* / *Ent. faec.:* *Enterococcus faecalis* / *E. coli.:* *Escherichia coli* / *Sal. en.:* *Salmonella enterica* / *P. aer.:* *Pseudomonas aeruginosa*
 AMI: Amicacina / AMP: Ampicilina / CLO: Cloranfenicol / ERI: Eritromicina / PEN: Penicilina / OXA: Oxacilina / VAN: Vancomicina
 HID: Hidrofobicidade / S. gástrico: percentual de inibição ao suco gástrico / S. biliar: percentual de inibição aos sais biliares
Fonte: SANDES et al., comunicação pessoal.

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, de origem humana, que foi utilizada nos experimentos foi isolada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG, Brasil) e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, sendo mantida no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG.

As linhagens bacterianas foram conservadas a -80°C em 1mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) para *Salmonella* (crescida por 18h a 37°C em aerobiose) e em caldo MRS para os isolados de *Lactobacillus* (crescidos por de 18h a 37°C, em anaerobiose), ambos adicionados de 0,2 mL de glicerina esterilizada por calor seco. Para todos os experimentos, as bactérias foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI (aerobiose) ou MRS (anaerobiose), a 37°C, durante 18 horas, sem agitação. Para a avaliação do crescimento das bactérias foram feitas diluições sucessivas das culturas ativas em salina 0,85% estéril, seguindo-se plaqueamento de 100 µL das diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ em placas de ágar MRS e BHI, para contagem de isolados de *Lactobacillus* e *Salmonella*, respectivamente, pela técnica de *spread plate*. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em

aerobiose para BHI e anaerobiose para MRS e, as colônias foram contadas. O crescimento bacteriano foi expresso em UFC/mL de cultura.

4.3 Tratamentos e desafio dos animais

4.3.1 Tratamento dos animais GF

Os animais GF pertencentes aos grupos experimentais foram inoculados, uma única vez, intragastricamente com 10^8 UFC dos isolados L36 ou L38, ressuspensos em 100 μ L de salina 0,85% esterilizada, em condições assépticas de manejo. Os animais GF do grupo controle não receberam nenhum inóculo. O esquema de tratamento dos animais GF está resumido na FIGURA 3A. Todos os animais foram mantidos em mini-isoladores Alesco (Modelo ALE.MIL.01.03- Monte Mor, SP, Brasil) adaptados com lã de vidro (FIGURA 2), alocados no biotério NB2 do Depto. de Microbiologia do ICB/UFMG, fora das estantes ventiladas.

4.3.2 Tratamento dos animais CV

Os animais CV dos grupos experimentais (desafiados ou não-desafiados) receberam um inóculo diário de 10^8 UFC de L36 ou L38, ressuspensos em 100 μ L de salina 0,85%, por gavagem, dez dias antes do desafio com a bactéria patogênica. Os animais dos grupos controles (desafiados ou não-desafiados) receberam, durante este período, 100 μ L de salina 0,85%, de acordo com o esquema descrito por Rodrigues et al., (1996). Após o desafio com a bactéria patogênica, os animais dos grupos experimentais continuaram a receber inóculos diários dos isolados de *Lactobacillus* e os dos grupos controles continuaram recebendo salina 0,85% por mais nove dias, quando foram sacrificados, 20 dias após o início dos tratamentos experimentais. O esquema de tratamento dos animais CV está resumido na FIGURA 3B.

4. 3. 3 Desafio dos animais CV

O desafio dos animais CV foi feito no 11º dia após o início da administração dos isolados. Os inóculos de *Salmonella* foram preparados a partir da seleção de uma colônia lisa crescida em ágar MacConkey e posteriormente repicada para caldo BHI e mantida a 37°C, por 18-24h. A cultura pura foi submetida a diluições sucessivas em salina 0,85% esterilizada, para obtenção da concentração de células desejada. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas foram feitas em ágar MacConkey, após 24h de incubação a 37°C. Os camundongos desafiados (controles e experimentais) receberam inóculo de 100 µL, contendo 10⁶ UFC de *Salmonella*, por via oral, utilizando uma agulha de inoculação intragástrica. Animais dos grupos não desafiados (controles e experimentais) receberam 100 µL de salina 0,85% pela mesma via. O desenho experimental de monoassociação de animais GF e de tratamento e desafio dos animais CV estão resumidos na FIGURA 3A e 3B, respectivamente.

FIGURA 3 – Esquemas de tratamento e desafio dos experimentos com animais.

FIGURA 3A – Esquema de monoassociação dos animais isentos de germes para avaliação da capacidade de adesão e imunomodulação *in vivo* dos isolados L36 e L38.

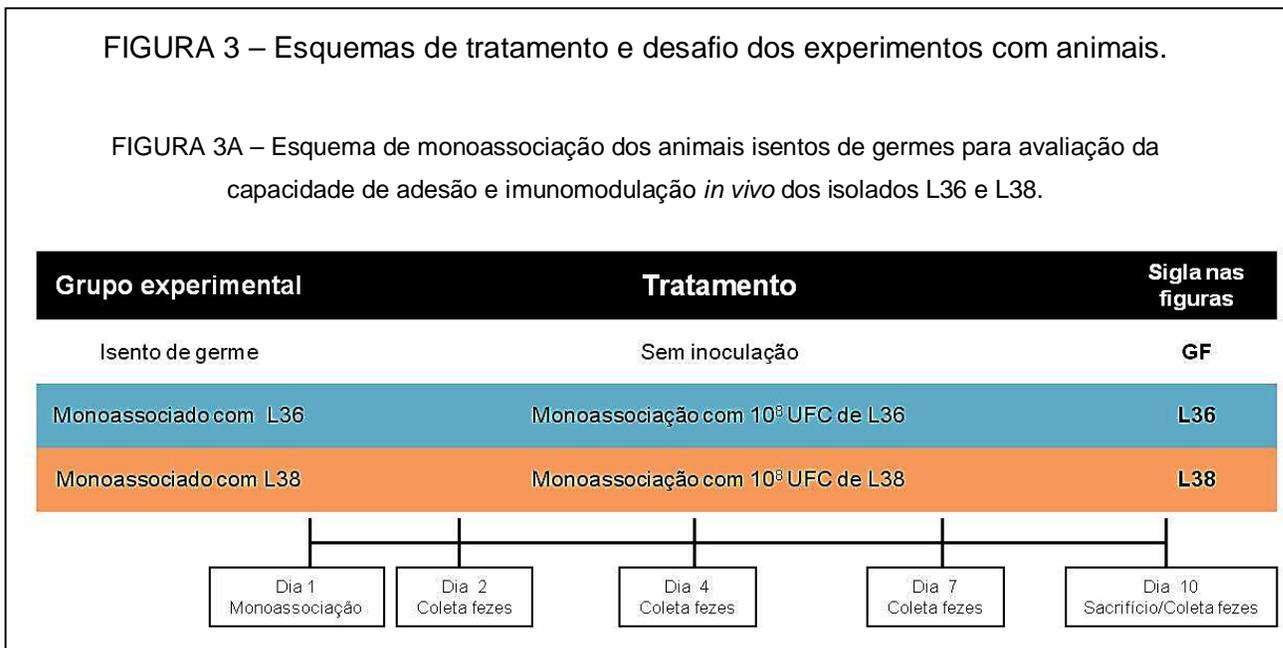


FIGURA 3 – Esquemas de tratamento e desafio dos experimentos com animais.

FIGURA 3B – Esquema de tratamento com *Lactobacillus* e desafio com *Salmonella* dos animais convencionais.

Grupo experimental	Tratamento PRÉ-desafio	Desafio	Tratamento PÓS-desafio	Sigla nas figuras
Controle salina	Tratamento diário com 0,1 mL de salina 0,85 %	0,1 mL de salina 0,85 %	Tratamento diário com 0,1 mL de salina 0,85 %	S
Experimental L36	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L36	0,1 mL de salina 0,85 %	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L36	L36
Experimental L38	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L38	0,1 mL de salina 0,85 %	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L38	L38
Controle <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 0,1 mL de salina 0,85 %	10 ⁸ UFC de <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 0,1 mL de salina 0,85 %	Salmonella
Experimental L36 desafiado c/ <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L36	10 ⁸ UFC de <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L36	L36+S
Experimental L38 desafiado c/ <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L38	10 ⁸ UFC de <i>Salmonella</i>	Tratamento diário com 10 ⁸ UFC de L38	L38+S

Diagrama de cronograma com três pontos principais: Dia 1 Início, Dia 11 Desafio e Dia 20 Sacrificio. Linhas horizontais conectam as colunas de tratamento/pré-desafio, desafio e pós-desafio aos pontos de tempo correspondentes.

Fonte: Criado pelo autor.

4.4 Avaliação dos níveis populacionais e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados de *Lactobacillus* em animais gnotobióticos

Camundongos gnotobióticos monoassociados com as linhagens de *Lactobacillus* tiveram os níveis populacionais de L36 ou L38 determinados por contagens nas fezes após 2, 4, 7 e 10 dias da monoassociação (FIGURA 3A). As fezes foram recolhidas, sob condições assépticas, através de estimulação anal, pesadas e submetidas a diluições decimais em salina 0,85% esterilizada. Um volume de 100 μ L das diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ foi plaqueado em agar MRS pela técnica de *spread plate* e as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37°C por 48h. Os resultados foram expressos em Log de UFC/g de fezes. Concomitantemente, fezes coletadas em todos os pontos de enumeração foram, também, adicionadas em tubos contendo caldo BHI e incubadas em estufa a 37°C, por 18h, em aerobiose, para avaliação da presença de quaisquer contaminantes

microbianos, assegurando o estado monoassociado (animais experimentais) ou GF (animais controle) dos animais.

No 10º dia após a monoassociação, os animais foram eutanasiados e sacrificados em condições assépticas. Após a abertura da cavidade peritoneal, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo intestinal foi retirado e processado conforme descrito no item 4.7 desta seção. Porções de 1-2 cm do terço inicial, medial e distal do intestino delgado, bem como do ceco e cólon desses animais foram retiradas e armazenadas em RNA *Later* e congeladas a -20°C, para posterior extração de RNA total. Porções similares, das mesmas regiões do trato gastrointestinal, também foram processadas e submetidas a diluições decimais em salina 0,85% esterilizada. Um volume de 100 µL das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram plaqueados em agar MRS pela técnica de *spread plate*. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37°C por 48h e o resultado desta enumeração foi expresso em Log de UFC/g de tecido intestinal.

4.5 Determinação do efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre índice hepático e esplênico e variação de peso em animais CV desafiados com *Salmonella*

Durante o experimento de desafio em animais CV, os pesos dos animais foram monitorados no início (Dia 1) e no fim (Dia 20) do experimento para avaliação da variação do peso produzida pelos diferentes tratamentos experimentais. No nono dia após o desafio (20º dia do experimento), os animais foram submetidos à anestesia com Cetamina (100 mg/kg de peso) e Xilasina (20 mg/kg de peso). Foi feita coleta de sangue no plexo axial e, em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os animais foram submetidos à laparotomia, em condições assépticas em capela de fluxo laminar, para coleta de baço, fígado, intestino delgado e grosso. Os pesos do fígado e baço foram registrados, para produção de peso relativo desses órgãos em relação ao peso final no dia do sacrifício (índices hepático e esplênico, respectivamente, expressos em mg do órgão por g de peso do animal no dia do sacrifício). O soro foi armazenado a -20°C para experimentos futuros. Depois da limpeza do conteúdo intestinal, porções intestinais

de 1-2 cm foram coletadas no terço inicial, medial e distal do intestino delgado, bem como do ceco e cólon e armazenadas em RNA *Later* para futura extração de RNA total, sendo todas condicionadas a -20°C até o momento da extração.

4.6 Determinação do efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados e CV desafiados com *Salmonella*

O intestino delgado foi removido dos animais, pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O procedimento de coleta do conteúdo intestinal foi uma adaptação do método descrito por Nader de Macias et al., (1992) e modificado por Rodrigues et al., (1996). O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2 (PBS) na proporção de 500 mg do conteúdo intestinal para 2,0 mL de PBS. Ao PBS foi adicionado 1% (v/v) de um coquetel de inibidores de protease (P-8340, Sigma-Aldrich Chemical). Depois de centrifugado a 2000 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -20°C, para posterior dosagem de sIgA.

A determinação do nível de sIgA total foi realizada pelo método de ELISA. As amostras de fluido intestinal foram inicialmente diluídas na proporção 1:50 (animais gnotobióticos) e 1:800 (animais CV) em PBS-tween e, em seguida, diluições 1:2 foram realizadas e adicionadas, em duplicata, aos poços das placas de ELISA. A sIgA total do fluido intestinal foi determinada utilizando anticorpos anti-IgA (M-8769, Sigma-Aldrich Chemical), para revestimento das placas e anticorpos anti-IgA de camundongo, conjugados com peroxidase (A-4789, Sigma-Aldrich Chemical) para detecção. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA de camundongo purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). A leitura foi feita a 492 nm em um leitor de placas de ELISA (MultiSkan Spectrum, Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Os resultados foram expressos como µg de sIgA/ g de conteúdo intestinal calculadas a partir da curva padrão ± desvio-padrão.

4.7 Determinação do efeito de isolados de *Lactobacillus* sobre a área de células produtoras de IgA (células IgA⁺) no íleo de camundongos CV desafiados com *Salmonella*

A área de células produtoras de IgA (células IgA⁺) foi determinada em cortes histológicos através de ensaio de imunofluorescência direta. Os intestinos dos animais CV foram divididos em três porções equivalentes em tamanho. No terço final do intestino (íleo distal) foi coletado um pedaço de aproximadamente 5 cm que foi aberto longitudinalmente e esticado sobre papel de filtro. Esse material foi pré-fixado em solução de Bouin e enrolado em espiral, com a mucosa voltada para dentro, de modo a formar um "Swiss roll" (ARANTES & NOGUEIRA, 1997). O material foi rotineiramente processado para inclusão em parafina, e dois cortes de secções histológicas consecutivas com 4 µm de espessura foram obtidos. Essas lâminas foram desparafinadas através da imersão em xilol, reidratadas em uma série graduada de soluções de etanol e coradas através de técnicas de imunofluorescência direta. As lâminas foram incubadas com anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (F9384, Sigma-Aldrich) usado na diluição 1:100 (em PBS acrescido de 1% de soro albumina) por 30 minutos ao abrigo de luz, seguido da observação em microscópio com luz fluorescente. Foi usado também um corante controle para coloração dos núcleos das células (Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Foram medidos, em média, 10 campos em objetiva de 10x, por animal. As imagens foram capturadas em microscopia e analisadas utilizando uma microcâmera JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany), do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia geral-ICB/UFMG. Os resultados foram expressos, graficamente, como médias e desvios-padrão da proporção (em %) da área de células IgA⁺/ área total de íleo, em cada imagem.

4.8 Determinação dos efeitos sobre aspectos histológico do fígado, íleo distal e cólon de animais CV tratados com isolados de *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella*

Amostras do lóbulo maior do fígado e de porções do trato digestivo (íleo e cólon) dos camundongos CV, controles e experimentais sacrificados no 9º dia após o desafio, foram submetidas a exame histológico. O intestino delgado distal e cólon foram abertos longitudinalmente e esticados sobre papel de filtro. O íleo distal foi pré-fixado em solução de Bouin, e enrolado em espiral, com a mucosa voltada para dentro do rocambole, de modo a formar um "*Swiss roll*" (ARANTES & NOGUEIRA, 1997). O material foi rotineiramente processado para inclusão em parafina, e dois cortes de secções histológicas consecutivas com 4 µm de espessura foram obtidos e corados utilizando coloração histológica de rotina com Hematoxilina e Eosina (H&E).

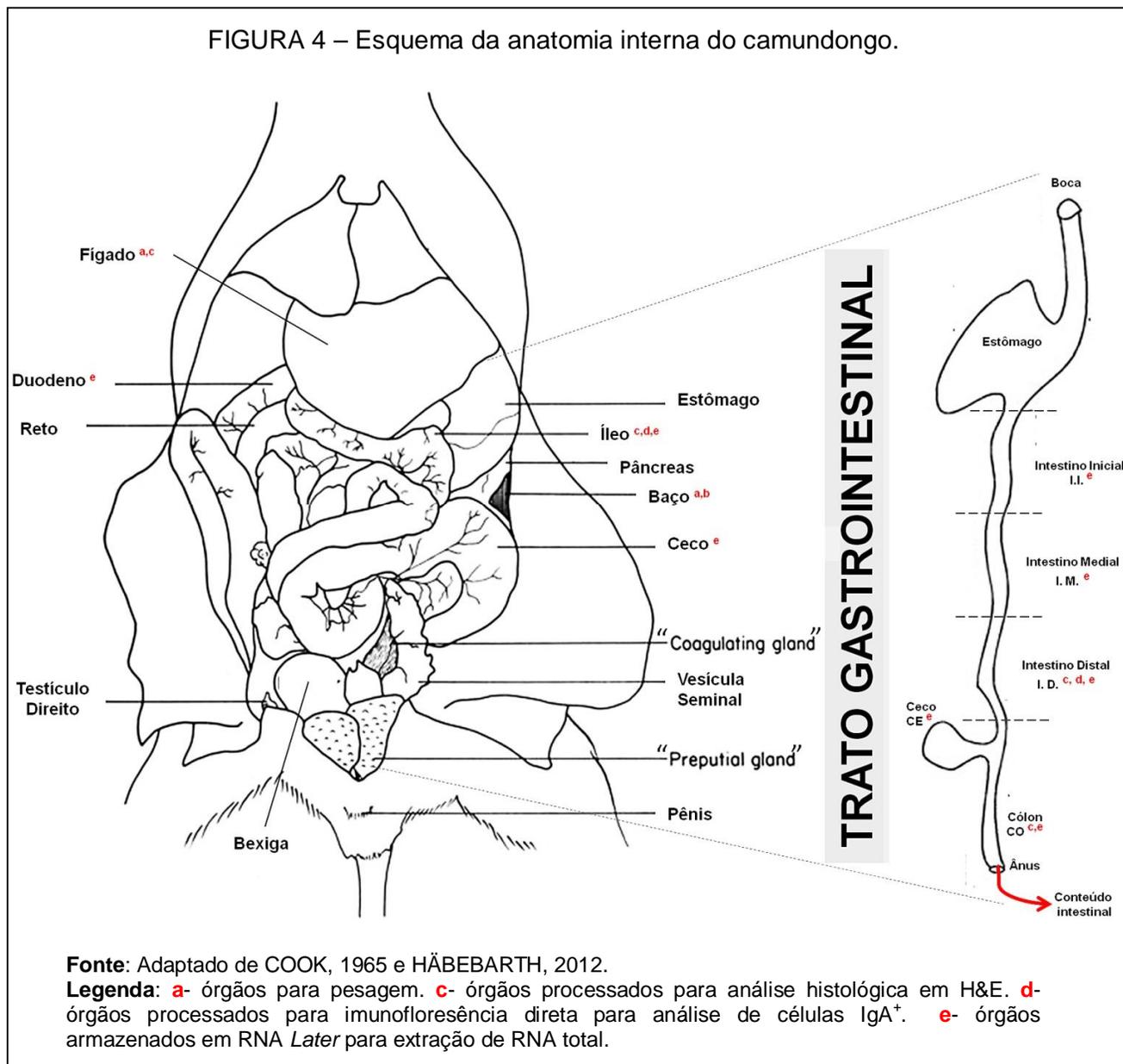
Para o exame histológico, foram obtidas imagens utilizando uma microcâmara JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente, por uma mesma patologista (Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, NIPE, do Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.

Um esquema geral da localização dos órgãos do camundongo e do destino de cada amostra biológica obtida nos ensaios está resumido na FIGURA 4.

4.9 Extração de RNA total, tratamento para remoção de DNA gênomico e produção de cDNA a partir de tecido das porções do intestino de animais CV e gnotobióticos

Foram coletados no 9º dia após o desafio de animais CV e no 10º dia após a monoassociação em animais gnotobióticos, pedaços de 1-2 cm de comprimento das porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon, armazenados em RNA Later a -20°C até o momento da extração. O protocolo de extração de RNA

total, para todos os materiais biológicos, foi realizado usando o reagente TRIZOL® seguindo as recomendações do fabricante.



O RNA total extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, para avaliação do estado de degradação e foi quantificado por espectrometria usando o equipamento NanoDrop (Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Foram utilizadas amostras que apresentaram quantificação acima de 200 µg/mL de RNA, relação de A260/A280 entre 1,7-2,1 e uma relação geral de 2x de intensidade da banda do

rRNA 28s em relação a banda do rRNA 18s nos géis de eletroforese. 10 µg de RNA total obtido de amostras das diferentes porções intestinais foi submetido à remoção de DNA genômico usando o kit Turbo DNase I (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total tratado foi usado em reações de *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) para produção de cDNA usando o kit High Capacity (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações de transcrição reversa foram feitas no mesmo dia e com o mesmo lote de reagentes. Foi utilizado 1µg de RNA para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20°C.

4.10 Padronização da quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongo CV e gnotobióticos usando RT-qPCR

Foram realizadas quantificações relativas através da amplificação por RT-qPCR do cDNA codificado pelos genes da IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa para as amostras de tecido obtidas das porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon. Foram usados para normalização dos dados de expressão gênica os resultados das amplificações do cDNA codificado pelos genes Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e Actb (Beta-actina). As reações de RT-qPCR foram feitas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA) pertencente ao Departamento de Biologia Geral-ICB/UFMG. As reações foram realizadas usando o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Techonologis), *primers* descritos por Giulietti et al., (2001), para cada um dos genes e o cDNA obtido do RNA total das diferentes porções intestinais.

Devido à contaminação com DNA genômico pelo método de extração usando o TRIZOL ® e também pela amplificação dos genes Gapdh e Actb usando os *primers* descritos por Giulietti et al., (2001) a partir de material genômico, foi realizado o tratamento das amostras de RNA total usando Turbo DNase I (Life Techonologis). O tratamento com Turbo DNase I foi feito seguindo as

recomendações do fabricante. Foi possível averiguar, através de reações teste de qPCR usando como material de amplificação RNA total tratado e não tratado com Turbo DNase I que, houve uma acentuada remoção de DNA gênomico das amostras, mesmo que não totalmente. O tratamento não acarretou em prejuízos para qualidade e estado de degradação do RNA total. Essa remoção pode ser observada pelo aumento de 23 C_{qs} tanto para amplificação de Gapdh e de Actb nas amostras de RNA tratado. Esse aumento de C_q evidencia uma redução de moléculas de DNA gênomico na ordem de 10^7 moléculas de DNA na amostra de RNA total. Isso se explica, pois, em reações com eficiência aproximadamente igual a 100% cada aumento de C_q indica uma redução pela metade do número de moléculas alvo na amostra inicial de amplificação. Além disso, ao comparar a amplificação de cDNAs obtidos de RNAs totais tratados e não-tratados com Turbo DNase I, foi observada uma diferença de aproximadamente 5 C_{qs} para dados de amplificação de Gapdh e de Actb, que permitem uma averiguação mais confiável dos dados de expressão, já que estes poderiam ser superestimados devido a amplificação de DNA gênomico. Para os *primers* que não amplificam DNA gênomico esses achados não foram observados. Os resultados destes testes estão exemplificados na FIGURA 5, com dados de amplificação de Gapdh, que usa *primers* que amplificam DNA gênomico e de IL10, cujos *primers* não amplifica DNA gênomico.

Para padronização das reações foram feitas curvas de diluição seriada de cDNA utilizando pontos contendo 50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng de cDNA. Nas reações de padronização foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total das diferentes porções intestinais analisadas (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) adicionadas em igual proporção. Essas curvas de diluição foram feitas para cada um dos genes. Os padrões para avaliação da qualidade das reações foram a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação. As reações tiveram sua eficiência (E) calculada através da inclinação (*slope*) da curva de diluição (quantidade) do cDNA *versus* C_q (ciclo de quantificação ou C_t), através da equação (2):

$$E_{(\%)} = [(10)^{-1/slope} - 1] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A especificidade das reações foi avaliada através da curva de dissociação. Foram padronizadas condições, para cada um dos genes amplificados, com eficiência entre 90-110% e com um único pico nas curvas de dissociação. Na FIGURA 6 estão representadas de curvas de amplificação, curvas de diluição seriada de cDNA e curva de dissociação obtidas durante a padronização das reações de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão de *Tgfb1*, como exemplo dos resultados obtidos.

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

As condições de padronização e sequencias de cada par de *primers*, bem como as eficiências das reações, temperatura de anelamento e tamanho do *amplicon* produzidos na amplificação de cada gene padronizado estão resumidos na TABELA 2. As reações de amplificação para *IL10*, *Tnfa* e *Tgfb1* não apresentaram eficiência dentro da faixa de 90-110% preconizada (80, 83 e 88% respectivamente). Porém, por apresentarem bons resultados de especificidade e reprodutibilidade foi feita a quantificação com a condição padronizada aqui, usando os valores específicos de eficiência no cálculo dos níveis relativos de expressão.

TABELA 2 – Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de intestino de camundongos CV e gnotobióticos.

Gene	Sequencia dos <i>primers</i>	[<i>primer</i>] (μ M)	Eficiência (%)	T° de anelamento	Tamanho do <i>amplicon</i>
Gapdh	F TCACCACCATGGAGAAGGC	0,5	92,1	60° C	168 bp
	R GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA				
Actb	F AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	0,5	90,1	60° C	138 bp
	R CAATAGTGATGACCTGGCCGT				
IL5	F AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT	0,5	102,4	60° C	117 bp
	R TCCAATGCATAGCTGGTGATTT				
IL6	F GAGGATACCACTCCCAACAGACC	0,3	99,8	60° C	141 bp
	R AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA				
IL10	F GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	0,75	80,0*	60° C	191 bp
	R ACCTGCTCCACTGCCTTGCT				
IL12b	F GGAAGCACGGCAGCAGAATA	1,0	104,7	60° C	180 bp
	R AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG				
IL17a	F GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	0,75	91,5	60° C	142 bp
	R AGCTTTCCCTCCGCATTGA				
Ifn γ	F TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	0,75	103,9	60° C	92 bp
	R TGGCTCTGCAGGATTTTCATG				
Tgfb1	F TGACGTCAGTGGAGTTGTACGG	0,5	88,0*	60° C	170 bp
	R GGTTTCATGTCATGGATGGTGC				
Tnfa	F CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	0,75	83,0*	60° C	175 bp
	R TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC				

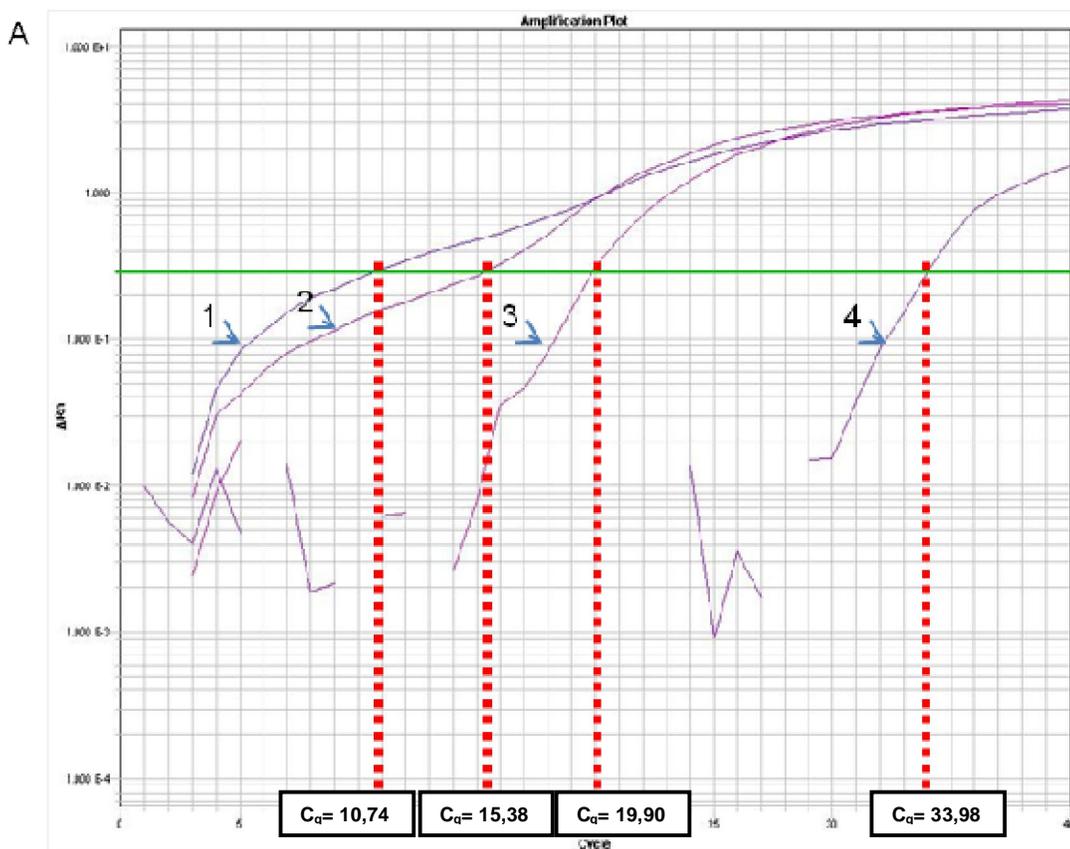
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: bp- *base pair*. F- *primer forward*. R- *primer reverse*. Para padronização das reações foram feitas curvas de diluição seriada de cDNA utilizando pontos contendo 50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng de cDNA. Nas reações de padronização foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total das diferentes porções intestinais analisadas (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) adicionadas em igual proporção.

* - reações com eficiência fora da faixa preconizada de 90-110% mas que apresentaram bons parâmetros de especificidade e reprodutibilidade e, foram usados nas condições descritas.

FIGURA 5 – Teste de amplificação de RNA total tratado e não-tratado com Turbo DNase I e de cDNA obtidos de RNA total tratado e não-tratado para avaliar o efeito da remoção de DNA gênomico sobre os resultados de amplificação por RT-qPCR.

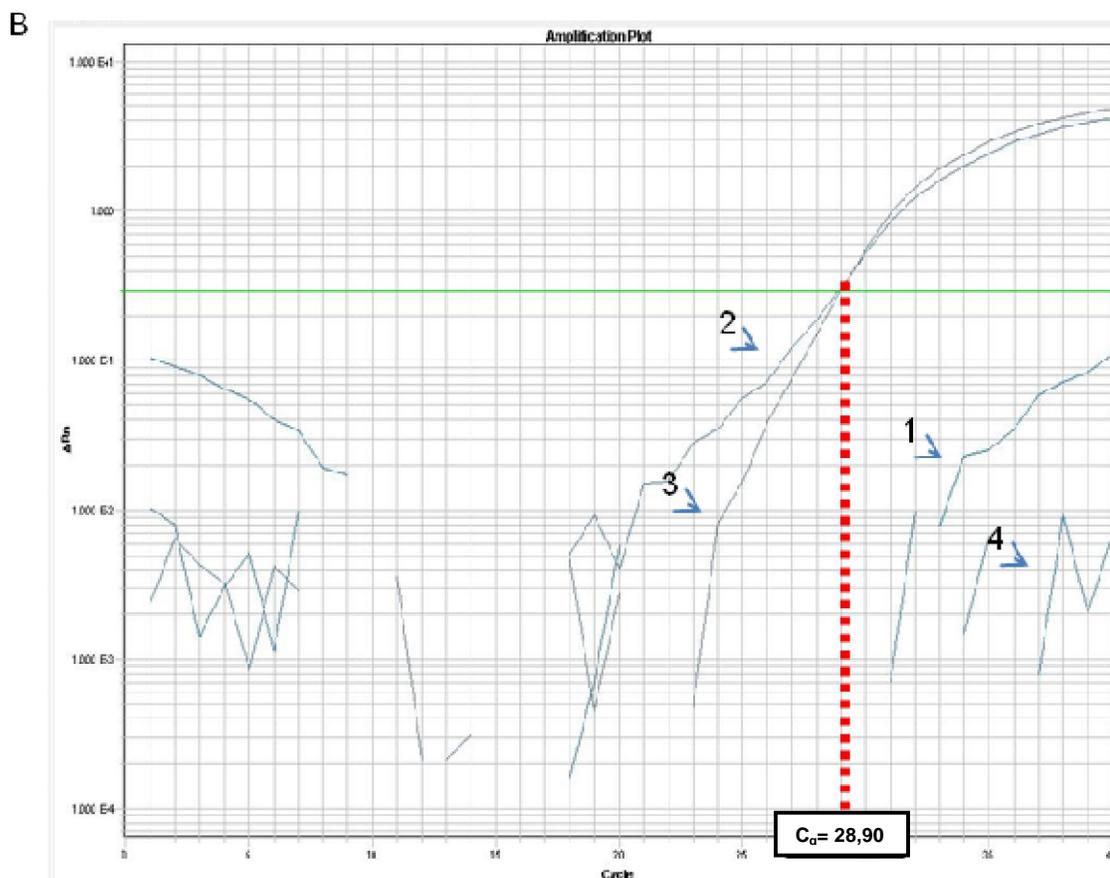
(continua)



Fonte: Criado pelo autor de dados obtidos do programa SDS 2.4 (Life Technologis)

Legenda: A- Curva de amplificação usando o *primer* para Gapdh (*primer* amplifica DNA gênomico): 1: RNA puro (50 ng) sem tratamento com Turbo DNase I ; 2: cDNA (50ng) produzido a partir de RNA não tratado com Turbo DNase I ; 3: cDNA (50ng) produzindo a partir de RNA tratado com Turbo DNase I ; 4: RNA puro (50 ng) tratado com Turbo DNase I . Nessas reações foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total das diferentes porções intestinais analisadas (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) adicionadas em igual proporção, bem como a amostra de RNA correspondente. No gráfico está representado no eixo X os valores dos ciclos de amplificação, no Y os valores de ΔRn que são medidas de fluorescência e a linha verde representa o *threshold* ou limiar de fluorescência usado para determinação do C_t .

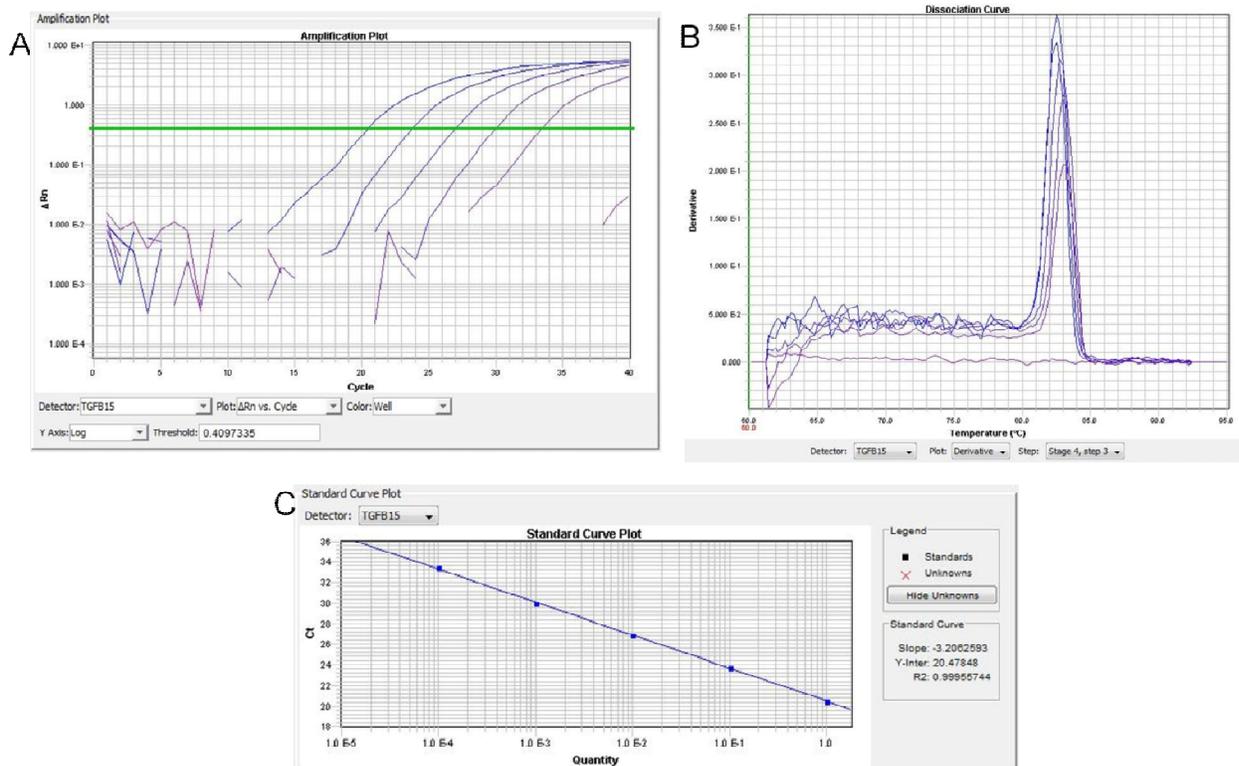
(continuação)



Fonte: Criado pelo autor de dados obtidos do programa SDS 2.4 (Life Technonogis)

Legenda: B- Curva de amplificação usando o primer para IL10 (*primer* não amplifica DNA genômico): 1: RNA puro (50 ng) sem tratamento com Turbo DNase I ; 2: cDNA (50ng) produzido a partir de RNA não tratado com Turbo DNase I ; 3: cDNA (50ng) produzindo a partir de RNA tratado com Turbo DNase I ; 4: RNA puro (50 ng) tratado com Turbo DNase I. Nessas reações foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total das diferentes porções intestinais analisadas (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) adicionadas em igual proporção, bem como a amostra de RNA correspondente. No gráfico está representado no eixo X os valores dos ciclos de amplificação, no Y os valores de ΔRn que são medidas de fluorescência e a linha verde representa o *threshold* ou limiar de fluorescência usado para determinação do C_q.

FIGURA 6 – Curvas de amplificação, dissociação e de diluição de cDNA de *Tgfb1* amplificado em amostras de cDNA obtidas de RNA total de amostras de intestino murino.



Fonte: Criado pelo autor a partir de dados obtidos do programa SDS 2.4 (Life Techonologies)

Legenda: **A-** Curva de amplificação da série de diluição de cDNA amplificado para o gene do *Tgfb1* com linhas roxas representando a amplificação de diferentes quantidades de cDNA (50, 5, 0,5, 0,05 e 0,005 ng). Nessa reação foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total das diferentes porções intestinais analisadas (intestino inicial, medial e distal, ceco e cólon) adicionadas em igual proporção. No gráfico está representado no eixo X os valores dos ciclos de amplificação, no Y os valores de ΔRn que são medidas de fluorescência e a linha verde representa o *threshold* ou limiar de fluorescência usado para determinação do C_q .

B- Curva de dissociação com pico representando o ponto de dissociação do produto amplificado para *Tgfb1*. No gráfico está representado no eixo X os valores de temperatura, no Y os valores de ΔRn que são medidas de fluorescência. O pico corresponde a temperatura na qual 50% do produto de amplificação está renaturado e 50% desnaturado, e essa temperatura é chamada de temperatura de *melting*.

C- Curva de diluição (quantidade) de cDNA versus C_t (C_q) de amplificação das diferentes quantidades de cDNA. Cada ponto representa a associação de um C_q com um ponto de quantidade de cDNA. A inclinação (*slope*) desta curva foi utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação.

4.11 Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais em animais gnotobióticos e CV sobre a expressão relativa dos genes de referência Gapdh e Actb

Para assegurar uma normalização adequada dos dados de expressão relativa das citocinas, foi avaliado o possível efeito dos tratamentos experimentais em animais isentos de germes (monoassociação com L38 ou L36) e animais convencionais (desafio com *Salmonella* e tratamento diário com os isolados de *Lactobacillus*) sobre a expressão relativa dos genes de referência Gapdh e Actb. Para este fim, os dados de amplificação (C_q) destes genes em amostras de intestino de todos os ensaios animais foram submetidas ao método do $2^{-\Delta C_q}$, no qual $\Delta C_q = (C_q \text{ do gene de referência na amostra teste}) - (C_q \text{ do gene de referência no calibrador})$ (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). Uma adaptação desta abordagem foi feita para inserção do valor real de eficiência ($1+E_{(\%)}$) no lugar da base 2, que predispõe eficiência de amplificação do gene normalizador de 100%. Nessa abordagem é calculado um valor relativo da expressão do gene referência em relação ao grupo usado como calibrador da expressão relativa. Para o experimento com animais isentos de germes o grupo calibrador usado foi o dos animais GF. Nos experimentos com animais convencionais, o grupo controle salina foi usado como calibrador. Depois de calculado o valor relativo de expressão para todos os grupos experimentais, foi feito um teste estatístico para averiguar se existem diferenças significativas da expressão do gene referência entre os diferentes grupos experimentais. Caso elas existam, o gene referência em questão sofre efeito na sua expressão do tratamento experimental, inviabilizando sua aplicação como normalizador dos dados de expressão gênica.

4.12 Quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de animais CV e gnotobióticos usando RT-qPCR

Para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, *Ifn γ* , *Tgfb1* e *Tnfa*, em amostras de cDNA oriundas de RNA total obtido de tecido intestinal, foi realizada amplificação do cDNA por RT-qPCR. Foram utilizadas as condições de reação padronizadas e descritas no item 4.10 desta seção. Para normalização dos dados de expressão, foram usados os resultados das amplificações do cDNA codificado pelos genes *Gapdh* e *Actb*, que foram os genes de referência usados neste trabalho. 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 (1):

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}]^{\Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Foi usado como calibrador os dados de expressão do grupo controle salina para os experimentos em animais CV e do grupo GF para os experimentos com animais gnotobióticos. Os resultados foram expressos graficamente usando média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de mRNA de cada citocina/ normalizado pelo fator de normalização, este último dado pela média geométrica das quantidades relativas de mRNA de *Gapdh* e *Actb*, para cada grupo experimental.

4.13 Análise Estatística dos dados

Para a produção de todos os gráficos e análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o *software* GraphPad Prism[®] 4 (GraphPad Software Inc.). Os valores

obtidos foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das distribuições. Foram obtidos as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Em seguida, foi realizado o teste *one-way* ANOVA para cada conjunto de dados em cada tipo de ensaio, para verificar se havia diferença entre as variâncias, e o pós-teste de Tukey, de múltiplas comparações, para verificar quais médias eram significativamente diferentes ($p < 0,05$). 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 ($p > 0,05$).

5 RESULTADOS

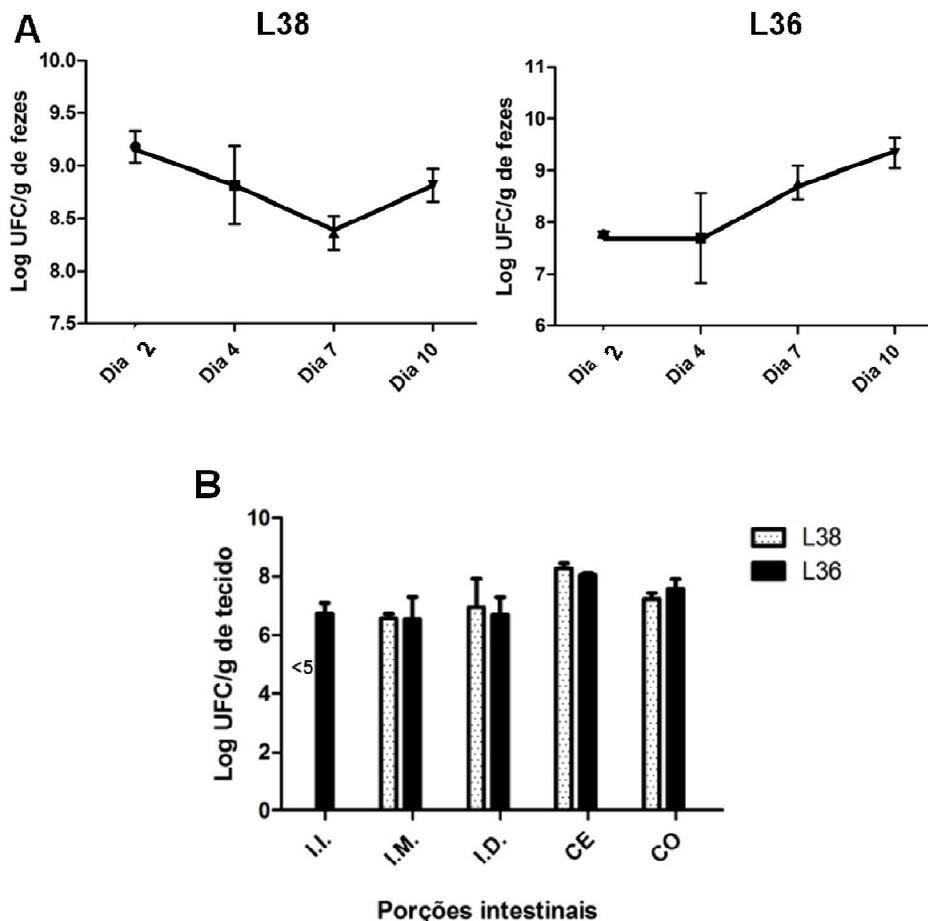
5.1 Experimentos com animais gnotobióticos monoassociados com um isolado de lactobacilos

5. 1. 1 Níveis populacionais e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados de *Lactobacillus* em animais gnotobióticos

Os níveis populacionais alcançados pelos isolados de *Lactobacillus* nas fezes dos animais gnotobióticos foram similares para ambos os isolados, com valores médios de $8,87 \pm 0,38$ Log UFC/g de fezes para L38 e $8,39 \pm 0,83$ Log UFC/g de fezes para L36. Esses resultados indicam que os dois isolados foram capazes de colonizar o trato digestivo de animais isentos de germes e de se manter em níveis elevados (acima de 10^7 UFC/g de fezes) ao longo dos 10 dias de acompanhamento do experimento de monoassociação (FIGURA 7A).

No décimo dia após a monoassociação foi analisada a capacidade de colonização dos isolados ao longo do trato gastrointestinal. A avaliação da colonização não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) para os resultados obtidos em cada uma das porções do intestino analisadas (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon), mesmo que os níveis populacionais de L36 e L38 tenham sido ligeiramente maiores no ceco, no qual foram observados valores de $8,25 \pm 0,18$ Log UFC/g de tecido para L38 e $8,03 \pm 0,07$ Log UFC/g de tecido para L36. Os resultados da análise da capacidade de colonização, para cada porção do intestino de animais gnotobióticos estão mostrados na FIGURA 7B. Para animais monoassociados com L38 a porção inicial do intestino delgado (I.I.) não apresentou crescimento nas placas, portanto o resultado foi mostrado com nível populacional < 5 Log UFC/g de tecido, pois neste ensaio só foram plaqueadas as diluições seriadas 10^{-5} e 10^{-6} do macerado de tecido intestinal.

FIGURA 7 - Níveis populacionais nas fezes e capacidade de colonização do trato gastrointestinal dos isolados L38 e L36 em animais gnotobióticos nas diferentes porções do intestino delgado e grosso.



Fonte: Dados da pesquisa.

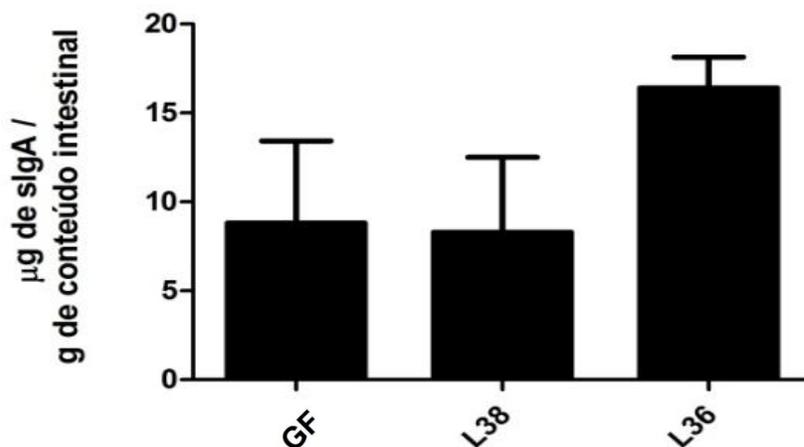
Legenda: A- Níveis populacionais de L38 e L36 nas fezes dos animais gnotobióticos avaliadas 2, 4, 7 e 10 dias após a monoassociação com os isolados. Os níveis populacionais foram avaliados a partir de diluições (em salina 0,85%) seriadas de fezes obtidas dos respectivos animais gnotobióticos e expressos como média e desvio-padrão de Log UFC/g de fezes. Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados os dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). As barras verticais indicam o desvio-padrão das médias. Ausências de letras sobre as barras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes pontos de avaliação ($p > 0,05$).

B- Capacidade de colonização de L38 e L36 avaliada no décimo dia após a monoassociação, nas diferentes porções do intestino delgado (I.I – intestino inicial, I.M. – intestino medial, I.D. – intestino distal) e grosso (CE- ceco e CO- cólon). Os níveis populacionais foram avaliados a partir de diluições (em salina 0,85%) seriadas de macerados dos tecidos intestinais obtidos dos respectivos animais gnotobióticos e expressos como média e desvio-padrão de Log UFC/g de tecido. No I.I. os níveis populacionais de L38 foram menores que 5 Log UFC/g de tecido. Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). As barras verticais indicam o desvio-padrão da média. Ausências de letras sobre as barras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os dados de cada porção e de cada grupo experimental ($p > 0,05$).

5. 1. 2 Efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados com L38 ou L36

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre as médias de produção de sIgA total no conteúdo intestinal de animais monoassociados com L38 ou L36 e de controles isentos de germes. Os resultados da avaliação da produção de sIgA, em animais monoassociados, foram expressos em μg de sIgA / g de conteúdo intestinal e estão mostrados na FIGURA 8.

FIGURA 8 - Produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos monoassociados com L38 ou L36.



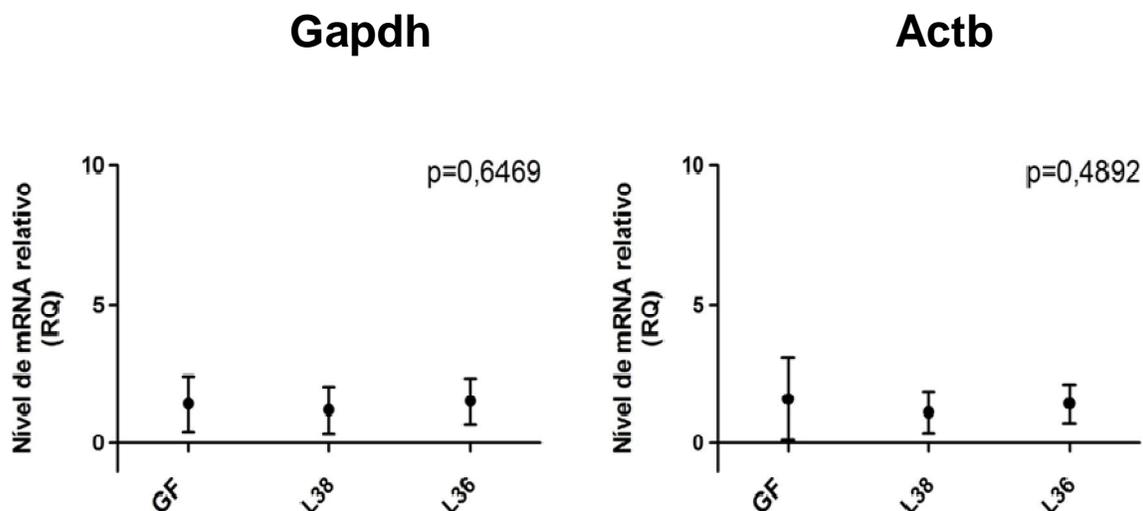
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) foi avaliada em ELISA para quantificação de IgA total, utilizando diluições de amostras de fluido intestinal obtido de animais gnotobióticos e isentos de germes sacrificados após 10 dias de monoassociação com 10^8 UFC dos isolados L36 ou L38. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão de μg de sIgA/ g de conteúdo intestinal, calculados a partir da curva padrão de IgA purificada. Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. No gráfico, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Ausências de letras sobre as barras iguais sinalizam inexistência de diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

5. 1. 3 Efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre a expressão de citocinas em porções do intestino de camundongos monoassociados com L38 ou L36 usando RT-qPCR

Os resultados dos efeitos dos isolados de *Lactobacillus* sobre a nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa foi expresso em quantidades médias relativas de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. A análise da expressão relativa dessas citocinas foi feita em cada uma das porções do intestino delgado (inicial, medial e distal) e do intestino grosso (ceco e cólon) de animais monoassociados com L38 ou L36, bem como dos controles isentos de germes. Não houve efeito dos tratamentos de monoassociação sobre a expressão relativa dos genes normalizadores (Gapdh e Actb), pois não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) de expressão relativa entre os grupos monoassociados e GF, como está mostrado na FIGURA 9. Portanto, os genes Gapdh e Actb foram usados com segurança para normalização dos dados de expressão de citocinas do tecido intestinal nos ensaios usando animais isentos de germes.

FIGURA 9 – Avaliação do efeito dos tratamentos de monoassociação com L38 ou L36 sobre a expressão relativa de Gapdh e Actb em animais isentos de germes.



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais (monoassociação com L36 ou L38) sobre a expressão relativa de Gapdh e de Actb utilizando o método do $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). Cada grupo experimental foi representado, nesta figura, como média e desvio-padrão dos dados relativos de expressão dos genes referência de todos os animais e de todas as porções (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) dos animais GF ou gnotobióticos da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). Os valores de expressão de cada gene normalizador foram relativizados pelos dados do grupo GF. Os resultados indicam ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na expressão desses genes no intestino, entre os diferentes tratamentos experimentais avaliados (monoassociação com L36 ou L38). Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão do nível de mRNA relativo de cada gene de referência. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. O valor de p foi obtido a partir de teste estatístico de comparação de médias e variâncias (ANOVA).

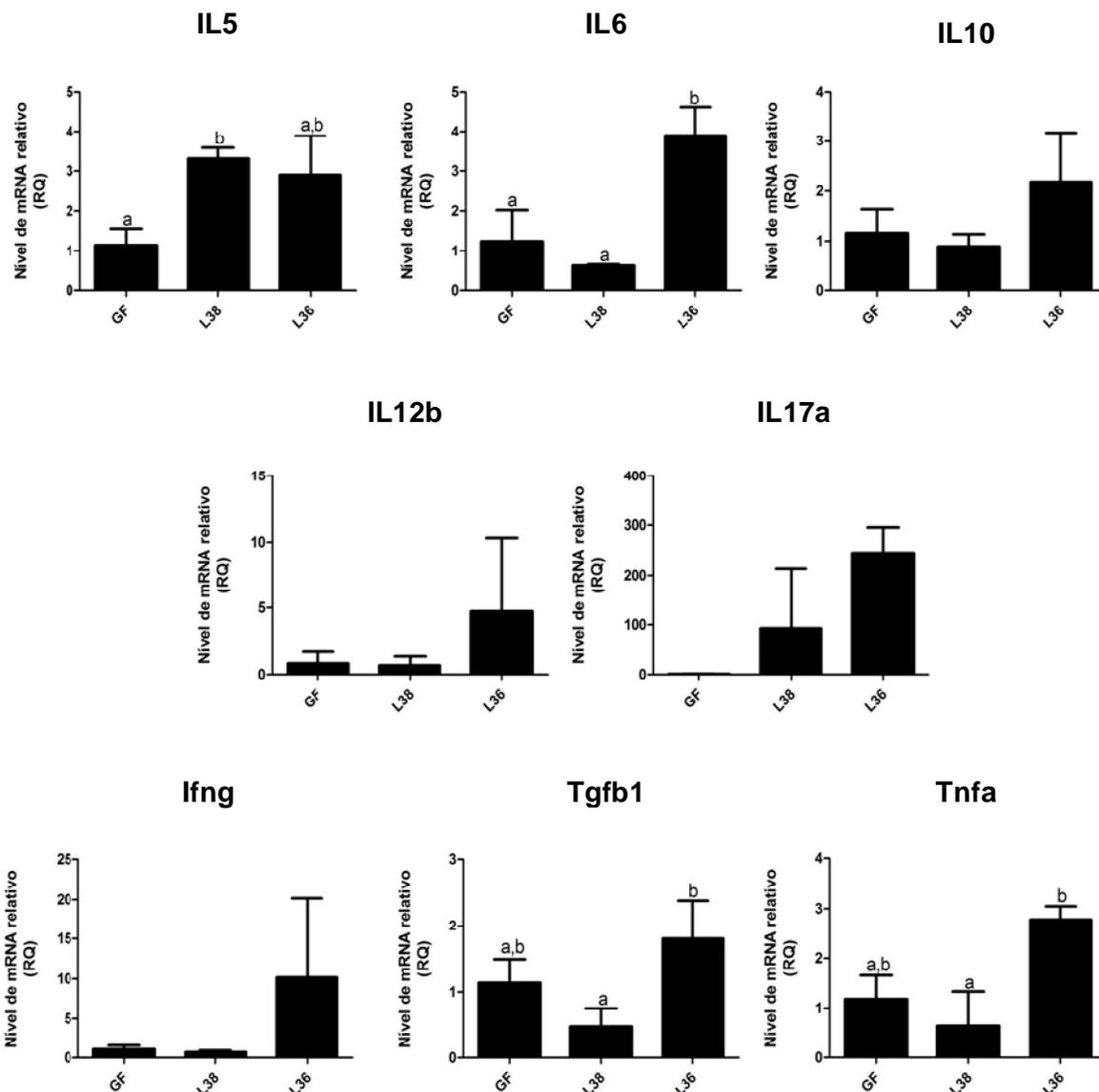
Os resultados da avaliação da expressão relativa das citocinas em animais monoassociados com L38 ou L36 estão mostrados na FIGURA 10. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram evidenciadas nos gráficos por letras diferentes sobre as barras verticais representativas dos desvios-padrão. Na porção inicial do intestino delgado (I.I.), L38 aumentou significativamente a expressão de IL5 enquanto que L36 aumentou a expressão de IL6. No intestino delgado medial (I.M.), ambos os isolados levaram a um aumento significativo da expressão de IL17a, sendo que L36 produziu um aumento significativamente maior que aquele induzido por L38. Além disso, nesta mesma porção, L36 produziu aumento na expressão de Tnfa. No intestino delgado distal (I.D.), foi observado aumento de IL17a por ambos os isolados, sem diferenças significativas entre o efeito de cada um. Nesta porção, L38

levou a aumento significativo da expressão de IL12b. No ceco (CE), apenas L36 produziu aumento significativo na expressão de IL5, Tgfb1 e Tnfa. Nesta porção não houveram dados da expressão de IL17a por falha de amplificação de todas as amostras, o que deve ser atribuído, provavelmente, à baixa expressão dessa citocina nesta porção. Por fim, no cólon (CO) foi observado um aumento significativo na expressão de IL6 e Ifng nos animais monoassociados com L38 e aumento da expressão de IL17a e Tnfa naqueles monoassociados com L36, bem como redução de IL12b em ambos os grupos monoassociados em relação ao grupo controle isento de germe. Os resultados significativos estão representados esquematicamente na FIGURA 11.

FIGURA 10 - Expressão relativa das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongos monoassociados com L38 ou L36, usando RT-qPCR.

A- Intestino Inicial

(continua)

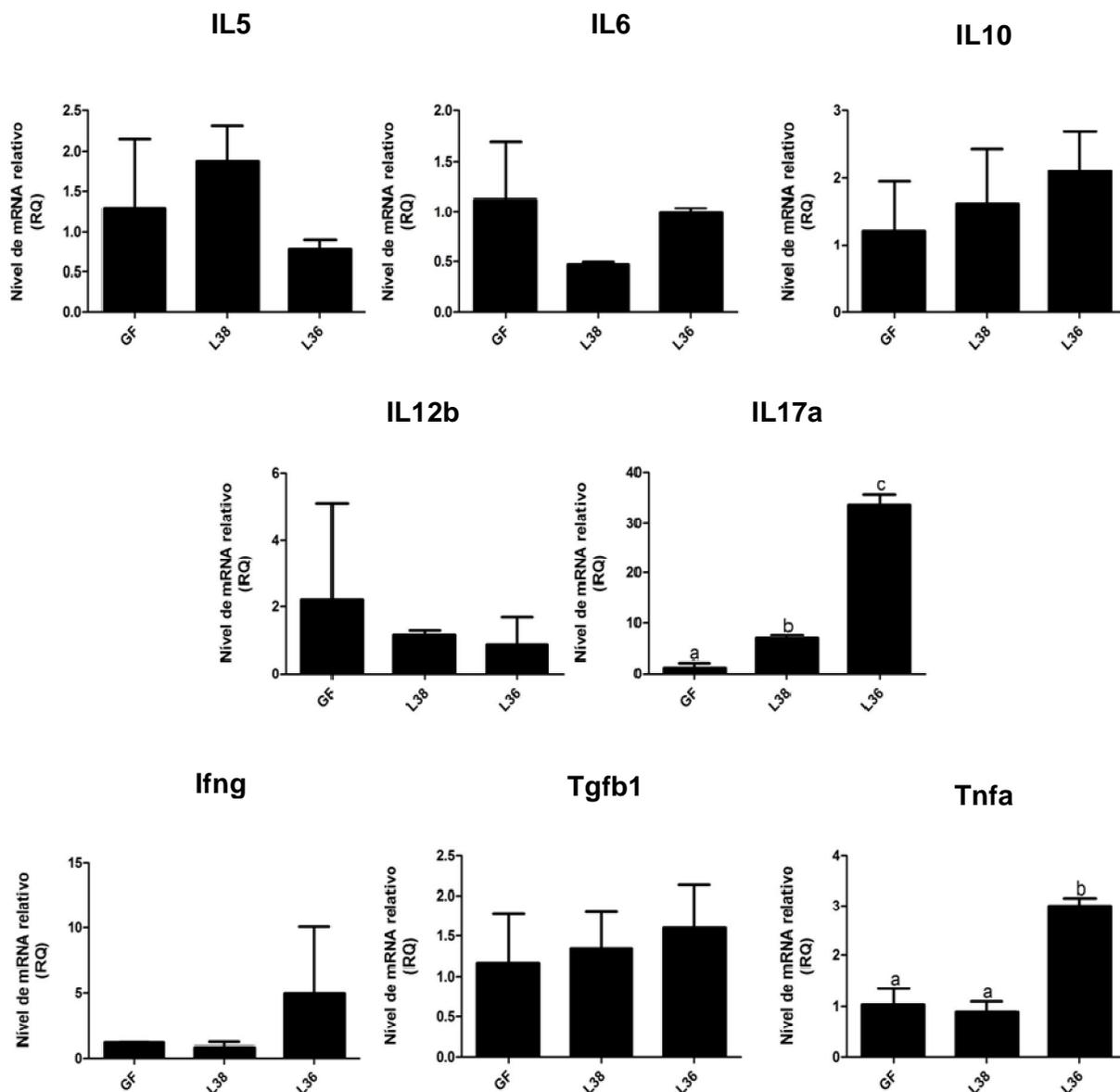


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

B- Intestino Medial

(continua)

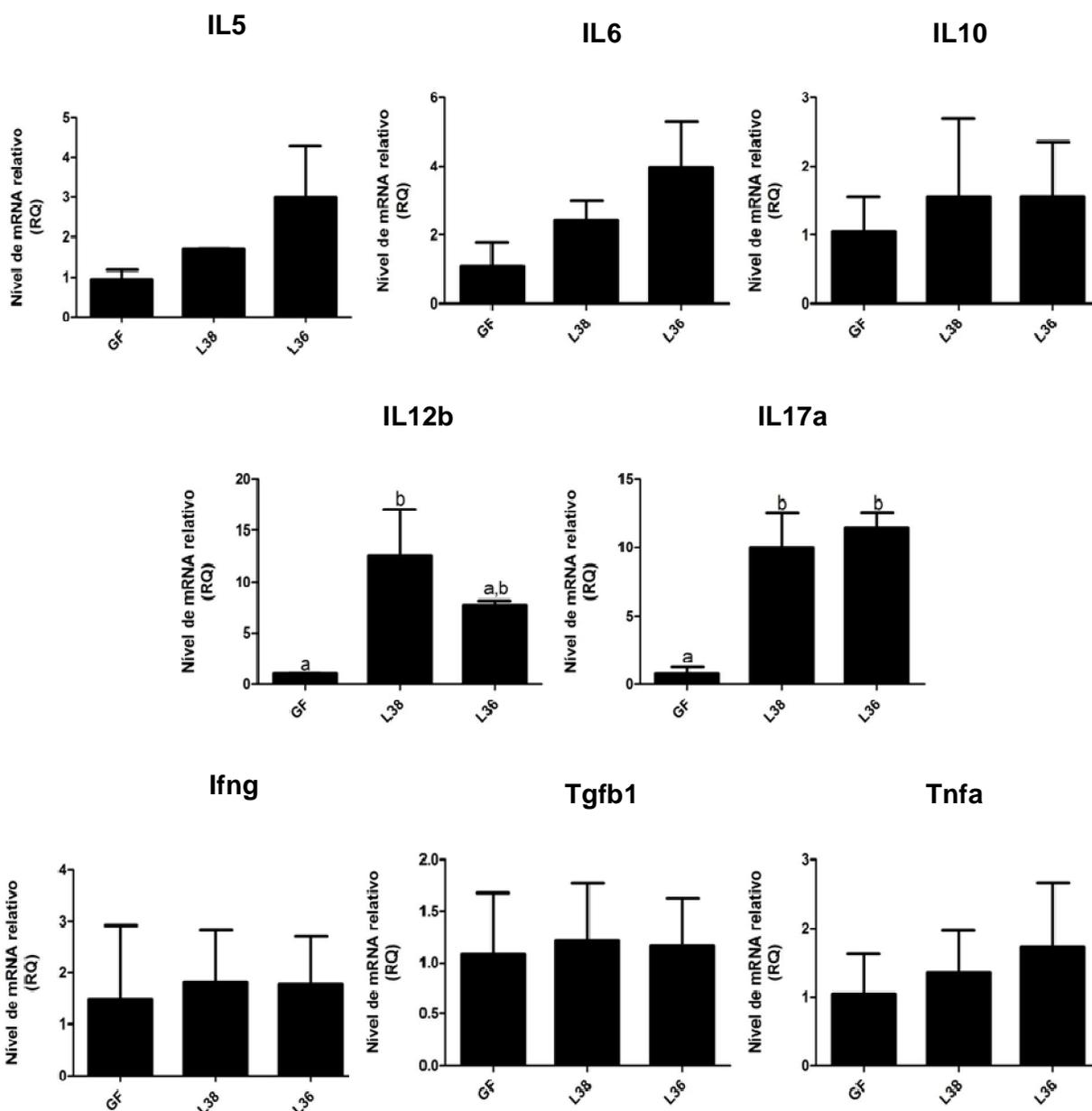


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellems et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

C- Intestino Distal

(continua)

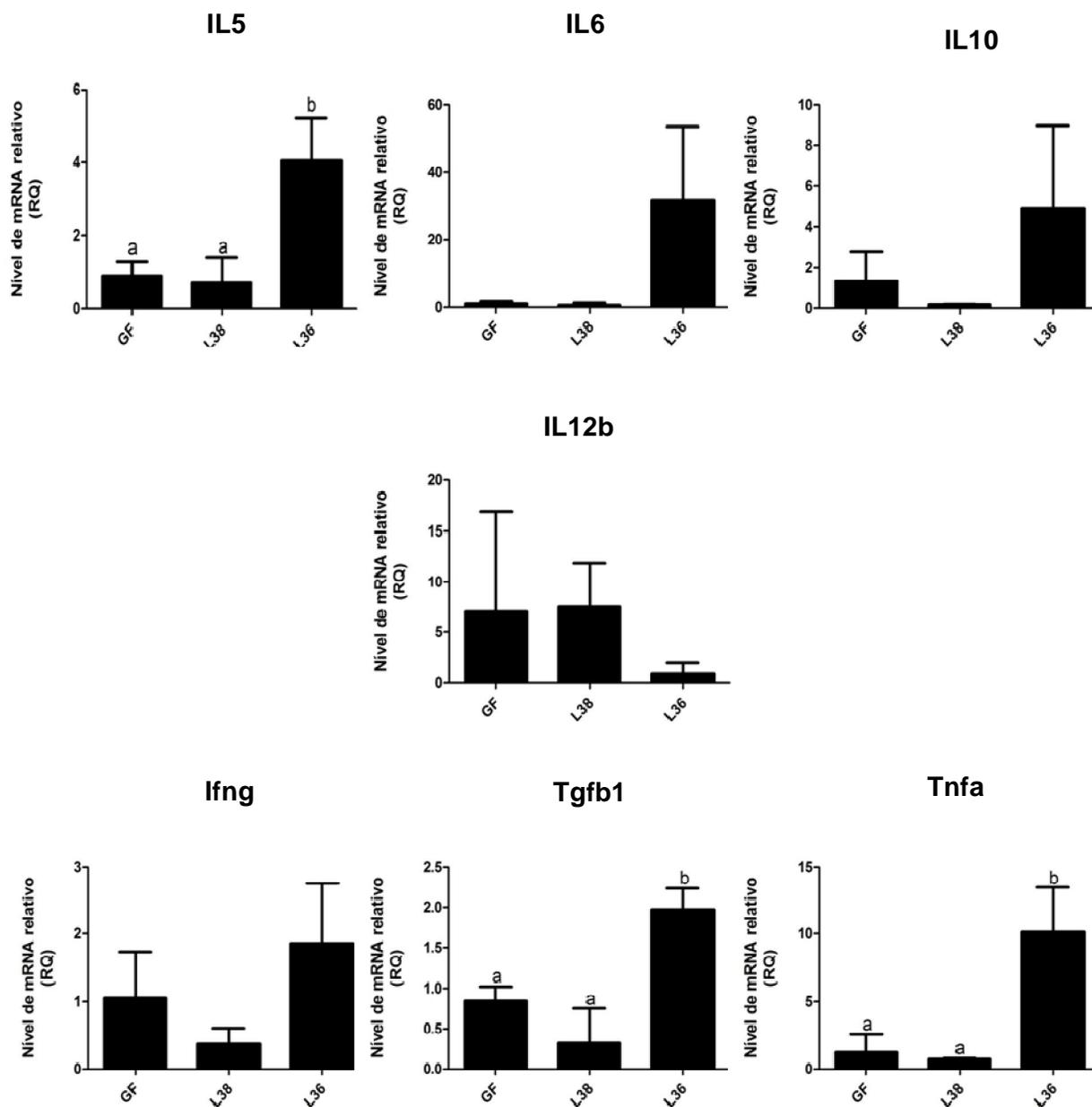


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

D- Ceco

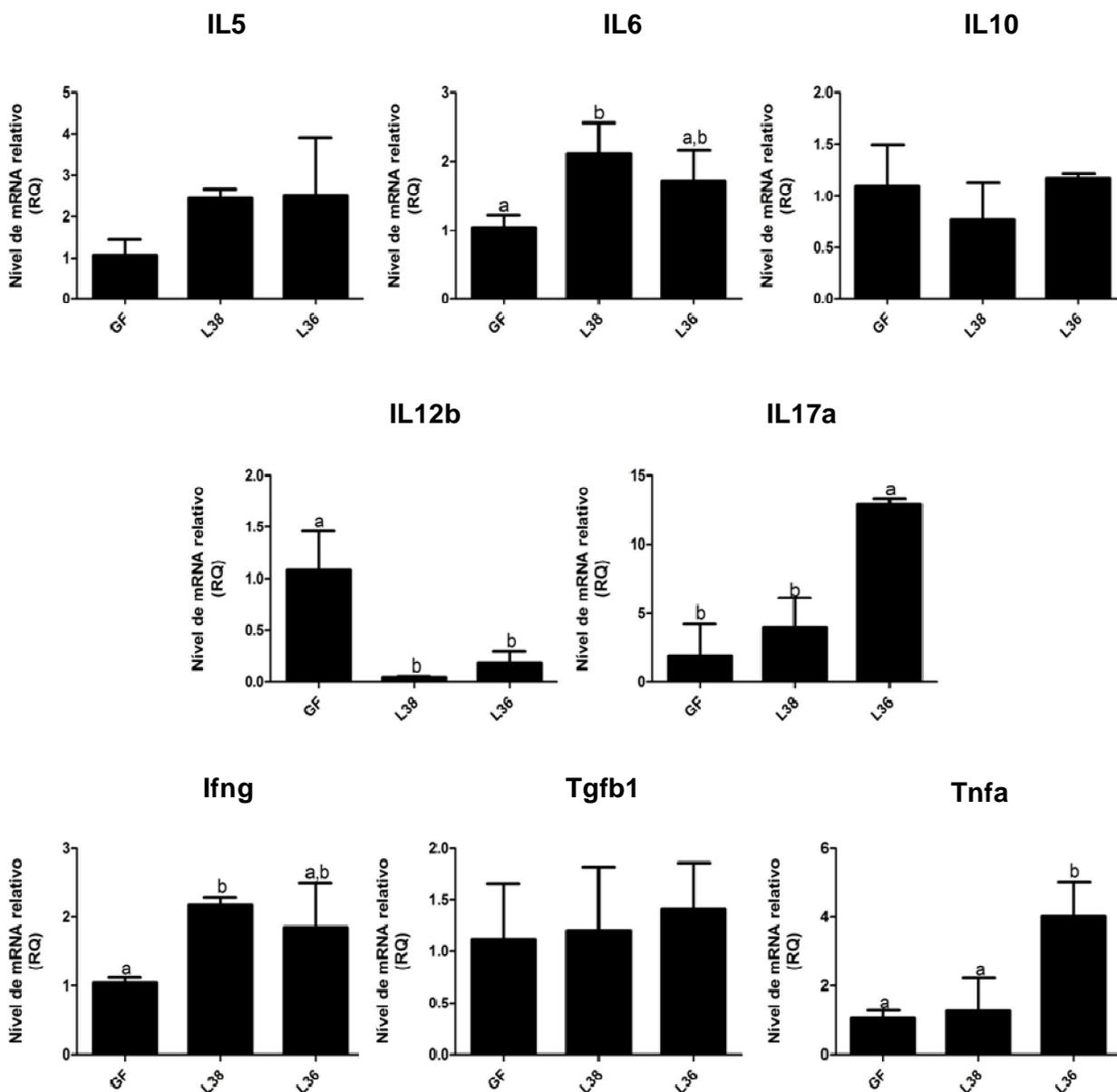
(continua)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Iľng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

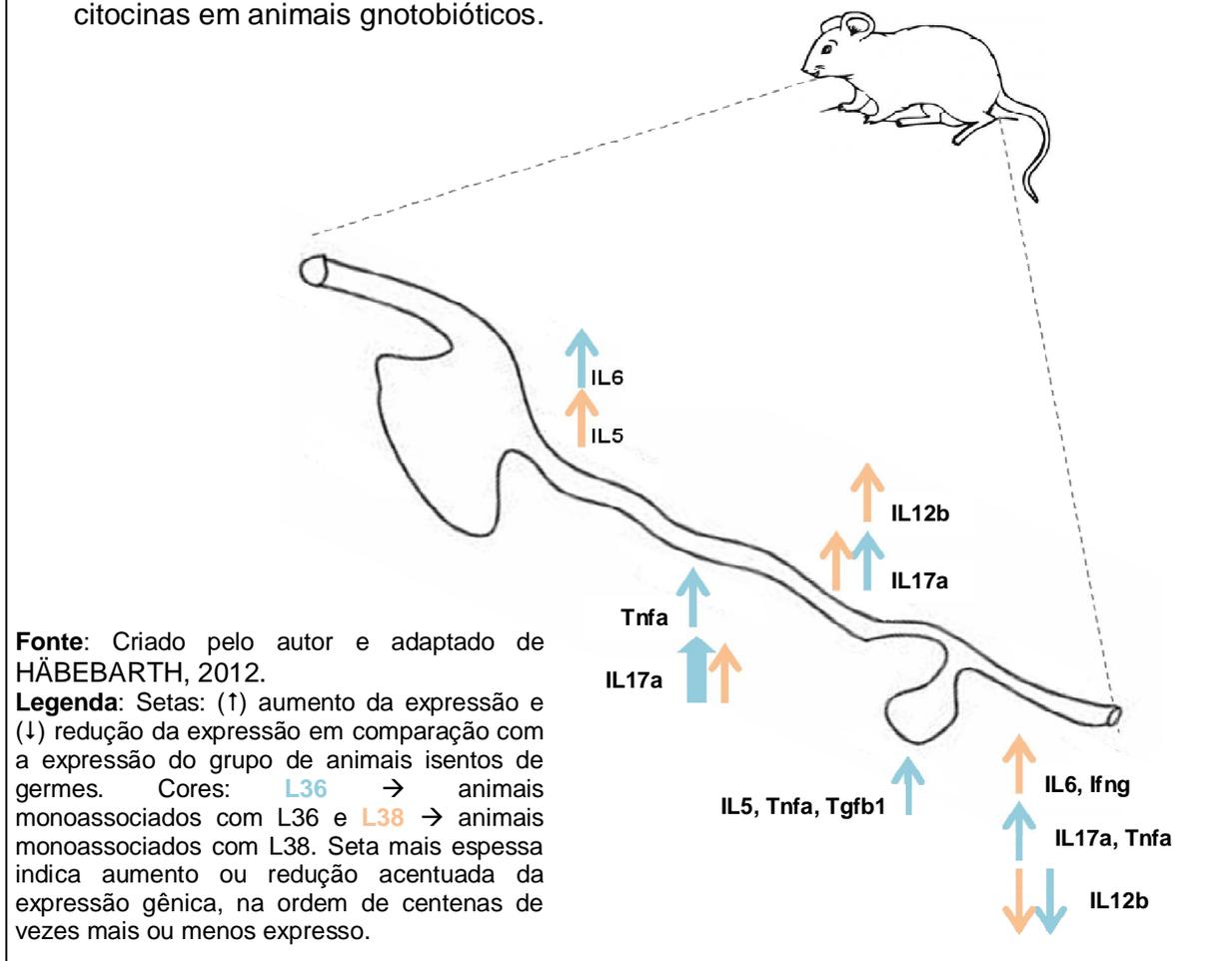
E- Cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais isentos de germes (GF). Cada grupo experimental foi composto por 3 fêmeas GF ou gnotobióticas da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle isento de germes (GF), monoassociado com L38 (L38) e monoassociado com L36 (L36). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

FIGURA 11 – Resumo esquemático do efeito de L36 e L38 na expressão de citocinas em animais gnotobióticos.



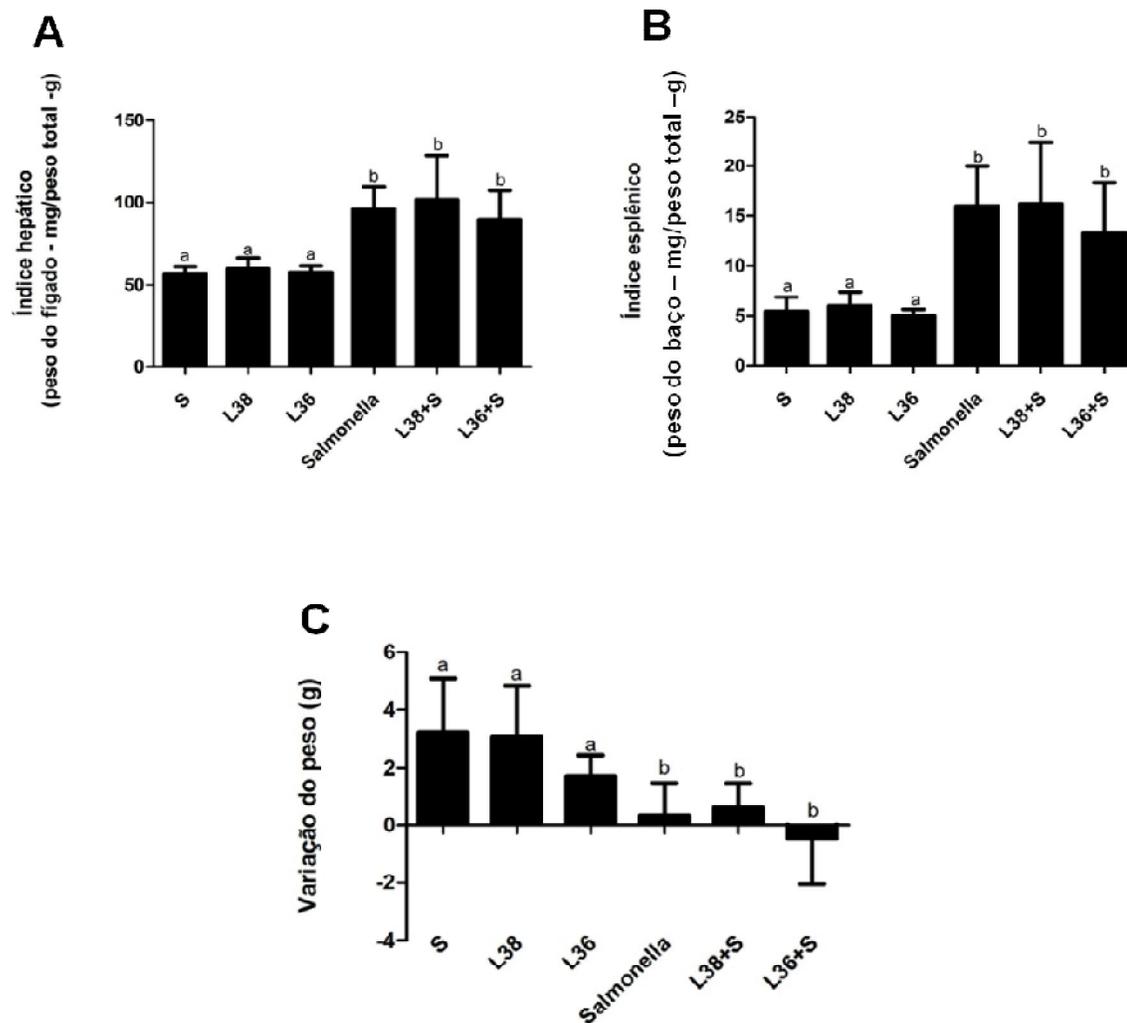
5.2 Experimentos com animais convencionais

5.2.1 Efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre os indicadores gerais de saúde em animais CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*

Foram quantificados tanto a variação do peso dos animais ao longo do experimento quanto os índices hepático e esplênico para avaliação do efeito dos isolados L36 e L38 sobre o status geral de saúde animal. Por isso, esses parâmetros foram chamados de indicadores gerais de saúde. Esses indicadores foram analisados em animais CV submetidos ao tratamento com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os animais experimentais (tratados com os isolados) e controles (não-tratados com os isolados), tanto no caso de animais desafiados como

aqueles que não foram desafiados com *Salmonella*. Além disso, os animais experimentais não desafiados não apresentaram mudanças perceptíveis em sua atividade, comportamento, brilho da pelagem, diarreia ou qualquer outro sinal clínico que poderia ser atribuído ao tratamento com os isolados. Porém, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para todos os indicadores entre os grupos desafiados em relação aos não desafiados. Os índices hepático e esplênico foram significativamente maiores nos animais desafiados em relação aos não desafiados, tanto para animais controle como para os experimentais. Todos os animais desafiados, tratados ou não com os isolados, apresentaram mudança de comportamento, tornando-se menos ativos e apresentando arrepiamento dos pelos do corpo e perda do seu brilho natural. Não foi observada diarreia em nenhum dos grupos desafiados. O ganho de peso em animais desafiados controle e desafiados tratados com L38 foi positivo, porém, estatisticamente menor em relação ao ganho de peso dos animais não desafiados. No grupo de animais desafiados e tratados com L36 ocorreu redução significativa do peso corporal ao longo do experimento. Os resultados para os indicadores gerais de saúde estão resumidos na FIGURA 12.

FIGURA 12 - Indicadores gerais de saúde (variação de peso corporal e índices hepático e esplênico) em animais CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A – Índice hepático expresso como média e desvio-padrão de mg de fígado / g de peso total final em animais CV tratados com salina (S) ou L38 ou L36, desafiados ou não com *Salmonella*.

B- Índice esplênico expresso como média e desvio-padrão de mg de baço / g de peso total final em animais CV tratados com salina (S) ou L38 ou L36, desafiados ou não com *Salmonella*.

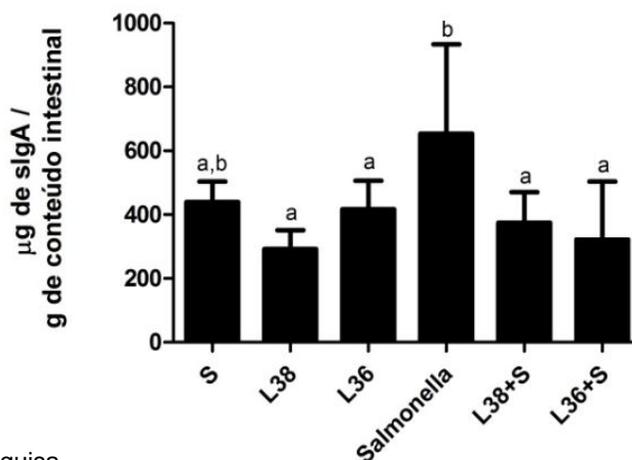
C – Variação do peso corporal expresso como média e desvio-padrão de g (peso final – Dia 20- subtraído do peso inicial – Dia 1) em animais CV tratados com salina (S) ou L38 ou L36, desafiados ou não com *Salmonella*.

Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L38+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

5. 2. 2 Efeito dos isolados de *Lactobacillus* sobre a produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*

A produção de sIgA no conteúdo intestinal (expressa em μg de sIgA/g de conteúdo intestinal) de camundongos CV controle salina ($439,28 \pm 64,12$) foi quase 50x maior que aquela observada em animais GF ($8,80 \pm 4,61$). Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os animais CV experimentais e os controles salina, nem entre os experimentais L38 e L36 desafiados (FIGURA 13). Uma tendência ($p>0,05$) de aumento foi detectada entre animais controles salina ($439,28 \pm 64,12$) e os controles desafiados com *Salmonella* ($653,45 \pm 280,1$). Uma redução significativa no nível de sIgA foi encontrada entre os animais experimentais desafiados e os animais controle *Salmonella*, para ambos os isolados (L38: $374,78 \pm 95,22$ e L36: $322,25 \pm 181,73$).

FIGURA 13 - Produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total dosada no conteúdo intestinal em camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A produção de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) foi avaliada em ELISA para quantificação de IgA total, utilizando diluições de amostras de fluido intestinal obtido de animais convencionais tratados com L36 ou L38 e desafiados com *Salmonella*. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão de μg de sIgA / g de conteúdo intestinal, calculados a partir da curva padrão de IgA purificada. Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) 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 ($p>0,05$).

5. 2 .3 *Efeitos dos isolados de Lactobacillus sobre aspectos histológicos do fígado, íleo distal e cólon de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com Salmonella*

O material histológico do íleo distal, cólon e fígado corado por H&E de todos os grupos foi muito homogêneo permitindo representar os grupos pelas fotomicrografias aqui descritas.

O grupo controle salina (não desafiado) apresenta aspecto habitual, sem alterações da parede da mucosa tanto no íleo distal como no cólon. A mucosa apresenta arquitetura íntegra além de celularidade habitual, com preservação das vilosidades e glândulas intestinais e sem alteração da borda em escova, bem como presença de células calciformes (FIGURA 14A). O fígado deste grupo apresenta, assim como a mucosa, aspecto normal (FIGURA 14B).

Nos grupos experimentais L36 ou L38, não desafiados, tratados apenas com os respectivos isolados, houve uma ligeira alteração da celularidade da lâmina própria, além de um discreto grau de edema e comprometimento relativamente difuso ao longo do íleo distal e do cólon, que pouco afetaram a integridade das vilosidades. Portanto, de forma geral, a arquitetura da mucosa intestinal nesses animais se manteve preservada (FIGURA 14C para L36 e 14D para L38). O fígado dos animais experimentais L36 ou L38 não desafiados foi preservado, sem grandes sinais de inflamação, degeneração ou translocação bacteriana, tendo aspecto similar ao do grupo controle salina (FIGURA 14B).

No grupo controle desafiado com *Salmonella* houve alteração da arquitetura da mucosa que se encontra achatada, às vezes erodida e com evidentes sinais de reparo no epitélio das vilosidades. Algumas vilosidades estão alargadas e outras fundidas, e há alteração do padrão habitual de espaçamento entre as vilosidades, algumas das quais apresentam sinais de atrofia evidente. No íleo desses animais foi observado edema da lâmina própria, ulceração intensa, destruição da arquitetura das vilosidades e perda de borda em escova dos enterócitos (FIGURAS 14E e 14F). O fígado deste grupo mostra intenso infiltrado inflamatório, às vezes com presença de eosinófilos e neutrófilos associados à necrose de grupos de hepatócitos. Foram

observados, também, intensa degeneração gordurosa microvascular difusa e formação de depósitos celulares de forma granulomatosa (FIGURA 14G).

Nos grupos experimentais tratados com L38 ou L36 e desafiados houve discreta preservação do íleo distal, porém ainda com pequenas áreas de descontinuidade da borda em escova e achatamento das vilosidades, que em alguns cortes, apresentaram arquitetura alterada. No entanto, o aspecto da mucosa é mais íntegro nestes grupos do que nos animais controle desafiados (FIGURA 14H para L36 e 14I para L38). Não houveram diferenças entre o aspecto histológico do fígado dos animais experimentais desafiados em relação ao controle desafiado com *Salmonella* (FIGURA 14J e 14K). Portanto, não foi possível quantificar diferenças significativas no aspecto dos cortes histológicos dos animais desafiados e tratados com L38 ou L36 em relação aos cortes de animais controle desafiados com *Salmonella*.

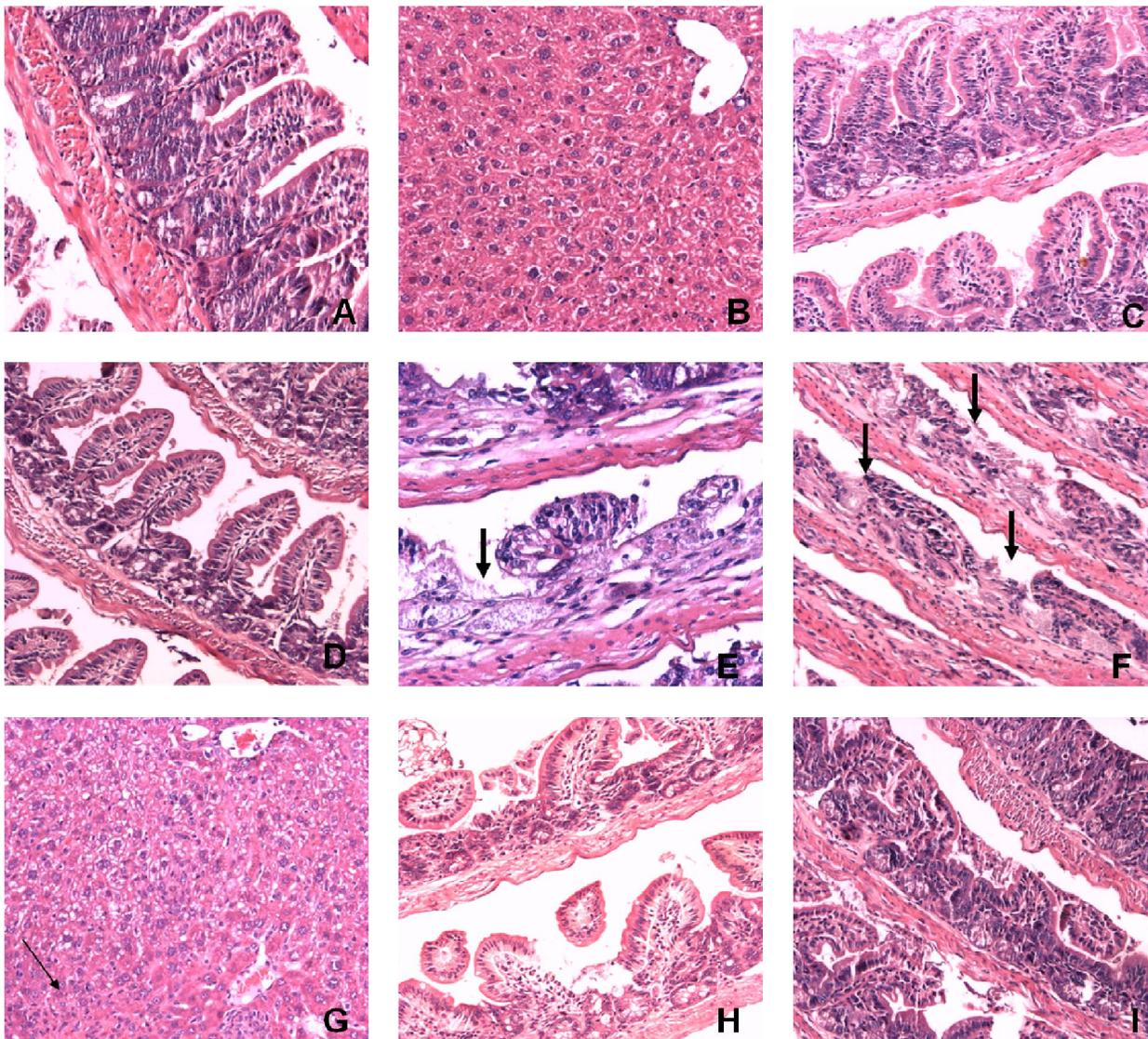
O aspecto do cólon em todos os animais desafiados não foi muito alterado, mantendo preservação da estrutura tecidual, no qual não houve observação de aspectos típicos de infecção bacteriana (FIGURA 14L-14O).

5. 2. 4 Efeito de isolados de *Lactobacillus* sobre a área de células produtoras de IgA (células IgA⁺) no íleo distal de animais CV desafiados com *Salmonella*

A proporção (%) da área ocupada por células produtoras de IgA (células IgA⁺) na área total dos cortes de íleo distal, entre os diferentes grupos experimentais, está mostrada na FIGURA 15. Não foram detectadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os animais experimentais tratados com L36 ou L38, os controles salina e os experimentais tratados e desafiados. Um aumento significativo ($p<0,05$) foi detectado entre animais controles salina ($1,53\% \pm 0,02$) e os controles desafiados com *Salmonella* ($2,66\% \pm 0,34$). Uma redução significativa na proporção da área de células IgA⁺ foi encontrada entre os animais experimentais tratados e desafiados e os animais controles desafiados, para ambos os isolados (L38: $0,85\% \pm 0,32$ e L36: $1,50\% \pm 0,76$). Na FIGURA 16 estão mostradas fotomicrografias da imunofluorescência direta usadas para quantificação da marcação de células IgA⁺.

FIGURA 14 – Fotomicrografias obtidas de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) do íleo distal, cólon e fígado de camundongos CV tratados com L36 ou L38 e desafiados com *Salmonella*.

(continua)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo controle não desafiado. Objetiva de 10x.

B - Fotomicrografia do fígado de animal representativo do grupo controle não desafiado. Objetiva de 10x.

C- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo experimental L36 não desafiado. Objetiva de 10x.

D- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo experimental L38 não desafiado. Objetiva de 10x.

E- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo controle desafiado. Objetiva de 10x.

F- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo controle desafiado. Objetiva de 20x.

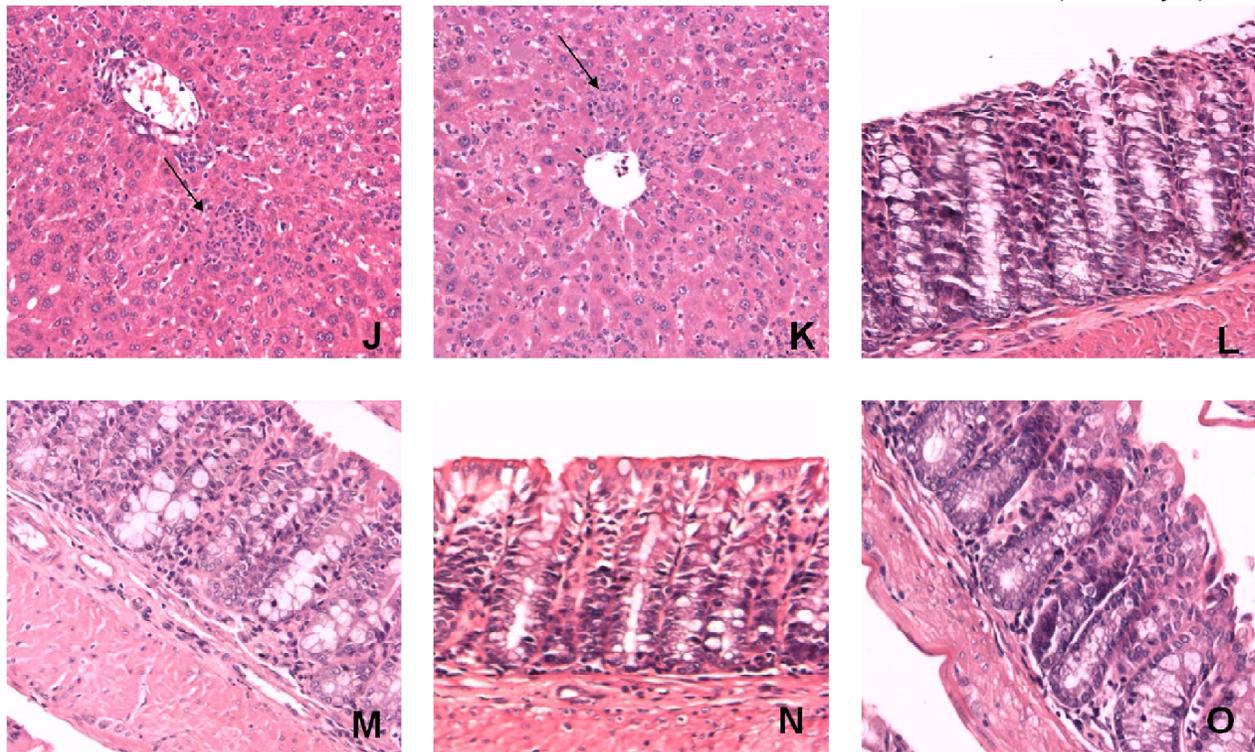
G - Fotomicrografia do fígado de animal representativo do grupo controle desafiado. Objetiva de 10x.

H- Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo experimental L36 desafiado. Objetiva de 10x.

I - Fotomicrografia do íleo distal de animal representativo do grupo experimental L38 desafiado. Objetiva de 10x.

* **Setas grossas** indicam ulceração extensa, falta de arquitetura das vilosidades, perda da borda em escova dos enterócitos e descamação luminal de restos celulares, além de edema da lâmina própria.

* **Setas finas** indicam infiltrado inflamatório no fígado (infiltrado difuso de células que perturba a arquitetura normal lobular do fígado). Coloração histológica de rotina por Hematoxilina e Eosina (H&E).



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: J- Fotomicrografia do fígado de animal representativo do grupo experimental L36 desafiado. Objetiva de 10x.

K - Fotomicrografia do fígado de animal representativo do grupo experimental L38 desafiado. Objetiva de 10x.

L- Fotomicrografia do cólon de animal representativo do grupo controle não desafiado. Objetiva de 10x.

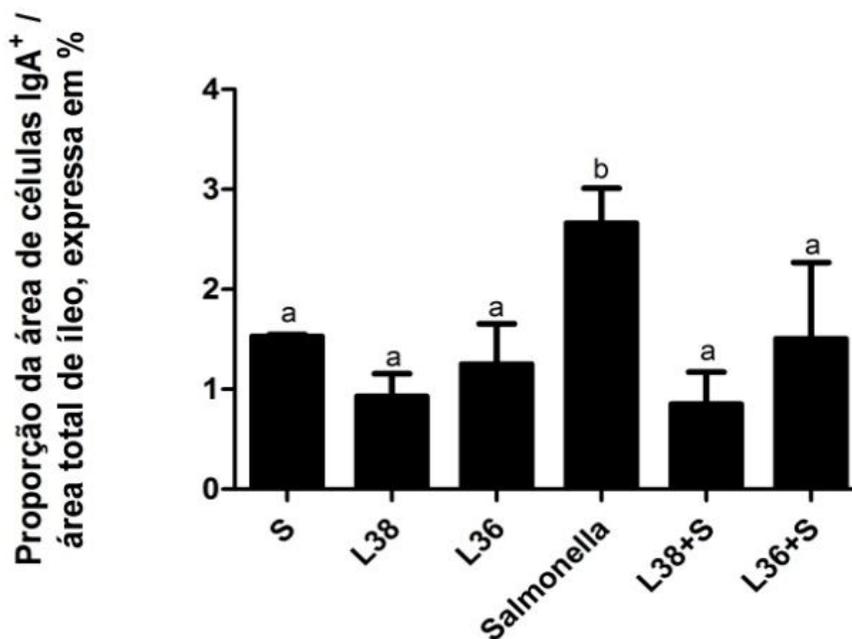
M- Fotomicrografia do cólon de animal representativo do grupo controle desafiado. Objetiva de 10x.

N- Fotomicrografia do cólon de animal representativo do grupo experimental L36 desafiado. Objetiva de 10x.

O- Fotomicrografia do cólon de animal representativo do grupo experimental L38 desafiado. Objetiva de 10x.

* **Setas finas** indicam infiltrado inflamatório no fígado (infiltrado difuso de células que perturba a arquitetura normal lobular do fígado). Coloração histológica de rotina por Hematoxilina e Eosina (H&E).

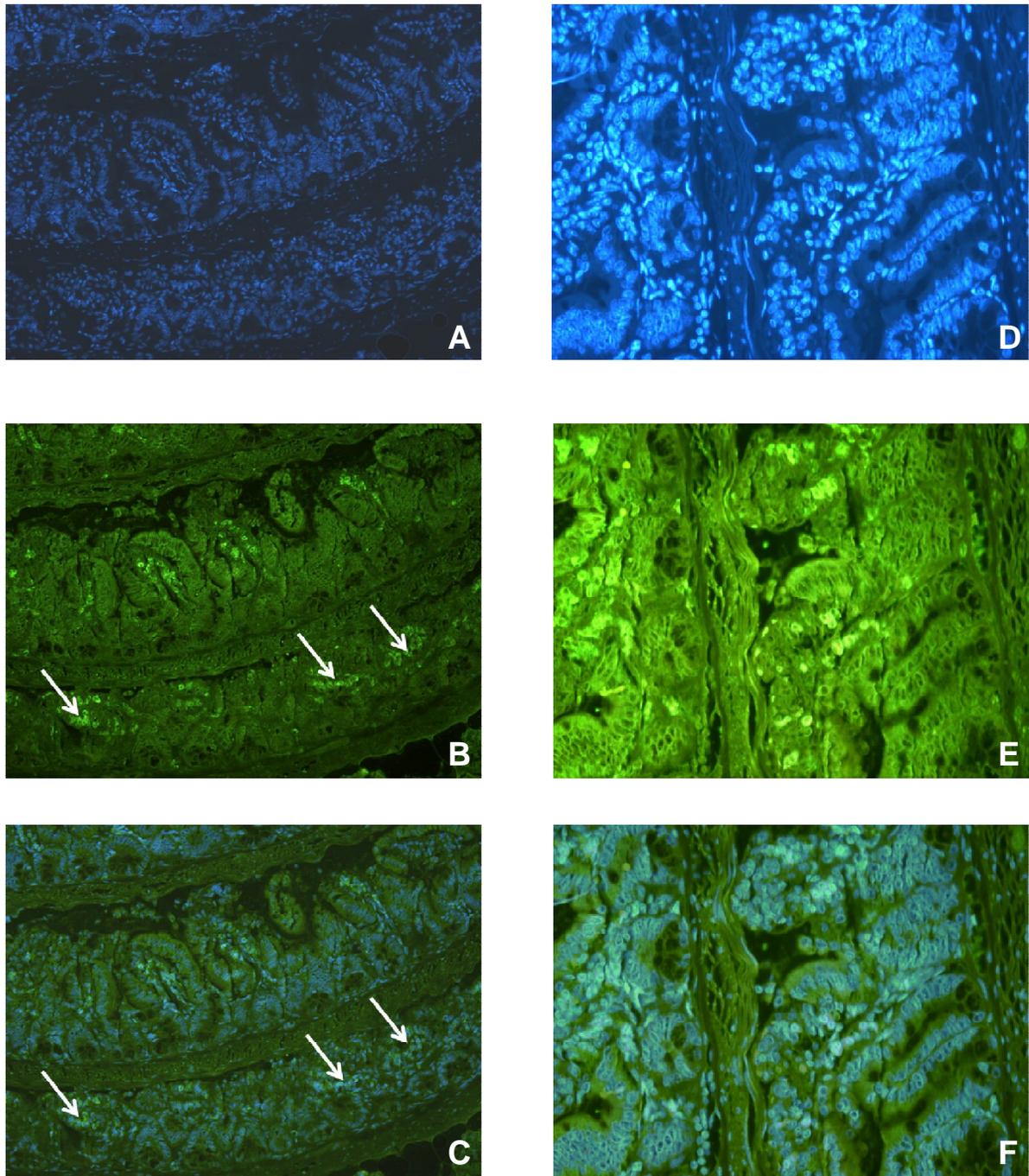
FIGURA 15 – Proporção da área de células produtoras de IgA (células IgA⁺) no íleo distal de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A proporção da área de células produtoras de IgA (células IgA⁺) no íleo distal foi avaliada em cortes histológicos de íleo marcados com anticorpo anti-IgA conjugado com FITC obtidos de animais convencionais tratados com L36 e L38 e desafiados com *Salmonella*. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão da proporção (em %) de área marcada de células IgA⁺ / área total de íleo. Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

FIGURA 16 – Fotomicrografias obtidas de lâminas histológicas de íleo distal através de marcação de células produtoras de IgA (células IgA⁺) por imunofluorescência direta usando anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado com FITC.



Fonte: Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes.

Legenda: A- Fotomicrografia de íleo distal com marcação de DNA nuclear com Hoechst 33342. Objetiva de 10x.

B- Fotomicrografia de íleo distal com marcação de células produtoras de IgA com FITC. Objetiva de 10x.

C- *Merge* (sobreposição) das fotomicrografias A e B.

D- Fotomicrografia de íleo distal com marcação de DNA nuclear com Hoechst 33342. Objetiva de 20x.

E- Fotomicrografia de íleo distal com marcação de células produtoras de IgA com FITC. Objetiva de 20x.

F- *Merge* (sobreposição) das fotomicrografias D e E.

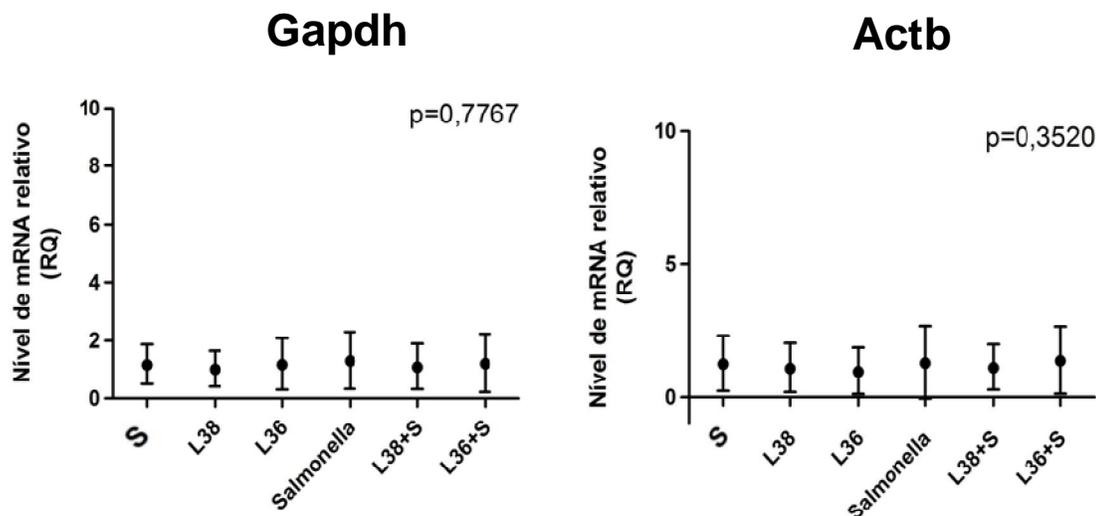
* **Setas brancas:** indicam células produtoras de IgA (células IgA⁺).

5. 2. 5 Efeitos de isolados de *Lactobacillus* sobre a expressão de citocinas nas porções do intestino de camundongos CV desafiados com *Salmonella*, avaliados por RT-qPCR

Os resultados dos efeitos dos isolados de *Lactobacillus* sobre a nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa foi expresso em quantidades médias relativas de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo controle salina. O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. A análise da expressão relativa dessas citocinas foi feita em cada uma das porções do intestino delgado (inicial, medial e distal) e do intestino grosso (ceco e cólon) de animais convencionais tratados com *Lactobacillus* e desafiados com *Salmonella*, bem como de todos os controles experimentais.

Não houve efeito de nenhum dos tratamentos experimentais sobre a expressão relativa dos genes normalizadores (Gapdh e Actb), pois não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) de expressão relativa entre os grupos experimentais, como está mostrado na FIGURA 17. Portanto, os genes Gapdh e Actb foram usados com segurança para normalização dos dados de expressão de citocinas do tecido intestinal nos ensaios usando animais convencionais.

FIGURA 17 – Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais de tratamento com L38 ou L36 e de infecção por *Salmonella* sobre a expressão relativa de Gapdh e Actb em animais convencionais.



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Avaliação do efeito dos tratamentos experimentais (tratamentos com L36 ou L38 e desafio com *Salmonella*) sobre a expressão relativa de Gapdh e de Actb utilizando o método do $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK & SHIMITTGEN, 2001). Cada grupo experimental foi representado, nesta figura, como média e desvio-padrão dos dados relativos de expressão dos genes referência de todos os animais e de todas as porções (intestino delgado inicial, medial e distal, ceco e cólon) dos animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). Os valores de expressão de cada gene normalizador foram relativizados pelos dados do grupo Salina. Os resultados indicam ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na expressão desses genes no intestino, entre os diferentes tratamentos experimentais avaliados. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão do nível de mRNA relativo de cada gene de referência. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. O valor de p foi obtido a partir de teste estatístico de comparação de médias e variâncias (ANOVA).

Os resultados da avaliação da expressão relativa das citocinas em animais convencionais estão mostrados na FIGURA 18. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram evidenciadas nos gráficos por letras diferentes sobre as barras verticais representativas dos desvios-padrão. Na porção inicial do intestino delgado (I.I.) foi verificado um aumento significativo da expressão de IL5 pela administração de L38 em relação ao controle salina. Nesta mesma porção, o desafio com *Salmonella* causou um aumento significativo de IL17a. O grupo experimental L38 desafiado, apresentou aumento da expressão de IL10 e redução de IL17a nesta porção, em relação aos animais controle desafiados. No intestino delgado medial (I.M.) foi observada uma expressão significativamente menor de IL17a no grupo experimental

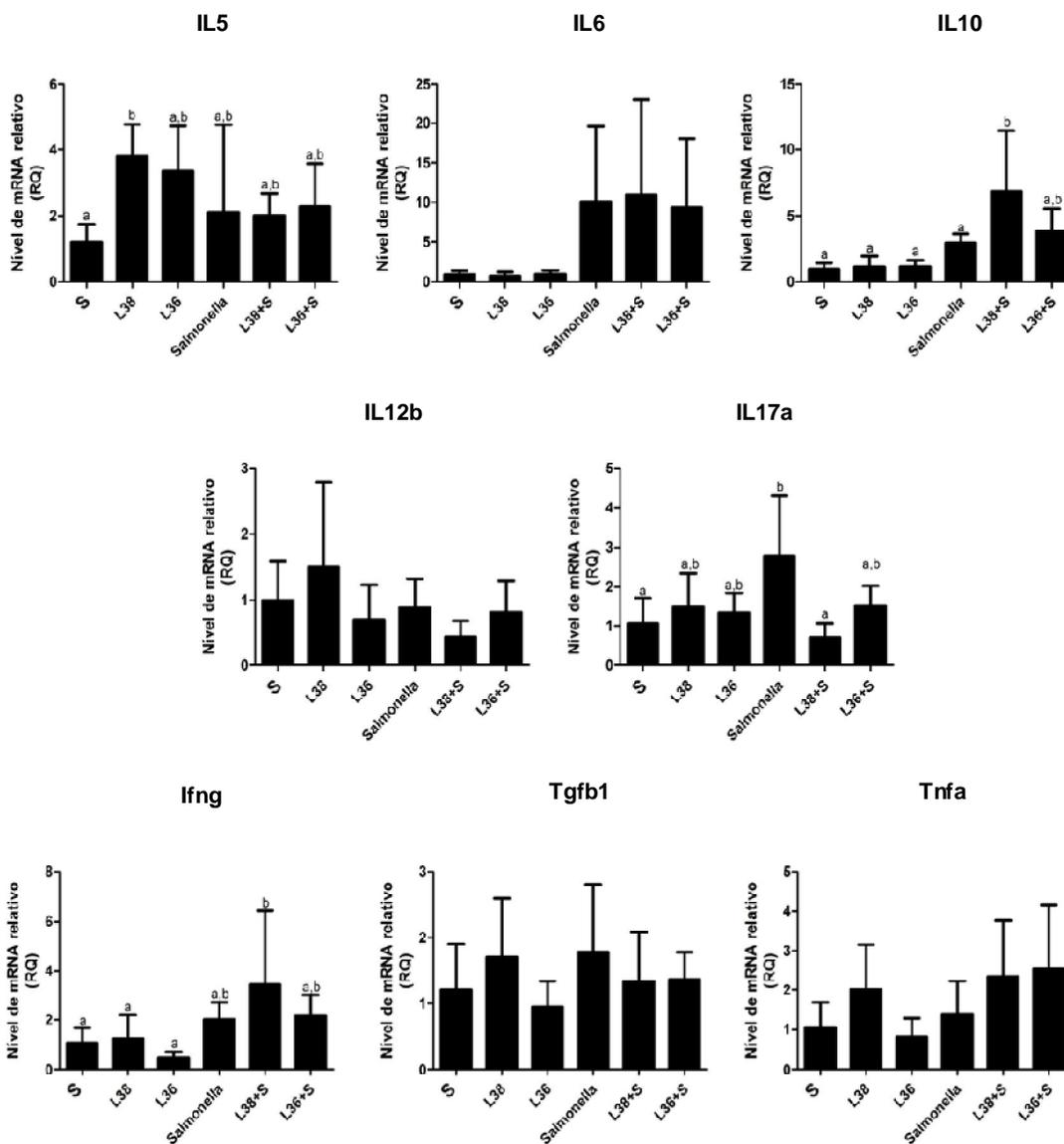
L36 não desafiado em relação ao controle salina e experimental L38 não desafiado. Nesta porção, a infecção causou aumento significativo da expressão de IL6. O tratamento com ambos isolados em animais desafiados levou a redução da expressão de IL6 em relação ao grupo controle desafiado, e o tratamento com L36 em animais desafiados com *Salmonella* levou a redução significativa da expressão de IL10 e Tgfb1 em comparação com animais controles desafiados. Na porção distal do intestino delgado (I.D.) foi verificado aumento da expressão de IL5 pela administração de L38, em comparação com os níveis de expressão do grupo controle salina. A infecção, nesta porção, causou aumento da expressão de IL12b e de Tgfb1 em comparação com o grupo controle salina. A administração de ambos os isolados em animais desafiados levou a significativa redução do nível de expressão de Tgfb1 em comparação com animais controles desafiados, e o isolado L38 em animais infectados produziu aumento significativo da expressão de IL10 em relação aos animais controles desafiados com *Salmonella*.

No ceco (CE) foi observado aumento da expressão de Tgfb1 em animais experimentais L38 e L36 em comparação com os controles salina e um aumento da expressão de IL17a em animais do grupo experimental L38 em relação aos do grupo controle não desafiado. A infecção nesta porção causou aumento da expressão de IL17a, Ifng e Tnfa. A administração de L38 em animais desafiados levou a significativo aumento da expressão de IL10 e Tnfa em relação aos animais controles desafiados, enquanto que a administração de L36 em animais doentes levou a redução da expressão de IL17a em comparação com os níveis de expressão observados no grupo controle desafiado. Finalmente, no cólon (CO) foi observado que o grupo experimental L38 teve nível de expressão maior de IL10 e Ifng em comparação com o controle salina. Ambos os isolados produziram aumento da expressão de IL12b em relação ao controle salina. Foi verificado nesta porção que a infecção causou redução significativa da expressão de IL5 e aumento da expressão de Tnfa. Os tratamentos com os isolados L38 e L36 em animais desafiados não produziram diferenças significativas no perfil de expressão de citocinas estudadas nesta porção em comparação com os animais controles desafiados. Os achados mais importantes de variação da expressão gênica do painel de citocinas testadas ao longo do intestino de animais convencionais estão esquematizados na FIGURA 19.

FIGURA 18 - Expressão relativa das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado, ceco e cólon de camundongos CV tratados com L38 ou L36 e desafiados com *Salmonella*, usando RT-qPCR.

A- Intestino Inicial

(continua)

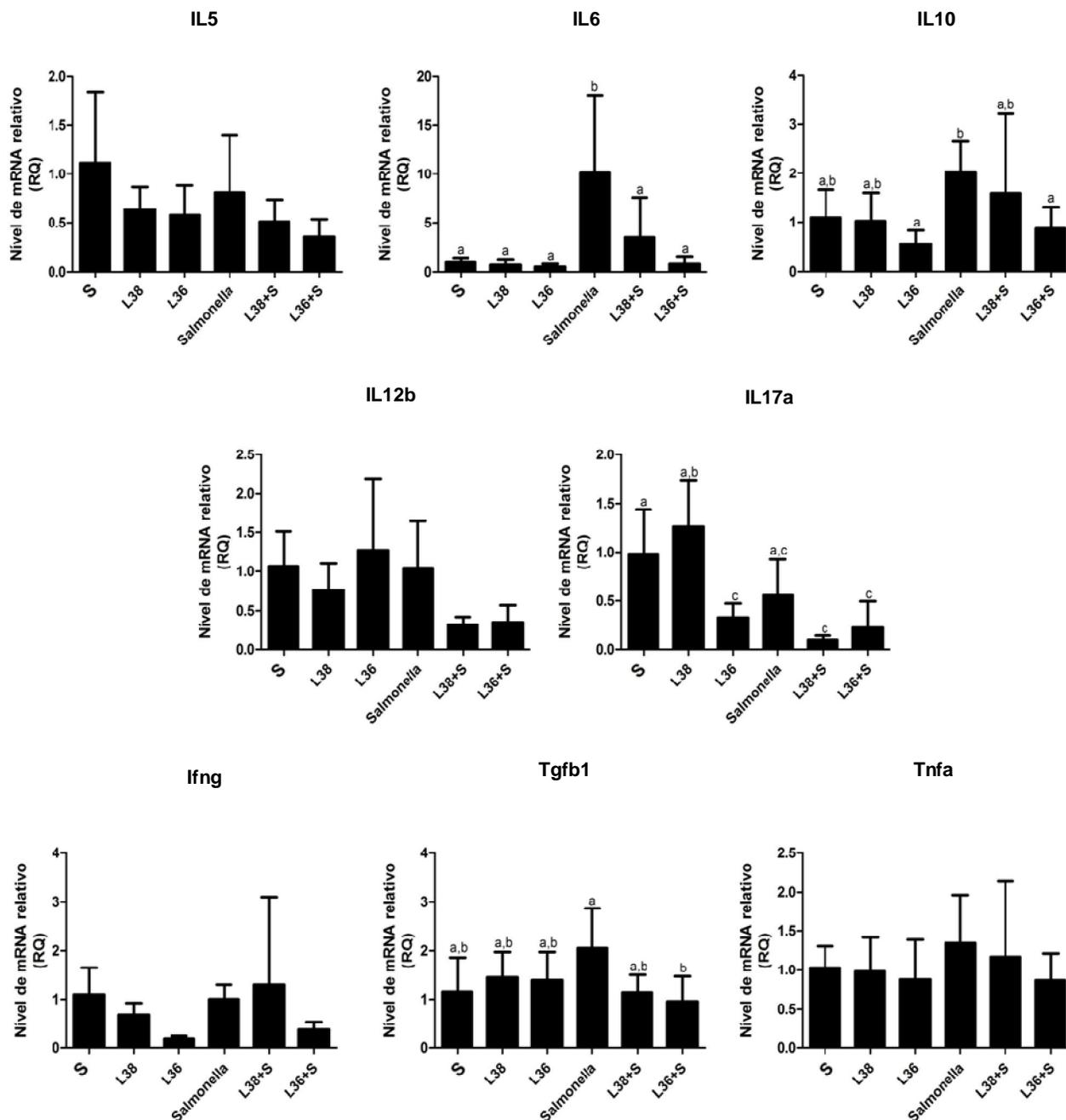


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais controle salina (S). Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

B- Intestino Medial

(continua)

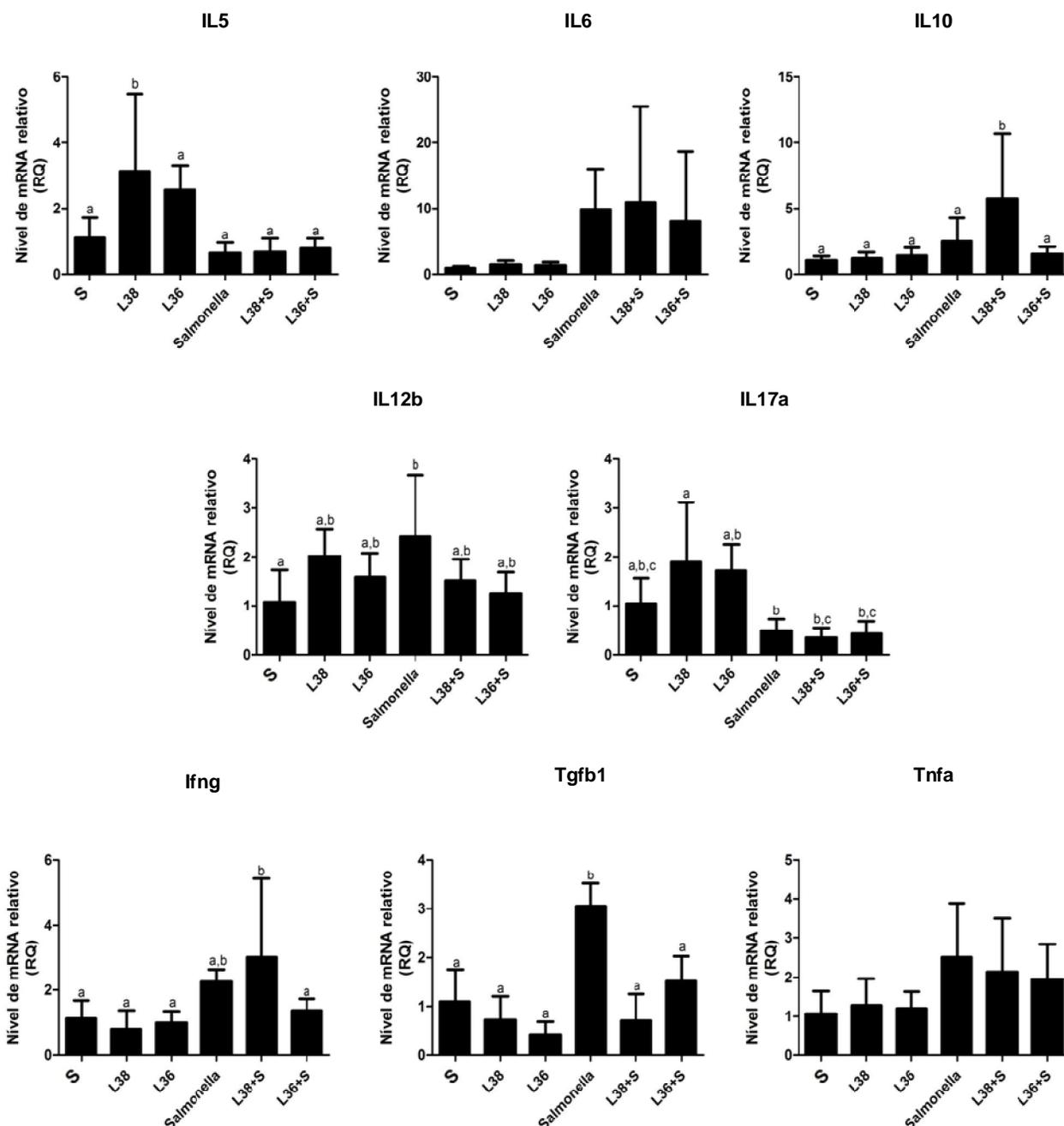


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais controle salina (S). Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L38+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

C- Intestino Distal

(continua)

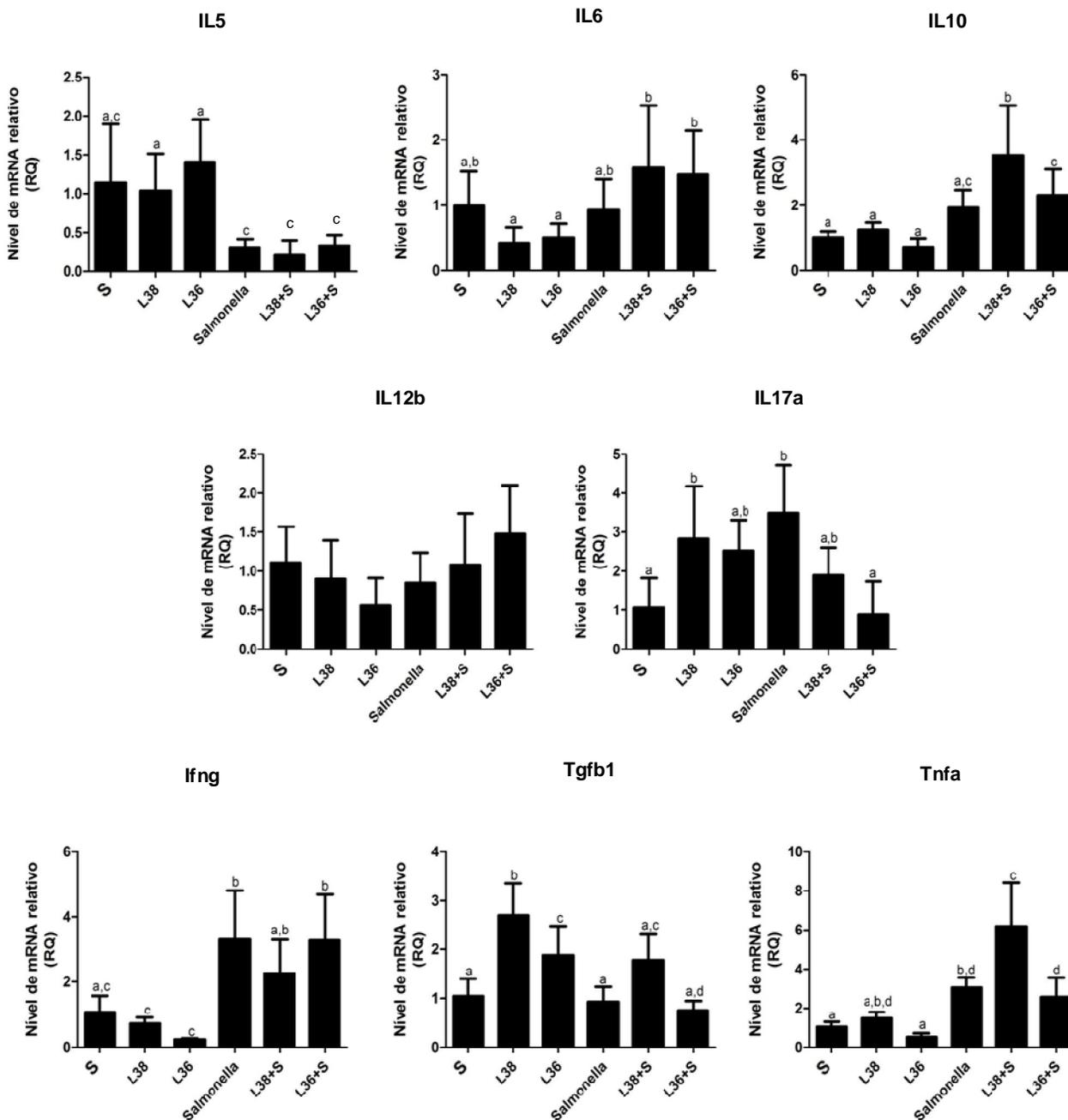


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais controle salina (S). Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

D- Ceco

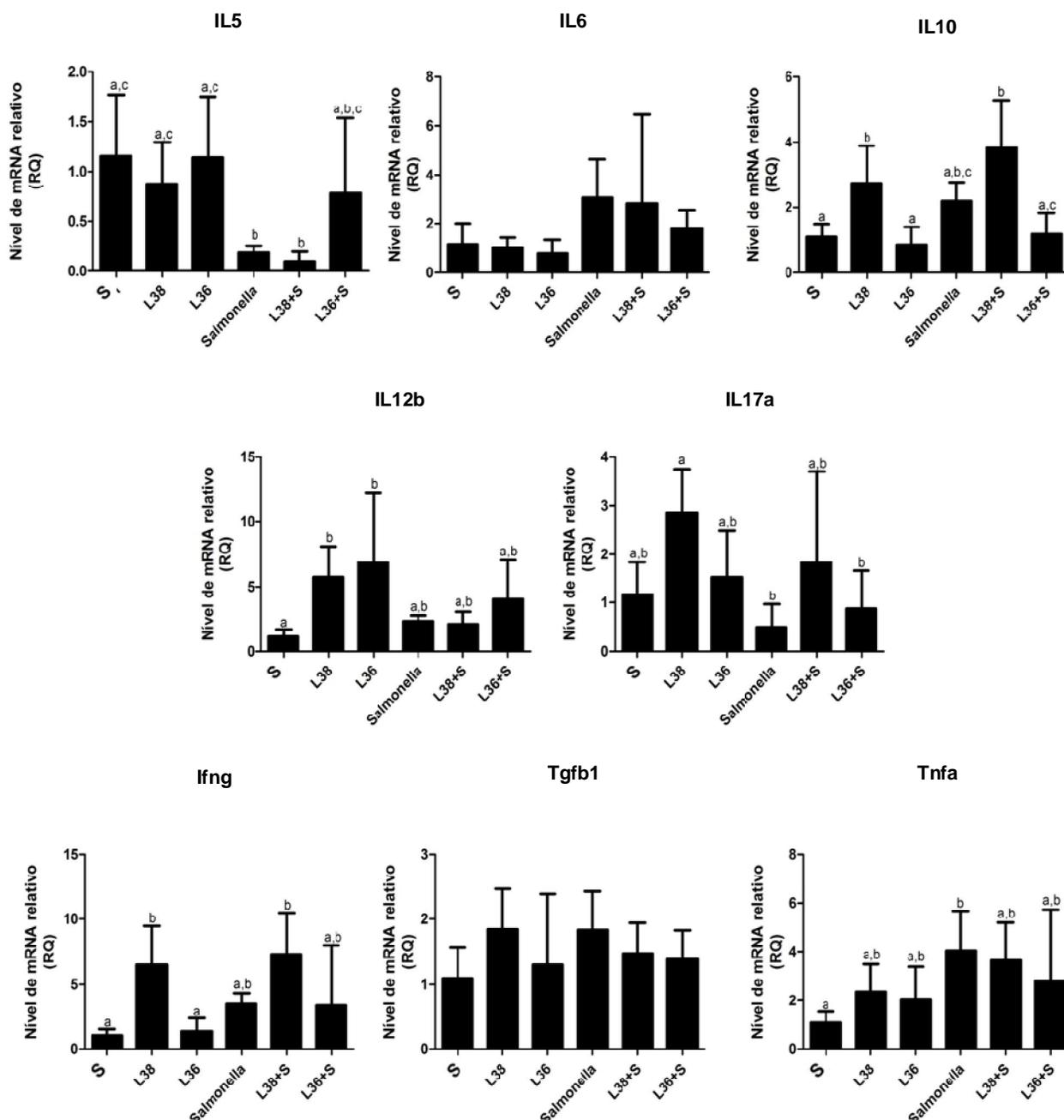
(continua)



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais controle salina (S). Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

E- Cólon



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: A expressão gênica do perfil de citocinas foi representado pelo nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa. Os dados foram expressos em quantidades médias relativas, e seus respectivos desvios-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al., (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo de animais controle salina (S). Cada grupo experimental foi composto por 5 machos e 5 fêmeas de animais convencionais da linhagem Swiss NIH. Nos gráficos, estão representados dados dos grupos controle salina (S), tratado com L38 (L38) e tratado com L36 (L36), desafiado com *Salmonella* (Salmonella), desafiado e tratado com L38 (L36+S) e desafiado e tratado com L36 (L36+S). O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma média da quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem nível de expressão definido como 1x. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) 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 ($p > 0,05$).

FIGURA 19 – Resumo esquemático do efeito de L36 e L38 na expressão de citocinas em animais CV desafiados ou não com *Salmonella*.

A- Não desafiado

Fonte: Criado pelo autor e adaptado de HÄBEBARTH, 2012

.Legenda: Setas: (↑) aumento da expressão e (↓) redução da expressão em comparação com a expressão do grupo de animais controle salina. Cores: L36 → animais tratados com L36 L38 → animais tratados com L38.

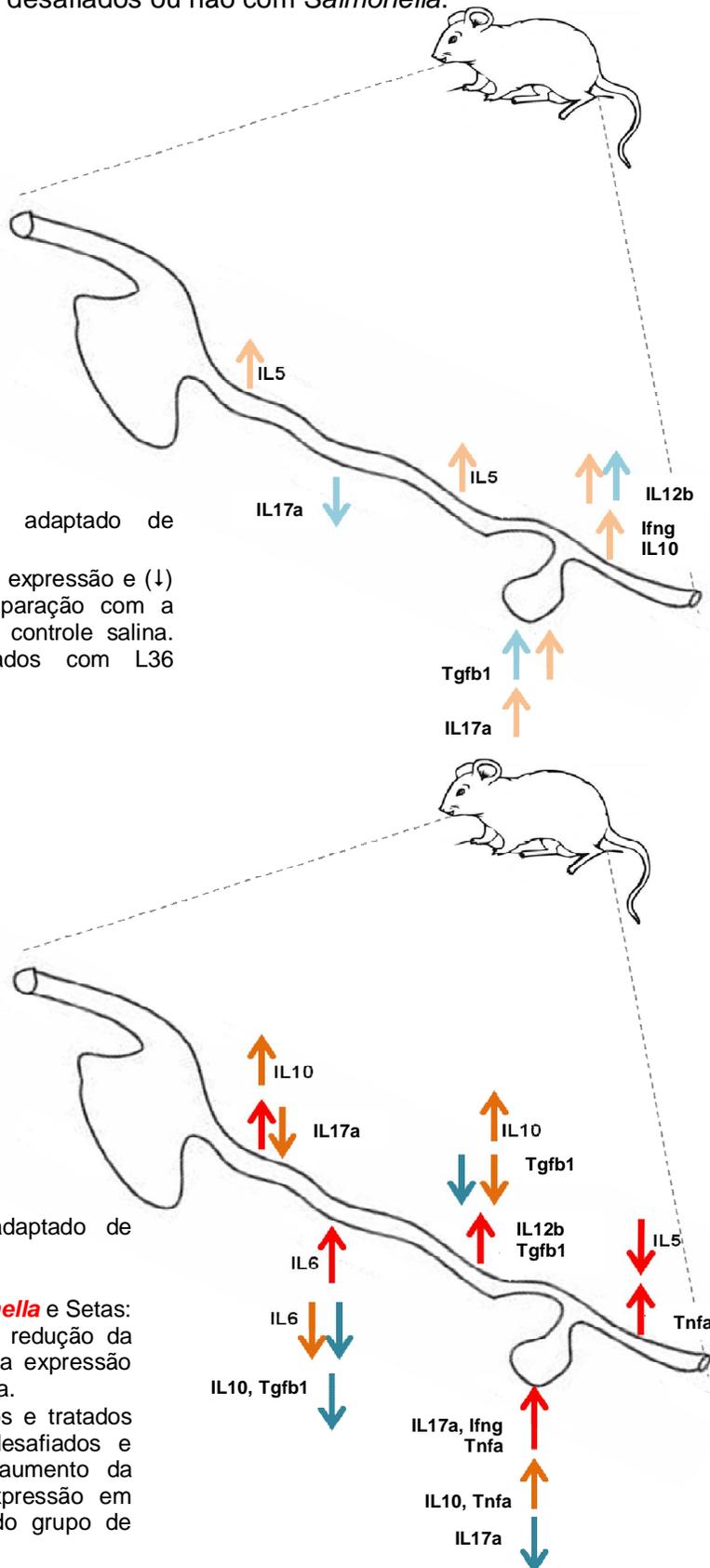
B- Desafiado

Fonte: Criado pelo autor e adaptado de HÄBEBARTH, 2012.

Legenda:

Cor: grupo desafiado com *Salmonella* e Setas: (↑) aumento da expressão e (↓) redução da expressão em comparação com a expressão do grupo de animais controle salina.

Cores: L36 → animais desafiados e tratados com L36 e L38 → animais desafiados e tratados com L38. Setas: (↑) aumento da expressão e (↓) redução da expressão em comparação com a expressão do grupo de animais controle *Salmonella*.



6 DISCUSSÃO

Existe, no Brasil e no mundo, uma ausência de preparações probióticas comerciais, para nutrição animal, contendo linhagens bacterianas de origem bovina. Diante disso, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na identificação e caracterização de linhagens potencialmente probióticas de *Lactobacillus* de origem animal. Mais de 70 linhagens de origem bovina já foram isoladas e caracterizadas, muitas das quais apresentaram resultados promissores em testes *in vitro* para potencial probiótico (SANDES et al., comunicação pessoal). Duas delas, L36 (*L. acidophilus*) e L38 (*L. salivarius*) foram escolhidas, neste trabalho, para avaliação da capacidade de colonização e do efeito imunomodulador em modelos animais (TABELA 1). Esses isolados foram selecionados, pois são de espécies, que em isolados humanos, apresentam efeitos probióticos comprovados na literatura e nos testes *in vitro* apresentaram características interessantes, como por exemplo, a alta hidrofobicidade da superfície bacteriana.

Uma das características desejadas para um probiótico é a sua capacidade de aderir à parede intestinal, permitindo sua permanência, mesmo que transitória, no ecossistema do intestino. Muitos mecanismos estão envolvidos na adesão de microorganismos à mucosa intestinal, sendo um deles a natureza hidrofóbica da superfície microbiana. (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; BARBOSA et al., 2005; KLAYRAUNG et al., 2008). Diante disto, para este trabalho foram escolhidos dois isolados que apresentaram elevada hidrofobicidade (70,28% para L36 e 99,85% para L38). Entretanto, a alta inibição do crescimento destes isolados na presença de sais biliares (68,12% para L36 e 100% para L38) foi um forte indicativo de um possível fracasso dos mesmos na passagem pelo trato gastrointestinal superior. Por isso, com o objetivo de avaliar a capacidade de sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal superior, adesão e colonização dos isolados *in vivo*, foi feita a monoassociação de L36 ou L38 em camundongos isentos de germes da linhagem Swiss NIH (“*germ free*” ou GF).

Durante 10 dias foram acompanhados os níveis populacionais dos isolados nas fezes de animais gnotobióticos, sendo esta medida um indicativo da sobrevivência pela passagem do trato gastrointestinal superior e de colonização do intestino. Ambos os isolados apresentaram nas fezes altos níveis populacionais,

acima de 10^7 UFC/ g de fezes, ao longo do período de monoassociação (FIGURA 7A).

Além disso, para avaliar a capacidade de adesão dos isolados à mucosa intestinal, foram quantificados os níveis populacionais dos mesmos em diferentes porções do intestino dos animais, sacrificados no décimo dia após a monoassociação. Ambos os isolados estavam presentes ao longo de todo o intestino delgado e grosso, apresentando níveis populacionais acima de 10^6 UFC/g de tecido intestinal. A ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os níveis populacionais presentes nas diferentes porções do intestino revela que não existe nenhuma tendência de associação preferencial dos isolados a alguma porção, mesmo que níveis populacionais maiores tenham sido observados no ceco (FIGURA 7B). Esses níveis populacionais maiores no ceco provavelmente estão relacionados à menor velocidade do trânsito intestinal nesta porção. Outros trabalhos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa também mostraram que *Bifidobacterium animalis*, *B. longum*, *Escherichia coli*, *L. casei* e *Saccharomyces boulardii* são capazes de resistir às condições de estresse impostas pelo trato gastrointestinal superior e alcançar altos níveis populacionais no intestino (SILVA et al., 2004; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010).

Ao comparar os resultados de hidrofobicidade da superfície celular dos isolados L36 e L38 com os resultados de monoassociação em animais GF pode-se perceber que uma alta hidrofobicidade pode ser usada como indicativo da capacidade de colonização da mucosa intestinal, visto que ambos os isolados apresentaram valores altos de hidrofobicidade e tiveram sucesso na colonização do intestino. Pan et al., (2006) observaram uma relação direta entre alta hidrofobicidade e sucesso na adesão de micro-organismos em células Caco-2 (linhagem celular com características similares aos enterócitos).

A adesão celular é um processo complexo que envolve o contato da parede bacteriana com a superfície dos enterócitos e, por isso é influenciado pela composição e estrutura da parede celular e por interações entre as superfícies envolvidas (PÉREZ et al., 1998; DEL RE et al., 2000). Além disso, a capacidade de se ligar a superfície de células intestinais é um pré-requisito para colonização bacteriana e para o desenvolvimento dos mecanismos de ação dos probióticos como a exclusão ou redução da aderência de enteropatógenos (provavelmente pela

competição pelos receptores que seriam utilizados pelos patógenos) e a estimulação do sistema imune (BERNET et al., 1993; MARTINS et al., 2009).

Diferentes testes *in vitro* podem ajudar a prever o destino de linhagens probióticas ingeridas: eles consistem de modelos simples de sensibilidade dos probióticos ao suco gástrico ou sais biliares e modelos mais sofisticados que representam a dinâmica fisiológica do trânsito intestinal e de suas secreções (MARTEAU et al., 1997^a). Portanto, baixa inibição de crescimento em condições que mimetizam a composição do suco gástrico e dos sais biliares é preconizada durante a seleção de novas linhagens probióticas. Entretanto, os isolados L36 e L38 apresentaram alta inibição nos testes de resistência aos sais biliares. Porém, esta inibição observada em teste *in vitro* não representou um desafio à passagem destes isolados pelo trato gastrointestinal, já que tanto L36 como L38 se mantiveram em altos níveis populacionais ao longo das porções intestinais e nas fezes dos animais dez dias após a inoculação intragástrica. Esse achado coloca em questionamento a validade de alguns dos testes *in vitro* para caracterização de linhagens possivelmente probióticas. Entretanto, os possíveis níveis populacionais de L38 no intestino inicial (níveis possivelmente <5 Log UFC/g de tecido intestinal) podem ser um reflexo da alta sensibilidade deste isolado aos sais biliares que são lançados no intestino nesta porção.

Os modelos animais apresentam como principal vantagem, em relação aos testes *in vitro*, a representação de complexidade mais próxima à realidade presente nos organismos aos quais os probióticos se destinam. Logo, a distância de extrapolação dos resultados obtidos em testes com animais para o organismo de destino do probiótico (no caso deste trabalho, os bovinos) é muito menor, permitindo que as expectativas de efeito sejam mais confiáveis em relação às obtidas em um ensaio *in vitro*. O modelo de monoassociação em animais GF representa um sistema experimental excelente para avaliação do potencial de colonização de micro-organismos (LEE & MAZMANIAN, 2010), pois permite o estudo da capacidade de sobrevivência de um único isolado no ambiente gastrointestinal sem a interferência e competitividade da complexa microbiota presente no intestino de animais. Segundo o *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, publicado pela WHO/FAO, após a identificação e seleção *in vitro* de probióticos e antes de ensaios nos organismos aos quais eles se destinam, a utilização de modelos animais é recomendada como “padrão-ouro” para a avaliação das características

funcionais e de segurança de bactérias potencialmente probióticas (MARTINS et al., 2012).

Durante a seleção e caracterização de novas linhagens probióticas a questão da segurança de sua administração para o hospedeiro deve ser cuidadosamente avaliada. As bactérias do ácido láctico (BAL), em especial os *Lactobacillus*, tem uma longa história de uso seguro por seres humanos e animais e, por isso, passaram a possuir o status GRAS (geralmente reconhecidas como seguras). Linhagens probióticas, como *L. acidophilus*, tem sido usadas com segurança por mais de 80 anos (SALMINEN et al., 1998^a). Porém, não deve ser assumido que uma linhagem recém-isolada, com algum potencial probiótico, é segura apenas pelo histórico de segurança adquirido pelas linhagens probióticas tradicionais (SALMINEN et al., 1998^b). Portanto, para certificar a segurança do consumo das linhagens L36 e L38 em modelo animal foram avaliados parâmetros relacionados ao ganho de peso, índice hepático e esplênico (aqui chamados, em conjunto, de indicadores gerais de saúde) e alterações histológicas no fígado, íleo distal e cólon em camundongos Swiss NIH convencionais (com uma microbiota normal) que receberam uma suplementação alimentar com os referidos isolados por 19 dias (FIGURA 3B).

A ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), entre o grupo controle salina e os grupos experimentais tratados apenas com os isolados L36 ou L38, para a avaliação do índice hepático, esplênico e variação de peso (FIGURA 12A, 12B e 12C, respectivamente) mostram que o tratamento com os isolados não causou alteração dos indicadores gerais de saúde. Além disso, durante todo o tratamento experimental, não foi observada nenhuma alteração do comportamento e atividade dos animais, que apresentavam pelo brilhante em todos os grupos experimentais tratados, bem como no grupo controle salina.

A avaliação de cortes histológicos de fígado, íleo distal e cólon corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) não identificou nenhuma alteração significativa no padrão histológico normal destes órgãos. Portanto não foi observada alteração da arquitetura dos referidos tecidos e nem alterações inflamatórias significativas entre preparações histológicas de animais tratados com L36 ou L38 em relação àquelas obtidas de animais que só receberam salina (FIGURA14). Esse conjunto de resultados permite afirmar que a administração dos isolados L36 ou L38 não causou dano a saúde dos animais testados, sendo o uso dos referidos isolados aparentemente seguro.

Infectividade e patogenezidade são dois importantes componentes do estudo de segurança de linhagens potencialmente probióticas. A ausência de alterações macroscópicas e microscópicas no intestino de animais tratados com L36 ou L38 indica que estas bactérias não apresentam risco de dano à mucosa intestinal. A degradação da mucosa intestinal tem sido usada como um dos primeiros marcadores para patogenezidade de uma linhagem probiótica e estudos avaliando esse parâmetro tem mostrado que as linhagens probióticas tradicionais, como *L. acidophilus*, não geram degradação da superfície intestinal (DONOHUE et al., 1998).

Além disso, a ausência de esplenomegalia e hepatomegalia são aspectos importantes para certificar a segurança desses isolados. O aumento de tamanho do fígado e do baço são indicadores indiretos de infecção. A ausência de indução de infecção pela administração de L36 ou L38 pode ser também afirmada pela ausência de infiltrado inflamatório no fígado dos animais experimentais tratados apenas com os isolados. Esses achados estão de acordo com a literatura, pois raros casos de infecções local e sistêmica, incluindo septicemia e endocardites, devido ao consumo de lactobacilos, bifidobactérias ou outras BAL, tem sido reportados com números muito baixos quando comparados com outros casos de bacteremia (incidência para enterococos 5-15%, lactobacilos 0,1%, leuconostocs <0,01%) (SALMINEN et al., 1998^a).

Outras linhagens potencialmente probióticas, que tinham sido recém-isoladas e não apresentavam história de uso seguro em animais ou seres humanos, apresentaram resultados similares aos aqui descritos quando foram administradas em animais. *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 e *Bifidobacterium lactis* HN019 foram administradas oralmente por 4 semanas em camundongos BALB/c. Nos animais tratados não foram observadas alterações do índice hepático, esplênico, aspectos histológicos do fígado, intestino e baço e outros parâmetros de saúde avaliados. Esses resultados atestam que o consumo dessas linhagens bacterianas era seguro em animais e, provavelmente, também seguro para seres humanos (ZHOU et al., 2000).

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 (LEBEER et al., 2008; 2010). O intestino delgado parece ser uma das regiões mais propensas ao desenvolvimento de imunomodulação mediada pelo consumo de probióticos. Isso se deve ao fato de que

esta região contém grande parte da capacidade imunomodulatória do corpo e o tamanho da microbiota indígena deste sítio é menor que a do intestino grosso. Esses fatores, em conjunto, permitem a dominância transitória, neste local, de micro-organismos adquiridos na dieta, que incluem os probióticos (BOOIJINK et al., 2007).

Portanto, com o objetivo de avaliar a capacidade imunomodulatória dos isolados L36 e L38 ao longo do trato gastrointestinal foi feita a dosagem de IgA secretória (sIgA) no fluido intestinal e a avaliação do perfil de citocinas expressas em camundongos monoassociados com os isolados e em animais CV tratados por 19 dias com L36 ou L38. A avaliação do perfil de citocinas (IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa) foi feita utilizando RT-qPCR, a partir de amostras de RNA total obtidas das diferentes porções do intestino delgado e grosso dos referidos animais.

A monoassociação com L36 ou L38 não induziu diferenças significativas ($p>0,05$) na produção de sIgA em relação ao nível de produção observado em animais GF (FIGURA 8). No intestino o mecanismo de imunidade humoral mais importante é a produção de sIgA que é o isotipo de anticorpo predominante na mucosa intestinal. A IgA é secretada na forma de dímero e transportada através do epitélio da mucosa por uma proteína receptora de imunoglobulinas poliméricas, também conhecida como componente secretório (CS). A ligação ao componente secretório é seguida pelo transporte da IgA através da célula epitelial (transporte por transcitose) pelo complexo dímero:IgA-CS, que é chamado de IgA secretora (sIgA) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). A habilidade de estimulação da produção de sIgA não é a mesma para diferentes micro-organismos. No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado o aumento dos níveis de sIgA após administração de BAL e bifidobactérias em camundongos isentos de germes e convencionais (PERDIGÓN et al., 1995; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010).

O resultado da quantificação de sIgA em animais gnotobióticos demonstra que, muito provavelmente, a imunomodulação induzida por esses isolados ativa mecanismos de imunidade inata ou adaptativa celular e não de imunidade humoral. Essa mesma tendência foi encontrada em animais CV que também receberam a suplementação de L36 ou L38 por 19 dias, nos quais também não foram detectadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os níveis de sIgA dos grupos experimentais não desafiados em relação aos animais controle salina. O mesmo resultado foi encontrado na quantificação da área de células produtoras de IgA (células IgA⁺)

nesses mesmos animais (FIGURA 15). Algumas linhagens tradicionalmente probióticas, tais como *L. acidophilus* La1 e *L. casei* Shirota também não alteram o nível de IgA na mucosa intestinal (MARTEAU et al., 1997^b; SPANHAAK et al., 1998). Diante destes resultados, mesmo a IgA sendo importante na imunidade de mucosa, a produção de sIgA no intestino delgado pode não ser um bom marcador imunológico para a seleção de bactérias com potencial imunomodulador (DOGI et al., 2008).

O perfil de expressão das citocinas ao longo do intestino foi muito diferente entre as distintas porções analisadas (intestino delgado inicial, médio e distal, ceco e cólon) tanto em animais gnotobióticos quanto em animais CV tratados com os isolados (FIGURA 10 e 18). Entretanto, não foram detectados níveis diferentes estatisticamente significativos ($p > 0,05$) na capacidade de colonização dos dois isolados ao longo de todo o intestino (FIGURA 7B). A diferença na capacidade de colonização poderia explicar parte das diferenças de perfil de citocinas observadas, pois a interação com células do intestino é o primeiro passo para produção de citocinas e imunomodulação (DELCENSERIE et al., 2008). Muito provavelmente essas variações estão relacionadas às diferenças na constituição da mucosa entre as distintas regiões do intestino, peculiaridades das condições do ambiente intestinal em cada região (pH luminal, disponibilidade de nutrientes, enzimas digestivas ativas, velocidade do trânsito intestinal) que juntas podem alterar o metabolismo dos isolados e a sua relação com células do hospedeiro. Esses fatores, em conjunto, podem explicar um perfil de citocinas diferenciado entre as porções. A diferença de mecanismos de ação de probióticos, ao longo do intestino, já havia sido relatada por Lee & Salminen (1995) que afirmaram “ser bem possível que diferentes regiões do trato gastrointestinal podem requerer diferentes bactérias probióticas”. Diante dessas diferenças, para facilitar a discussão dos resultados de imunomodulação mediada pelos isolados L36 e L38 os resultados da avaliação de citocinas foram divididos pelo perfil de expressão de citocinas no intestino delgado e no intestino grosso e estão esquematizados dessa forma na TABELA 3.

TABELA 3 – Resumo esquemático do perfil de expressão de citocinas (IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa) expressos no intestino delgado e grosso.

3.1 Perfil de expressão em animais gnotobióticos monoassociados com L36 ou L38

Citocina	L36		L38	
	Int. delgado	Int. grosso	Int. delgado	Int. grosso
IL5		+	+	
IL6	+			+
IL10				
IL12b		-	+	-
IL17a	++	+	++	
Ifng				+
Tgfb1		+		
Tnfa	+	++		

3.2 Perfil de expressão em animais convencionais tratados com L36 ou L38 durante 19 dias (grupos não desafiados com *Salmonella*)

Citocina	L36		L38	
	Int. delgado	Int. grosso	Int. delgado	Int. grosso
IL5			++	
IL6				
IL10				+
IL12b		+		+
IL17a	-			+
Ifng				+
Tgfb1		+		+
Tnfa				

3.3 Perfil de expressão em animais convencionais tratados com L36 ou L38 e desafiados com *Salmonella*

Citocina	<i>Salmonella</i>		L36+S		L38+S	
	Int. delgado	Int. grosso	Int. delgado	Int. grosso	Int. delgado	Int. grosso
IL5		-				
IL6	+		-		-	
IL10			-		++	+
IL12b	+					
IL17a	+	+		-	-	
Ifng		+				
Tgfb1	+		--		-	
Tnfa		++				+

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (+): aumento da expressão e (-) redução da expressão. Número de sinais (+ou-) esta relacionado ao número de porções intestinais que apresentaram a alteração de expressão por ele indicada, dentro do conjunto de porções do intestino delgado (intestino inicial, médio e distal) e grosso (ceco e cólon).

No intestino delgado de animais gnotobióticos, L36 produziu aumentos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) da expressão de IL6 e Tnfa e um grande aumento de expressão de IL17a. Em animais monoassociados com L38 foi observado aumento da expressão de IL5, IL12b e grande aumento de IL17a, em alguns casos estaticamente ($p < 0,05$) menor que aquele observado em animais monoassociados com L36. No intestino grosso, animais monoassociados com L36 apresentaram aumento da expressão das mesmas citocinas que tiveram expressão intensificada no intestino delgado, além de aumento da expressão de IL5 e Tgfb1 e redução da expressão de IL12b. Por fim, em animais monoassociados com L38, o intestino grosso apresentou aumento da expressão de IL6 e Ifng e redução da expressão de IL12b (FIGURA 10, FIGURA 11 e TABELA 3).

A imunidade adaptativa da mucosa intestinal é, em grande parte, produzida dentro do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). O GALT é composto por agregados linfóides, incluindo as placas de Peyer (localizadas preferencialmente no intestino delgado) onde a indução da resposta imune ocorre e também pelos linfonodos mesentéricos. Além disso, um grande número de células imunes estão presentes na lâmina própria e no epitélio intestinal, como descrito no item 1.6 (DELCENSERIE et al., 2008). A mucosa entre placas de Peyer e os folículos associados é constituída por um tecido conjuntivo que contém células do sistema imune, predominantemente células B, macrófagos, células dendríticas e células T. Para o desenvolvimento dos mecanismos efetores da imunidade induzidos por probióticos, as mais importantes classes de células T da lâmina própria envolvidas são as células T *helper* (T_H) e as células T regulatórias (T_{reg}) (BRON et al., 2012)

A maior parte da regulação da função efetora do sistema imune é exercida por subpopulações de células T diferenciadas por padrões específicos de citocinas que levam a uma distinção de função dessas subpopulações (MOSMANN & MOORE, 1991). Células T *helper* são principalmente encontradas sobre dois tipos principais. T_{H1} e T_{H2} , distinguidos pelas citocinas que produzem e repostas imunes em que elas estão envolvidas. Células T_{H1} produzem citocinas pró-inflamatórias como o Ifng, Tnfa e IL2, enquanto células T_{H2} produzem citocinas IL4, IL5, IL6 e IL13. As citocinas produzidas por T_{H1} estimulam a fagocitose e destruição dos patógenos microbianos enquanto as citocinas T_{H2} , tais como a IL4, geralmente

estimulam a produção de anticorpos que agem diretamente contra um grande número de parasitas extracelulares (MOSMANN et al., 1986).

A polarização de células T em células T_H1 ou T_H2 é geralmente dependente das condições ambientais (tipo de célula dendrítica, citocinas presentes, natureza e dose do antígeno encontrado durante sua polarização). As células T imaturas podem passar através de um estágio transitório (T_H0) durante a ativação. A diferenciação de células T_H1 requer *I*fn γ e IL12 enquanto o desenvolvimento de T_H2 requer IL4 (DELCENSERIE et al., 2008). Os fatores envolvidos nas respostas imunes T_H1 tem impacto negativo sobre a diferenciação de T_H2 e vice-versa (MURPHY & REINER, 2002). Outras citocinas estão associadas a respostas T_H1 (IL2 e linfotóxina) ou T_H2 (IL6, IL9, IL10), mas sua produção não é necessariamente característica de T_H1 ou T_H2 (LEONARD, 2003). As células apresentadoras de antígeno regulam (pela produção de citocinas e moléculas de superfície co-estimuladoras) a diferenciação de células T (MOSMANN & MOORE, 1991). Nos últimos anos, porém, outras subpopulações de células T têm sido descritas e sua importância para a resposta imune vem sendo compreendida. A célula T_H17 é um tipo de subpopulação de células T que é caracterizado pela secreção de IL17a, produzida através da estimulação por *Tgfb1* e IL6 (BETTELLI et al., 2006; HARRINGTON et al., 2006). Outras subpopulações de células T atuam na regulação da resposta imune e são chamadas em conjunto de células T_{reg} . Este grupo inclui as células T_r1 que secretam altos níveis de IL10 e *Tgfb1*, as células T_H3 que secretam primariamente *Tgfb1*, sendo que o principal papel das células T_{reg} , em conjunto, é inibir as respostas imunes, trazendo o sistema imune para um estado de reatividade não inflamatória (SHEVACH, 2000).

Os resultados de expressão de citocinas observados no intestino, portanto, podem ser um indicativo da presença de um determinado tipo de resposta de células T. Essas células T, recrutadas e ativadas pela presença de antígenos microbianos, produzem um perfil de citocinas que caracteriza o tipo de subpopulação ($T_H1/T_H2/T_H17/T_{reg}$) majoritariamente presente na mucosa intestinal de animais gnotobióticos ou convencionais. Por outro lado, o perfil de citocinas observado pode ser fruto da interação dos micro-organismos com outras células presentes na mucosa intestinal, como os enterócitos, células dendríticas e macrófagos residentes. Nessa abordagem, o perfil de citocinas presente no intestino pode gerar um

ambiente adequado para a polarização de um determinado tipo de célula T em detrimento do outro, favorecendo uma determinada resposta T_H ou T_{reg} . Isso faz sentido, pois, a interação de bactérias probióticas com o epitélio intestinal é um fator chave na determinação da produção de citocinas por enterócitos e outras células presentes na mucosa intestinal e, provavelmente, nos eventos de início de atividade de imunomodulação que acontecem antes do encontro dos probióticos com células do sistema imune (DELCENSERIE et al., 2008).

Células apresentadoras de antígenos, sendo as células dendríticas as mais importantes, são peças chave para determinação do balanço $T_H1/T_H2/T_H17/T_{reg}$ e o desenvolvimento da tolerância imune. Dada a importância das células dendríticas nessa orquestração da resposta imune, tem sido hipotetizado que os organismos probióticos modulam a resposta imune através da influência sobre a maturação de células dendríticas (DELCENSERIE et al., 2008). As células dendríticas podem contribuir enormemente para a polarização de células T $CD4^+$ imaturas para as subpopulações $T_H1/T_H2/T_H17/T_{reg}$ (BRAAT et al., 2004). Estas células são encontradas em toda a lâmina própria e nas placas de Peyer, locais nas quais podem ser ativadas e sofrerem maturação pela exposição aos *microorganism-associated molecular patterns* (MAMPs) ou outros estímulos (RESCIGNO, 2010). A ativação das células dendríticas produz moléculas estimuladoras, que incluem *Tgfb1*, ácido retinoico e outras citocinas, em proporções que dependem do modo como as células dendríticas foram ativadas, e com isso as células dendríticas podem modular a ativação, expansão clonal e polarização de células T (KAPSENBERG, 2003; COOMBES et al., 2008). Portanto o perfil induzido de citocinas de células dendríticas pela interação com os probióticos pode definir o tipo de polarização de células T induzidas, e por assim dizer, explicar a ação imunomodulatória dessas bactérias. *L. casei* subsp. *alactus* tem sido caracterizado como indutor de citocinas pró-inflamatórias (IL12, IL6 e *Tnfa*) em culturas de células dendríticas, enquanto que *L. reuteri* inibe a produção de IL12, IL6 e *Tnfa* e leva a produção de IL10 (CHRISTENSEN et al., 2002).

O perfil de citocinas induzido em animais monoassociados com L36, tanto no intestino delgado como no grosso, envolve aumento da expressão de IL6 (somente no intestino delgado) e *Tgfb1* (significativamente no intestino grosso e com tendência de aumento no delgado) que são fatores importantes na polarização de

células T_H17 (HARRINGTON et al., 2006). Além disso, o grande aumento de expressão de IL17a nesse grupo de animais é um forte indicativo para a presença de grandes quantidades de células T_H17 no intestino. Portanto, parece que o isolado L36 é um indutor de respostas do tipo T_H17 em animais isentos de germes. A redução da expressão de IL12b no intestino grosso é um indicativo da falta de condições ambientais nesse local para polarização de células T_H1. A presença de níveis aumentados de Tnfa no intestino delgado e grosso desses animais fortalece essa hipótese, pois as células T_H17 são caracterizadas pela produção de grandes quantidades de IL23a, IL17a, IL6, Tnfa e Ccl6 (MCKENZIE et al., 2006).

A resposta T_H17 está diretamente relacionada com a produção de grandes quantidades de IL17a sem produção de Ifng. A IL17a é uma citocina que foi descoberta inicialmente como um potente mediador pró-inflamatório (ROUVIER et al., 1993). Esta citocina atua principalmente no estroma de células endoteliais e também em monócitos, induzindo nestes a produção de mediadores inflamatórios, tais como IL8, ligante CXCL-1, Tnfa e GM-CSF. Esses mediadores produzidos pelos monócitos, em conjunto, promovem um rápido recrutamento de neutrófilos, o que caracteriza um processo importante no combate de infecções agudas. O recrutamento de neutrófilos é essencial para produção de radicais de oxigênio e outros mediadores inflamatórios que são importantes para produzir inflamação contra invasão microbiana (MCKENZIE et al., 2006).

Um desbalanço na produção de IL17a e Tnfa, em tecidos locais, pode levar à produção de dano tecidual crônico mediado por resposta imune. Portanto, uma análise histológica simples, usando coloração histológica de rotina com H&E, pode ser feita para certificar se ocorre presença de recrutamento de neutrófilos para o intestino de animais monoassociados com L36, dando mais embasamento à teoria de indução de respostas do tipo T_H17 pela administração desse isolado em animais isentos de germes. O aumento da produção de IL6 além de estar envolvido na polarização da diferenciação de células T pode favorecer a expansão clonal de células B que encontram seu antígeno específico localmente no intestino após o encontro com uma bactéria não patogênica, por exemplo, contribuindo indiretamente para produção de anticorpos (DOGI et al., 2008).

O isolado L38 em animais gnotobióticos parece induzir um perfil de citocinas menos diversificado que aquele obtido em animais monoassociados com o isolado

L36. L38 induz no intestino delgado aumentos dos níveis de IL12b e IL17a, sendo estes mediadores pró-inflamatórios, o primeiro importante para polarização de células T_H1 e o segundo produto de respostas do tipo T_H17 . Porém, os níveis de expressão de IL17a induzido por L38 são, em algumas porções, menores que aqueles produzidos por L36. No cólon, ocorreu um aumento da produção de Ifng acompanhado de redução de IL12b. Esse achado indica que podem existir células T_H1 já polarizadas produtoras de Ifng ou esta citocina está sendo produzida por outras células da mucosa intestinal. De qualquer forma, o aumento de Ifng pode facilitar a polarização de células T imaturas em células T_H1 . Entretanto, a baixa expressão de IL12b nessa porção pode ser um problema nessa polarização, pois a ativação via IL12 e de STAT4 é necessária para uma ótima diferenciação de células T imaturas em células T_H1 produtoras de Ifng (MCKENZIE et al., 2006).

Por fim, ambos os isolados produzem aumento de IL5 em animais monoassociados (L36 induz aumento da expressão no intestino grosso e L38 no intestino delgado). A IL5 é uma citocina marcadora de respostas imunes do tipo T_H2 que induz a proliferação e diferenciação de eosinófilos (COFFMAN et al., 1989). Essas células são capazes de se ligar a IgE e usá-la como receptor na sua subsequente ativação em contato com o antígeno. A produção de IgE é aumentada em repostas do tipo T_H2 como produto do aumento de produção de IL4 e IL5, sendo associada ao desenvolvimento de alergias (MOSMANN & MOORE, 1991). A avaliação da expressão de IL4 pode ajudar a corroborar essa hipótese, pois a presença de IL4 é um dos fatores mais importantes para a polarização de células T_H2 (DELCENSERIE et al., 2008). Entretanto, devido a dificuldades enfrentadas durante a padronização das reações de RT-qPCR para quantificação de IL4, a avaliação da expressão dela não foi incluída neste trabalho.

Quando comparamos o perfil de citocinas obtido de animais monoassociados com L36 ou L38 com aquele obtido de animais convencionais tratados com ambos os isolados, observamos que eles são muito diferentes. No intestino delgado, a forte indução de expressão de IL17a e outros marcadores da resposta T_H17 (como IL6, Tgfb1 e Tnfa) não foi encontrada em animais convencionais tratados com L36, sendo, na verdade, substituída por uma redução significativa da expressão de IL17a. No intestino grosso desses animais foi observado aumento da expressão de Tgfb1 e IL12b, marcadores de indução de respostas do tipo T_{reg} e T_H1 , respectivamente.

Porém, a ausência de expressão aumentada, no intestino grosso de animais CV tratados com L36 de outros marcadores das respostas do tipo T_{reg} e T_H1 parece indicar ausência destas subpopulações. Porém, este perfil de citocinas pode ser um indício de uma condição ambiental local possivelmente propícia às referidas polarizações.

Surpreendentemente, o isolado L38 que induziu um perfil de citocinas menos variado em animais isentos de germes, em animais convencionais apresentou um perfil de citocinas muito mais diversificado, principalmente no intestino grosso. No intestino delgado de animais convencionais, assim como em animais isentos de germes, L38 levou a um aumento da produção de IL5. No intestino grosso, os animais convencionais tratados com L38 apresentaram níveis significativamente aumentados de expressão de IL10, IL12b, IL17a, Ifng e Tgfb1.

Probióticos podem causar aumento da produção de Ifng, efeito que foi observado pela ingestão de *L. brevis* subsp. *coagulans* (Labre) e *B. lactis* HN019 que induziram a produção de Ifng em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (ARUNACHALAM et al., 2000). Assim, algumas linhagens probióticas podem contribuir para respostas inflamatórias. A produção de Tnfa, IL12 e IL1- β foi aumentada no intestino de camundongos quando *L. reuteri* ML1 e *L. brevis* ML12 foram ingeridos (MAASSEN et al., 2000). *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgarius* e *L. acidophilus* induziram aumento do número de células produtoras de Tnfa e Ifng enquanto, somente *L. acidophilus* aumentou o número de células produtoras de IL2 e IL12 no intestino delgado de camundongos tratados com as referidas bactérias (PERDIGÓN et al., 2002). A maturação fisiológica do sistema imune durante a infância inclui um papel importante do aumento da produção de Ifng (PRESCOTT et al., 1999), por isso linhagens probióticas como L38, que levam a aumento da expressão de Ifng, podem ter papel importante na melhora do desenvolvimento do sistema imune de mucosa em animais jovens. Aumento da produção de Ifng está associado com ativação de células do sistema imune principalmente macrófagos e células dendríticas, envolvidas na imunidade inata, que atuam sobre a polarização de células efetoras da imunidade adaptativa, os linfócitos (BOGDAN & SCHLEICHER, 2006).

Um aumento da expressão de Tgfb1 foi observado em um experimento usando *Lactobacillus johnsonii* em co-cultura com células Caco-2. Nele foi observada redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Tnfa, IL1b e IL8) enquanto a co-cultura levava ao aumento da expressão de Tgfb1 (HALLER et al., 2000). Tgfb1 é uma citocina importante para o desenvolvimento tanto de células T_H17 quanto T_{reg} (DELCENSERIE et al., 2008). Tgfb1 tem sido descrito como importante bloqueador da diferenciação de células T_H1 e T_H2 pela inibição da expressão de fatores de transcrição requeridos para expressão de Ifng (T-bet) e IL4 (GATA-3) (HEATH et al., 2000; GORELIK et al., 2002). No nível de células apresentadoras de antígeno, Tgfb1 pode inibir a ativação de macrófagos e sua habilidade de produzir citocinas pró-inflamatórias além de prevenir a maturação de células dendríticas e reduzir a expressão de moléculas MHC classe II nas mesmas, essenciais para a apresentação de antígenos para células T (GORELIK & FLAVELL, 2002). Juntos, Tgfb1 e IL10 são as principais citocinas produzidas por células T regulatórias do tipo T_r1 que parecem exercer importantes funções na regulação de respostas imunes (LEVINGS et al., 2002).

Por outro lado, muitos estudos indicam que probióticos favorecem a produção de IL10, uma citocina produzida por muitos tipos de células, incluindo células dendríticas, monócitos, células B, queratinócitos e células T_{reg}. IL10 é um membro da família *4 α -helix bundle* que foi originalmente clonado em células T_H2 tendo seu papel relacionado com a inibição de síntese de citocinas por células T_H1, portanto com efeito anti-inflamatório (MOORE et al., 2001). Nos últimos anos ficou mais claro que a principal função da IL10 parece estar envolvida com o controle das respostas imunes, prevenindo uma superativação destas e minorando os danos inflamatórios induzidos por patógenos (LEVINGS et al., 2002). Além disso, IL10 é uma citocina crítica na manutenção da tolerância às bactérias comensais. Na sua ausência, camundongos desenvolvem severas doenças inflamatórias intestinais (KUHN et al., 1993). Os resultados deste trabalho indicam que L38 foi capaz de aumentar a expressão de IL10 no intestino grosso de animais CV quando comparados com o controle salina. Outras linhagens probióticas possuem este mesmo efeito pois, *L. delbrueckii* subsp. *bulgarius* e *L. casei* induziram aumento do número de células produtoras de IL10 no intestino delgado de camundongos tratados (PERDIGON et al., 2002).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se especular que L38 poderia, então, causar um balanço entre respostas do tipo T_H e T_{reg} . Esse mecanismo de atuação já vem sendo descrito na literatura. Por exemplo, *L. rhamnosus* GG tem sido associado a alívio e prevenção de sintomas de alergia possivelmente pela prevenção de excesso de produção de células do tipo T_H2 e manutenção do balanço homeostático entre células $T_{reg}/T_H1/T_H2$ (KALLIOMAKI & ISOLAURI, 2003; KALLIOMAKI et al., 2003). O perfil de citocinas induzido por L38 no intestino grosso de animais CV gera condição para produção de respostas do tipo T_H1 , T_H17 e T_{reg} , já que foi aumentada a expressão de marcadores de todos esses tipos de respostas. As células T_{reg} são consideradas a principal fonte de IL10 e estão envolvidas na regulação da imunidade mediada por células T, supressão de auto-reatividade de células T e manutenção da tolerância imune (BARNES & POWRIE, 2009).

No intestino delgado, o aumento de IL5 indica certa tendência de polarização para respostas do tipo T_H2 que são importantes no desenvolvimento de respostas imunes contra parasitas extracelulares (DELCENSERIE et al., 2008). Alguns probióticos, como parece ser o caso do isolado L38, parecem influenciar da mesma forma as duas subpopulações, tanto T_H1 quanto a T_H2 . Esse tipo de comportamento já foi descrito pois, *L. rhamnosus* HN001, normalmente considerado um forte indutor da produção de Ifng, foi administrado oralmente em camundongos durante uma sensibilização alérgica (que gera respostas T_H2) e, nestes animais, foi observado aumento da produção de IL4 e IL5 (CROSS et al., 2002).

A homeostase intestinal pode ser destruída na ausência ou super-representação de certos grupos de bactérias, fenômeno conhecido como disbiose (BRON et al., 2012). Esse processo pode levar a mudanças no metabolismo bacteriano e alterar a apresentação de fatores e padrões microbianos ao sistema imune do hospedeiro. Algumas patologias, como as doenças inflamatórias intestinais (IBDs), são caracterizadas pela presença em excesso de bactérias pro-inflamatórias e uma deficiência de bactérias anti-inflamatórias que produz um aumento de células T_H17 e deficiência de células T_{reg} , respectivamente (FOLIGNE et al., 2007). Logo, o conceito de disbiose está diretamente relacionado com a deterioração da saúde do hospedeiro (SARTOR, 2008).

Tem sido proposto que o sistema imune de mucosa normalmente mantém um estado que favorece a tolerância ao próprio e a produção de IgA, mostrando um ligeiro desvio de polarização para respostas T_H2 em detrimento de T_H1 , o que caracteriza um estado fisiologicamente saudável (DELCENSERIE et al., 2008). Portanto, um balanço adequado entre respostas pró-inflamatórias (T_H1 e T_H17) e regulatórias (T_{reg}) é importante para manutenção da saúde da mucosa (LEE & MAZMANIAN, 2010). Assim, a suplementação com probióticos pode corrigir a disbiose e restaurar a homeostase intestinal através dos mecanismos imunomodulatórios induzidos por essas bactérias (REID et al., 2011). Portanto, L38 se mostra um candidato interessante como linhagem probiótica por induzir a expressão de um conjunto de citocinas pró-inflamatórias (IL12, IL17a, Ifng) e anti-inflamatórias (IL5, IL10 e Tgfb1), podendo contribuir para um balanço adequado entre os diferentes subtipos de células T CD4+ polarizados na mucosa intestinal.

Muitos dos resultados de imunomodulação descritos na literatura foram realizados em sistemas experimentais de co-cultivo de probióticos com diferentes linhagens e tipos de células eucarióticas. Portanto, podem não necessariamente representar uma situação real *in vivo*, como é mais bem simulada em modelos animais (DELCENSERIE et al., 2008). Um estudo com abordagem parecida com a utilizada neste trabalho e com alguns resultados similares avaliou o efeito da administração de bactérias Gram (+) (linhagens não probióticas: *L. acidophilus* CRL 1462 e *L. acidophilus* A9; linhagens potencialmente probióticas: *L. acidophilus* CRL 924 e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 423; e a linhagem probiótica: *L. casei* CRL 431) e Gram (-) (*Escherichia coli* 129 and *E. coli* 13-7) em animais BALB/c. Nesse trabalho foram avaliados o número de células produtoras de IgA, Ifng, Tnfa, IL17a, IL10, IL12, IL6 e MIP-1 α por imunofluorescência direta em cortes histológicos de intestino delgado. Todas as linhagens levaram a aumento do número de células produtoras de IgA. As bactérias Gram (+) aumentaram o número de células produtoras de IL10. Bactérias Gram (-) não aumentam o número de células produtoras de IL10, mas aumentaram o número de células produtoras de IL12. As linhagens probióticas levaram a aumento do número de células que produzem Tnfa e Ifng. Não foram detectadas alterações no número de células produtoras de IL17a por ação de bactérias probióticas e potencialmente probióticas (DOGI et al., 2008).

Muitos dos estudos de imunomodulação de probióticos são feitos utilizando co-cultura com células monomorfonucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas de animais e humanos (O'MAHONY et al., 2005). Porém, o uso de culturas de PBMCs para acessar as propriedades imunomodulatórias de probióticos pode não ser a melhor abordagem para avaliar a fisiologia da imunidade intestinal induzida por novas linhagens probióticas. Essa crítica é fundamentada no fato de que, a maioria das células T, presentes no sangue, muito provavelmente não expressa a combinação de moléculas e marcadores usados durante o direcionamento, adesão e penetração no tecido intestinal (DELCENSERIE et al., 2008). Células T que são direcionadas ao intestino sofrem perda de CCR7 e de selectina-L e passam a expressar $\alpha_4\beta_7$ integrina que se liga a adressina vascular de mucosa (MAdCAM-1) que é encontrada nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos da parede intestinal (MURPHY et al., 2010). Portanto, a predição do efeito *in vivo* de probióticos com base na extrapolação de dados de imunomodulação obtidos em testes *in vitro* permanece como uma tarefa altamente desafiadora e complexa apesar de algum sucesso ter sido obtido nessa tentativa (BRON et al., 2012).

As diferenças de perfil de citocinas entre os experimentos com animais gnotobióticos e convencionais pode ser atribuída a muitos fatores. O tempo e o tipo de tratamento (10 dias após a monoassociação e 19 dias de tratamento diário com os isolados em CV) podem explicar a diferença dos resultados aqui apresentados. Entretanto, o fator que parece melhor explicar as diferenças aqui descritas é a presença da complexa microbiota indígena em animais convencionais.

Em primeiro lugar, o metabolismo da microbiota normal, estabelecida em animais convencionais, pode alterar as condições do ambiente intestinal, modificando o metabolismo das linhagens administradas, fato que pode produzir alterações no perfil de moléculas secretadas e de superfície que podem ser responsáveis pela ativação do sistema imune. Experimentos que acompanham a colonização e os níveis populacionais dos isolados em animais convencionais podem ajudar a esclarecer essa questão, e podem ser implementados usando RT-qPCR ou marcação com sondas de DNA, para quantificação da recuperação dos isolados administrados nas fezes de animais convencionais. Além disso, o uso de marcação fluorescente dos isolados administrados pode permitir o acompanhamento de seu destino *in vivo*. Um estudo usando lactobacilos marcados com fluorescência,

administrados em camundongos, mostrou que em 10 minutos após a inoculação por via oral a fluorescência foi detectada em células imunes localizadas nas placas de Peyer e na lâmina própria do intestino delgado, bem como em células imunes das criptas intestinais e dos linfonodos mesentéricos no cólon (GALDEANO & PERDIGÓN, 2004).

Em segundo lugar, a presença da microbiota intestinal normal leva a um grande amadurecimento do sistema imune local e sistêmico, e por isso, muda as respostas a qualquer tipo de antígeno. Estudos em animais isentos de germes têm sugerido que a colonização do trato gastrointestinal desempenha um papel crucial no desenvolvimento do GALT por mecanismos relacionados à maturação do epitélio intestinal e do compartimento de células imunes presentes neste local (UMESAKI & SETOYAMA, 2000). Além disso, diversificação de anticorpos, aumento da recombinação dos genes VDJ e aumento do número de células T em placas de Peyer são fenômenos associados à colonização do intestino por micro-organismos, demonstrando que a microbiota intestinal é importante para o desenvolvimento do GALT (VAARALA, 2003). Portanto, o sistema imune de animais isentos de germes é extremamente imaturo e respostas imunes obtidas nesse tipo de modelo devem ser encaradas com cautela, visto que por ser pouco desenvolvido, muitas das tendências obtidas nesse tipo de animal podem não ser observadas em modelos usando animais convencionais. Os animais CV apresentam sistema imune completamente desenvolvido e uma realidade mais próxima daquela obtida quando os probióticos são administrados nos organismos de destino.

Independente das diferenças entre as respostas de animais gnotobióticos e convencionais, pode-se concluir que L38 e L36 modulam de forma diferente a expressão de citocinas no intestino completamente diferentes. Isso é importante, pois, possibilita que cada um deles possa ser usado, com algum sucesso, sobre diferentes conjuntos de ambientes imunológicos intestinais (GAUDANA et al., 2010). Além disso, por induzir uma variedade de citocinas, L38 poderia funcionar como um bom veículo de vacinas de DNA para mucosas, por já ter efeito intrínseco de estimulação não específica do sistema imune local (MIETTINEN et al., 1996). Porém, experimentos adicionais usando, por exemplo, citometria de fluxo, devem ser realizados para caracterizar melhor as populações de células presentes na mucosa dos animais tratados para melhor embasar as especulações levantadas neste

trabalho. Além disso, tais experimentos podem melhor caracterizar o aumento de celularidade observado nos cortes histológicos da mucosa intestinal de animais tratados com os isolados (FIGURA 14).

O modelo murino de infecção usando *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium tem sido corriqueiramente usado em nosso grupo de pesquisa para avaliação de efeito protetor de novas linhagens bacterianas com potencial probiótico. Muitas linhagens tem apresentado efeito protetor no modelo murino de febre tifoide, tais como *S. bouldarii*, *S. cerevisiae*, *E. coli* EMO, *B. longum*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *E. faecium* e *L. bulgaricus* (RODRIGUES et al., 1996; SILVA et al., 1999; FILHO-LIMA et al., 2000; MAIA et al., 2001; SILVA et al., 2004; MARTINS et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Além disso, por ser *S. Typhimurium* usada em modelo de indução de enterite em bezerras e a diarreia neonatal ser um dos problemas mais impactantes sobre a pecuária bovina, foi avaliado o potencial de proteção dos isolados L36 e L38 em modelos murinos de infecção com *S. Typhimurium*. Foram quantificados os indicadores gerais de saúde e analisados cortes histológicos de fígado, íleo distal e cólon de animais Swiss NIH convencionais infectados com 10^6 UFC de *Salmonella* e tratados com L36 ou L38, dez dias antes e nove dias depois do desafio. Nesses mesmos animais, foi avaliado o perfil de citocinas expressos nas diferentes porções do intestino para análise do padrão de citocinas desenvolvido no contexto de infecção e possivelmente modificado pelo tratamento com os referidos isolados.

O aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dos índices esplênico e hepático de animais controles desafiados com *Salmonella* em relação aos controles não desafiados é sinal de indução de esplenomegalia e hepatomegalia, respectivamente. Além disso, houve redução significativa no ganho de peso de animais infectados em relação aos controles não desafiados (FIGURA 12). Somados a esses resultados, a análise histológica de cortes de fígado corados com H&E identificou profundo infiltrado inflamatório no fígado em animais desafiados com *Salmonella*, que explica a hepatomegalia observada macroscopicamente. Em adição a esses achados, alterações da arquitetura do intestino observadas em cortes histológicos de íleo distal estão de acordo com o padrão esperado para animais infectados com *Salmonella* (FIGURA 14). Por fim, os animais do grupo controle desafiado com *Salmonella* apresentaram sinais clínicos próprios da infecção

sistêmica como redução da atividade motora, mudança para um comportamento mais letárgico e eriçamento dos pelos de todo o corpo, que perderam o seu brilho habitual presente nos grupos não desafiados. Portanto, pode-se concluir que a dose de 10^6 UFC de *Salmonella* foi suficiente para produzir os sintomas associados ao modelo de desafio com *Salmonella* em animais convencionais da linhagem Swiss NIH com 4-5 semanas de idade.

A observação de micro-abcessos na superfície do fígado que possuía também cor mais opaca são sinais condizentes com a translocação bacteriana presente no modelo de desafio com *Salmonella* (MITTRÜCKER & KAUFMANN, 2000). Porém, não foi feito, neste experimento, o tradicional ensaio para quantificação da carga de *Salmonella* presente no fígado, por plaqueamento de diluições seriadas do macerado em meio seletivo para bactérias Gram (-). A *Salmonella* causa mudança na permeabilidade intestinal, principalmente devido alterações na estrutura do epitélio intestinal e mudança na arquitetura tecidual deste órgão (SANTOS et al., 2001), confirmadas neste experimento nas análises de cortes histológicos do íleo distal. Portanto, em animais convencionais, não apenas *Salmonella*, mas uma ampla variedade de bactérias sofre translocação no intestino caindo na corrente sanguínea e causando bacteremia. Logo, ao quantificar a translocação bacteriana em animais convencionais por plaqueamento em meio seletivo para bactérias Gram (-) (como o MacConkey) estaremos quantificando a translocação de bactérias Gram (-) e não somente da *Salmonella*, ao contrário do que é obtido em animais isentos de germes associados com *Salmonella*. Para quantificação da translocação de *Salmonella* em animais convencionais, técnicas de RT-qPCR ou de marcação *in situ* podem ser empregadas utilizando *primers* ou sondas que se ligam a segmentos de DNA específicos do genoma de *Salmonella*, o que pode ser feito com kits comerciais já disponíveis no mercado.

O aumento dos valores de índice esplênico pode ser relacionado com a elevação do número de esplenócitos, na tentativa de aumentar a resposta imune para controlar a infecção, e não apenas como resultado do aumento do volume do fluido ou do tecido conectivo desse órgão (HILBURGER et al., 1997). Os aumentos de tamanho tanto do fígado quanto do baço, como indicativo de translocação bacteriana e do recrutamento de fagócitos para eliminação de *Salmonella*, foram

encontrados neste trabalho e estão de acordo com dados anteriores descritos na literatura (MÄKELÄ & HORMAECHE, 1997). Assim como neste trabalho, Lee et al., (2006) observaram que a inoculação de 10^5 UFC de *Salmonella*, em camundongos, causou sinais clínicos de infecção, como a letargia.

Considerando-se os mecanismos envolvidos na via de internalização da *Salmonella* (descritos com mais detalhes nas seções 1.7 e 1.8), sabe-se que, após o contato entre *Salmonella* e células epiteliais do intestino, e antes da perda da integridade estrutural do epitélio, o patógeno induz a liberação de IL8 a partir de enterócitos, fato que favorece a migração dos neutrófilos para o epitélio intestinal (MCCORMICK et al., 1993; WALL et al., 2007). Neste estudo, pequena presença de neutrófilos bem como destruição do epitélio e da arquitetura da mucosa intestinal foram observados em animais desafiados (FIGURA 14). A preservação da arquitetura do cólon observada em todos os animais desafiados (controles e experimentais tratados com L36 ou L38) está de acordo com dados anteriores, nos quais foi relatado que *Salmonella enteritidis* ataca preferencialmente o íleo terminal com menor extensão de dano observada no cólon (WELTON et al., 2008; DE MORENO DE LEBLANC et al., 2010).

Foi observado uma tendência de aumento ($p>0,05$) na produção de sIgA e um aumento significativo ($p<0,05$) na proporção de células IgA⁺ em animais controles desafiados com *Salmonella* em relação aos controles salina não desafiados (FIGURAS 13 e 14, respectivamente). Esses resultados sugerem, em conjunto, que a infecção por *Salmonella* aumenta a produção de IgA na mucosa intestinal, provavelmente por aumentar o número de células plasmáticas produtoras de IgA ou por aumentar a atividade de secreção das células IgA⁺ residentes na mucosa intestinal. O mecanismo de aumento da produção de IgA pode ser melhor esclarecido através da contagem de células produtoras de IgA na lâmina própria, usando para isso a marcação de núcleos nas preparações marcadas também com anti-IgA conjugado com FITC. Além disso, a correspondência dos resultados obtidos por ambas as técnicas (ELISA e imunofluorescência direta) nos permite inferir que ambas as metodologias são igualmente viáveis para quantificação da produção de IgA na mucosa do intestino.

Um dos primeiros mecanismos de defesa contra enteropatógenos é a secreção local de sIgA, que contribui para produção de uma barreira imunológica contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal. A IgA se liga ou à superfície bacteriana prendendo-a na camada mucosa do epitélio intestinal ou às moléculas da superfície bacteriana que medeiam a adesão às células epiteliais, impedindo a ligação do patógeno aos receptores usados em sua translocação. O fato de resistir à proteólise luminal faz da IgA uma molécula ideal para desempenhar função protetora na primeira linha de defesa do sistema imune de mucosa (HAJISHENGALLIS et al., 1992). Com o auxílio de células T CD4+ e citocinas (IL10, IL6 e Tgfb1) presentes no intestino, as células B se diferenciam em células plasmáticas secretoras de IgA (MESTECKY, 2003; MOWAT, 2003; MACDONALD & MONTELEONE, 2005; LEFRANCOIS & PUDDINGTON, 2006).

Portanto, parece que este aumento da produção de IgA observado é fruto da indução de mecanismos imune humorais naturais para reduzir a translocação de *Salmonella* no intestino de animais desafiados. Esse aumento de secreção de IgA parece ser sustentado pelos altos níveis de produção de IL6 e Tgfb1 expressos no intestino delgado de animais controles desafiados (FIGURA 18 e TABELA 3) que provavelmente contribuem para a mudança de isotipo de células B imaturas para células plasmáticas produtoras de IgA (GALDEANO et al., 2007), presentes em quantidades significativamente maiores no íleo de animais desafiados. De fato, anticorpos presentes no lúmen intestinal, particularmente IgA e IgM, podem bloquear a penetração de *Salmonella* para tecidos mais profundos. A injeção de hibridomas de células B produtoras de IgA anti-*Salmonella* preveniu a infecção oral de camundongos (MICHETTI et al., 1992). A proteção contra a infecção provavelmente foi mediada pela inibição da adesão bacteriana em células M e enterócitos, que é vital para o sucesso da penetração bacteriana (MICHETTI et al., 1994).

A avaliação do perfil de citocinas induzido pela infecção de *Salmonella* identificou aumento significativo de expressão de várias citocinas pró-inflamatórias no intestino delgado (IL6, IL12b e IL17a) e no grosso (IL17a, Ifng e Tnfa) e apenas de uma citocina regulatória Tgfb1 no intestino delgado, bem como redução da expressão de IL5 no intestino grosso (FIGURA 18 e TABELA 3).

Durante os estágios iniciais de infecção, componentes da parede celular de *Salmonella*, tais como o lipolissacarídeo (LPS) e certas lipoproteínas, induzem uma intensa resposta inflamatória no tecido circundante, resultando na expressão aumentada de citocinas inflamatórias (Tnfa, IL1, IL6, IL12 e IL18). O aumento da expressão de IL12, causado pela infecção por *Salmonella*, está provavelmente relacionado com a polarização de células T em células T_{H1} (TRINCHIERI, 1995). IL12 parece ser principalmente produzida por macrófagos e células dendríticas nas fases iniciais da infecção (TRINCHIERI, 1995; SCHAIBLE et al., 1999). A redução da expressão de IL5 observada neste trabalho pode ser um indicativo da polarização de resposta T_{H1} em detrimento da T_{H2}. Sendo *Salmonella* um patógeno que vive principalmente dentro de macrófagos, a ativação de resposta T_{H1} ou da imunidade inata são características da resposta imune apresentada, pelo hospedeiro, contra a infecção por esse patógeno (MITTRÜCKER & KAUFMANN, 2000). A ativação do eixo IL12:IL18→Ifng é um dos mecanismos de ativação de resposta inflamatória mais característico do combate contra *Salmonella* (ECKMANN & KAGNOFF, 2001).

O aumento da produção de Ifng e Tnfa está relacionado, provavelmente, com a ativação de macrófagos e outras células fagocíticas para destruição da *Salmonella* (NAUCIEL & ESPINASSE-MAES, 1992; GULIG et al., 1997). Essas citocinas podem levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem melhorar a manipulação dos fagossomos contendo bactérias, tornando-os mais acessíveis às moléculas efetoras líticas presentes nos lisossomos (RICHTER-DAHLFORS & FINLAY, 1997). A secreção de Ifng é um dos principais marcos da produção de respostas imunes contra *Salmonella* e o aumento da sua produção é muitas vezes associado com a proteção contra a infecção. O papel central dessa citocina foi demonstrado em um experimento onde camundongos mutantes para o receptor de Ifng eram extremamente sensíveis à infecção por *Salmonella* (HESS et al., 1996). Portanto, aumento da produção de Ifng está relacionado diretamente com mecanismos bactericidas importantes da imunidade celular e inata, vitais para o controle da salmonelose.

O aumento de IL17a em animais controles desafiados com *Salmonella*, observado neste trabalho, vem sendo recentemente descrito como associado aos mecanismos de combate à infecção por *Salmonella*. Um estudo recente mostrou resposta envolvendo aumento da produção de IL17a induzido por *Salmonella* que

levemente contribuiu para a imunidade protetora durante a infecção por *S. Enteritidis* em camundongos. Diante dos resultados, os autores desse estudo afirmam que respostas envolvendo IL17a/T_H17 parecem complementar as respostas do eixo IL12/Ifng que são características do combate contra a infecção causada por *Salmonella* (SCHULZ et al., 2008). Outro estudo mostrou que a ausência de expressão de IL17a na mucosa intestinal está relacionada ao aumento da carga microbiana no fígado e baço em camundongos infectados por *S. Typhimurium* (VAN DE VEERDONK et al., 2009). A expressão de IL17a no intestino pode, em certa parte, explicar a presença de neutrófilos no intestino de animais infectados, pois esta citocina tem papel importante no recrutamento destas células para os sítios de infecção.

Mesmo sendo um potente indutor de respostas anti-inflamatórias, Tgfb1, que teve sua expressão aumentada no intestino de animais pertencentes ao grupo controle desafiado com *Salmonella*, parece ter efeitos protetores contra a infecção causada por *Salmonella* (ECKMANN & KAGNOFF, 2001). Tratamento com Tgfb1 em camundongos produziu redução da translocação bacteriana para fígado e baço e aumento da sobrevivência em camundongos infectados por *Salmonella*. Parece que a proteção induzida por Tgfb1 está relacionada com a liberação de óxido nítrico por macrófagos residentes no baço (GALDIERO et al., 1999).

A ausência de redução significativa de esplenomegalia e hepatomegalia nos grupos experimentais tratados com os lactobacilos e desafiados com *Samonella* em relação ao grupo controle desafiado foi um indicativo de não proteção conferida pelos isolados L36 e L38 à infecção por *Salmonella* (FIGURA 12A e 12B). O tratamento dos isolados não gerou aumentos significativos no ganho de peso, sendo que L36 causou, inclusive, perda de peso significativa (FIGURA 12C). Além disso, não foram detectadas diferenças histológicas significativas nos cortes de íleo distal e fígado entre os grupos tratados e desafiados e o controle desafiado, que poderiam ser indicativo de proteção (FIGURA 14). Somados a esses achados, não foram observadas, durante o período de tratamento, alterações clínicas relacionadas à proteção conferidas pelos tratamentos com L36 ou L38, visto que os grupos tratados e controle desafiados apresentaram os mesmos sinais clínicos típicos da infecção por *Salmonella*. Portanto, é seguro afirmar que os isolados L38 e L36 não conferiram proteção contra a infecção por *S. Typhimurium*.

Entretanto, mesmo não apresentando proteção no modelo experimental de infecção por *Salmonella*, os tratamentos experimentais foram capazes de produzir alterações significativas na produção de IgA e no perfil de citocinas expresso no intestino. Os tratamentos com os lactobacilos reduziram a produção de sIgA no fluido intestinal e também na área de células IgA+ na lâmina própria em comparação ao grupo controle desafiado com *Salmonella* (FIGURA 13 e 15, respectivamente). Como a produção de IgA está relacionada com a proteção contra infecção por *Salmonella*, essa redução explica, em parte, a ausência de proteção conferidas pelos isolados ao desafio. Entretanto, pode-se especular que a redução da produção de IgA é um indicativo da atuação, em animais tratados, de mecanismos de imunidade celular e não humoral.

Os animais tratados com L36 apresentaram redução significativa da expressão de IL6, IL10 e Tgfb1 no intestino delgado e de IL17a no intestino grosso (FIGURA 18). O tratamento com L38 produziu redução significativa da expressão de IL6, IL17a e Tgfb1 no intestino delgado e aumento da expressão de Tnfa no intestino grosso. Porém, o resultado mais interessante que esse tratamento apresentou foi o aumento significativo, ao longo de todo o intestino, da expressão de IL10 em animais desafiados por *Salmonella*. Esses achados corroboram a ausência de proteção, pois não foram detectados aumentos da expressão de citocinas indicativas de respostas protetoras T_H1 (o aumento de Tnfa no intestino grosso de animais tratados com L38 é pouco significativo nesse sentido, visto ser esta uma região pouco afetada pela infecção) contra salmonelose. Além disso, a redução da expressão de IL17a é um indicativo de provável redução de produção de resposta do tipo T_H17 que, tem sido relatada como importante na proteção contra a infecção por *Salmonella*.

O perfil de citocinas gerados pelo tratamento dos isolados em um contexto fisiológico (animais não desafiados) e de infecção (animais desafiados) foi diferente. Isso faz todo o sentido pois, as respostas geradas pelo consumo de bactérias potencialmente probióticas vão depender do estado básico de saúde do hospedeiro. Esse estado pode ser dependente do indivíduo ou ser alterado pela presença de patologias específicas e podem interferir diretamente no impacto imunomodulador da intervenção probiótica (PELTO et al., 1998; ROESSLER et al., 2008; BORCHERS et al., 2009). Entretanto, o aumento da expressão de IL10, ao longo de todo o intestino, produzido pelo tratamento com L38 em animais desafiados com

Salmonella, parece ser um achado muito importante, pois indica uma possível intervenção deste isolado no balanço de citocinas expressas na mucosa inflamada destes animais.

Muitos estudos indicam que um alto valor das proporções entre IL10/IL12 e/ou IL10/Tnfa observadas em co-cultivo de probióticos com linhagens celulares estão correlacionadas com a proteção observada em modelos de colite ulcerativa quimicamente induzida (FOLIGNE et al., 2007; MOHAMADZADEH et al., 2011; VISSERS et al., 2011) possivelmente, como resultado da expansão clonal na mucosa de subpopulações T_{reg} (ROSELLI et al., 2009). A administração de *L. reuteri* em camundongos IL10 nocaute (-/-) reduz o desenvolvimento de colite, sugerindo que probióticos podem exercer efeitos anti-inflamatórios no intestino (MADSEN et al., 1999). Em modelos animais de doença inflamatória intestinal, o probiótico VSL#3, quando administrado em camundongos por 3 semanas, reduziu a severidade da colite. Este benefício foi associado com o aumento de produção de IL10 e, em particular, pela geração de grande número de células T_{reg} na lâmina própria (DI GIACINTO et al., 2005). Tem sido proposto que probióticos podem diminuir a inflamação intestinal em modelos animais de doenças crônicas intestinais pela redução da produção de mediadores inflamatórios associados com a resposta inflamatória T_H1 e, portanto, podem ser usados como fortes candidatos para tratamento destas patologias (DELCENSERIE et al., 2008). Diante disto, L38 parece ser um candidato interessante para tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Sugere-se, portanto, que este isolado deve ser usado em modelos animais de IBDS para averiguação de seu potencial efeito terapêutico neste contexto.

Como as linhagens probióticas produzem os efeitos imunomodulatórios ainda é um tema pouco compreendido na literatura e representa um amplo campo de pesquisa (DELCENSERIE et al., 2008). A membrana citoplasmática de bactérias Gram (+), que constituem a grande maioria dos probióticos comerciais disponíveis, é coberta por uma espessa parede celular constituída de múltiplas camadas de peptídeoglicano, cápsula de polissacarídeos, lipoproteínas e ácido teicóico (KLEEREBEZEM et al., 2010). Algumas dessas moléculas contêm motivos que podem ser reconhecidos por receptores expressos nas células da mucosa intestinal do hospedeiro e causarem efeitos imunomodulatórios (WELLS et al., 2011). Além disso, compostos produzidos pelas bactérias probióticas, como as bacteriocinas

podem ter, além do seu efeito antagonista direto contra patógenos, efeito imunomodulador (CORR et al., 2007; MEIJERINK et al., 2010).

O metabolismo bacteriano também pode estar relacionado com os efeitos dos probióticos sobre o sistema imune. Foi recentemente proposto que o aumento de adenosina-5'-trifosfato (ATP) na mucosa intestinal está relacionado com aumento de produção de IL17a e indicativo de polarização preferencial de células T_H17 (ATARASHI et al., 2008). Portanto, bactérias que apresentam elevada atividade de ATPase poderiam de alguma forma ter algum efeito anti-inflamatório. Dados preliminares de nosso grupo de pesquisa tem sugerido que a linhagem L36 tem elevada atividade de ATPase, o que poderia explicar a redução da expressão de IL17a em animais convencionais tratados com este isolado. Em animais *germ free*, entretanto, o aumento de IL17a observado nos animais monoassociados com L36 pode ser fruto de outros mecanismos moduladores que superam o efeito de redução do ATP luminal apresentado por essa linhagem.

Análises de genômica comparativa e funcional das linhagens L36 e L38 podem providenciar informação útil para determinação dos fatores linhagem-específicos que podem explicar as diferenças de imunomodulação entre elas. Além disso, deve ser sempre lembrado que muitos dos achados de imunomodulação são feitos sobre diferentes condições fisiológicas, e que os resultados encontrados em cada um deles devem ser sempre avaliados com atenção, principalmente aqueles obtidos a partir de células que no organismo vivo não entram em contato com as linhagens administradas oralmente em indivíduos saudáveis, que não representam uma condição biológica real (DELCENSERIE et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

Como conclusões principais deste trabalho podem-se citar:

1. Os isolados L36 e L38 foram capazes de colonizar com sucesso o intestino de animais isentos de germes e se manter viáveis por 10 dias neste ecossistema sem preferência de colonização de nenhuma porção intestinal;
2. Ambos os isolados, L36 e L38, se apresentaram seguros para o consumo oral em modelos animais;
3. O modelo de salmonelose, utilizado neste trabalho, apresentou vários sinais clínicos, histológicos e imunológicos condizentes com a infecção por *Salmonella*, sendo uma ferramenta útil para estudos posteriores com outras linhagens potencialmente probióticas;
4. Os isolados L36 e L38 não conferiram proteção aparente contra infecção por *Salmonella*;
5. As linhagens L36 e L38 não estimularam a produção de IgA em contexto fisiológico e a reduzem em contexto de infecção por *Salmonella*;
6. Ambos os isolados possuem capacidades imunomodulatórias diferentes em animais isentos de germes, convencionais desafiados e não desafiados por *Salmonella*, sendo que algumas dessas capacidades merecem ser exploradas em outros modelos animais, como é o caso do aumento da produção de IL10 induzido por L38 e redução de IL17a produzido por ambos os isolados, observados em animais convencionais, que merece ser estudado em modelos de doenças inflamatórias intestinais como é o caso do modelo de colite quimicamente induzida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. Get Pigs Off Antibiotics. **Nature**, v. 486, p. 564-466, 2012.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.
- ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 12, p. 2838–2846, 1995.
- AIBA, Y.; SUZUKI, N.; KABIR, A. M.; TAKAGI, A.; KOGA, Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 2097-2101, 1998.
- ALDRIDGE, P. D.; GRAY, M. A.; HIRST, B. H.; ANJAM KHAN, C. M. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 655-663, 2005.
- ANADÓN, A; LARRAÑAGA, M. R. M. In: **Simpósio sobre as implicações Sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal**. CBNA-Campinas, p.105-128, 1999.
- ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell Tissue Res.**, v. 290, p. 61–69, 1997.
- ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Basílica**, v.1, n.3, p. 69-77, 2007.
- ARUNACHALAM, K.; GILL, H.S.; CHANDRA, R.K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 263-267, 2000.
- ATARASHI, K.; NISHIMURA, J.; SHIMA, T.; UMESAKI, Y.; YAMAMOTO, M.; ONOUE, M.; YAGITA, H.; ISHII, N.; EVANS, R.; HONDA, K.; TAKEDA, K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 808-812, 2008.
- AXELSSON, L. T.; CHUNG, T. C.; DOBROGOSZ, W. G.; LINDGREN, S. E. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 2, p. 131–136, 1989.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, p.1-66. 2004.
- BACHMANN, P. A. Neue virale Durchfallerkrankungen beim kalb. **Tierärztliche Umschau**, v. 10, p. 524-526, 1977.
- BARBOSA, F. H. F.; SILVA, A. M.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium*

longum Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 1-11, 2005.

BARNES, M. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. **Immunity**, v. 31, p. 401–411, 2009.

BARRINGTON, G. M; GAY, J. M; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BARROW, B. A. Probiotics for chickens. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics – the Scientific Basis**. London: Chapman & Hall, p. 225–259. 1992.

BENDER, A. **Meat and Meat Products in Human Nutrition in the Developing World. Food and Nutrition paper No. 53**, Rome. FAO. 1992.

BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect. Immun.**, v. 23, p. 403–411, 1979.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Micro-biol.**, v. 4, p. 430–435, 1996.

BERG, R. D. Probiotic, probiotics or ‘conbiotics’? **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 89–92, 1998.

BERGEY’S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Ed. George M. Garrity. Williams & Wilkins, 2th ed., v. 2, p. 1106, 2005.

BERNARD, P. S.; WITTEWER, C. T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin. Chem.**, v.48, p. 1178 – 1185, 2002.

BERNET, M. F.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4121-4128, 1993.

BERNET-CAMARD, M. F.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes non bacteriocin antibacterial substances active in vitro and in vivo. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 2747–2753, 1997.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-238, 2006.

BLACKMAN, N. Antibiotics in livestock industries - Their role, current use and alternatives. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v. 13, p. 355-358, 2000.

BOGDAN, C., SCHLEICHER, U. Production of interferon- γ by myeloid cells-fact or fancy? **Trends in Immunol.**, v. 27, n. 6, p. 282–90, 2006.

- BOLTE, E. R. Autism and Clostridium tetani. **Med. Hypotheses**, v. 51, p. 133-144, 1998.
- BOOIJINK, C. C.; ZOETENDAL, E. G.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. **Future Microbiol.**, v. 2, p. 285–295, 2007.
- BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **J. Gastroenterol.**, v. 44, p. 26–46, 2009.
- BRAAT, H.; VAN DEN BRANDE, J.; VAN TOL, E.; HOMMES, D.; PEPPELENBOSCH, M.; VAN DEVENTER, S. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, p. 1618-1625 2004.
- BRASIL. Diário Oficial da União. Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, DF, 23 out. 2007.
- BRASSART, D.; SCHIFFRIN, E.J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, n. 10, p. 321-326, 1997
- BRON, P. A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 66-78, 2012.
- BRUNING-FANN, C.; KANEENE, J. B. Environmental and management risk factors associated with morbidity and mortality in perinatal and pre-weaning calves: a review from an epidemiological perspective. **Veterinary Bulletin**, v. 62, p. 399-413, 1992.
- BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin. Sci.**, v.109, p. 365–379, 2005.
- BUSTIN, S. A; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, p. 192–223, 2006.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p.4 611–622, 2009.
- CANIBE, N.; HOJBERG, O.; HOJSGAARD, S.; JENSEN, B. B. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. **J. Anim. Sci.**, v., 83, p. 1287-1302, 2005.
- CARVALHO, I. P.; MANSILHA, H. F.; MATOS, P.; ALMEIDA, R. **Orientações clínicas urgência pediátrica do porto. Urgência pediátrica integrada do porto**. UPIP. ISBN: 978-989-96449-1-5. 2010.
- CEBRA, J. J.; GEARHART, P. J.; HALSEY, J. F.; HUNVITZ, J. L.; SAHIN, R. D. Role of environmental antigens in the ontogeny of the secretory immune response. **Reticuloendothel S.O.C.**, v.28 (Suppl), p. 61S-7 1S, 1980.

CHAN, R. C.; REID, G.; IRVIN, R. T.; BRUCE, A. W.; COSTERTON, J. W. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. **Infect. Immun.**, v. 47, p.84–89, 1985.

CHRISTENSEN, H.; FRØKIÆR, H.; PESTKA, J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. **J. Immunol.**, v.168, p. 171–8, 2002.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007

CHR. HANSEN S/A. Disponível em <<http://www.chr-hansen.com>>. Acesso 28 ago. 2012.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. ANTIBODY to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, v. 245, n. 4915, p. 308–310, 1989.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Legislação e Ética. 2006. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso 01 mar. 2009. **COBEA**. 2009.

COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p.1052S–1057S, 1999

CONWAY, P. L. Development of intestinal microbiota. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A.; ISAACSON, R. E. (Eds) **Gastrointestinal Microbiology**. London: Chapman & Hall, v. 2, p. 3–38.1997.

CONWAY, P. L.; WANG, X. Specifically targetted probiotics can reduce antibiotic use in animals. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.**, v. 13, p. 358-361, 2000.

COOK, M. J. **The anatomy of the laboratory mouse**. 1965. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure54.shtml>>. Acesso 26 ago. 2012.

COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. **Nature Rev. Immunol.**, v. 8, p. 435–446, 2008.

CORNELI, J. **Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, característica de carcaça e morfologia intestinal em frangos de corte**. Santa Maria, 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2004.

CORR, S. C.; LI,Y.; RIEDEL, C. U.; O'TOOLE, P. W.; HILL, C.; GAHAN, C. G. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 104, p. 7617–7621, 2007.

CROMWELL, G. L. Feed supplements: antibiotics. In: POND, W. G. and BELL, A. W. (Eds.). **Encyclopedia of Animal Science**. New York: Marcel Dekker. 2004.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 245-253, 2002.

CROSS, M. L.; MORTENSEN, R. R.; KUDSK, J.; GILL, H. S. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 191, p. 49-53, 2002.

CRUMP, J. A.; LUBTY, S. P.; MINTZ, E. Z. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of World Health Organization**, v. 82, p. 346-353, 2004.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 213-217, 2002.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; PERDIGÓN, G. Yoghurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, p. 96-104, 2004.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; VALDEZ, J.; PERDIGÓN, G. Regulatory effect of yoghurt on intestinal inflammatory immune response. **Eur. J. Inflamm.**, v. 2, p. 21-61, 2004.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGÓN, G. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. **Cytokine**, v. 34, p. 1-8, 2006.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 223-231, 2010.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E.L. (Eds). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Glasgow, United Kingdom: Blackie Academic and Professional, p.91-142.1994.

DEHORITY, B. A.; ORPIN, C. G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds) **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Chapman & Hall, p. 196-245.1997.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Appl. Environ. Micro-biol.**, v. 66, n. 7, p. 2921-2927,2000.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p. 438-442, 2000.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 10, p. 37-54, 2008.

DI GIACINTO, C.; MARINARO, M.; SANCHEZ, M.; STROBER, W.; BOIRIVANT, M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL10 and IL10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 3237-3246, 2005.

DIERICK, N. A.; VERVAEKE, I. J.; DECUYPERE, J. A.; HENDERICKX, H. K. Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. II. Studies in vivo. **Livestock Production Science**. v. 14, n. 2, p. 177-193, 1986.

DOGI, C.A.; GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. **Cytokine**, v. 41, p. 223–231, 2008.

DONOHUE, D.; SALMINEN, S.; MARTEAU, P. Safety of probiotic bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.), **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker. New York: Marcel Dekker, p. 369–384. 1998.

DOWD, S. E.; SUN, Y.; SECOR, P. R.; RHOADS, D. D.; WOLCOTT, B. M.; JAMES, G. A.; WOLCOTT, R. D. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. **BMC Microbiol.**, v.8, n.43, p. 1-15, 2008^a.

DOWD, S. E.; CALLAWAY, T. R.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; MCKEEHAN, T.; HAGEVOORT, R. G.; EDRINGTON, T. S. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v.8, e125, 2008^b.

DRASAR, B. S.; BARROW, P. A. *Intestinal Microbiology* Wokingham, UK, Van Nostrand Reinhold; 1985.

DUNKLEY, K. D.; DUNKLEY, C. S.; NJONGMETA, N. L.; CALLAWAY, T. R.; HUME, M. E.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C. Comparison of in vitro fermentation and molecular microbial profiles of high-fiber feed substrates incubated with chicken cecal inocula. **Poult. Sci.**, v.86, p. 801-810, 2007.

DUNNE, C. ; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 386S – 392S, 2001.

ECKMANN, L. Defense molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 147-151, 2005.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against Salmonella. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1191–1200., 2001.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1516-635x2003000200001&script=sci_arttext>. Acesso 10 ago. 2012.

EDWARDS, P. R.; BRUNER, D. W. The occurrence and distribution of Salmonella types in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 72, p. 58–67, 1943.

EGERT, M.; GRAAF, A. A.; SMIDT, H.; VOS, W. M.; VENEMA, K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 86-91, 2006.

ELMER, G. W., SURAWICZ, C. M.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutics Agents: A Neglected Modality for the Treatment and Prevention of Selected Intestinal and Vaginal Infection. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 275, p. 870-876, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA SUÍNOS E AVES. **Entendendo a questão dos antibióticos promotores de crescimento em frangos.** 2005. EMBRAPA AVES E SUÍNOS. Disponível em: www.cnpqa.embrapa.br/sgc/sgcartigos/artigos_x9t63k4g.pdf. Acesso em: 10 de ago. de 2012.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Lactobacillus.** Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html#acetotolerans>. Acesso 20 ago. 2012.

FARRELLY, V.; RAINEY, F.A.; STACKEBRANDT, E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2798-2801, 1995.

FASANO, A.; NATARO, J. P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 795-807, 2004.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Curr. Issues Intestinal Microbiol.**, v. 8, p. 44-61, 2007.

FERNANDO, S. C.; PURVIS, H. T.; NAJAR, F. Z.; et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Appl. Environ. Microb.**, v. 76, p. 7482-7490, 2010.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K .C. K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biotecnologia**, v. 8, p. 40-43, 1999.

FILHO-LIMA, J. V. M.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-370, 2000.

FINEGOLD, S. M.; MOLITORIS, D.; SONG, Y.; LIU, C. VAISANEN, M. L.; BOLTE, E.; MCTE-AGUE, M.; SANDLER, R.; WEXLER, H.; MARLOWE, E. M.; COLLINS, M.D.; LAWSON, P. A.; SUMMANEN, P.; BAYSALLAR, M.; TOMZYNSKI, T. J.; READ, E.; JOHNSON, E.; ROLFE, R.; NASIR, P.; SHAH, H.; HAAKE, D. A.; MANNING, P.; KAUL, A. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p.S6-S16, 2002.

FOLIGNE, B.; ZOUMPOPOULOU, G.; DEWULF, J.; YOUNES, A. B.; CHAREYRE, F.; SIRARD, J.; POT, B.; GRANGETTE, C. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. **PLoS ONE**, v. 2, e313, 2007.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO of the United Nations, London Ontario, Canada. 2002.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **World Livestock 2011 – Livestock in food security**, Rome. FAO. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. United States of America. U.S. Department of Health and Human Services., Center for Veterinary Medicine. **Guidance for Industry # 209, The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals**. FDA. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. United States of America. U.S. Department of Health and Human Services., Center for Veterinary Medicine. **Draft Guidance for Industry #213, New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209**. FDA. 2012.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365–369, 1989.

FULLER, R. (Ed) **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992.

FUJIWARA, S.; HASHIBA, H.; HIROTA, T.; FORSTNER, J. F. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1-ceramide. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p. 506–512, 1997.

FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. Effects of a mixture of organisms *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on fat-and-cholesterol-enriched diet. **Br. J. Nutr.**, v. 76, p. 857–867, 1996.

GACKOWSKA, L.; MICHALKIEWICZ, J.; KROTKIEWSKI, M.; et al. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 57, s. 9, p. 13–21, 2006.

GALDEANO, C. M.; PERDIGON, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immunostimulation. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 673-681, 2004.

GALDEANO, C. M.; DE MORENO DE LEBLANC, A. VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 485–492, 2007

GALDIERO, M.; MARCATILI, A.; CIPOLLARO, D.; NUZZO, I.; BEN-TIVOGLIO, C.; ROMANO, C.C. Effect of transforming growth factor beta on experimental *Salmonella typhimurium* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1432–1438, 1999.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd edition, release 5.0. New York: Springer-Verlag. 2004.

GAUDANA, S. B.; DHANANI, A. S.; BAGCHI, T. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1620–1628 2010.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on other colonic bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, v.77, p. 412–420, 1994.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.

GILL, H. S.; SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rham-nosus* strain HN001. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.190, p. 97-104, 2001.

GILLILAND, S. E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 2483-2494, 1989.

GILLILAND, G.; PERRIN, S.; BLANCHARD, K.; BUNN, H. F. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 2725-2729, 1990.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods**, v. 25, p. 386–401, 2001.

GONZALEZ, S. N.; CARDOZO, R.; APELLA, M. C.; OLIVER, G. Biotherapeutic role of fermented milk. **Biotherapy**, v.8, p. 126–134, 1995.

GORDON, S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 3257–3264, 2008.

GORELIK, L., FLAVELL, R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2,p. 46–53 2002.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 1499–1505, 2002.

GOULD, I. M.; MACKENZIE, F. M. Antibiotic Exposure as a Risk Factor for Emergences of Resistance: The Influence of Concentration. **Journal of Applied Microbiology**. Symposium Supplement. v. 92, p.78S–84S, 2002.

GRASSL, G.A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 22-26, 2008.

GUAN, L. L.; NKRUHMAH, J. D.; BASARAB, J. A.; MOORE, S. S. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 288, p. 85–91, 2008.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512 – 519, 2003.

GUERRA, P. V. P.; LIMA, L. N.; SOUZA, T. C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F. J.; SILVA, A. M.; NICOLI, J. R.; GUIMARÃES, E. V. Pediatric functional constipation treatment with

Bifidobacterium-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. **World J. Gastroenterol.**, v. 17, p. 3916-3921, 2011.

GULIG, P. A.; DOYLE, T. J.; CLARE-SALZER, M. J.; MAIESE, R. L.; MATSUI, H. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5191–5191, 1997.

HÄBEBARTH, A. 2012. Disponível em <<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/haegebarth-andrea-2005-08-18/HTML/image002.jpg>> Acesso 26 ago. 2012.

HAIJSHENGALLIS, G.; NIKOLOVA, E.; RUSSEL, M. W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA 1 protease cleavage. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 5057-5064, 1992.

HALLER, D.; BODE, C.; HAMMES, W. P.; PFEIFER, A. M. A.; SCHIFFRIN, E. J.; BLUM, S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. **Gut**, v. 47, p. 79-87, 2000.

HARAGGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 53-66, 2008.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4T+ cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 349-356, 2006.

HEATH, V. L.; MURPHY, E. E.; CRAIN, C.; TOMLINSON, M. G.; O'GARRA, A. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 2639–2649, 2000.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, R19, p. 1-14, 2007.

HENDERICKX, H. K.; VERVAEKE, I. J. J.; DECUYPERE, A. In: **Proceedings of the Growth Promotion Mode of action**. Symposium, SmithKline Corp., Philadelphia, p.3-9, 1981.

HERÍAS, M. V.; KONINKX, J. F. J. G.; VOS, J. G.; HUISIN'TVELD; J. H. J.; VAN DIJK, J. E. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 103, p. 143–155, 2005.

HERSH, D.; MONACK, D. M.; SMITH, M. R.; GHORI, N.; FALKOW, S. ZYCHLINSKY, A. The *Salmonella* invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 2396-2401, 1999.

HESS, J.; LADEL, C.; MIKO, D.; KAUFMANN, S. H. E. *Salmonella typhimurium* aroA2 infection in gene-targeted mice. **J. Immunol.**, v. 156, p. 3321–3326, 1996.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v.10, p 413–417, 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, p. 1026 –1030, 1993.

HILBURGER, M. E.; ADLER, M. W.; ROGERS, T. J.; EISENSTEIN, T. K. Morphine alters macrophage and lymphocyte populations in the spleen and peritoneal cavity. **Journal of Neuroimmunology**, v.80, p. 106-114, 1997.

HOARAU, C.; LAGARAINÉ, C.; MARTIN, L.; VELGE-ROUSSEL, F.; LEBRANCHU, Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 117, p, 696–702, 2006.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, p. 1115–1118, 2001.

HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 283–307, 2002.

HOPKINS, S. A.; NIEDERGANG, F.; CORTHESEY-THEULAZ, I. E.; KRAEHENBUHL, J. P. A recombinant *Salmonella Typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. **Cellular Microbiology**, v. 2, p. 59-68, 2000.

HORMAECHE, C. E. The in vivo division and death rates of *Salmonella typhimurium* in the spleens of naturally resistant and susceptible mice measured by the superinfecting phage technique of Meynell. **Immunology**, v. 41 p. 973–979, 1980.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137–143, 2003.

HUAYNATE, R. A. R.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; BUDIÑO, F. E. L. Uso de probiótico em dietas de suínos: incidência de diarreia, desempenho zootécnico e digestibilidade de rações. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 43, n. 5, p. 664-673, 2006.

HUGHES, L. E.; GIBSON, E. A.; ROBERTS, H. E.; DAVIES, E. T.; DAVIES, G.; SOJKA, W. J. Bovine salmonellosis in England and Wales. **Br. Vet. J.**, v. 127, p. 225–238, 1971.

HUNGATE, R. E. **The Rumen and Its Microbes**. 3 ed. New York: Academic Press. 1966.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária municipal**. Rio de Janeiro. v. 37, p.1-55. IBGE. 2010.

ISHIKAWA, H.; AKEDO, I.; OTANI, T.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, T.; TAKEYAMA, I.; ISHIGURO, S.; MIYAOKA, E.; SOBUE, T.; KAKIZOE, T. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colo-rectal tumors. **Int. J. Cancer**, v. 116, p. 762–767, 2005.

ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 444S–450S, 2001.

JANEWAY, C. A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JEPSON, M. A.; CLARK, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, v.3, p. 1183–1190, 2001.

JIANG, T.; SAVAIANO, D. A. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro: impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, p. 2370 –2377, 1997.

JIMÉNEZ, M. M. S; CASTRO, N. M. C. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. **Infectio**, v.7, p. 22-29, 2003.

JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M. L.; MARTÍN, R.; ODRIÓZOLA, J. M.; NUENO-PALOP, C.; et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical chord blood of healthy neonates born by caesarean section. **Curr. Microbiol.**, v. 51, p.270-274, 2005.

JIN, L.; HO, Y. W.; et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.**, v. 53, p. 351-368, 1997.

KALLIOMAKI, M.; ISOLAURI, E. Role of intestinal flora in the development of allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 3, p. 15–20, 2003.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 1869–1871, 2003.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, p. 127-140, 1990.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, p. 984–993, 2003.

KARNEY, T. L.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Changes in the lactobacilli and coliform populations in the intestinal tract of calves from birth to weaning. **J. Anim. Sci.**, v. 63, p. 446–447, 1986.

KATO, I.; TANAKA, K.; YOKOKURA, T. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 21, p. 121-131, 1999.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, p. 12-19, 2005.

KEDINGER, M.; DULUC, I.; FRITSCH, C.; LORENTZ, O.; PLATEROTI, M.; FREUND, J. N. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 859, p. 1-17, 1998.

KHAFIPOUR E.; LI, S.C.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Appl. Environ. Microb.**, v. 75, p. 7115–7124, 2009.

KHAN, S. A.; EVEREST, P.; SERVOS, S.; FOXWELL, N.; ZÄHRINGER, U.; BRADE, H.; RIETSCHHEL, E. T.; DOUGAN, G.; CHARLES, I. G.; MASKELL, D. J. A lethal role for lipid A in Salmonella infections. **Mol. Microbiol.**, V. 29, p. 571–579, 1998.

KHUNTIA, A.; CHAUDHARY, L. C. Performance of Male Crossbred Calves as Influenced by Substitution of Grain by Wheat Bran and the Addition of Lactic Acid Bacteria to Diet. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 15, n. 2, p.188-194, 2002.

KING, T. S.; ELIA, M.; HUNTER, J. O. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. **Lancet**, v. 352, p.1187–1189, 1998.

KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; SIRITHUNYALUG, J.; OKONOGLI, S. Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Thai Traditional Food. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 485-503, 2008.

KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P.; BERNARD, E.; ROLAIN, T.; ZHOU, M.; SIEZEN, R. J.; BRON P. A. The extracellular biology of the lactobacilli. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 199–230, 2010.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 101, p. 229–238, 2001.

KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 663–693, 2003.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, p. 263-274, 1993.

LAMMERS, K. M.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.; et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunol. Med. Micro-biol.**, v. 38, p. 165–72, 2003.

LANDSVERK, T. The follicle-associated epithelium of the ileal Peyer's patch in ruminants is distinguished by its shedding of 50 nm particles. **Immunol. Cell Bio.**, v. 65, p. 251-261, 1987.

LANGHENDRIES, J. P.; DETRY, J.; VAN HEES, J.; et al. 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.**, v.21, p.177–181, 1995.

LAYTON, A. N.; GALYOV, E.E. Salmonella -induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 9, p. 1-17, 2007.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, p. 728–764, 2008.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 171–184, 2010.

LEE, M-H.; KWON, H. A.; KWON, D-Y.; PARK, H.; SOHN, Y-C.; EO, S-K.; KANG, H-Y.; KIM, S-W.; LEE, J.H. Antibacterial activity of medicinal herb extracts against Salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.270-275, 2006.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p.241-245, 1995.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System?. **Science**, v. 330, p. 1768-1773, 2010.

LEEDLE, J. Probiotics and DFMs-mode of action in the gastrointestinal tract. In: **Simpósio sobre aditivos alimentares alternativos na nutrição animal**. Anais. Campinas: CBNA, p. 25-40. 2000.

LEFRANCOIS, L.; PUDDINGTON, L. Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 681-704, 2006.

LEONARD, W. J. Type I cytokines and interferons and their receptors. In: PAUL, W. E. (Ed.) **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 701-747. 2003.

LEVINGS, M. K.; BACCHETTA, R.; SCHULZ, U.; RONCAROLO, M. G. The Role of IL10 and TGF- β in the Differentiation and Effector Function of T Regulatory Cells. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v. 129, p. 263–276, 2002.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LIEBLER, E. M. Untersuchungen zur Anzahl, Verteilung und Ausdehnung der schleimhauteigenen Solitarfollikel und Peyerschen Platten im Diindarm des Kalbes unter besonderer Berücksichtigung ihrer Oberflächenstruktur. Diss. Tierärztliche Hochschule, Hannover, Germain, 1985.

LIEBLER, E. M.; POHLENZ, J. F.; WOODE, G .N. Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. I. Distribution and histology. **Vet. Pathol.**, v. 25, p. 503-508, 1988.

LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-337, 2006.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F. D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, n. 8, e120, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOEFFLER, F.; Epidemien unter den im hygienischen Institute zu Greifswald gehaltenen Mäusen und über die Bekämpfung der Feldmausplage, Zbl. Bakt. Parasitenkunde, v. 11, p. 129–141, 1892.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. **Real-time PCR: Current Technology and Applications**. Norfolk, UK: Caister Academic Pre., p.284. 2009.

LOUVARD, D.; KEDINGER, M.; HAURI, H. P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 157-195, 1992.

MAASSEN, C. B.; VAN HOLTEN-NEELEN, C.; BALK, F.; DEN BAK-GLASHOUWER, M. J.; LEER, R. J.; LAMAN, J. D.; BOERSMA, W. J.; CLAASSEN, E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. **Vaccine**, v. 18, p. 2613-2623, 2000.

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

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic. Acids. Res.**, v.30, p. 1292–1305, 2002.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, p. 190 –212, 2004.

MADSEN, K. L.; DOYLE, J. S.; JEWELL, L. D.; TAVERNINI, M. M.; FEDORAK, R.N. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1107-1114, 1999.

MAIA, O. B.; DUARTE, R.; SILVA, A. M.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with Salmonella enterica subsp. enterica ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology** , v. 79, p. 183-189, 2001.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 179–185, 1997.

MÄKELÄ, P. H.; HORMAECHE, C. E. Immunity to salmonella. In: Kaufmann, S. H. E. (Ed) **Host Response to Intracellular Pathogens**. TX:R.G. Landes, p.143–166. 1997.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 1031–1037, 1997^a.

MARTEAU, P.; VAERMAN, J. P.; DEHENNIN, J. P.; et al. Effect of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. **Gastroenterology and Clinical Biology**, v. 21, p. 293 – 298, 1997^b.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M. L.; XAUS, J.; et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **J. Pediatr.**, v. 143, p.754-748, 2003.

MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 1-13, 2005.

MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. H. F.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 623-630, 2009.

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. 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, 2010.

MARTINS, F. S.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TIAGO, F. C. P.; MARTINS, A. K. S.; SILVA, F. C. P.; SOUZA, E. L. S.; SOUSA, L. P.; ARAÚJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune response and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 359-364, 2011.

MARTINS, F. S.; GENEROSO, S. V.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVA, A. M.; NEUMAN, E.; LIMA-FILHO, J. V. M.; BAMBIRRA, E. A.; ARANTES, R. M. E.; CARMONA, D. C.; CARDOSO, V. N.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Modelos Animais Gnotobióticos e Convencionais para a Seleção e Avaliação de Probióticos. In: FERREIRA, C. L. L F. (Ed) **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. 1ed. Viçosa: Rubio, 2012.

MASTROENI, P.; GRANT, A. J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, e12, 2011.

MATSUGUCHI, T.; TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 259–66, 2003.

MATSUZAKI, T.; Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 133–140 1998.

MAW, J.; MEYNELL, G. G. The true division and death rates of *Salmonella typhimurium* in the mouse spleen determined with superinfecting phage P22. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 49, p. 597–613, 1968.

MCCORMICK, B. A.; COLGAN, S. P.; DELP-ARCHER, C.; MILLER, S. I.; MADARA, J. L. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, p. 895– 907, 1993.

MCCRACKEN, V. J.; GASKINS, H. R. Probiotics and the immune system. In: Tannock, G.W. (Ed.) **Probiotics a Critical Review**. Norfolk, England: Horizon Scientific Press, p. 85-111. 1999.

MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 1-11, 2001.

MCFARLAND, L. V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. **Microbial. Ecol. Health Dis.**, v. 6, p. 157-171, 1993.

MCKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23–IL17A immune pathway. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.

MEIJERINK, M.; VAN HEMERT, S.; TAVERNE, N.; WELS, M.; DE VOS, P.; BRON, P. A.; SAVELKOUL, H. F.; VAN BILSEN, J.; KLEEREBEZEM, M.; WELLS, J. M. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. **PLoS ONE**, v. 5, e10632, 2010.

MENEZES, A. B.; LEWIS, E.; O'DONOVAN, M.; O'NEILL, B. F.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. M. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 78, p. 256–265, 2011.

MENTEM, J .F. M. **Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos**. In: Anais da 38º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Piracicaba, SP: SBZ, p. 141-157. 2001.

MESTECKY, J.; BLUMBERG, R. S.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R. The mucosal immune system. In: Paul, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 965-1021. 2003.

METCHNIKOFF, E. **Prolongation of Life: Optimistic Studies**. New York: Put-nam's Sons. 1908.

MICHETTI, P.; MAHAN, M. J.; SLAUCH, J. M.; MEKALANOS, J. J.; NEUTRA, M. R. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1786–1792, 1992.

MICHETTI, P.; PORTA, N.; MAHAN, M. J.; SLAUCH, J. M.; MEKALANOS, J. J.; BLUM, A. L.; KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium*. **Gastroenterology**, v. 107, p. 915–923, 1994.

MIETTINEN, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; VARKILA, K. Production of human tumor necrosis factor α , interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5403 – 5405, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2011/12/projecoes-mostram-brasil-como-grande-fornecedor-de-alimentos>>. Acesso 23 de mai. 2012. **MAPA**, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso 15 ago. 2012. **MAPA**. 2012.

MITSUOKA, T. The human gastrointestinal tract. In: WOOD, B. J. B. (Ed) **The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. London: Elsevier Applied Science, p.69–114. 1992.

MITTRÜCKER, H.; KAUFMANN, S. H. E. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 457-463, 2000.

MOHAMADZADEH, M.; PFEILER, E. A.; BROWN, J.B.; ZADEH, M.; GRAMAROSSA, M.; MANAGLIA, E.; BERE, P.; SARRAJ, B.; KHAN, M. W.; PAKANATI, K. C.; ANSARI, M. J.; O'FLAHERTY, S.; BARRETT, T.; KLAENHAMMER, T. R. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.108, p. 4623–4630, 2011.

MONTGOMERY, R. K.; MULBERG, A. E.; GRAND, R. J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**, v. 116, p. 702-731, 1999.

MOORE, W. E.; HOLDEMAN, L. V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese Hawaiians. **Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 961–979, 1974.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MOREAU, M. C.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. (Eds). **Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 69–104. 2000.

MORTEO, C. G.; AWJA, A. S.; ESTRELLA, S. G. Estudio etiológico de los problemas diarreicos em becerros lactentes. **Veterinaria Mexicana**, v. 21, n. 4, p. 435-438, 1990.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunol Today**, v. 12, n.3, p. A49-53, 1991.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 331-341, 2003.

MOUGHAN, P. J.; BIRTLES, M. J.; CRANWELL, P. D.; SMITH, W. C.; PEDRAZA, M. The pig let as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. In: SIMOPOULOS, A.P. (Ed.) **Nutritional Triggers for Health and in Disease**. Washington, D.C.: Karger, p. 40–113. 1992.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. São Paulo: Artemed. 2010.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 933-944, 2002.

NADER DE MACIAS, M.E.; APELLA, M.C.; ROMERO, N.C.; S.N.; OLIVER, G. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 407-411, 1992.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 39, p. 13–126, 1999.

NAKONECZNA, I.; HSU, H.S. The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis, **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 61, p. 76–84, 1980.

NAUCIEL, C.; ESPINASSE-MAES, F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 450–454, 1992.

NEUMANN, C.; DEMMENT, M. W.; MARETZKI, A.; DRORBAUGH, N. & GALVIN, K. The Livestock Revolution and Animal Source Food Consumption. In: STEINFELD H.; MOONEY H.; SCHNEIDER F.; & NEVILLE L. (Eds) **Livestock in a changing landscape**, Vol. 1: Drivers, consequences, and responses. Washington DC: Island Press. 2010.

NEUTRA, M. R.; FREY, A.; KRAEHENBUHL, J. P. M Cells: Gateways: for Mucosal Infection and Immunization. **Cell**, v. 86, p. 345-348, 1996.

NEUTRA, M. R.; MANTIS, N. J.; KRAEHENBUHL, J. P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 1004-1009, 2001.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; CHEN, X. B.; MCINTOSH, F. M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S.C. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

NGAN, J.; KIND, L. S. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. **J. Immunol.**, v. 120, p. 861-865, 1978.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, p. 34-38, 2000.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. 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. 2004.

NISSLE, A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of E. coli therapy (mutaflor). **Medizinische**, v. 4, n. 21, p. 1017–1022, 1959.

NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A.K. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. **Microb. Ecol.**, v. 54, p. 276-289, 2007.

NUTRITION PHYSIOLOGY COMPANY. Disponível em <<http://www.bovamine.com/index.html>>. Acesso 20 ago. 2012. NPC. 2012.

O'BRIEN, A. D. Innate resistance of mice to Salmonella typhi infection. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 948–952, 1982.

O'MAHONY, L.; MCCARTHY, J.; KELLY, P.; HURLEY, G.; LUO, F.; CHEN. K.; O'SULLIVAN, G. C.; KIELY, B.; COLLINS. J. K.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. M. M. Lactobacillus and Bifidobacterium in Irritable Bowel Syndrome: Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profiles. **Gastroenterology**, v. 128, p. 541–551, 2005.

O'NEILL, B. F.; DEIGHTON, M. H.; O'LOUGHLIN, B. M. O.; MULLIGAN, F. J.; BOLAND, T. M.; O'DONOVAN, M.; LEWIS, E. Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. **J. Dairy Sci.**, v. 94, p. 1941–1951, 2011.

OTTE, J. M.; PODOLSKY, D. K. Functional modulation of enterocytes by Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 286, p. G613–G626, 2004.

OWEN, R. L. And now pathophysiology of M cells: good news and bad news from Peyer's patches. **Gastroenterology**, v.85, p.468-470, 1983.

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

OUWEHAND, A. C.; LAGSTROM, H.; SUOMALAINEN, T.; SALMINEN, S. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 46, p. 159 –162, 2002^b.

PAN, W.; LI, P.; LIU, Z. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of Bifidobacterium strains from centenarians' faeces. **Anaerobe**, v. 12, p. 148-152, 2006.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação.** 2.ed. Goiânia: Editora UFG, v. 1, 623 p. 2001.

PARSONS, K. R.; BLAND, A. P.; HALL, G. A. Follicle Associated Epithelium of the Gut Associated Lymphoid Tissue of Cattle. **Vet. Pathol.**, v. 28, p. 22-29, 1991.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H .Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PEARCE, J. L.; HAMILTON, J. R. Controlled trial of orally administered lactobacilli in acute infantile diarrhoea. **J. Pediatr.**, v. 84, p.261–262, 1974.

PEINNEQUIN, A.; MOURET, C.; BIROT, O.; ALONSO, A.; MATHIEU, J.; CLARENÇON, D.; AGAY, D.; CHANCERELLE, Y.; MULTON, E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. **BMC Immunology**, v. 5, e3, 2004.

PELTO, L.; ISOLAURI, E.; LILIUS, E. M.; NUUTILA, J.; SALMINEN, S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. **Clin. Exp. Allergy**, v. 28, p.1474–1479, 1998.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 141-147, 2005.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-521, 2006.

PERDIGÓN, C.; ALVAREZ, S.; MACIAS, M. E. N.; ROUX, M. E.; RUIZ HOLGADO, A.P. The Oral Administration of Lactic Acid Bacteria Increases the Mucosal Intestinal Immunity In Response to Enteropathogens. **I. Food Protect.**, v. 53, p. 404-410, 1990^a.

PERDIGÓN, G.; MARCIAS, M. E. N.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A.P. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Res.**, v. 57, p. 255-264, 1990^b.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Symposium: probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness – Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1597-1606, 1995.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; VINTIÑI, E.; ROUX, E. Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. **Int. J. Immunol. Pharmacol.**, v. 12, p. 97–102, 1999.

PERDIGÓN, G.; GALDEANO, M. C; VALDEZ, J. C.; MEDICI, M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 564, p. 21–26, 2002.

PÉREZ, P .F.; MINNAARD, Y.; DISALVO, E. A.; ANTONI, G. L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 21-26, 1998.

PÉREZ, P. F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; BENYACOUB, J.; SERRANT, P.; et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells. **Pediatrics**, v.119, p.724-732, 2007.

PETERSON, R. E.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.E.; FOLMER, J.; HINKLEY, S.; MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. Effect of *Lactobacillus acidophilus* Strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 Fecal Shedding and Finishing Performance in Beef Feedlot Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 287-291, 2007.

PLEASANTS, J. R. Gnotobiotics. In: MELBY Jr, E.C.; ALTMANN, N.H. Handbook of Laboratory Animal Science. Cleveland, CRC press, p. 119-174, 1974.

POHLENZ, J. F .L.; WOODE, G. N.; WOODMANSEE, D. Typhlitis and colitis in gnotobiotic calves experimentally infected with 108-109 chemically purified *Cryptosporidium* oocysts, p. 268. **Proc. 65 th Ann. Meet. Conf. Res. Workers in Anim. Dis.**, Chicago, IL, 1984.

PRESCOTT, S. L.; MACAUBAS, C.; SMALLACOMBE, T.; HOLT, B. J.; SLY, P. D.; HOLT, P. G. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. **Lancet**, v. 353, p.196–200, 1999.

RADA, V.; VLKOVA, E.; NEVORAL, J.; TROJANOVA, I. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. **F.E.M.S. Microbiol. Lett.**, v. 258, p. 25-28, 2006.

RAMSEY, F. K. **Pathology of a mucosal disease of cattle**. PhD Thesis, Iowa State University, Ames, IA, USA, 1956

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? **Microbes and Infection**, v. 3, p.1261–1269, 2001.

RAUPACH, B.; PEUSCHEL, S. K.; MONACK, D. M.; ZYCHLINSKY, A. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 4922-4926, 2006.

REDDY, B. S. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1478S–1482S, 1999.

REID, G.; YOUNES, J. A.; VAN DER MEI, H. C.; GLOOR, G. B.; KNIGHT, R.; BUSSCHER, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 27–38, 2011.

RESCIGNO, M. Intestinal dendritic cells. **Adv. Immunol.**, v. 107, p. 109–138, 2010.

RICHTER-DAHLFORS, A. A.; FINLAY, B. B. Salmonella interaction with host cells. In: KAUFMANN, S. H. E. (Ed.). **Host Response to Intracellular Pathogens**. Austin, TX: R. G. Landes, p. 251–270. 1997.

RICHTER-DAHLFORS, A.; BUCHAN, A. M. J.; FINLAY, B. B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 569–580, 1997.

RICKE, S.C.; PILLAI, S. D. Conventional and molecular methods for understanding probiotic bacteria functionality in gastroin-testinal tracts. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 19-38, 1999.

RIGBY, R.; KAMM, M. A.; KNIGHT, S. C.; et al. Pathogenic bacteria stimulate colonic dendritic cells to produce pro-inflammatory IL-12 while the response to probiotic bacteria is to produce anti-inflammatory IL10. **Gut.**, v. 50, A70, 2002.

RODRIGUES, A. C. P.; NARDI, R. M.; BAMBIRRA, E. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 251-256, 1996.

ROESSLER, A.; FRIEDRICH, U.; VOGELSANG, H.; BAUER, A.; KAATZ, M.; HIPLER, U. C.; SCHMIDT, I.; JAHREIS, G. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, p. 93–102, 2008.

ROOS, N. M.; KATAN, M. B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 405–411, 2000.

ROSA, João Guimarães. Disponível em < <http://www.fraseseproverbios.com/frases-de-guimaraes-rosa.php>>. Acesso em: 22 ago. 2012.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; NUCCITELLI, S.; CARNEVALI, P.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.; NOBILI, F.; RAMI, R.; GARAGUSO, I.; MENGHERI, E. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 15, p. 1526–1536, 2009.

ROUSSEAU, Jean-Jacques. Disponível em: < http://pt.wikiquote.org/wiki/Jean-Jacques_Rousseau>. Acesso em: 22 ago. 2012.

ROUVIER, E.; LUCIANI, M. F.; MATTÉI, M. G.; DENIZOT, F.; GOLSTEIN, P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. **J. Immunol.**, v. 150, p. 5445–5456, 1993.

RUSHTON, J. **The economics of animal health and production**. Oxford: CAB International. 2009.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. , **Science**, v. 292, p. 1119-1122, 2001.

RUTZ, F.; LIMA, G. J. M. M. **O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abraves-sc/pdf/Palestras2001/Fernando_Rutz.pdf>. Acesso 10 ago. 2012.

SAAVEDRA, J. M. Microbes to fight microbes: a not so novel approach for controlling diarrheal disease. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 125–129, 1995.

SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in Salmonella infections. **Medicine Science (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347–358, 1996.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; W. VOS, M.; FONDEN R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.; MATTILA-ANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93–106, 1998^a.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.-C.; CUMMINGS, J.H.;FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBER-FROID, M.; ROWLAND, I.; Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. S147–S171, 1998^b.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Ed). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.115-8. 2002.

SANTOS, R. L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R. M.; KINGSLEY, R. A.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infection**, v. 3, p.1335–1344, 2001.

SARTOR, R. B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics , probiotics and prebiotics. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1620–1633, 2004.

SARTOR, R. B. Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 105, p. 16413–16414, 2008.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107–33, 1977.

SCARPIGNATO, C.; RAMPAL, P. Prevention and treatment of traveler's diarrhea: a clinical pharmacological approach. **Chemotherapy**, v. 41, p. 48-81, 1995.

SCHAEDLER, R. W.; DUBOS, R.; CASTELLO, R. The development, the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. **J. Exp. Med.**, v. 122, p.59–66, 1965.

SCHAIBLE, U. E.; COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. E. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Adv. Immunol.**, v. 71, p. 267–377, 1999.

SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 286, p. C1213-C1228, 2004.

SCHOTTELIUS, M. Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. II. **Arch. Hyg.**, v. 42, p.48–70, 1902.

SCHULTZ, M.; SARTOR, R. B. Probiotics and inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 1, p. S19–S21, 2000.

SCHULTZ, M.; STRAUCH, U. G.; LINDE, H.; WATZL, S.; OBERMEIER, F.; GÖTTL, C.; DUNGER, N.; GRUNWALD, N.; SCHÖLMERICH, J.; RATH, H. C. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 2, p. 372–378, 2004.

SCHULZ, S. M.; KÖHLER, G.; HOLSCHER, C.; IWAKURA, Y.; ALBER, G. IL17AA is produced by T_H17 , $\gamma\delta$ T cells and other $CD4^+$ lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. **Int. Immunol.**, v. 20, n. 9, p.1129-1138, 2008.

SEJIAN, V.; NAQVI, S.M.K.; EZEJI, T.; LANKRITZ, J.; LAL, R. Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production, DOI: 10.1007/978-3-642-29205-7_2, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. 2012.

SELLARS, R.L. In: ROBINSON, R. K, (Ed) **Therapeutic Properties of Fermented Milks**. Maryland Heights, Elsevier, p. 81-116. 1991.

SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405–440, 2004.

SGOURAS, D.; MARAGKOUidakis, P.; PETRAKI, K.; MARTINEZ-GONZALEZ, B.; ERIOTOU, E.; MICHOPoulos, S.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; MENTIS, A. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 518–526, 2004.

SHEVACH, E. M. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. **Curr. Biol.**, v. 10, p. R572-575, 2000.

SHIRAI, Y.; SUNAKAWA, K.; ICHIHASHI, Y.; YAMAGUCHI, H. A morphological study in germfree mice (*Salmonella* infection). **Exp. Pathol.**, v. 17, p. 158–166, 1979.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 411-417, 1999.

SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; SEMPERE, L.; OLIVARES, M.; BOZA, J.; XAUS, J. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 to healthy adults. *Anaerobe*, v.16, p.195-200, 2010.

SILVA, A. M.; BAMBIRRA, E. A.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, P. P.; GOMES, D. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 331-336, 1999.

SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 29-37, 2004.

SIMMERING, R.; KLEESSEN, B.; BLAUT, M. Quantification of the flavonoid-degrading bacterium *Eubacterium ramulus* in human fecal samples with a species-specific oligonucleotide hybridization probe. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 3705–3709, 1999.

SINGH, R.; CHAUDHARY, L. C.; KAMRA, D. N.; PATHAK, N. N. Effect of feeding yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell suspension on growth and nutrient utilization in rabbits. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 65, p. 104-106, 1995.

SMITH, B. P.; HABASHA, F.; REINA-GUERRA, M.; HARDY, A.J. Bovine salmonellosis: experimental production and characterization of the disease in calves, using oral challenge with *Salmonella typhimurium*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 1510–1513, 1979.

SNITKOFF, G.G. Testes biológicos. In: GENNARO, A. R. (Ed) **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.556-68. 2004.

SOJKA, W. J.; WRAY, C. Incidence of *Salmonella* infection in animals in England and Wales, 1968–73. **Vet. Rec.**, v. 96, p. 280–284, 1975.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 899– 907, 1998.

SPAHN, T. W.; KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. **Gut**, v. 53, p. 456-465, 2004.

SPIKA, J. S.; WATERMAN, S. H.; SOO HOO, G.W.; ST. LOUIS, M. E.; PACER, R. E.; JAMES, S. M.; BISSETT; M. L.; MAYER; L. W.; CHIU; J. Y.; et al. Chloramphenicol-Resistant *Salmonella newport* Traced through Hamburger to Dairy Farms. **N. Eng.I J. Med.** v. 316, p.565-570, 1987.

STECHEER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 82-91, 2011.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds) **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Chapman & Hall, p. 10–72.1997.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 625-630, 1996.

TANNOCK, G. W. More than smell: the complexity of the normal microflora. In: **Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body**. Londres: Chapman and Hall, p.1-35. 1995.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 107-138, 2002.

THORNTON, P.K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.** v.365, p. 2853–2867, 2010.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 251–276, 1995.

TSOLIS, R. M.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; BAUMLER, A. J. Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4879–4885, 1999.

TSOLIS, R. M.; ADAMS, L. G.; HANTMAN, M. J.; SCHERER, C. A.; KIMBOROUGH, T.; KINGSLEY, R. A.; FICHT, T. A.; MILLER, S. I.; BÄUMLER, A. J. SspA is required for lethal Salmonella typhimurium infections in calves but is not essential for diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3158–3163, 2000.

UMESAKI, Y.; SETOYAMA, H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1343–51, 2000.

UNIÃO EUROPÉIA. **Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition**. Disponível em: <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_nutrition/l12037d_en.htm>. Acesso 20 ago. 2012. UE. 2012

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 10 ago. 2012. USDA. 2011.

VAARALA, O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 33, p. 1634–1640, 2003.

VAN DE VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. M.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMB Rep.**, v. 42, p. 776–787, 2009.

VAN DEN BERG, R. J.; VAESSEN, N.; ENDTZ, H. P.; SCHULIN, T.; VAN DER VORM, E. R.; KUIJPER, E. J. Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.36 – 42, 2007.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Arch. Tierernahr.**, v. 40, p. 543-567, 1990.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

VAUGHAN, E. E., MOLLET, B.; VOS, W. M. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 505–510, 1999.

VIEIRA, L. Q.; SANTOS, L. M.; NEUMANN, E.; SILVA, A. P.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R. Probiotics protect mice against experimental infections. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. S168-S169, 2008.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barriers resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895-904, 2003.

VINTIÑI, E.; OCAÑA, V.; NADER DE MACÍAS, M. E. Effect of lactobacilli administration in the vaginal tract of mice: evaluation of side effects and local immune response by local administration of selected strains. **Methods Mol. Biol.**, v. 268, p. 401–410, 2004.

VIRTALA, A. K.; MECHOR, G. D.; GRÖHN, Y. T.; ERB, H.N. Morbidity from non respiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 2043-2046, 1996.

VISSERS, Y.M.; SNEL, J.; ZUURENDONK, P. F.; KLEEREBEZEM, M.; WICHERS, H. J.; SVELKOU, H.F. *Lactobacillus* strains differentially modulate cytokine production by hPBMC from pollen-allergic patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 28–40, 2011.

VITAMEX, S. International Pig Topics. v.16. n.4. 2001.

WALL, D. M.; NADEAU, W. J.; PAZOS, M. A.; SHI, H. N.; GALYOV, E. E.; MCCORMICK, B. A. Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 2299–2313, 2007.

WALL, R.; ROSS, R. P.; RYAN, C. A.; HUSSEY, S.; MURPHY, B.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Role of gut microbiota in early infant development. **Clinical Medicine: Pediatric**, v. 3, p. 45-54, 2009.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics – the Scientific Basis**. London: Chapman & Hall, p. 317–353. 1992.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast culture as feed additives. In: LYONS, T. P. (Ed.) **Biotechnology in Feed Industry**. Nicholasville, Kentucky: Alltech Technical Publications, p. 173-192. 1993.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, 1994.

WALLACE, R. J. Gut microbiology – broad genetic diversity, yet specific metabolic niches. **Animal**, v. 2, p. 661–668, 2008.

WELLS, J. M.; ROSSI, O.; MEIJERINK, M.; VAN BAARLEN, P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.108, p. 4607–4614, 2011.

WELLS, S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BESSER, T.; MCDONOUGH, P.; SMITH, B. E. coli O157 and Salmonella—Status on U.S. **Dairy Operations. National Animal Health Monitoring System**, US Department of Agriculture, Washington, DC, 1998

WELTON, M. L.; SHELTON, A. A.; CHANG, G. I.; VARMA, M. G. Colon, rectum and anus. In: NORTON, J. A. F.; BARIE, P. S.; CHANG, A. E.; LOWRY, S. F.; MULVIHILL, S. J.; PASS, H. I.; THOMPSON, R. W. (Eds). **Surgery: Basic science and clinical evidence**. New York: Springer, p. 1011 – 1110. 2008.

WINKLER, P.; GHADIMI, D.; SCHREZENMEIR, J.; et al. Molecular and cellular basis of microflora – host interactions. **J. Nutr.**, v. 137, p. 756S – 772S, 2007.

WITTEWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, v. 22: 130–138, 1997.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol.Rev.**, v. 51, p. 221–71, 1987.

WOHLT, J. E.; CORCIONE, T. J.; ZAJAC, P. K. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 1345-1352, 1998.

WOODMANSEY, E. J. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1178–1186, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Disponível em <<http://www.who.int.media centre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso 08 de fev. WHO, 2012.

WRAY, C.; SOJKA, W.J. Experimental Salmonella typhimurium infection in calves, **Res. Vet. Sci.**, v. 25, p. 139–143, 1978.

TANI, K.; KUROKAWA, K.; NASU, M. Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 1536–1540, 1998.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p.1027-1031, 2006,

YASUI, H.; SHIDA, K.; MATSUZAKI, T.; YOKOKURA, T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 76, p. 383–389, 1999.

YOKOYAMA, M. G.; JOHNSON, K. A. Microbiology of the rumen and intestine. In: CHURCH, D.C. (Ed) **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. Englewood Cliffs, N.J.: Waveland Press; p.125-144. 1988.

ZHOU, J.S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K.J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M.J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 87-96, 2000.

ZOCCAL, R. ; SOUZA, A. D.; GOMES, A. T.; LEITE, J. L.B. **Produção de Leite na Agricultura Familiar**. Disponível em < <http://www.sober.org.br/palestra/12/09O433.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

ZOUMPOPOULOU, G.; FOLIGNE, B.; CHRISTODOU LOU, K.; GRANGETTE, C.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 18 – 26, 2008.