

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

FERNANDA ALVES ABRANTES

**EFEITOS DA *Bifidobacterium longum* 5^{1A} SOBRE O
RESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE INTESTINAL, EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR
DSS**

**Belo Horizonte
2015**

FERNANDA ALVES ABRANTES

**EFEITOS DA *Bifidobacterium longum* 5^{1A} SOBRE O
RESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE INTESTINAL, EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR
DSS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
Coorientadora: Profa. Dra. Simone Odília Antunes
Fernandes

**Belo Horizonte
2015**

Abrantes, Fernanda Alves.

A161e Efeitos da *Bifidobacterium longum* 5^{1A} sobre o restabelecimento da homeostase intestinal, em modelo experimental de colite ulcerativa induzida por DSS / Fernanda Alves Abrantes – 2015.

112 f.: il.

Orientador: Valbert Nascimento Cardoso.

Coorientadora: Simone Odília Antunes Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Intestinos – Doenças inflamatórias – Teses. 2. Colite ulcerativa – Teses. 3. Probióticos – Teses. 4. *Bifidobacterium* – Teses. I. Cardoso, Valbert Nascimento. II. Fernandes, Simone Odília Antunes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

FERNANDA ALVES ABRANTES

EFEITOS DA *Bifidobacterium longum* 51A SOBRE A HOMEOSTASE
INTESTINAL, EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA
INDUZIDA POR DSS

TESE APROVADA EM 10 DE ABRIL DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ELISABETH NEUNANN


Prof. Dr. FLÁVIO ALMEIDA AMARAL


Profa. Dra. JACQUELINE APARECIDA TAKAHASHI


Profa. Dra. SIMONE ODÍLIA ANTUNES FERNANDES
Coorientadora


Prof. Dr. VALBERT NASCIMENTO CARDOSO
Orientador e Presidente da Comissão

Aos meus pais, meu noivo e minha irmã, que me apoiaram durante toda a caminhada e incentivaram em cada dificuldade,

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado e acompanhado durante toda essa jornada, dando-me sabedoria e força nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador, prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, por todos os ensinamentos e exemplo profissional no decorrer do mestrado. Muito obrigada por todo apoio, disponibilidade e confiança!

À minha coorientadora, profa. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes, pela atenção, carinho, e fornecimento da estrutura e materiais necessários para realização dessa pesquisa.

Aos colaboradores prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins e profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes por terem disponibilizado a estrutura e material necessário para a manipulação do probiótico, realização da dosagem de citocinas, quimiocinas, enzimas, sIgA e análises histológicas. Agradeço também por toda atenção e tempo disponibilizado para discussão dos resultados e esclarecimento de dúvidas.

Às companheiras de laboratório, Maria Emília Andrade e Patrícia Barros, pela ajuda e paciência durante os experimentos, e também pela instrução relativa aos procedimentos do laboratório.

À aluna de mestrado Bruna Nascimento, pela ajuda nos experimentos, dosagem de citocinas, quimiocinas, sIgA e instruções quanto à manipulação do probiótico. Muito obrigada pela amizade e companheirismo!

À aluna de pós-doutorado do laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, Christiane Cartelle, por toda a ajuda nos processos relativos à análise histológica.

Aos alunos de iniciação científica, Ítala Marzano e Sued Miranda pela ajuda nos últimos experimentos realizados.

A todos os companheiros do laboratório de Radioisótopos, laboratório de Agentes Bioterapêuticos, laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos e laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, pelos momentos que passamos juntos.

Ao farmacêutico Vanderli Pacheco, por toda ajuda no processo de adaptação às normas do laboratório e providência de materiais necessários à realização dos experimentos.

Aos meus pais, José Francisco e Virgínia, que sempre me apoiaram e forneceram as condições necessárias para que eu conseguisse realizar essa conquista. Ao meu noivo, Rondinele, pelo apoio, carinho, paciência e compreensão em todos os momentos. À minha irmã, Bruna, por todo incentivo e preocupação. Amo vocês!

Aos professores, funcionários e colegas do programa de pós-graduação, que de maneiras diferentes, contribuíram para o processo de aprendizagem.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por todo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

Albert Einstein

RESUMO

Colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal caracterizada por períodos crônicos de remissão e reincidência da inflamação intestinal, resultando em dor abdominal intermitente, diarreia e febre. Existem relatos na literatura mostrando que probióticos são capazes de induzir efeitos benéficos sobre o epitélio intestinal. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração da *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL5^{1A}) em camundongos BALB/c com colite ulcerativa, induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS). A colite foi induzida pela administração, na água, da solução de DSS (3,5%), durante sete dias. Os animais do grupo preventivo/curativo receberam, por gavagem, 0,1 mL da BL5^{1A} (10⁸ UFC) antes e durante a indução da colite, enquanto que, no grupo curativo, a administração da BL5^{1A} ocorreu apenas no período correspondente à indução da doença. Durante os 7 dias de indução da doença, os animais foram avaliados quanto ao consumo de DSS, variações no peso, consistência e presença de sangue nas fezes. Após este período, os camundongos foram anestesiados [solução de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg)] e eutanasiados para a retirada do sangue, fluido intestinal e cólon. Parâmetros como permeabilidade intestinal (PI), comprimento do cólon, extensão da lesão e estudos histológicos do epitélio intestinal foram investigados. Além disso, foram realizadas dosagens de citocinas (IL-1 β , IL-10), quimiocinas (CXCL1 (KC), CCL11) e imunoglobulina A secretora (sIgA). Infiltrados de neutrófilos e eosinófilos também foram investigados, de maneira indireta, por meio da avaliação das enzimas MPO e EPO, respectivamente. Os resultados mostraram que os animais que receberam DSS perderam peso ($p < 0,001$), apresentaram aumento do score clínico ($p < 0,05$), da PI ($p < 0,01$), da citocina IL-1 β ($p < 0,05$), das quimiocinas CXCL1 ($p < 0,01$) e CCL11 ($p < 0,001$), das enzimas MPO e EPO ($p < 0,001$) e, também da sIgA ($p < 0,001$), em relação ao controle. Além disso, apresentaram alterações do epitélio intestinal, intenso edema da submucosa, lesões na mucosa e infiltrado inflamatório. Os animais que receberam o tratamento curativo com *Bifidobacterium longum* 5^{1A} mostraram redução da extensão da lesão ($p < 0,01$), redução dos níveis de IL-1 β ($p < 0,001$) e MPO ($p < 0,05$) e maior preservação do epitélio intestinal, com menor intensidade do edema, quando comparados com o grupo DSS. Enquanto isso, o tratamento preventivo/curativo contribuiu apenas para a redução de EPO ($p < 0,001$) e da

extensão da lesão ($p < 0,01$). O tratamento curativo foi mais eficaz na redução de alguns aspectos relacionados com a intensidade da resposta inflamatória, entretanto, não produziu efeitos benéficos sobre os parâmetros clínicos avaliados e, tampouco, reduziu a PI na colite experimental.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais; colite ulcerativa; probióticos; *Bifidobacterium*; *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

ABSTRACT

Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease characterized by periods of remission and recurrence of intestinal inflammation, resulting in intermittent abdominal pain, diarrhea and fever. There are reports in literature demonstrating that probiotics are capable of inducing beneficial effects on intestinal epithelium. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effect of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL5^{1A}) administration in BALB/c mice with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). For this, colitis was induced by administration of DSS solution (3.5%) for seven days. Animals belonging to preventive/curative group received by gavage, 0.1 mL of BL5^{1A} (10⁸ CFU) before and during colitis induction, while, animals in curative group, only received BL5^{1A} during colitis induction. During disease induction period, DSS consumption, weight variation, consistency and presence of blood in the stool were evaluated. After this period, mice were anesthetized [xylazine (8 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) solution], euthanized, and blood, intestinal fluid and colon were collected for carrying out analyzes. Parameters such as intestinal permeability (IP), colon length, injury extent and histological studies of intestinal epithelium were investigated. In addition, cytokines (IL-1 β , IL-10), chemokines (CXCL1 (KC), CCL11) and secretory immunoglobulin A (sIgA) measurements were performed. Neutrophils and eosinophils infiltrate were indirectly investigated through MPO and EPO enzymes evaluation, respectively. DSS administration resulted in animals weight lost (p<0.001), increased clinical score (p<0.05), IP (p<0.01), IL-1 β cytokine (p<0.05), CXCL1 (p<0.01) and CCL11 (p<0.001) chemokines, MPO and EPO enzymes (p<0.001), and also sIgA (p<0.001), as compared to control group. Furthermore, disease induction resulted in intestinal epithelium changes, submucosa edema, mucosal lesions and inflammatory infiltrate. Animals that received *Bifidobacterium longum* 5^{1A} curative treatment showed reduced lesion extension (p<0.01), IL-1 β (p<0.001) and MPO (p<0.05) levels reduction, higher intestinal epithelial preservation and lower edema intensity compared with DSS group. Preventive/curative treatment only contributed to EPO (p<0.001) and injury extension (p<0.01) reduction. Curative treatment was more effective in reducing some aspects related to inflammatory response intensity, however, did not produce beneficial effects on clinical parameters evaluated and neither reduced IP in experimental colitis.

Keywords: Inflammatory bowel diseases; ulcerative colitis; probiotics; *Bifidobacterium*; *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Barreira intestinal.....	19
Figura 2 - Principais características do sistema imune intestinal.....	24
Figura 3 - Resposta imune inata e adaptativa a bactérias invasoras.....	25
Figura 4 - Estrutura conceitual da patogênese das IBDs.....	28
Figura 5 - Fisiopatologia da colite ulcerativa.....	34
Figura 6 - Estratégias terapêuticas para modulação da disbiose intestinal.....	39
Figura 7 - Potenciais mecanismos de ação dos probióticos.....	42
Figura 8 - Esquema representando o delineamento experimental dos tratamentos conforme a indução da doença.....	55
Figura 9 - Consumo da solução de DSS (3,5%) durante a indução da colite.....	64
Figura 10 - Desenvolvimento ponderal.....	65
Figura 11 - <i>Score</i> clínico.....	66
Figura 12 - Permeabilidade intestinal.....	67
Figura 13 - Comprimento do cólon.....	68
Figura 14 - Fotomicrografias do cólon de camundongos BALB/c convencionais tratados com probiótico antes e durante a indução da colite (preventivo/curativo)...	70
Figura 15 - Fotomicrografias do cólon de camundongos BALB/c convencionais tratados com probiótico durante a indução da colite (curativo).....	72
Figura 16 - Análise morfométrica do cólon.....	73
Figura 17 - <i>Score</i> histológico.....	74
Figura 18 - Concentração de IL-1 β no cólon.....	75
Figura 19 - Concentração de IL-10 no cólon.....	76
Figura 20 - Concentração de CXCL1 (KC) no cólon.....	77
Figura 21 - Concentração de CCL11 (eotaxina-1) no cólon.....	78
Figura 22 - Concentração da enzima mieloperoxidase no cólon.....	79
Figura 23 - Concentração da enzima peroxidase eosinofílica no cólon.....	80
Figura 24 - Concentração de sIgA no fluido intestinal.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPs - (*Antimicrobial peptides*) Peptídeos antimicrobianos
- APCs - (*Antigen-presenting cells*) Células apresentadoras de antígenos
- BL5^{1A} - *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
- CD - (*Crohn's disease*) Doença de Crohn
- Célula Th - Célula T auxiliar
- CTL - Controle
- Da - Daltons
- DCs - (*Dendritic cells*) Células dendríticas
- DSS - (*Dextran sodium sulfate*) Sulfato de sódio dextrano
- DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- EPO - (*Eosinophil peroxidase*) Peroxidase eosinofílica
- FAE - (*Follicle-associated epithelium*) Epitélio associado ao folículo
- FAO - (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- GWA - (*Genomewide association*) Estudos genômicos de associação
- IBDs - (*Inflammatory bowel diseases*) Doenças inflamatórias intestinais
- IECs - (*Intestinal epithelial cells*) Células epiteliais intestinais
- IFN- γ - Interferon gama
- IL - Interleucina
- IL23R - Receptor da IL-23
- MBq - Megabecquerel
- MLNs - (*Mesenteric lymph nodes*) Linfonodos mesentéricos
- MPO - (*Myeloperoxidase*) Mieloperoxidase
- MRS - *de Man, Rogosa e Shape*
- Na^{99m}TcO₄ - Pertecnetato de sódio
- NF- κ B - (*Nuclear factor- κ B*) Fator nuclear kappa B
- NKT - (*Natural killer T cells*) Células T natural killer
- NLRs - (*NOD-like receptors*) Receptores do tipo NOD
- NOD - (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo

PBMCs - (*Peripheral blood mononuclear cells*) Células mononucleares do sangue periférico

PPs - Placas de Peyer

PRRs - (*Pattern-recognition receptors*) Receptores de reconhecimento padrão

SCFA - (*Short-chain fatty acids*) Ácidos graxos de cadeia curta

SEM - Erro padrão da média

sEPS - (*Surface exopolysaccharide*) Polissacarídeo extracelular

slgA - Imunoglobulina A secretora

SNPs - (*Single nucleotide polymorphisms*) Polimorfismos de nucleotídeo único

^{99m}Tc - ^{99m}t tecnécio

TGF- β - (*Transforming growth factor- β*) Fator de transformação do crescimento beta

TGI - Trato gastrointestinal

TLRs - (*Toll-like receptors*) Receptores do tipo toll

TNBS - Ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico

TNF- α - (*Tumour necrosis fator alpha*) Fator de necrose tumoral alfa

TSLP - (*Thymic stromal lymphopoietin*) Linfopoiatina do estroma tímico

UC - (*Ulcerative colitis*) Colite ulcerativa

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

WHO - (*World Health Organization*) Organização Mundial da Saúde

ZO-1 - Zônula oclusiva-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Intestino: estrutura e funções	17
2.2 Microbiota entérica e sua relação com o sistema imune intestinal.....	19
2.3 Doenças inflamatórias intestinais.....	25
2.3.1 Considerações gerais	25
2.3.2 Colite ulcerativa	28
2.3.2.1 Epidemiologia	28
2.3.2.2 Diagnóstico e classificação.....	29
2.3.2.3 Etiologia e fisiopatologia	31
2.3.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais	37
2.4. Probióticos	39
2.4.1 As bifidobactérias.....	44
2.5 Modelo experimental de colite ulcerativa e testes de permeabilidade intestinal	47
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Animais experimentais	54
4.2 Micro-organismo	54
4.3 Indução química de colite aguda por DSS	54
4.4 Delineamento experimental	55
4.5 Análise de parâmetros clínicos	56
4.6 Estudo da permeabilidade intestinal	57
4.6.1 Marcação do DTPA com ^{99m} tecnécio.....	57
4.6.2 Determinação da permeabilidade intestinal	57
4.7 Análise do comprimento do cólon	58
4.8 Análise histológica	58
4.8.1 Coloração Hematoxilina e Eosina.....	59
4.8.2 Análise das lâminas e documentação fotográfica	59
4.8.3 Análise morfométrica	59

4.8.4 Score histológico.....	60
4.9 Dosagem de citocinas (IL-1 β e IL-10) e quimiocinas [CXCL1 (KC) e CCL11 (eotaxina-1)] no cólon	60
4.10 Avaliação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) para determinação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos no cólon	61
4.10.1 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)	61
4.10.2 Medida da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO).....	61
4.11 Dosagem de imunoglobulina A secretora (slgA)	62
4.12 Análises estatísticas.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 Análise do consumo da solução de DSS durante a indução da colite	64
5.2 Análise de parâmetros clínicos	64
5.3 Permeabilidade intestinal	67
5.4 Comprimento do cólon	68
5.5 Análise histológica	69
5.5.1 Análise histopatológica do cólon.....	69
5.5.2 Análise morfométrica do cólon.....	73
5.5.3 Score histológico.....	73
5.6 Análise de citocinas e quimiocinas no cólon	75
5.6.1 IL-1 β	75
5.6.2 IL-10.....	76
5.6.3 CXCL1 (KC).....	76
5.6.4 CCL11 (Eotaxina-1)	77
5.7 Avaliação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no cólon	78
5.7.1 MPO.....	78
5.7.2 EPO	79
5.8 Concentração de slgA no fluido intestinal	80
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	112

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (IBDs) são desordens crônicas que compreendem majoritariamente a colite ulcerativa (UC) e a doença de Crohn (CD). Apesar de não possuírem etiologia totalmente esclarecida, sabe-se que fatores imunológicos, genéticos, ambientais e alterações na microbiota intestinal (disbiose) estão envolvidos no seu aparecimento. As doenças são oriundas, portanto, de uma resposta imune anormal da mucosa aos elementos da microbiota intestinal em indivíduos geneticamente susceptíveis (BRAUS; ELLIOTT, 2009; CHO, 2008; FIOCCHI, 2005; KUGATHASAN; FIOCCHI, 2007; ORDÁS *et al.*, 2012).

Os pacientes portadores das IBDs possuem a qualidade de vida prejudicada devido às características, sintomas e complicações oriundas dessas doenças, as quais são caracterizadas por períodos crônicos de remissão e reincidência da inflamação intestinal, resultando em dor abdominal intermitente, diarreia e febre. Tais fatores denotam a necessidade de tratamento e controle adequados, já que na maioria das vezes a possibilidade de cura dessas doenças é inexistente (BRAUS; ELLIOTT, 2009; DEWULF *et al.*, 2007; ORDÁS *et al.*, 2012).

Assim, diversos estudos têm sido realizados buscando formas alternativas para o tratamento, sendo que a relação entre disbiose intestinal e o surgimento das IBDs, sobretudo da UC, torna relevante o estudo dos probióticos como uma possível ferramenta terapêutica (KANAUCHI; ANDOH; MITSUYAMA, 2013; KOBOZIEV *et al.*, 2014; SPEKHORST *et al.*, 2014).

De acordo com Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO), probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Diversos são os tipos de probióticos existentes, porém os efeitos acarretados pela utilização dos mesmos dependem da linhagem a que eles pertencem. Alguns tipos têm demonstrado possuir efeito positivo no tratamento da UC (*Escherichia coli* Nissle 1917 e VSL#3), sendo que linhagens de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são consideradas candidatas em potencial para utilização no manejo das IBDs (FAO/WHO, 2002; LEAHY *et al.*, 2005; PHILIPPE *et al.*, 2011).

As bifidobactérias são micro-organismos pertencentes naturalmente à microbiota intestinal humana e estão diretamente associadas a efeitos intestinais benéficos (SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013). *Bifidobacterium longum* 5^{1A} é uma bactéria anaeróbia obrigatória, a qual foi isolada de fezes de criança saudável e mantida no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estudos realizados com essa bactéria mostraram que a mesma foi efetiva no tratamento da constipação intestinal de crianças e adolescentes, na proteção contra infecção patogênica e na indução da proliferação de células produtoras de IgA no intestino de camundongos (GUERRA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

Sendo assim, tendo em vista o impacto que a UC causa na qualidade de vida dos pacientes, a relação entre microbiota e IBDs, além dos benefícios intestinais e sistêmicos já comprovados pelo uso dos probióticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a administração intragástrica da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em um modelo experimental de colite ulcerativa seria eficaz na preservação da integridade da mucosa intestinal e na promoção de equilíbrio dos sistemas imunológico e inflamatório. A escolha desta bifidobactéria deveu-se ao fato desse gênero ser membro da microbiota humana, assim como pelos efeitos benéficos acarretados pela sua utilização. Além disso, não há na literatura estudos relacionados à utilização da *Bifidobacterium longum* 5^{1A} na UC, o que torna este estudo relevante e original.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Intestino: estrutura e funções

O trato gastrointestinal (TGI) consiste em um conjunto de órgãos tubulares fundamentais para o processo de digestão de alimentos, absorção de nutrientes e água, excreção de resíduos e proteção do organismo (BRANDTZAEG, 2009; GUARNER, 2011; KIM; HO, 2010; SANDERS *et al.*, 2012; SELLERS; MORTON, 2014).

A proteção proporcionada pelo TGI pode ser atribuída em parte à presença do epitélio intestinal, o qual é dotado de estruturas capazes de separar o meio interno e externo do indivíduo, possibilitando, porém, uma comunicação entre ambos e o reconhecimento imunológico das substâncias que transitam pelo intestino (GUARNER, 2011; MOAL; SERVIN, 2006; SELLERS; MORTON, 2014).

O epitélio intestinal é revestido por uma camada única de células, as células epiteliais intestinais (IECs), as quais estão interconectadas por junções firmes estabelecendo a formação de uma barreira física e controle da permeabilidade no intestino, fatores fundamentais para manutenção da homeostase intestinal. Outros fatores envolvidos na manutenção da homeostase são: secreção de compostos que influenciam na colonização microbiana, “amostragem” do microambiente intestinal, diferenciação entre bactérias benéficas e patogênicas, e indução/modulação das respostas imunes (ARTIS, 2008; MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

Diferentes tipos de IECs podem ser identificados, dentre os quais, enterócitos, células de Paneth, células calciformes, células enteroendócrinas e células M (*microfold*) (Figura 1). Os enterócitos são células absorptivas adaptadas às funções metabólicas e digestivas. As células calciformes, células de Paneth e células enteroendócrinas são células secretoras fundamentais para a manutenção da função digestiva e de barreira do epitélio intestinal (ABREU, 2010; KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014).

As células enteroendócrinas promovem a conexão entre os sistemas neuroendócrinos entérico e central, por meio da produção de hormônios que atuam na regulação da função digestiva, como regulação da secreção de fluidos e

eletrólitos, modulação da motilidade e da sensação de saciedade (ABREU, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

As células caliciformes e células de Paneth atuam no estabelecimento de uma barreira física e bioquímica no intestino, por meio da secreção de muco e peptídeos antimicrobianos (AMPs), minimizando o contato de micro-organismos com a superfície do epitélio e células do sistema imune (PETERSON; ARTIS, 2014).

O muco, primeira linha de defesa do epitélio intestinal contra injúrias físicas e químicas é composto principalmente pela mucina MUC2, uma proteína altamente glicosilada produzida e secretada pelas células caliciformes. O muco secretado forma duas camadas distintas, uma interna firmemente aderida às células epiteliais que é impermeável à maioria das bactérias, e a outra externa, mais frouxa, onde as bactérias são encontradas (HOOPER; MACPHERSON, 2010; JOHANSSON *et al.*, 2011; KIM; HO, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

Além de estabelecer essa barreira física, o muco forma uma estrutura que permite a retenção de outras substâncias, como moléculas antimicrobianas e imunoglobulina A secretora (sIgA), culminando em elevada atividade antimicrobiana na superfície do epitélio, limitando assim, a quantidade e diversidade de bactérias que podem atingir o epitélio intestinal ou interagir com o sistema imune da mucosa (KIM; HO, 2010; MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

Os AMPs são moléculas fundamentais para o controle microbiano intestinal, uma vez que promovem a morte bacteriana por meio do ataque enzimático às suas estruturas essenciais ou por meio da privação de metais importantes para as mesmas. Esses peptídeos são produzidos pela maioria das IECs, em especial, as células de Paneth (HOOPER; MACPHERSON, 2010; MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

As células M encontram-se sobrepostas às estruturas linfoides do intestino, como placas de Peyer (PPs) e folículos linfoides isolados, em uma região denominada epitélio associado ao folículo (FAE). Esse tipo de célula especializada possui importante função na imunidade da mucosa, uma vez que medeia a apresentação de antígenos luminiais e micro-organismos intactos para as células dendríticas presentes no domínio subepitelial, desencadeando a resposta imunológica (BAUMGART; CARDING, 2007; KIM; HO, 2010; MOWAT, 2003; PETERSON; ARTIS, 2014).

O funcionamento adequado dos componentes da barreira intestinal é fundamental para garantir uma eficiente separação entre a microbiota e os tecidos do hospedeiro, culminando em uma resposta imunológica apropriada e manutenção da homeostase (SELLERS; MORTON, 2014).

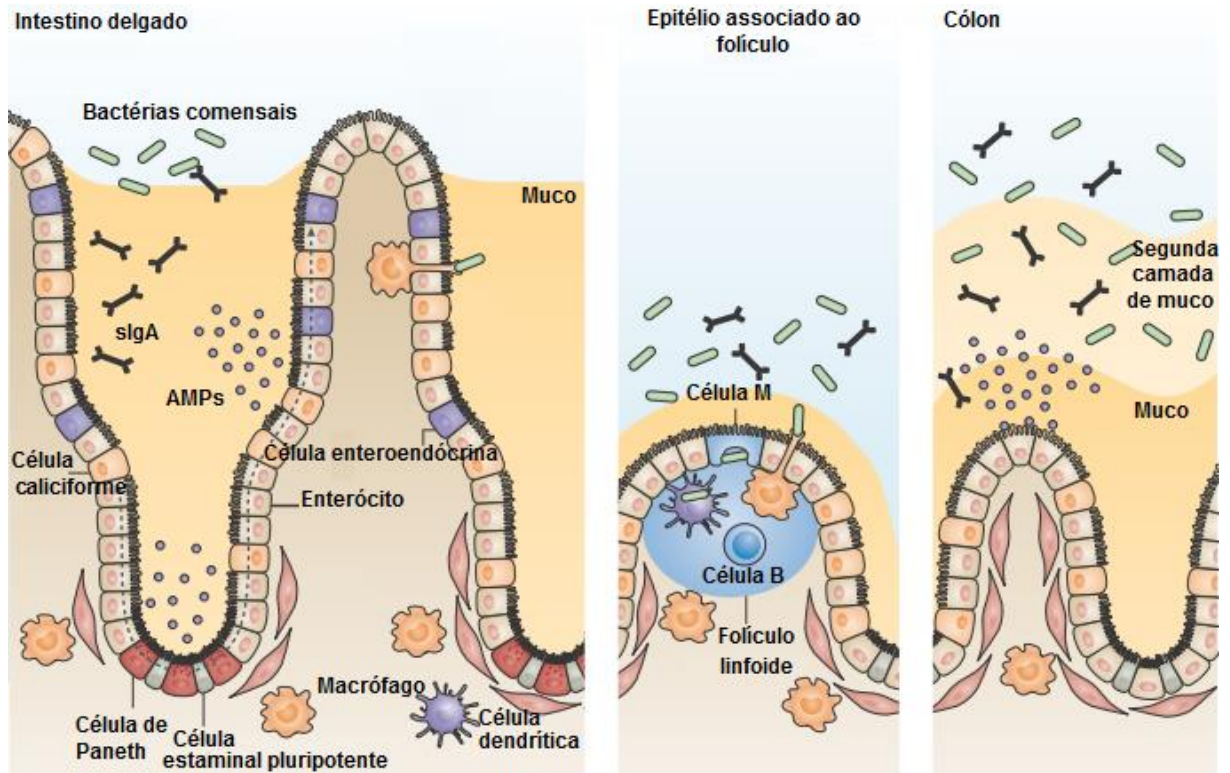


Figura 1. Barreira Intestinal. Células epiteliais intestinais (IECs) formam uma barreira física e bioquímica que mantém a segregação entre as comunidades microbianas luminiais e o sistema imune da mucosa. As células estaminais pluripotentes epiteliais intestinais controlam a renovação contínua da camada de IECs. IECs diferenciadas migram das criptas para as vilosidades, com exceção das células de Paneth. Células caliciformes e células de Paneth secretam muco e peptídeos antimicrobianos (AMPs) que promovem a exclusão de bactérias da superfície epitelial. A transcitose e liberação de IgA secretora (sIgA) no lúmen contribuem para o funcionamento da barreira. As células M medeiam o transporte de antígenos e bactérias presentes no lúmen para as células dendríticas. Macrófagos residentes reconhecem o conteúdo luminal por meio dos seus dendritos transepteliais (PETERSON; ARTIS, 2014, p. 142 - adaptado).

2.2 Microbiota entérica e sua relação com o sistema imune intestinal

O termo microbiota refere-se a uma comunidade de micro-organismos vivos reunidos em um determinado nicho ecológico. O TGI do ser humano é densamente povoado por diferentes micro-organismos, em especial bactérias, que o colonizam permanentemente (GUARNER, 2011).

A população microbiana do intestino humano é estimada em aproximadamente 100 trilhões de bactérias, incluindo de 500 a 1000 espécies diferentes, sendo quatro filos predominantes: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria (ARTIS, 2008; CLEMENTE *et al.*, 2012; GUARNER, 2011; HOOPER; MACPHERSON, 2010; KIM; HO, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; RUPA; MINE, 2012).

A concentração de bactérias aumenta à medida que se desloca distalmente no intestino, abrigando, o duodeno, cerca de 10^3 - 10^5 organismos por grama de conteúdo luminal, jejuno e íleo, 10^4 e 10^7 , respectivamente, e o cólon, aproximadamente 10^{14} bactérias/grama. A distribuição de bactérias aeróbias e anaeróbias ao longo do intestino também é diferente, sendo a dominância na região proximal de bactérias aeróbias e ou anaeróbias facultativas. Já a região distal, principalmente o cólon é majoritariamente colonizado por bactérias anaeróbias (ARTIS, 2008; CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011; GUARNER, 2011; HO; LESS; SATSANGI, 2011; KIM; HO, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; RUPA; MINE, 2012).

A microbiota intestinal exerce funções de fundamental importância para a saúde do hospedeiro, podendo dividi-las em três categorias: função metabólica, função protetora e função trófica.

1. Função metabólica: A maioria das bactérias do cólon são anaeróbias estritas que possuem a capacidade de fermentar substratos não digeríveis, como as fibras dietéticas, fornecendo energia e nutrientes tanto para o hospedeiro quanto para as comunidades simbióticas. Os principais produtos da fermentação dos carboidratos no cólon são os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) – acetato, propionato e butirato (KOBOZIEV *et al.*, 2014) - os quais podem ser usados pelas células da mucosa intestinal para obtenção de energia. A síntese de vitaminas é outra importante função desempenhada pelas bactérias comensais (ABREU, 2010; ALONSO; GUARNER, 2013; ARTIS, 2008; GUARNER, 2011; HOOPER; MACPHERSON, 2010; MASLOWSKI; MACKAY, 2011; RUPA; MINE, 2012).
2. Função protetora: Bactérias da microbiota intestinal possuem a capacidade de proteger o hospedeiro contra infecções patogênicas, por diferentes mecanismos:

- As bactérias intestinais patogênicas são pouco adaptadas para competirem por nutrientes com os micro-organismos comensais, limitando assim, a sua colonização luminal. Além disso, os SCFA produzidos pela fermentação bacteriana promovem a redução do pH luminal, inibindo o crescimento de patógenos; reforçam a função de barreira da mucosa intestinal; estimulam a produção de muco; estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias e reduzem a produção das pró-inflamatórias (ALONSO; GUARNER, 2013; HOOPER; MACPHERSON, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014).
 - A sinalização produzida por bactérias comensais às IECs limita o crescimento de patógenos no intestino e minimiza o contato entre os micro-organismos luminiais e as células intestinais por meio do estímulo à produção de AMPs e muco, regulação do transporte de IgA através da barreira epitelial, e manutenção da integridade das junções firmes (ARTIS, 2008; HOOPER; MACPHERSON, 2010; KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).
3. Função trófica: Micro-organismos residentes geram sinais que estimulam o desenvolvimento intestinal por meio da maturação e diferenciação das IECs, desenvolvimento de linfócitos e angiogênese (ALONSO; GUARNER, 2013; ARTIS, 2008; GUARNER, 2011; HOOPER; MACPHERSON, 2010; SELLERS; MORTON, 2014).

Além de todos os benefícios conferidos, a microbiota intestinal possui um papel crítico para o estabelecimento de um balanceado sistema imune e manutenção da saúde intestinal (ALONSO; GUARNER, 2013; ARTIS, 2008).

A abundância de bactérias presentes no intestino torna a capacidade de distinguir entre bactérias patogênicas e residentes fundamental para evitar uma resposta imune exacerbada e inadequada. Sendo assim, o reconhecimento imunológico intestinal é diferente de outros órgãos, visto que o sistema imune intestinal deve possuir a capacidade concomitante de manter-se hiporresponsivo a organismos da microbiota e responsivo ao estímulo patogênico (ARTIS, 2008; CHO, 2008; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

Portanto, o sistema imune intestinal possui adaptações que limitam a invasão oportunista de bactérias comensais e respondem adequadamente a bactérias patogênicas. A presença de mediadores imunológicos que limitam o

contato direto entre bactérias e a superfície das IECs, a rápida detecção e eliminação de bactérias que porventura penetrem na barreira intestinal, e a redução da exposição de bactérias residentes ao sistema imune são mecanismos que garantem uma adequada resposta imunológica (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

O reconhecimento microbiano no ambiente intestinal é mediado por receptores expressos principalmente pelas IECs, macrófagos e células dendríticas – receptores de reconhecimento padrão (PRRs) – os quais promovem a diferenciação de bactérias comensais e patogênicas, direcionando respostas imunológicas apropriadas, como a produção de fatores antimicrobianos, indução ou prevenção de respostas inflamatórias (ARTIS, 2008; KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

Os PRRs podem ser divididos em diferentes tipos, dentre os quais: receptores do tipo *Toll* (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). Dependendo do receptor ativado e da localização deste receptor nas células (apical, basolateral ou intracelular), diferentes tipos de respostas podem ser suscitados. Cada micro-organismo é detectado de forma diferente, dependendo da combinação de receptores que estimular (ABREU, 2010; ARTIS, 2008; KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

Os macrófagos e células dendríticas (DCs) atuam em conjunto com as IECs para modular o sistema imune adaptativo e controlar o balanço entre as células T reguladoras e T efetoras intestinais, regulando assim as respostas anti e pró-inflamatórias (PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) que após serem ativadas migram para tecidos linfoides secundários, como os linfonodos mesentéricos (MLNs), carregando a bactéria ou material antigênico para apresentar às células do sistema imune, como as células T (ARTIS, 2008; HOOPER; MACPHERSON, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014). Macrófagos residentes no intestino permanecem próximos às IECs, onde promovem a eliminação de bactérias patogênicas e comensais que atravessam a barreira intestinal. Assim como as DCs, os macrófagos possuem dendritos transepiteliais que permitem o reconhecimento de antígenos presentes no lúmen intestinal. Além disso, os macrófagos estão associados à manutenção da tolerância da mucosa (produção de interleucina (IL)-10) e recuperação da integridade física da barreira epitelial após dano (produção de

fatores de crescimento) (HOOPER; MACPHERSON, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PETERSON; ARTIS, 2014).

Resumidamente, o rompimento da barreira epitelial intestinal e a invasão do tecido por bactérias promovem a ativação das DCs, que migram (carregando o antígeno) para os MLNs e ativam as células T *naïve*, as quais, por influência de fatores liberados pelas próprias DCs, diferenciar-se-ão em células T efetoras e T reguladoras (Figura 2). Essas células, agora diferenciadas, migram do MLN para a lâmina própria intestinal, onde estão presentes os patógenos. Células efetoras Th1 e Th17 produzirão citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- γ , IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , que por meio da interação e ativação das APCs e macrófagos residentes, estimularão a produção de outros mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (Figura 3A). Esses mediadores inflamatórios aumentam a atividade microbicida dos macrófagos e a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, facilitando o recrutamento adicional de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) para o tecido intestinal (CHO, 2008; KOBOZIEV *et al.*, 2014; MOWAT, 2003; PETERSON; ARTIS, 2014).

Além de estimular a diferenciação das células T, as DCs promovem a ativação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de IgA. Após ativação, as células produtoras de IgA migram para a lâmina própria e secretam a imunoglobulina, a qual é transportada para o lúmen através de receptores presentes nas IECs. A imunoglobulina secretada limita a associação bacteriana com a superfície epitelial, impedindo a penetração de bactérias no epitélio, favorecendo assim, o controle microbiano e a homeostase intestinal (HOOPER; MACPHERSON, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

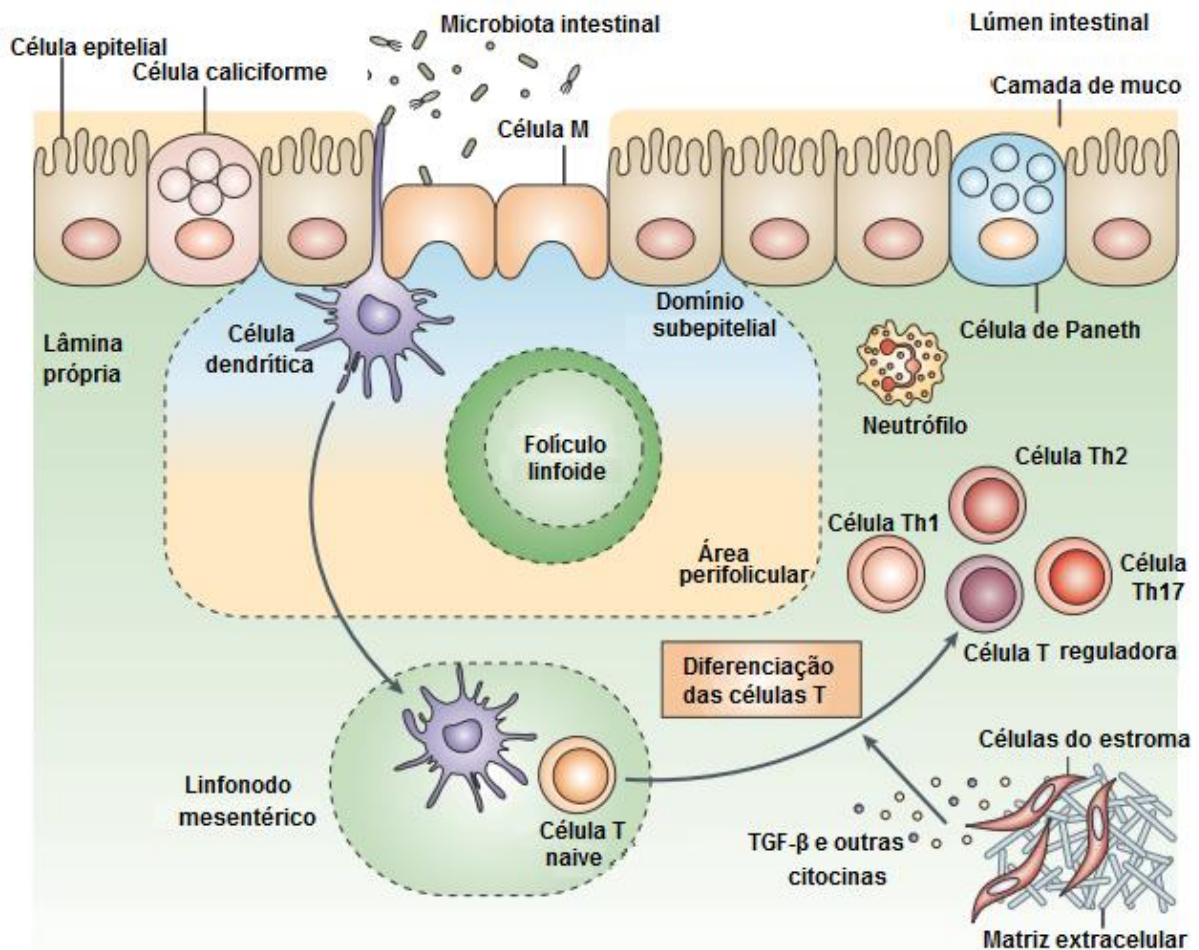


Figura 2. Principais características do sistema imune intestinal. O sistema imune intestinal é único em relação à sua proximidade com as bactérias intraluminais, as quais são separadas da lâmina própria por apenas uma única camada de células epiteliais, composta por células absorptivas, secretoras, células de Paneth e células caliciformes. As células M e células dendríticas (DCs) fazem o reconhecimento do conteúdo luminal. A presença de bactérias patogênicas ou a destruição da barreira epitelial promovem a ativação e migração das DCs para os linfonodos mesentéricos, onde ocorrerá a ativação das células T *naíves*, as quais por influência de fatores liberados pelas DCs e células do estroma sofrerão diferenciação (CHO, 2008, p. 459 - adaptado).

Em condições normais, as respostas oriundas da penetração de microorganismos na barreira intestinal são reguladas por componentes do sistema imune (células T reguladoras, IL-10, fator de transformação do crescimento (TGF)- β), os quais suprimem uma resposta exacerbada, limitando a inflamação no tecido. Porém, alterações nos mecanismos regulatórios podem resultar em uma resposta imunológica inadequada, com produção elevada de mediadores inflamatórios, a qual promoverá lesão e disfunção epitelial podendo culminar no surgimento de doenças, como as doenças inflamatórias intestinais (Figura 3B) (ANDRADE; VAZ; FARIA, 2003; BAUMGART; CARDING, 2007; KIM; HO, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PETERSON; ARTIS, 2014; SELLERS; MORTON, 2014).

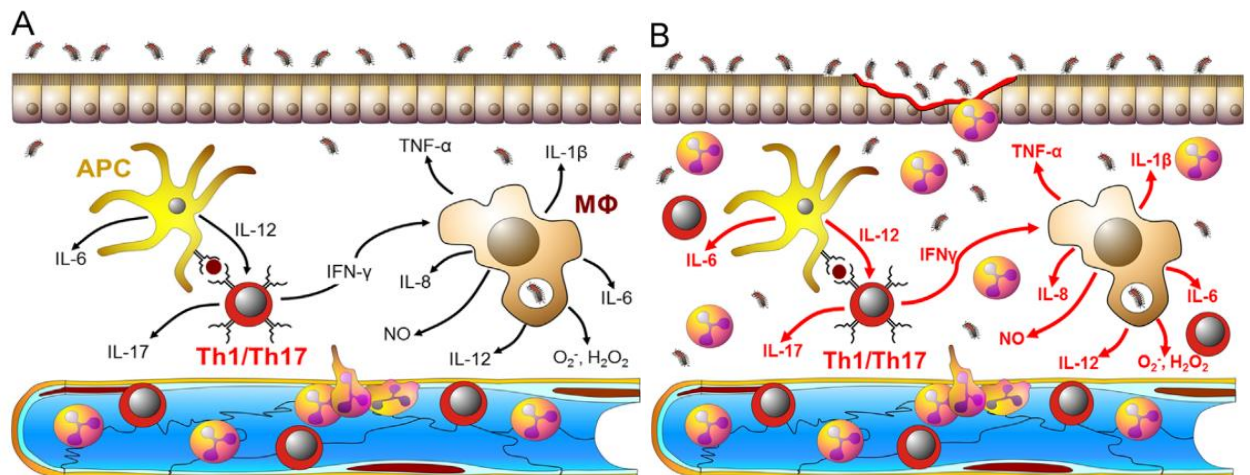


Figura 3. Resposta imune inata e adaptativa a bactérias invasoras. (A) Células efetoras Th1 e Th17 ativadas por antígenos entéricos produzem elevada quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-17 e TNF- α , na lâmina própria. Essas citocinas interagem com as células apresentadoras de antígenos (APC) e macrófagos (M Φ), estimulando a produção de outros mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (superóxido - O $_2^-$, peróxido de hidrogênio -H $_2$ O $_2$ e óxido nítrico - NO). Esses mediadores aumentam a atividade microbicida dos macrófagos presentes no tecido e a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais facilitando o recrutamento adicional de leucócitos (neutrófilos, monócitos, linfócitos) para o tecido intestinal. Em condições normais essas repostas imunológicas são reguladas a fim de limitar o desenvolvimento de danos ao tecido. (B) Na ausência de mecanismos de regulação apropriados, a produção exacerbada de mediadores inflamatórios promove danos endoteliais e epiteliais, originando erosões, ulcerações, fibrose e edema (KOBZIEV *et al.*, 2014, p. 126).

2.3 Doenças inflamatórias intestinais

2.3.1 Considerações gerais

Doenças inflamatórias intestinais (IBDs) são desordens crônicas, recidivantes, multifatoriais e de etiologia não totalmente esclarecida. São caracterizadas por períodos crônicos de remissão e reincidência da inflamação intestinal, resultando em dor abdominal intermitente, diarreia e febre (BRAUS; ELLIOTT, 2009; CHO, 2008; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013).

As principais formas clínicas das IBDs são a UC e a CD, que evidenciam elevado número de infiltrados de células inflamatórias na lâmina própria, as quais contribuirão para o surgimento de lesões e disfunções no tecido (edema, perda das células calciformes, fibrose, erosão e ulceração) (BAUMGART; CARDING, 2007; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; KOBZIEV *et al.*, 2014).

Apesar de as duas doenças possuírem características similares, elas diferenciam-se em aspectos importantes, como características clínicas, endoscópicas, histológicas e genéticas (BRAUS; ELLIOTT, 2009; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012).

A CD, caracterizada por uma inflamação transmural e descontínua, afeta principalmente o íleo e o cólon, porém pode atingir qualquer porção do TGI. Os pacientes portadores dessa doença possuem maior risco de complicações, como, estenoses, fístulas, formação de abscessos, perfurações e desenvolvimento de câncer (CHO, 2008; GLOCKER; GRIMBACHER, 2012; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; NEURATH, 2014; ZHANG; LI, 2014).

A UC, diferentemente da CD, é caracterizada por uma inflamação superficial, a qual atinge as camadas mucosa e submucosa do cólon. A doença acomete principalmente a região retal, podendo estender-se de maneira contínua até o ceco. As principais complicações oriundas da doença são: sangramento severo, megacólon tóxico, ruptura do intestino e surgimento de câncer colo-retal (CHO, 2008; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; ZHANG; LI, 2014).

Os sintomas e complicações que prejudicam a qualidade de vida dos pacientes, aliados à elevada e crescente incidência dessas doenças em indivíduos relativamente jovens, revelam o impacto das IBDs na saúde pública e a necessidade de controle e tratamento adequados (DEWULF *et al.*, 2007; NEURATH, 2014).

Dentre os sintomas mais prevalentes destacam-se, diarreia, dor abdominal, sangramento retal, febre, náuseas, perda de peso, letargia e perda de apetite. Doenças autoimunes, problemas articulares, episódios tromboembólicos, desnutrição, osteoporose e translocação bacteriana são complicações oriundas das IBDs (CESTARI, 2008; GLOCKER; GRIMBACHER, 2012; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; SILVA *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2012).

A perda de peso observada nessas doenças tem sido associada a diversos fatores, como aumento do catabolismo originado pelo quadro inflamatório, má-absorção de macro e micronutrientes, sintomas que prejudicam a ingestão de alimentos, e diarreia (ELSHERIF; ALEXAKIS; MENDALL, 2014).

A UC e CD possuem maior incidência na América do Norte e Europa, entretanto tem-se observado um aumento no número de casos em países em desenvolvimento, sendo esse aumento associado ao processo de industrialização e

ocidentalização dos hábitos de vida nessas regiões. A ocorrência dessas doenças é maior em regiões urbanas quando comparada a regiões rurais, uma vez que o processo de urbanização e industrialização expõem os indivíduos a fatores de risco para o desenvolvimento das IBDs, como, alterações na exposição microbiana, processo de sanitização e modificações na dieta (CHO 2008; MOLODECKY *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013; SILVA *et al.*, 2014). Esse padrão de desenvolvimento das IBDs relacionado ao modo de vida da população mostra que apesar de não possuírem etiologia totalmente esclarecida, o fator ambiental possui papel preponderante no desencadeamento da UC e CD (PONDER; LONG, 2013).

Além de fatores ambientais, fatores imunológicos, genéticos e alterações da microbiota intestinal também estão envolvidos no desenvolvimento das IBDs. Evidências sugerem que o desencadeamento dessas doenças ocorra devido a uma resposta imune anormal da mucosa aos elementos da microbiota intestinal em indivíduos geneticamente susceptíveis (BRAUS; ELLIOTT, 2009; FIOCCHI, 2005; KUGATHASAN; FIOCCHI, 2007; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PONDER; LONG, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

Em síntese, disfunções genéticas e fatores ambientais promovem alterações na barreira epitelial intestinal, permitindo o influxo de antígenos luminais. Uma resposta imunológica exacerbada e inadequada a esses antígenos gera uma inflamação aguda da mucosa em indivíduos geneticamente susceptíveis. Caso a inflamação aguda não seja resolvida, um quadro inflamatório crônico se instala, com ativação descontrolada do sistema imune e consequente produção excessiva de citocinas, perpetuando a inflamação no TGI e originando as respectivas consequências (Figura 4) (NEURATH, 2014).

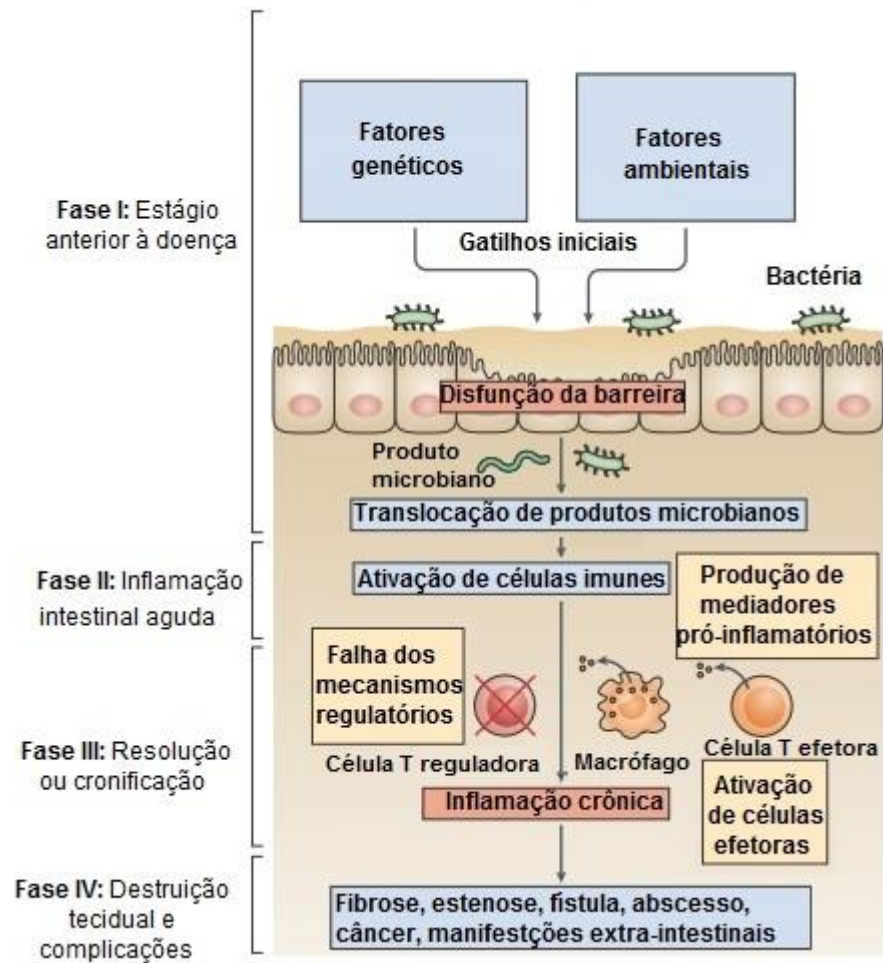


Figura 4. Estrutura conceitual da patogênese das IBDs. Fatores genéticos e ambientais promovem disfunção da barreira epitelial intestinal. A função de barreira alterada induz a translocação de bactérias comensais e produtos microbianos do lúmen intestinal para dentro da parede do intestino, ativando células imunes e estimulando a produção de citocinas. Caso a inflamação aguda da mucosa não seja resolvida por mecanismos anti-inflamatórios, uma inflamação crônica desenvolve-se. Por sua vez, a inflamação crônica pode causar complicações e destruição tecidual, ambas impulsionadas por respostas de citocinas (NEURATH, 2014, p.331 - adaptado).

2.3.2 Colite ulcerativa

2.3.2.1 Epidemiologia

A UC é uma IBD cuja ocorrência tem aumentado ao longo dos anos, especialmente, em países em desenvolvimento, como os da América Latina, Ásia e Europa Oriental. Apesar da expansão observada no número de casos em países em desenvolvimento, a prevalência da UC ainda é maior em países desenvolvidos (5,3

a 63,6 casos para cada 100.000 pessoas na Ásia, e 37,5 a 238 para cada 100.000 pessoas na América do Norte). A incidência varia de 0,5 a 31,5 casos para cada 100.000 pessoas por ano, dependendo da região avaliada (SILVA *et al.*, 2014).

A disparidade na ocorrência de UC em países desenvolvidos e em desenvolvimento pode ser explicada em parte, pelo maior acesso aos cuidados médicos e adequada notificação dos casos em países mais desenvolvidos. A hipótese da higiene também tem sido apontada como um fator importante para esses achados (BAUMGART; CARDING, 2007; KOBOZIEV *et al.*, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012).

A hipótese da higiene propõe que crianças desenvolvidas em ambientes excessivamente sanitizados serão menos expostas a antígenos ambientais e micro-organismos infecciosos, acarretando em prejuízo na maturação e tolerância do sistema imunológico, assim como inadequada resposta imune frente à exposição patogênica em uma fase tardia da vida (BAUMGART; CARDING, 2007; KOBOZIEV *et al.*, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013).

Além disso, a UC possui um padrão bimodal de incidência, observando-se um primeiro pico entre a segunda e quarta décadas de vida e, em seguida, um novo pico em indivíduos idosos (CHO, 2008; HO; LESS; SATSANGI, 2011; MOLODECKY *et al.*, 2012; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

2.3.2.2 Diagnóstico e classificação

O diagnóstico da UC é realizado por meio da avaliação de sintomas clínicos, confirmados pela avaliação endoscópica (colonoscopia) e histopatológica (DANESE; FIOCCHI, 2011; HO; LESS; SATSANGI, 2011; ORDÁS *et al.*, 2012). Testes laboratoriais (proteína C reativa, análises fecais) e imagens radiográficas, incluindo raios-X, são técnicas menos invasivas também utilizadas para diagnóstico, acompanhamento e análise da evolução da doença (SWANSON *et al.*, 2013).

As principais características clínicas são: sangramento retal, diarreia, dor abdominal, perda de peso, febre (em casos mais severos) e tenesmo. Exames endoscópicos podem evidenciar edema, eritema, mucosa com aspecto granular, exsudação mucopurulenta, áreas de ulceração superficial, erosão, sangramento espontâneo e presença de pseudopólipos inflamatórios. Na avaliação histológica observa-se distorção da arquitetura, presença de abscesso e encurtamento das

criptas, infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria (neutrófilos e eosinófilos), depleção de células caliciformes e mucinas, agregados linfoides, erosão e ulceração (BRAUS; ELLIOTT, 2009; DANESE; FIOCCHI, 2011; HO; LESS; SATSANGI, 2011, ORDÁS *et al.*, 2012).

A classificação da UC é realizada de acordo com a extensão e severidade da doença. De acordo com a classificação de Montreal, proctite é a denominação utilizada quando o acometimento da doença é limitado ao reto, quando o envolvimento atinge uma região colo-retal distal à flexura esplênica, ela é chamada de colite distal ou colite do lado esquerdo. Se a doença envolver todo o cólon, tem-se a pancolite ou colite extensa (ORDÁS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; SPEKHORST *et al.*, 2014; VERMEIRE; ASSCHE; RUTGEERTS, 2012).

O número de evacuações diárias e a presença de sinais sistêmicos da inflamação, como febre e taquicardia, são fatores utilizados na determinação da severidade da colite. De acordo com esse critério, a UC pode ser dividida em quatro categorias: remissão (ausência de sintomas), leve (quatro ou menos evacuações diárias com ou sem presença de sangue, sem comprometimento sistêmico e marcadores inflamatórios normais – taxa de sedimentação de eritrócitos), moderada (mais de quatro evacuações diárias, com mínimo comprometimento sistêmico), e severa (seis ou mais evacuações diárias com sangue, taxa de pulso ≥ 90 batimentos por minuto, temperatura $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$, hemoglobina $< 10,5$ g/dL e taxa de sedimentação de eritrócito ≥ 30 mm/h) (ORDÁS *et al.*, 2012; SPEKHORST *et al.*, 2014; VERMEIRE; ASSCHE; RUTGEERTS, 2012).

A avaliação da atividade da doença por meio de exames clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico é de extrema importância para se determinar o prognóstico da doença e direcionar o tratamento. A presença de febre, taquicardia, elevado número de evacuações diárias e alterações nos marcadores inflamatórios são preditores de maior dificuldade no tratamento e necessidade cirúrgica (DANESE; FIOCCHI, 2011; SILVA *et al.*, 2014).

Um mau prognóstico também é observado quando o acometimento da colite não se limita apenas ao cólon, afetando outros locais como articulações, pele, olhos, fígado e originando manifestações hematológicas (CHO, 2008; SILVA *et al.*, 2014).

Tendo em vista a complexidade de fatores envolvendo a UC e as consequências por ela acarretadas, uma adequada compreensão acerca da

etiologia da doença torna-se essencial para a determinação de um tratamento eficaz e novas abordagens terapêuticas, assim como um controle ativo dos fatores de risco.

2.3.2.3 Etiologia e fisiopatologia

Diversos processos envolvendo a imunidade inata, adaptativa e mecanismos de regulação da imunidade estão associados ao desencadeamento das IBDs, dentre os quais vale ressaltar a falha no reconhecimento microbiano e no processamento de antígenos por células efectoras do sistema imune (ARTIS, 2008; BAUMGART; CARDING, 2007; BRAUS; ELLIOTT, 2009).

Além desses fatores, alterações na função de barreira do epitélio intestinal, em células do sistema imune (monócitos, macrófagos e células dendríticas), nos linfócitos da lâmina própria e dos linfonodos mesentéricos (incluindo as células T residentes na mucosa intestinal normal), e na produção de substâncias importantes para o equilíbrio das respostas inflamatórias, como o TGF- β e a linfopietina do estroma tímico (TSLP), contribuem para um desequilíbrio na homeostase intestinal (BAUMGART; CARDING, 2007; CHO, 2008; DI SABATINO *et al.*, 2012).

A função de barreira do epitélio intestinal está prejudicada em pacientes portadores de UC devido a um processo deturpado de diferenciação das células estaminais pluripotentes em células caliciformes maduras e devido a uma alteração na atividade das junções firmes das IECs, causada entre outros fatores, pela sinalização do TNF e INF- γ (BAUMGART; CARDING, 2007; GERSEMANN; STANGE; WEHKAMP, 2011; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; PETERSON; ARTIS, 2014). A inadequada diferenciação celular é resultante de falhas na expressão de fatores de transcrição envolvidos nesse processo (Hath1 e KLF4), fato que promove uma deficiência na produção e composição do muco. Essa disfunção da barreira resulta em aumento da permeabilidade intestinal e maior influxo de micro-organismos luminiais para o interior da mucosa, desencadeando o processo inflamatório (CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011; GERSEMANN; STANGE; WEHKAMP, 2011; HOOPER; MACPHERSON, 2010; NEURATH, 2014).

Além do influxo aumentado de micro-organismos luminiais para o interior da mucosa, pacientes portadores de UC possuem um perfil de microbiota intestinal

diferente de indivíduos saudáveis. Observa-se um aumento na densidade microbiana intestinal e alteração na sua composição (disbiose), com redução na biodiversidade e maior instabilidade (DANESE; FIOCCHI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014; ZHANG; LI, 2014).

A microbiota de pacientes portadores de IBDs é caracterizada por menor quantidade de bactérias com propriedades anti-inflamatórias e maior quantidade com propriedades pró-inflamatórias, assim como maior número de bactérias mucolíticas (*Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques*) as quais proporcionam maior penetração na camada de muco e conseqüente maior proximidade com a mucosa intestinal. É documentado também, que nesses pacientes há redução no número de membros do filo Bacteroidetes (*Bacteroides fragilis*) e Firmicutes (*Faecalibacterium prausnitzii*) ambos associados a propriedades anti-inflamatórias e protetoras (CHASSAING; DARFEUILLE-MICHAUD, 2011; CLEMENTE *et al.*, 2012; HOOPER; MACPHERSON, 2010; HO; LESS; SATSANGI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PARKES; WHELAN; LINDSAY, 2014).

A disbiose observada em pacientes portadores de UC culmina em menor produção e oxidação de butirato, metabólito energético essencial para as IECs. Essa “deficiência nutricional” para as células intestinais promove alteração na homeostase epitelial e maior susceptibilidade à injúria, com conseqüente prejuízo da função de barreira (HO; LESS; SATSANGI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014).

Apesar da relação existente entre disbiose e UC, ainda não está completamente elucidado se a alteração da microbiota intestinal é causa ou conseqüência da doença (ARTIS, 2008; KOBOZIEV *et al.*, 2014).

Mesmo sendo a microbiota intestinal o alvo principal para o desenvolvimento das IBDs, diversos fatores infecciosos (gastroenterite bacteriana aguda, *Helicobacter pylori* e exposição a helmintos) estão relacionados ao seu desenvolvimento, seja de forma protetora ou indutora. Eles atuam através de alterações da própria microbiota ou por mecanismos imunomodulatórios. Em relação aos agentes patogênicos associados ao desencadeamento das IBDs, alguns microorganismos têm sido apontados como fatores potenciais, podendo-se citar a *Listeria monocytogenes*, *Clamidia tracomatis* e *Escherichia coli* (KUGATHASAN; FIOCCHI, 2007; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013).

O sistema imune, assim como a microbiota intestinal, encontra-se desfigurado em pacientes portadores de IBDs. Diversas alterações são relatadas,

dentre as quais: irregularidades na expressão dos PRRs pelas IECs; desequilíbrio no perfil das DCs (predominância de células maduras ativas e escassez de células imaturas “tolerogênicas”) e falha no reconhecimento microbiano realizado pelas mesmas; ativação de células efetoras por APCs atípicas; desequilíbrio entre células T efetoras e T reguladoras; distúrbio na remoção de células T ativas do sítio inflamatório, culminado na perpetuação da inflamação (BAUMGART; CARDING, 2007; ZHANG; LI, 2014).

Apesar de haver predominância de respostas de células T efetoras em relação a T reguladoras tanto na UC quanto na CD, a diferenciação imunológica entre as duas doenças é realizada principalmente pelo tipo de resposta da célula T auxiliar (Th) e o perfil de citocinas produzidas. A CD é caracterizada por uma resposta do tipo Th1, com produção aumentada de IFN- γ e IL-2, assim como pela ação da IL-12. Já a UC é considerada uma doença tipo Th2, com produção excessiva de IL-13 e IL-5. Porém, evidências sugerem que a IL-4, citocina característica desse tipo de resposta não se encontra aumentada na colite, fato que permite a classificação dessa doença como Th2 atípica (BAUMGART; CARDING, 2007; HO; LESS; SATSANGI, 2011; NEURATH, 2014; STROBER; FUSS, 2011; ZHANG; LI, 2014).

Sendo assim, observa-se a expressão do fator de transcrição associado às células Th2 (GATA3) nas células T da lâmina própria de pacientes portadores de UC, assim como a presença de células T natural *killer* (NKT) atípicas, responsáveis pela produção de elevadas quantidades de citocina IL-13, a qual está associada ao surgimento de fibrose, alteração na função das junções firmes e indução de apoptose nas IECs, originando assim, ulceração na mucosa (HO; LESS; SATSANGI, 2011; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; ZHANG; LI, 2014).

O mecanismo fisiopatológico da colite está explicado na figura 5.

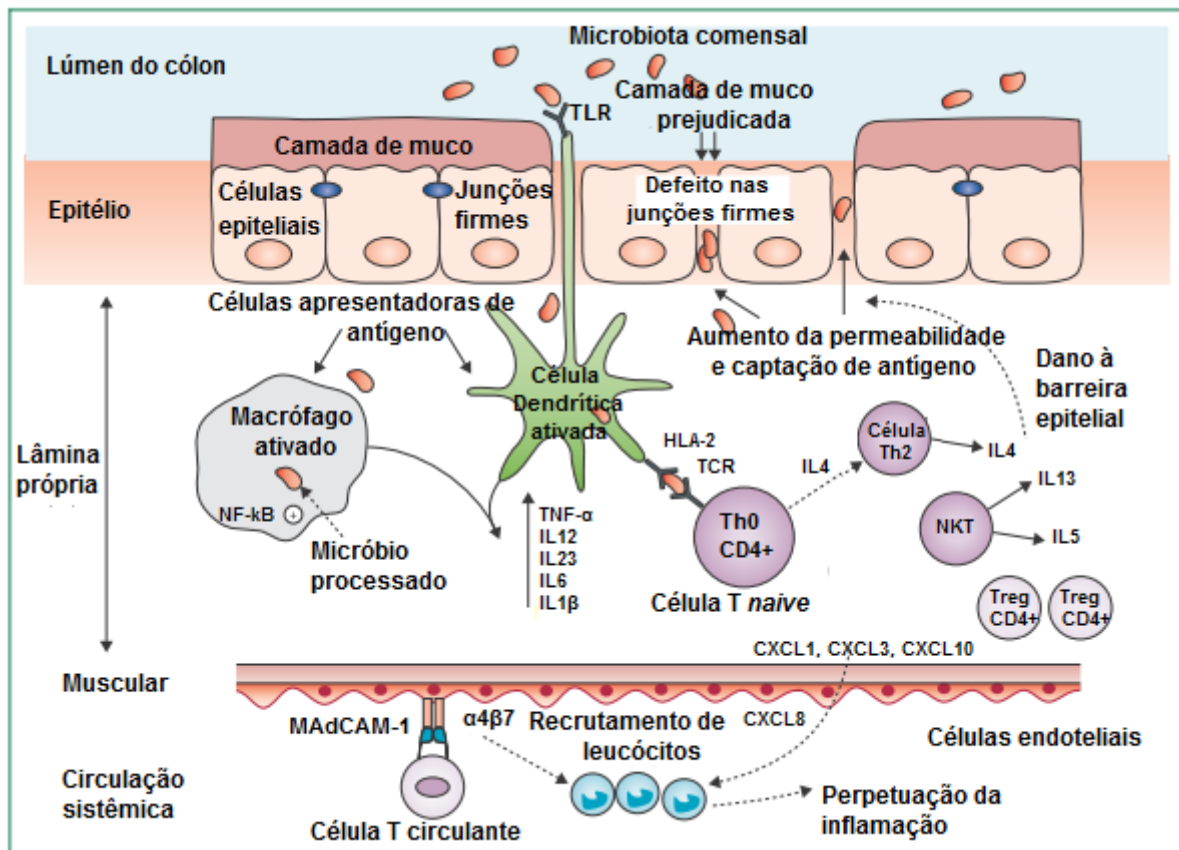


Figura 5. Fisiopatologia da colite ulcerativa. O rompimento das junções firmes e da camada de muco sobre as IECs gera aumento na permeabilidade do epitélio intestinal, resultando na captação aumentada de antígenos luminiais. O reconhecimento de bactérias não patogênicas (microbiota comensal) por macrófagos e células dendríticas, por meio dos TLRs, promove a alteração do fenótipo dessas células, assumindo um perfil ativado. A ativação de vias do fator nuclear (NF)-κB estimula a transcrição de genes pró-inflamatórios, resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6 e IL-1 β). Após o processamento dos antígenos, macrófagos e células dendríticas apresentam-nos às células T CD4 *naive*, as quais se diferenciam em células Th2, caracterizadas pela produção de IL-4. Células T natural *killer* (NKT) são a principal fonte de produção de IL-13, a qual está associada à disfunção da barreira epitelial. A infiltração de células T circulantes na lâmina própria encontra-se aumentada e ocorre por meio da ligação da integrina $\alpha 4\beta 7$ presente nessas células à moléculas de adesão MAdCAM-1 presentes nas células endoteliais. A expressão de MAdCAM-1 encontra-se elevada no intestino inflamado. A regulação positiva de quimiocinas inflamatórias, tais como CXCL1, CXCL3 e CXCL8, leva ao recrutamento de leucócitos, perpetuando o ciclo inflamatório (ORDÁS *et al.*, 2012, p. 1608 - adaptado).

Apesar da classificação dicotômica da CD e UC em respostas tipo Th1 e Th2, observações a respeito do perfil de citocinas na mucosa de pacientes portadores de IBDs têm demonstrado a fragilidade desse paradigma e proporcionado reconsiderações a respeito de um novo cenário imunológico, no qual as células efetoras Th17 vêm ganhando cada vez mais destaque e o eixo marcado pela relação IL-17-IL-23, cada vez mais importância na patogênese dessas doenças (DI SABATINO *et al.*, 2012; NEURATH, 2014; ZHANG; LI, 2014).

Análises de biopsias obtidas de regiões inflamadas e não inflamadas de pacientes portadores de UC e CD detectaram elevada quantidade de IFN- γ e IL-17A

em ambas as doenças, concentrações iguais ou reduzidas de IL-13 na colite, e número reduzido de células NKT na mucosa de pacientes com UC clinicamente ativa quando comparado aos com CD (BIANCHERI *et al.*, 2014; DI SABATINO *et al.*, 2012; VAINER *et al.*, 2000).

A IL-17A, citocina com funções pró-inflamatórias, é produzida pelas células efectoras Th17, as quais estão presentes em abundância no intestino e são estimuladas pela ação da IL-6 e IL-23, que são reguladas positivamente em resposta aos componentes da microbiota. É importante salientar ainda, que as células T presentes na mucosa de pacientes portadores de IBDs expressam em sua superfície marcadores associados às células Th17, como o receptor para IL-23 (IL23R), cuja expressão é aumentada pela ação da citocina IL-21, também produzida pelas células Th17, promovendo assim, um mecanismo autorregulatório positivo (DI SABATINO *et al.*, 2012; NEURATH, 2014; ZHANG; LI, 2014).

A importância da IL-23 na patogênese das IBDs é reafirmada por meio de estudos genéticos que apontam relação entre alterações de genes relacionados às vias de sinalização da citocina e o surgimento das doenças (CHO, 2008; DANESE; FIOCCHI, 2011; DI SABATINO *et al.*, 2012; HO; LESS; SATSANGI, 2011; ORDÁS *et al.*, 2012; ZHANG; LI, 2014).

Avanços na compreensão de aspectos genéticos na etiologia da UC são obtidos por meio de estudos genômicos de associação (GWA) e análises de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), os quais possibilitaram a discriminação dos genes envolvidos no surgimento da colite. São relatados cerca de 163 loci gênicos associados às IBDs, sendo 110 associados aos dois tipos da doença, 30 específicos para a CD e 23 específicos para UC (HO; LESS; SATSANGI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014; PONDER; LONG, 2013; ZHANG; LI, 2014).

A função de barreira do epitélio intestinal é o foco dos estudos genéticos relacionados à UC. Diversos genes estão envolvidos com a doença, dentre os quais podem-se destacar: CDH1, HNF4- α , ECM1 e LAMB-1 (implicados na manutenção da integridade epitelial); PLA2G2E, CARD9, BTNL2, IFN γ -IL25, NKX2-3, IL10 (associados às funções imune inata e regulatória); TNFRSF14, TMFRSF9, IL1R2, IL8Ra, IL7R (envolvidos na produção de mediadores inflamatórios); IL23R; IL12B, JAK2, STAT3 (relacionados à via de sinalização da IL-23). Os genes associados a IL-23 são comuns à UC e à CD, assim como outros genes acima citados (IL10, IL7R e IFN γ) estão relacionados à UC e outras doenças imunológicas (CHO, 2008;

DANESE; FIOCCHI, 2011; HO; LESS; SATSANGI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013; ZHANG; LI, 2014).

Outro aspecto que relaciona o componente genético à UC é o risco aumentado que parentes de primeiro grau possuem em desenvolver a doença, sendo a concordância entre os pares maior em gêmeos monozigóticos (15%) quando comparados a dizigóticos (6%). A concordância fenotípica da UC é ainda menor que a da CD (27% gêmeos monozigóticos vs. 2% gêmeos dizigóticos) (BAUMGART; CARDING, 2007; CHO, 2008; HALFVARSON, 2011; HALME *et al.*, 2006; PONDER; LONG, 2013; THOMPSON *et al.*, 1996).

Apesar da importância genética no desenvolvimento da UC, as taxas de concordância relativamente baixas em gêmeos monozigóticos e o aumento da ocorrência da doença com o processo de industrialização e ocidentalização dos hábitos de vida, destacam a influência dos fatores ambientais na patogenia da doença (KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; KOBOZIEV *et al.*, 2014).

Diversos hábitos de vida têm sido associados ao desenvolvimento e evolução das IBDs, podendo atuar como protetores ou gatilhos para a doença. Diferentemente da CD, o hábito de fumar possui caráter protetor em relação à UC, reduzindo o risco de surgimento da doença e resultando em um curso menos severo em pacientes com a doença já instalada. Fator recentemente explorado é a relação entre o nível sérico de vitamina D e IBDs, sendo a deficiência vitamínica, aspecto comumente observado em pacientes portadores de UC e CD (BAUMGART; CARDING, 2007; HO; LESS; SATSANGI, 2011; KUGATHASAN; FIOCCHI, 2007; ORDÁS *et al.*, 2012; PARKES; WHELAN; LINDSAY, 2014; PONDER; LONG, 2013; SILVA *et al.*, 2014; ZHANG; LI, 2014).

A utilização de alguns medicamentos, como drogas anti-inflamatórias não esteroidais, anticoncepcionais orais e antibióticos, tem sido associada positivamente ao surgimento das IBDs, enquanto a apendicectomia está inversamente associada ao desenvolvimento da UC. Apesar de ainda haver controvérsias a respeito do aleitamento materno, acredita-se que a amamentação por um período maior de 3 meses exerça um efeito protetor em relação à UC por meio da modulação da microbiota intestinal. A existência de controvérsias é vista também em relação aos componentes dietéticos (consumo de carboidratos, gorduras e fibras), estresse e IBDs (BAUMGART; CARDING, 2007; ORDÁS *et al.*, 2012; PONDER; LONG, 2013; SILVA *et al.*, 2014; ZHANG; LI, 2014).

Os mecanismos pelos quais a maioria dos fatores ambientais atua desencadeando a UC consistem em alterações da microbiota intestinal e do funcionamento do sistema imune (PONDER; LONG, 2013).

2.3.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais

A possibilidade de cura em diversos casos de IBD é inexistente, sendo assim, o tratamento visa promover e manter a remissão da fase aguda, bem como melhorar a sintomatologia, reduzir o número de hospitalizações e cirurgias, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes (BRASIL, 2002; DEWULF *et al.*, 2007; HO; LESS; SATSANGI, 2011; KOBOZIEV *et al.*, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012).

O tratamento na maioria das vezes é iniciado fora do ambiente hospitalar com o uso de medicação, sendo que pacientes refratários à terapia oral ou com doença ativa grave devem ser hospitalizados. Caso não haja melhora, o paciente deve ser considerado para colectomia de urgência (BRASIL, 2002; BRAUS; ELLIOTT, 2009). A terapia nutricional é indicada em alguns casos para a recuperação do estado nutricional e ou controle da doença ativa (CAMPOS *et al.*, 2002).

Devido à similaridade entre a UC e CD, o tratamento de ambas as doenças era tradicionalmente realizado em paralelo, com a utilização de corticoides, aminossalicilatos (ASA) e tiopurinas (RIETDIJK; D' HAENS, 2013). Porém, sabe-se que alguns medicamentos são mais efetivos no tratamento de uma doença em relação à outra, como o imunomodulador metotrexato, o qual é mais eficaz na CD do que na UC (BRAUS; ELLIOTT, 2009).

O metotrexato, azatioprina e 6-mercaptopurina são eficazes na indução e manutenção da remissão da CD. O produto da metabolização da azatioprina interfere na proliferação e promove a apoptose de linfócitos ativos, enquanto que o metotrexato inibe a proliferação dessas células (BRAUS; ELLIOTT, 2009).

Em relação à UC, o tratamento é realizado com aminossalicilatos orais e via retal, corticosteroides e imunossupressores. Pacientes que não respondem aos aminossalicilatos (sulfassalazina e mesalazina) podem beneficiar-se do uso de corticoides, como a prednisona, porém, se não houver resposta, a azatioprina é

indicada (BRASIL 2002; CESTARI, 2008; HO; LESS; SATSANGI, 2011; ORDÁS *et al.*, 2012; SPEKHORST *et al.*, 2014).

A ciclosporina é outro fármaco que pode ser utilizado em casos graves de UC ou casos que não respondem a tratamentos anteriores. Este medicamento age basicamente inibindo a função dos linfócitos T, os quais são essenciais para a propagação da inflamação. Esse medicamento pode ser usado também, em pacientes portadores da CD (BRASIL 2002; CESTARI, 2008; HO; LESS; SATSANGI, 2011).

Anticorpos anti-TNF são efetivos na indução e manutenção da remissão das IBDs, e são utilizados em casos severos ou em pacientes dependentes de esteroides (DANESE; FIOCCHI, 2011; HO; LESS; SATSANGI, 2011; RIETDIJK; D'HAENS, 2013).

Algumas modificações das medicações até então utilizadas podem ser observadas, dentre as quais, a produção da multi-matrix (MMX) mesalazina, a qual é um medicamento indicado no tratamento da UC distal, uma vez que ocorre liberação lenta do princípio ativo atingindo regiões mais distantes do intestino, como o reto. A MMX budesonida é uma formulação de corticoides para uso tópico a qual atinge o íleo terminal e o cólon (RIETDIJK; D'HAENS, 2013).

Enema de sucralfato, enema de butirato e probióticos são agentes também utilizados no tratamento das IBDs (CESTARI, 2008).

Probióticos, prebióticos, antibióticos e ou transplante fecal da microbiota são alternativas terapêuticas utilizadas para tentar restaurar uma microbiota saudável, e podem ser utilizadas com terapia adjuvante, visto que a disbiose é considerada um fator causal da UC (figura 7). Essas terapias são utilizadas também na tentativa de reduzir as consequências oriundas dos tratamentos tradicionalmente utilizados, como os efeitos colaterais e alto custo (KANAUCHI; ANDOH; MITSUYAMA, 2013; KOBOZIEV *et al.*, 2014; SPEKHORST *et al.*, 2014).

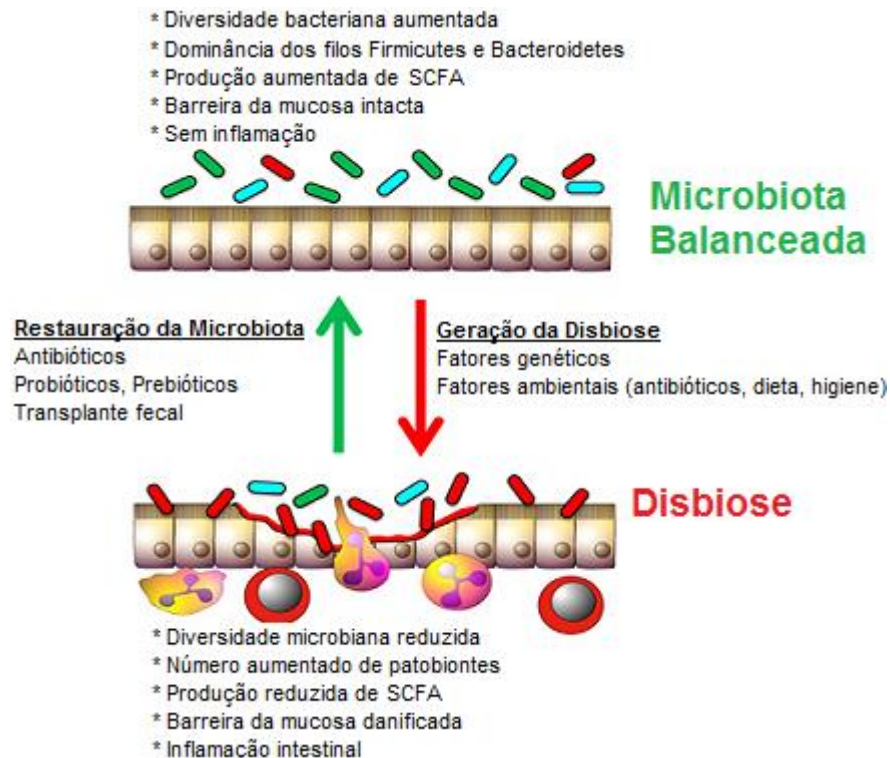


Figura 6. Estratégias terapêuticas para modulação da disbiose intestinal. (KOBOZIEV *et al.*, 2014, p. 130 - adaptado).

2.4. Probióticos

As evidências cada vez mais contundentes de que um desequilíbrio na microbiota intestinal acarreta quadros de inflamação e doença tornam promissoras as buscas por micro-organismos que, quando introduzidos no sítio intestinal inflamado, sejam capazes de reduzir ou eliminar o quadro inflamatório. Esses micro-organismos com propriedades benéficas são denominados probióticos, palavra derivada do grego *pro bios*, que significa “para a vida” (BORIVIAN; STROBER, 2007; SAROWSKA *et al.*, 2013).

O reconhecimento de benefícios à saúde provenientes da utilização de bactérias na alimentação, por meio do consumo de alimentos fermentados, data de tempos antigos. Em 1857, Louis Pasteur provou a existência de micro-organismos responsáveis pela fermentação láctica, sendo que 20 anos após, Lister identificou a primeira cultura de bactérias ácido lácticas. Nos primórdios do século XX, o cientista russo Elie Metchnikoff correlacionou a ingestão de leite fermentado ao aumento da longevidade da população da Bulgária, propondo que a ingestão de bactérias produtoras de ácido láctico seriam capazes de reduzir o crescimento de outras bactérias, e conseqüentemente a toxicidade de seus produtos no intestino (BRON;

BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; SAROWSKA *et al.*, 2013; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013).

O interesse aumentado por esses micro-organismos "saudáveis" culminaram em um grande número de estudos realizados na segunda metade do século XX, fato que resultou na formulação de diversos conceitos para probióticos, dentre os quais: substâncias comuns em vegetais como, vitaminas, enzimas, substâncias aromáticas e outras substâncias relacionadas a processos vitais; antônimos de antibióticos; substâncias secretadas por micro-organismos que estimulam o crescimento de outro; organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal. Apesar das diversas definições propostas, a utilizada atualmente é a estipulada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO), a qual define que probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; SAROWSKA *et al.*, 2013; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Sendo assim, para que os benefícios propostos pelo uso dos probióticos sejam atingidos, alguns pré-requisitos devem ser seguidos visando garantir a sua viabilidade e funcionalidade. Primeiramente, as preparações comerciais devem fornecer condições adequadas para que as culturas sobrevivam ao estresse provocado pelo processamento e estocagem dos produtos. Além disso, após o consumo, os micro-organismos são submetidos a um estresse adicional imposto pela acidez gástrica, sais biliares e enzimas digestivas (BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; FONTANA *et al.*, 2013). Portanto, para que um micro-organismo probiótico seja efetivo, ele deve ser tolerante às condições do TGI; isento de efeitos adversos significativos, ser não patogênico e não tóxico. Além disso, deve possuir efeitos benéficos comprovados; ser capaz de aderir às IECs e ou muco, promovendo a exclusão de patógenos e interagindo com o sistema imune, e finalmente, estar presente em concentrações adequadas no produto (FONTANA *et al.*, 2013; RUPA; MINE, 2012; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Apesar da viabilidade dos probióticos ser considerada fundamental para a obtenção de seus efeitos, estudos mostram que micro-organismos inativos, componentes bacterianos ou até mesmo fatores liberados por esses agentes são capazes de promover benefícios ao hospedeiro (GENEROSO *et al.*, 2010; GENEROSO *et al.*, 2011; SHIOU *et al.*, 2013; UENO *et al.*, 2011).

Os benefícios advindos da utilização dos probióticos são demonstrados em pesquisas envolvendo modelos animais e ensaios clínicos (FONTANA *et al.*, 2013; VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013). Seu uso tem sido associado a efeitos benéficos no manejo e prevenção de diversas doenças, podendo-se destacar as IBDs (FONTANA *et al.*, 2013; MENNIGEN *et al.*, 2009; PHILIPPE *et al.*, 2011; UENO *et al.*, 2011), enterocolite necrosante em pré-termos (ALFALEH; ANABREES; BASSLER, 2010; BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; SHIOU *et al.*, 2013), infecção por patógenos (MARTINS *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2012), diarreia associada ao uso de antibióticos, infecciosa aguda e do viajante (CHEN *et al.*, 2010; GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010; LONNERMARK *et al.*, 2010), síndrome do intestino irritável (BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; FONTANA *et al.*, 2013; MOAYYEDI *et al.*, 2010), e auxílio no tratamento contra *Helicobacter pylori*, por meio da redução da carga bacteriana e controle da inflamação (LINSALATA *et al.*, 2004; SGOURAS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2004). Tem sido documentado também, que os probióticos possuem influência em doenças alérgicas, intolerância à lactose, câncer, obesidade e diabetes (MASLOWSKI; MACKAY, 2011; RUPA; MINE, 2012; SAROWSKA *et al.*, 2013; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013).

Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus benefícios são diversos, podendo-se destacar a exclusão competitiva de patógenos realizada direta (produção de componentes antibacterianos, competição por nutrientes e sítios de adesão na superfície das mucosas, e redução do pH no TGI – produção de SCFA) ou indiretamente (promoção da homeostase microbiana); melhorias na função de barreira do epitélio intestinal por meio da modulação de vias de sinalização que conduzem ao aumento na produção de muco, moléculas antimicrobianas e sIgA, prevenção de apoptose e fortalecimento das junções firmes; modulação das respostas imunológicas; redução da exposição a carcinógenos por meio da alteração do perfil de bactérias intestinais, detoxificação de componentes carcinogênicos ingeridos e produção de compostos que controlam o crescimento tumoral (BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; FEDORAK, 2010; FONTANA *et al.*, 2013; GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010; KANAUCHI; ANDOH; MITSUYAMA, 2013; RAO; SAMAK, 2013; REIFF; KELLY, 2010; RUPA; MINE, 2012; SAROWSKA *et al.*, 2013; UENO *et al.*, 2011; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

De maneira geral, os probióticos previnem danos e promovem reparos à mucosa, garantindo sua integridade; aumentam a resistência epitelial contra patógenos; e induzem a proliferação celular, influenciando dessa maneira o perfil das doenças e promovendo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (RUPA; MINE, 2012).

Alguns mecanismos de ação dos probióticos estão esquematizados na figura 7.

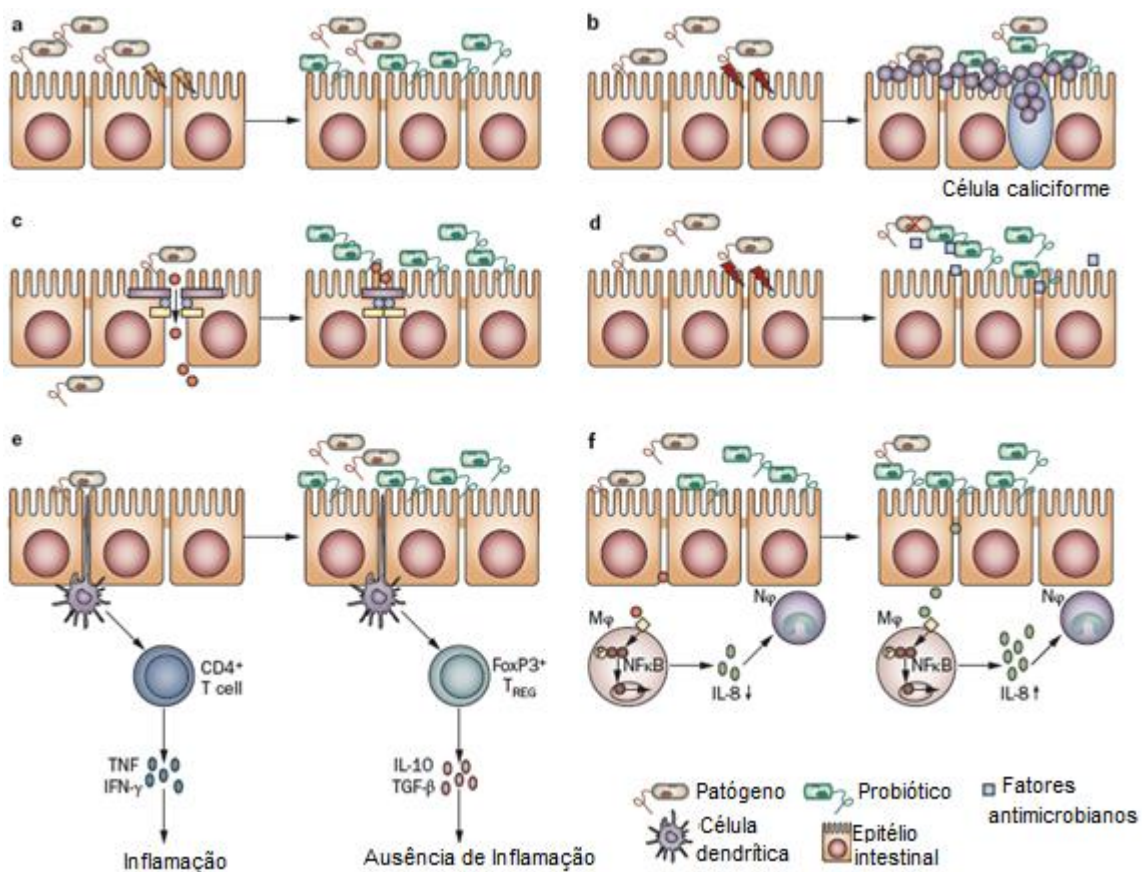


Figura 7: Potenciais mecanismos de ação dos probióticos. Organismos probióticos podem promover efeitos benéficos às células epiteliais intestinais de diversas maneiras. **(a)** Algumas linhagens podem bloquear a entrada de patógenos nas células epiteliais ao fornecerem uma barreira física ou **(b)** ao fortalecerem a barreira de muco, estimulando a liberação de mucinas pelas células caliciformes. **(c)** Outros micro-organismos controlam a permeabilidade intestinal aumentando a integridade das junções firmes (a exemplo, aumentando a expressão da zona ocludina 1, uma proteínas das junções firmes) ou prevenindo a redistribuição das proteínas dessas junções, o que evita a passagem de moléculas para o interior da lâmina própria. **(d)** Algumas linhagens de probióticos produzem substâncias antimicrobianas, **(e)** outras estimulam o sistema imune inato por meio da sinalização às células dendríticas as quais se dirigem para os linfonodos mesentéricos e induzem células T reguladoras (T_{REG}) a produzirem citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF- β . **(f)** Alguns probióticos (ou seus produtos) podem ainda modular a resposta imune inata, prevenindo-a (lado esquerdo) ou induzindo-a (lado direito), por meio da ativação ou supressão do NF- κ B em macrófagos ($M\phi$), influenciando assim a produção de IL-8 e o conseqüente recrutamento de neutrófilos ($N\phi$) para os locais de injúria intestinal (GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010, p. 506 - adaptado).

Os probióticos podem ser veiculados por formulações farmacêuticas, suplementos dietéticos e produtos fermentados. As bactérias probióticas que possuem maior potencial de utilização são linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. *Streptococcus thermophilus*, cepas de *Escherichia coli* não patogênicas, *Enterococcus*, *Bacillus*, e algumas leveduras, como a *Saccharomyces boulardii* são outros micro-organismos com potencial de utilização (BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; FONTANA *et al.*, 2013; KANAUCHI; ANDOH; MITSUYAMA, 2013; RUPA; MINE, 2012; SAROWSKA *et al.*, 2013).

Apesar dos diversos tipos de probióticos existentes, os efeitos acarretados pela utilização dos mesmos e os mecanismos pelos quais eles atuam para suscitar tais efeitos dependem da linhagem a que eles pertencem. Sendo assim, os benefícios atribuídos ao uso de determinado probiótico, não devem ser atribuídos a outro, mesmo que eles pertençam ao mesmo gênero e mesma espécie (BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; FAO/WHO, 2002; FONTANA *et al.*, 2013; RAO; SAMAK, 2013; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013).

Sob esse contexto, apesar de alguns tipos de probióticos demonstrarem-se efetivos na melhoria de parâmetros relacionados às IBDs (PHILIPPE *et al.*, 2011; UENO *et al.*, 2011; ZOCCO *et al.*, 2006), os que estão especialmente relacionados à terapia da UC são a *Escherichia coli* Nissle 1917 e o VSL#3, o qual é composto por uma mistura de lactobacilos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), bifidobactérias (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*) e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. A *E.coli* Nissle 1917 tem-se demonstrado tão efetiva quanto a mesalazina na manutenção da remissão da UC, enquanto que a utilização conjunta do VSL#3 com 5-aminossalicilato auxilia na promoção da remissão da colite leve ou moderada (DANESE; FIOCCHI, 2011; FEDORAK; MADSEN, 2004; GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010; KOKESOVÁ *et al.*, 2006; MENNIGEN *et al.*, 2009; NAGALINGAM; LYNCH, 2012; OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002; REIFF; KELLY, 2010; SAROWSKA *et al.*, 2013; UHLIG; POWRIE, 2009; VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013).

Os mecanismos pelos quais os probióticos atuam nas IBDs estão incluídos nos mecanismos dos probióticos em geral, podendo-se destacar: inibição competitiva da adesão e translocação bacteriana; ação imunomoduladora, tornando

o sistema imune da mucosa menos pró-inflamatório e mais anti-inflamatório, por meio da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e indução de mecanismos regulatórios, em especial tornando as DCs menos responsivas às bactérias luminais e induzindo a produção e migração de células T reguladoras para a região intestinal inflamada; supressão da apoptose e aumento da proliferação de células epiteliais do cólon; supressão do crescimento de patógenos por meio da liberação de fatores antimicrobianos; fortalecimento da função de barreira do epitélio intestinal por meio da secreção de muco, sIgA e regulação positiva das junções firmes, protegendo o hospedeiro contra bactérias invasivas. Ao atuar por meio desses mecanismos, os probióticos protegem o hospedeiro dos efeitos adversos que as bactérias luminais podem ter no desencadeamento e manutenção da resposta inflamatória intestinal (FEDORAK; MADSEN, 2004; FEDORAK, 2010; GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010; RUPA; MINE, 2012).

Visto os benefícios que a utilização dos probióticos pode originar no tratamento e prevenção de diversas doenças, sobretudo nas IBDs, faz-se necessário a contínua busca por novos micro-organismos que possam ser utilizados como alternativa na terapia da UC. Nesse âmbito, destacam-se pesquisas de linhagens de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, as quais são candidatas em potencial para utilização no manejo das IBDs (LEAHY *et al.*, 2005; PHILIPPE *et al.*, 2011).

2.4.1 As bifidobactérias

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez, em 1899, pelo pediatra francês Henry Tissier. Enquanto estudava sobre a diarreia infantil ele notou que bactérias em forma de Y, as quais eram encontradas em abundância em fezes de lactentes saudáveis amamentados, estavam ausentes nos que eram acometidos pela diarreia. Sendo assim, Tissier sugeriu que essa bactéria poderia ser utilizada no tratamento de pacientes com diarreia, a fim de restaurar a microbiota intestinal saudável (BIAVATI *et al.*, 2000; BOTTACINI *et al.*, 2014; GOMES; MALCATA, 1999; LEAHY *et al.*, 2005; TISSIER, 1900, citado por TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011; TISSIER, 1906, citado por BRON; BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2012; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As bifidobactérias foram inicialmente denominadas *Bacillus bifidus* devido à sua similaridade morfológica com os lactobacilos, podendo ser encontradas sob diversas formas, incluindo bacilos curtos e curvados, em forma de bastão e bifurcados em Y ou V. A semelhança morfológica e fisiológica resultou em uma incorreta inclusão das bifidobactérias no gênero *Lactobacillus*, atribuição que perdurou durante grande parte do século XX. Porém, estudos mais detalhados envolvendo análise de DNA, conteúdo de guanina e citosina (G+C) e capacidades metabólicas específicas, culminaram no surgimento do gênero *Bifidobacterium* (BIAVATI *et al.*, 2000; BOTTACINI *et al.*, 2014; GOMES; MALCATA, 1999; LEAHY *et al.*, 2005; TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O gênero *Bifidobacterium* é pertencente ao filo Actinobacteria, à ordem *Bifidobacteriales* e à família *Bifidobacteriaceae*. O filo Actinobacteria inclui elevado número de espécies com propriedades morfológicas, fisiológicas e metabólicas diversas. É constituído por micro-organismos Gram-positivo, com elevado conteúdo de G+C no DNA, variando de 46% a 70% ou mais dependendo da espécie ou do gênero. Esse filo inclui gêneros isolados de diversos locais, como comensais de plantas, habitantes do solo, simbiontes fixadores de nitrogênio e habitantes do TGI, dentro do qual encontra-se o gênero *Bifidobacterium* (BOTTACINI *et al.*, 2014; TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são micro-organismos Gram-positivo, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativo, anaeróbios e detentores de elevado conteúdo de G+C no DNA (BIAVATI *et al.*, 2000; BOTTACINI *et al.*, 2014; GOMES; MALCATA, 1999; LEAHY *et al.*, 2005; MIYAKE *et al.*, 1998; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Apesar de serem descritas como anaeróbias estritas, algumas linhagens de bifidobactérias são tolerantes à presença de oxigênio, assim como são tolerantes ao meio ácido. O pH ótimo para crescimento dessas bactérias varia em torno de 6,5 - 7,0, sendo que algumas linhagens de *B. lactis* e *B. animalis* conseguem sobreviver ao pH 3,5. Em relação à temperatura, a maioria das linhagens humanas de bifidobactérias possui uma temperatura ótima para crescimento de 36 – 38 °C, sendo que as de origem animal crescem em valores de 41 – 43 °C (BIAVATI *et al.*, 2000; GOMES; MALCATA, 1999; LEAHY *et al.*, 2005).

As bifidobactérias possuem capacidade de fermentar hexoses por meio da atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase, originando ácido acético e

ácido láctico, sem produção de gás carbônico. A presença dessa enzima é de fundamental importância para o gênero, pois é o único de origem intestinal que possui essa via fermentativa (via bífida). Sendo assim, a presença dessa enzima constitui uma importante ferramenta no auxílio da identificação desse gênero, uma vez que ela pode ser considerada seu marcador taxonômico (BIAVATI *et al.*, 2000; BOTTACINI *et al.*, 2014; GAVINI *et al.*, 1996; GOMES; MALCATA, 1999; MIYAKE *et al.*, 1998).

Outro processo fermentativo realizado pelas bifidobactérias que merece atenção, devido aos benefícios acarretados ao seu hospedeiro, é a fermentação de carboidratos complexos que não podem ser digeridos por enzimas humanas (BOTTACINI *et al.*, 2014; PICARD *et al.*, 2005). Os produtos finais da fermentação desses carboidratos são os SCFA (butirato, acetato e propionato), os quais possuem influência em respostas imunológicas e inflamatórias. Os SCFA, sobretudo acetato e propionato, ligam-se ao receptor GPR43 expresso majoritariamente em células do sistema imune inato (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos ativados) modulando a resposta inflamatória. A modulação proporcionada pelos SCFA pode ser comprovada ao constatar respostas inflamatórias totalmente alteradas em camundongos deficientes no receptor, assim como pela relação entre consumo adequado de fibras e índices reduzidos de doenças inflamatórias. O acetato possui a propriedade de modular o recrutamento de neutrófilos, bem como induzir a sua apoptose (MASLOWSKI *et al.*, 2009; MASLOWSKI; MACKAY, 2011; SLAVIN, 2003).

Atualmente são reconhecidas 48 espécies de bifidobactérias, as quais foram agrupadas em seis grandes grupos: *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium pseudolongum* (BOTTACINI *et al.*, 2014). Essas bactérias são encontradas em diversos nichos ecológicos, como intestino de humanos e animais, cavidade oral, esgoto, sangue e alimentos, sendo os três últimos resultantes da contaminação da fonte original, o TGI (BOTTACINI *et al.*, 2014; TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Para que as bifidobactérias sejam capazes de sobreviver e colonizar temporariamente o TGI, a resistência bacteriana é um requisito essencial. Desta forma, elas são dotadas de estruturas que permitem a ocorrência da colonização, como bombas de efluxo biliar, que são importantes para combater a toxicidade oriunda do acúmulo de bile no interior dessas bactérias; inibidores de proteases, os

quais são cruciais para protegê-las da ação de enzimas proteolíticas do hospedeiro; e estruturas relacionadas ao processo de colonização da mucosa intestinal, como polissacarídeos extracelulares (sEPS) e estruturas extracelulares semelhantes às fímbrias, as quais estão envolvidas no processo de agregação bacteriana, permitindo a aderência de uma bactéria à outra e potencializando a colonização (BOTTACINI *et al.*, 2014; PICARD *et al.*, 2005; TURRONI; SINDEREN; VENTURA, 2011).

O fato de as bifidobactérias serem encontradas naturalmente e em abundância no TGI de humanos (aproximadamente 80 a 90% em crianças amamentadas e 3 a 6% em adultos) tem despertado interesse no estudo desses micro-organismos, sobretudo devido aos benefícios acarretados à saúde e sua potencial aplicação como probiótico (BOTTACINI *et al.*, 2014; LEAHY *et al.*, 2005; PHILIPPE *et al.*, 2011; PICARD *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2012).

Nesse contexto pode-se mencionar a *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, a qual foi isolada de fezes de criança saudável e tem-se mostrado uma opção para utilização como micro-organismo probiótico. Resultados de estudos prévios mostraram a eficácia da utilização dessa bactéria no tratamento da constipação intestinal de crianças e adolescentes, na proteção de infecção por *Salmonella* Typhimurium e na indução da proliferação de células produtoras de IgA no intestino grosso e delgado de camundongos. Além disso, a *Bifidobacterium longum* 5^{1A} apresentou elevada taxa de crescimento em condições de anaerobiose, boa tolerância à presença de oxigênio e habilidade em produzir substâncias antagonistas a diversos tipos de bactérias patogênicas (GUERRA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

2.5 Modelo experimental de colite ulcerativa e testes de permeabilidade intestinal

O entendimento e esclarecimento de aspectos relacionados à patogênese e tratamento das IBDs são de fundamental importância para que haja evolução no manejo clínico dessas doenças. Sendo assim, a utilização de modelos animais tornou-se uma ferramenta indispensável para o estudo dos mecanismos relacionados às doenças e para o estabelecimento, em estágio pré-clínico, da eficácia e segurança de uma nova terapia (CAMPOS *et al.*, 2002; KHANNA *et al.*,

2014; LOW; NGUYEN; MIZOGUCHI, 2013; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2010; NEURATH, 2012).

Para que um modelo experimental de IBD seja considerado ideal, ele deve se enquadrar nos seguintes requisitos: possuir características semelhantes às da doença em humanos; permitir uma visão simplificada da complexa patologia da doença; não possuir custo muito elevado; ser de simples indução e curta duração; fácil de reproduzir, e acarretar o mínimo possível de danos ao bem-estar do animal (CHEN *et al.*, 2007; ROSE; SAKAMOTO; LEIFER, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010; UHLIG; POWRIE, 2009).

Não existe um modelo único que seja capaz de cumprir todas essas demandas, porém é importante salientar que diferentes modelos representam diferentes estágios das doenças (agudo ou crônico), simulam características em um grupo específico de pacientes, e permitem que os mecanismos das doenças sejam analisados minuciosamente (DE FAZIO *et al.*, 2014; LOW; NGUYEN; MIZOGUCHI, 2013; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2010; NEURATH, 2012; PERSE; CERAR, 2012; UHLIG; POWRIE, 2009). Portanto, diversos modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, fornecendo diversas opções para o estudo de fatores ambientais, imunológicos, genéticos e microbiológicos relacionados à doença, assim como alternativas para abordagens terapêuticas (KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007; KHANNA *et al.*, 2014; NEURATH, 2012; PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010).

Os modelos de IBDs compreendem majoritariamente animais que desenvolvem a doença espontaneamente (*knockout*), e aqueles cuja inflamação é induzida por meio da modificação genética, transferência de células em animais imunodeficientes e utilização de agentes químicos (ANDRADE; VAZ; FARIA, 2003; LAROUI *et al.*, 2012; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2010; NEURATH, 2012; PERSE; CERAR, 2012; UHLIG; POWRIE, 2009). Os modelos murinos de indução química são os mais utilizados devido à simplicidade de indução e aparecimento da doença, assim como maior controle sobre a duração e gravidade da inflamação (LOW; NGUYEN; MIZOGUCHI, 2013; PERSE; CERAR, 2012).

Dentre os modelos de inflamação intestinal quimicamente induzidos destacam-se a utilização do sulfato de sódio dextrano (DSS) para simular a UC e o ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para simular a CD (ANDRADE; VAZ;

FARIA, 2003; JOHANSSON *et al.*, 2010; KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007; LOW; NGUYEN; MIZOGUCHI, 2013; PHILIPPE *et al.*, 2011).

O DSS, polissacarídeo contendo mais de três grupos de sulfato por molécula de glicose, possui peso molecular que varia de 5 kDa a mais de 1400 kDa. O peso molecular é de extrema importância para a indução da colite, já que a severidade da doença foi maior em camundongos BALB/c quando se utilizou DSS cujo peso molecular era de 40 kDa. Em contrapartida, a administração do agente de 5 kDa induziu uma colite moderada, e 500 kDa não promoveu lesões no cólon. A influência do peso molecular na indução da doença deve-se principalmente ao efeito que o DSS possui na camada de muco presente sobre as IECs. O tamanho elevado das moléculas de 500 kDa dificulta a sua difusão na camada de muco, enquanto que as de 40-50 kDa penetram facilmente nessa rede de mucinas, conseguindo desestabilizar as interações que mantêm a sua estrutura organizacional (CHEN *et al.*, 2007; DE FAZIO *et al.*, 2014; JOHANSSON *et al.*, 2010; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999b; KULLMANN *et al.*, 2001; PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010).

O modelo experimental de UC utilizando DSS foi proposto por Okayasu e colaboradores (1990) e consiste no fornecimento de água suplementada com o agente químico aos animais, originando uma inflamação limitada ao cólon com características histopatológicas e manifestações semelhantes às da doença em humanos. Dependendo da forma de administração do DSS, pode-se induzir um modelo crônico ou agudo da doença. A forma aguda da colite é oriunda da administração contínua de DSS (2-5%) por um curto período de tempo (4-9 dias), enquanto que a forma crônica pode ser induzida por meio da administração contínua de baixas doses, ou ciclos repetitivos de doses relativamente mais altas (DE FAZIO *et al.*, 2014; KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999a; NEURATH, 2012; OKAYASU *et al.*, 1990 citado por PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010).

O mecanismo exato pelo qual o DSS origina a UC não está completamente elucidado, porém existem diversas especulações a respeito da sua ação, podendo-se destacar: efeito citotóxico; interferência na interação normal entre linfócitos e células epiteliais; ativação da resposta imune; modulação anormal da expressão e função dos receptores celulares; estímulo à produção de quimiocinas [CXCL1 (KC)] e citocinas pró-inflamatórias; regulação positiva da produção de óxido

nítrico; e alterações da microbiota intestinal, caracterizadas por redução no número de bactérias anaeróbias (bifidobactérias) e bactérias produtoras de SCFA, assim como aumento de bactérias com propriedades pró-inflamatórias e mucodegradantes (ARAKI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2007; DE FAZIO *et al.*, 2014; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999a, b; KULLMANN *et al.*, 2001; NAGALINGAM *et al.*, 2011; PERSE; CERAR, 2012; SCHWAB *et al.*, 2014).

A citotoxicidade exercida pelo DSS nas células epiteliais do cólon provoca defeitos na integridade da barreira epitelial, promovendo aumento da permeabilidade intestinal. As alterações epiteliais originadas pelo DSS são percebidas já no primeiro dia de indução da doença com perda e redistribuição de componentes pertencentes às junções firmes, como a zônula oclusiva-1 (ZO-1), e aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ). No terceiro dia já se percebe um aumento considerável na permeabilidade intestinal. Na fase aguda da UC são também observadas alterações em outras proteínas das junções firmes (occludinas, claudinas-1, -3, -4 e -5), aumento do índice apoptótico celular e redução da proliferação epitelial (LAROUÏ *et al.*, 2012; NAGALINGAM *et al.*, 2011; NEURATH, 2012; PERSE; CERAR, 2012; SCHWAB *et al.*, 2014; SOLOMON *et al.*, 2010).

Um dos mecanismos pelo qual o DSS torna-se capaz de penetrar nos colonócitos, induzir apoptose e promover prejuízo na integridade da barreira epitelial é por meio da formação de vesículas com ácidos graxos de cadeia média, os quais estão presentes em grande quantidade no cólon. Uma vez formadas, as vesículas fundem-se com as membranas dos colonócitos e entram no citoplasma dos mesmos, afetando as suas vias de sinalização e iniciando a cascata de eventos inflamatórios, o que prejudica a função da barreira epitelial. Outro fator associado à perda de integridade da mucosa é a interação existente entre os ácidos graxos de cadeia média e as proteínas claudinas, fato que permite o transporte do agente químico através do epitélio. A perda da integridade epitelial culmina na entrada de antígenos e micro-organismos na mucosa intestinal, agravando ainda mais a resposta inflamatória (DE FAZIO *et al.*, 2014; LAROUÏ *et al.*, 2012; PERSE; CERAR, 2012).

Outro fator relacionado ao influxo aumentado de bactérias na mucosa é o desarranjo organizacional que o DSS provoca na camada de muco presente no cólon. O agente promove redução na espessura e aumento na permeabilidade do

muco, permitindo que bactérias penetrem facilmente na sua camada interna (JOHANSSON *et al.*, 2010).

Uma vez que a disfunção da barreira intestinal é fator comum nas IBDs, vários testes *in vivo* de permeabilidade intestinal foram desenvolvidos, os quais possuem em comum o fato de que moléculas de diferentes pesos moleculares são utilizadas devido à sua capacidade de “atravessar” o epitélio em direção à submucosa ou sangue (BISCHOFF *et al.*, 2014). O transporte de fluidos e solutos através da barreira intestinal pode ocorrer tanto por um processo transcelular quanto paracelular, sendo que o último possui especial importância devido à passagem de substâncias de tamanho mediano ou grande, com maior potencial antigênico. A via paracelular é realizada mediante as junções intercelulares (junções firmes, junções aderentes e desmossomos), as quais são responsáveis por “selar” este espaço. Portanto, a avaliação da permeabilidade através dessas junções é foco de vários estudos (HENDERSON *et al.*, 2011; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999a).

Sendo assim, a permeabilidade intestinal pode ser definida como uma característica funcional da barreira intestinal medida pela análise do fluxo de moléculas através da parede intestinal como um todo, ou de componentes da mesma. A permeabilidade é considerada aumentada quando se observa a passagem de moléculas com peso molecular acima de 150 daltons (Da) pela barreira intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014; BJARNASON; MACPHERSON; HOLLANDER, 1995; GENEROSO *et al.*, 2010; GENEROSO *et al.*, 2011).

Os ensaios de permeabilidade utilizam na maioria das vezes açúcares de elevado ou reduzido tamanho e peso molecular, assim como outras substâncias não digeríveis administradas oralmente, tais quais o ^{51}Cr -ácido etilenodiaminotetracético (^{51}Cr -EDTA) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilenotriaminopentacético ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA). A permeabilidade é então determinada por meio da detecção da radiação ou marcadores na urina ou sangue, sendo a passagem de moléculas grandes associada à disfunção das junções firmes (BISCHOFF *et al.*, 2014; BJARNASON; MACPHERSON; HOLLANDER, 1995; JORGENSEN *et al.*, 2006; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999a).

O complexo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA é considerado adequado para avaliação da permeabilidade intestinal, porque além de raramente atravessar o intestino, essa macromolécula possui peso molecular de 549 Da, é solúvel em água, não é destruída no intestino, não é tóxica, não é metabolizada, de fácil detecção e é

eliminada em parte pelos rins. Estudos experimentais realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a eficácia da utilização dessa macromolécula na determinação da permeabilidade intestinal (GENEROSO *et al.*, 2010; GENEROSO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de forma preventiva/curativa e curativa, da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, sobre a colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da *B. longum* 5^{1A} como terapia primária na colite, por meio de parâmetros clínicos como variação de peso, consistência e presença de sangue nas fezes.
- Avaliar o efeito da *B. longum* 5^{1A} sobre a barreira intestinal com base em resultados de permeabilidade intestinal empregando o ^{99m}Tc- DTPA como radiotraçador.
- Investigar o impacto da administração da *B. longum* 5^{1A} sobre o epitélio intestinal por meio de análises histológicas, considerando aspectos qualitativos e quantitativos.
- Avaliar o efeito da administração da *B. longum* 5^{1A} na promoção da modulação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como também investigar os níveis de quimiocinas no cólon.
- Investigar alguns aspectos relacionados com o processo inflamatório na mucosa intestinal mediante avaliações indiretas de infiltrado de células brancas e, também, investigar os níveis de sIgA no lúmen intestinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos convencionais da linhagem BALB/c, de 6 a 8 semanas de idade e 19 a 23 g, adquiridas do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível NB2. Os camundongos receberam ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade e temperatura controladas.

Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob protocolo nº 359/2013 (ANEXO A).

4.2 Micro-organismo

A bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL5^{1A}) utilizada neste estudo foi mantida no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Ela foi repicada diariamente em caldo MRS (de Man, Rogosa e Shape) (Difco, Detroit, MI, USA), e o crescimento realizado em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Marietta, USA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, a 37 °C e sem agitação por 48 h (SOUZA *et al.*, 2013).

4.3 Indução química de colite aguda por DSS

Para indução da colite experimental, os animais receberam na água uma solução de DSS (3,5% peso/volume) (36 - 50 kDa; MP Biomedicals, USA) diluído em água filtrada. A solução foi administrada continuamente durante 7 dias, período no qual a mesma foi ofertada sem restrição aos camundongos (WIRTZ *et al.*, 2007). O consumo da solução de DSS (n=8) foi acompanhado durante esse período por meio da determinação do volume diário ingerido.

4.4 Delineamento experimental

Duas modalidades de tratamento foram realizadas:

A. Tratamento preventivo/curativo: Os animais receberam por gavagem inóculo diário contendo 0,1 mL de salina estéril ou do probiótico durante todo o período experimental, sendo que no 10^o dia iniciou-se a indução da colite através da substituição da água por uma solução de DSS (3,5%) (figura 8A).

B. Tratamento curativo: Os animais receberam durante todo o período experimental, gavagem diária contendo 0,1 mL de salina estéril ou do probiótico, sendo a indução da colite (solução de DSS 3,5%) realizada concomitantemente ao tratamento (figura 8B).

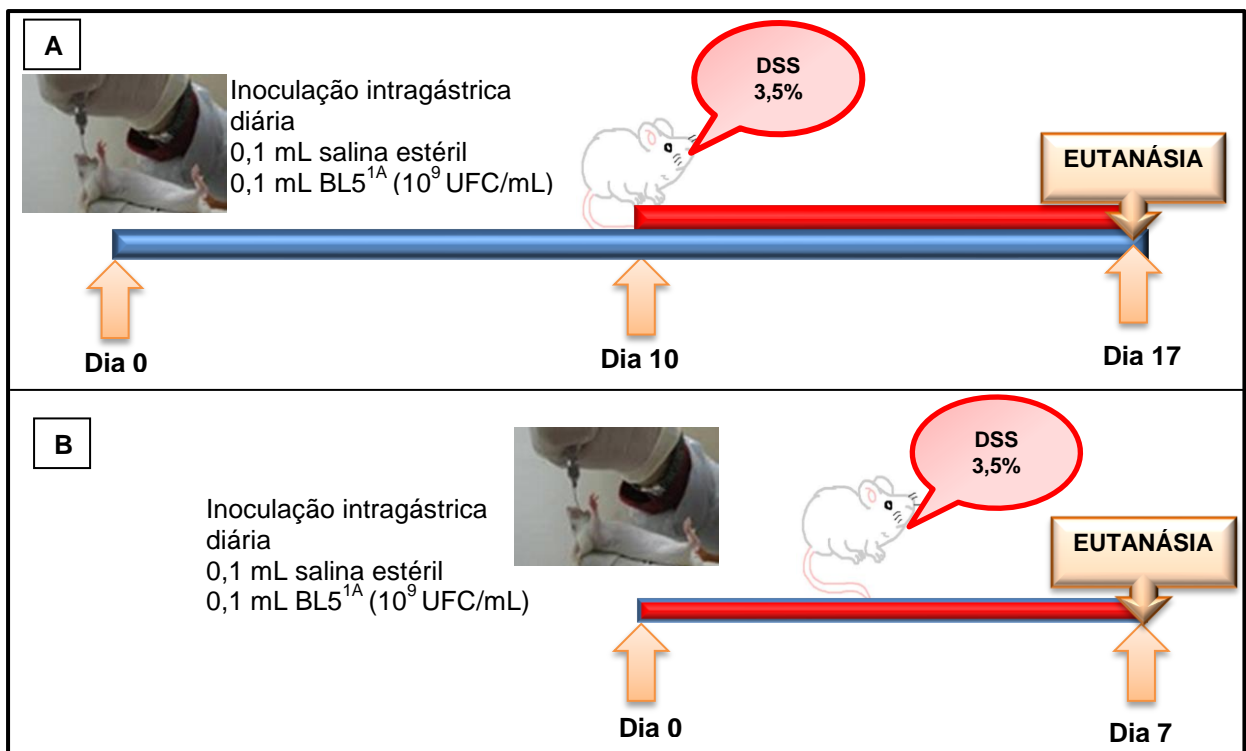


Figura 8: Esquema representando o delineamento experimental dos tratamentos conforme a indução da doença. (A) Modelo preventivo/curativo e (B) Modelo curativo. Em ambas as formas de tratamento os animais receberam inóculo diário, contendo salina ou 10^8 UFC da *B. longum* 5^{1A}, por via intragástrica. A faixa azul (A) indica o período que os animais receberam o tratamento, e a faixa vermelha, o período que receberam o DSS. A faixa vermelha (B) indica o período concomitante do tratamento e indução da doença (DSS).

Em ambas as formas de tratamento, os animais foram divididos em 4 grupos: controle (CTL), *B. longum* 5^{1A} (BL5^{1A}), DSS e DSS + BL5^{1A}.

Os camundongos do grupo CTL e grupo BL5^{1A} não receberam DSS para indução da colite, enquanto que aqueles pertencentes aos grupos DSS e DSS+BL5^{1A} receberam na água solução de DSS (3,5%) durante 7 dias para a indução da doença. Os animais tratados, BL5^{1A} e DSS+BL5^{1A}, receberam inóculo diário de 100µL do probiótico, contendo 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC), via administração intragástrica. Os animais dos grupos CTL e DSS receberam durante o mesmo período inóculo de 100µL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril, a fim de serem submetidos às mesmas condições de estresse que os animais que receberam o probiótico (MARTINS *et al.*, 2009).

Os animais foram pesados, durante o período experimental, para análise do desenvolvimento ponderal. Durante a indução da colite, analisou-se a presença de sangue e consistência das fezes, a fim de se estabelecer um *score* clínico. Após o período experimental, os animais foram anestesiados [solução de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg)] via intraperitoneal e o sangue coletado para análise da permeabilidade intestinal. Após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o cólon e o fluido intestinal, retirados para posteriores análises. Todas as análises foram realizadas igualmente para os grupos do modelo preventivo/curativo e curativo.

4.5 Análise de parâmetros clínicos

A análise de parâmetros clínicos compreendeu avaliações do peso e das fezes (*score* clínico) dos camundongos. Os animais (n=8) foram pesados todos os dias no mesmo horário, na parte da manhã, a fim de evitar variações durante o dia. Para análise do desenvolvimento ponderal, o peso obtido no início da indução da doença (dia 0) foi considerado 100%, sendo as alterações diárias (perda ou ganho) computadas individualmente em relação ao peso inicial e expressas em porcentagem. Sendo assim, tornou-se possível avaliar as alterações do peso nos diferentes tempos de indução da doença.

O *score* clínico (n=7) da doença foi avaliado conforme descrito por Wirtz *et al.* (2007), baseado em um *score* acumulativo (0 a 6) pela análise dos seguintes parâmetros: (1) consistência das fezes (0 = normal, 1= mole porém ainda formada, 2= muito mole, 3=diarreia), e (2) presença de sangue nas fezes (0= negativo para presença de sangue oculto, 1= positivo para presença de sangue oculto, 2= traços

de sangue visíveis nas fezes, 3= sangramento retal). A presença de sangue oculto nas fezes foi avaliada de acordo com o kit comercial FECA-CULT (InLab Diagnóstica, Diadema, SP, Brasil), segundo instruções do fabricante.

4.6 Estudo da permeabilidade intestinal

4.6.1 Marcação do DTPA com ^{99m}Tc tecnécio

A marcação do DTPA com ^{99m}Tc tecnécio foi realizada por meio da utilização de um reagente liofilizado contendo 10 mg de DTPA e 0,5 mg do agente redutor cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fornecido pelo laboratório de Farmácia Nuclear/UFMG. O reagente foi reconstituído com 1 mL da solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) contendo uma atividade de 185 Megabecquerel (MBq) de ^{99m}Tc . Essa preparação foi mantida em temperatura ambiente durante 15 minutos (SOARES, 2012).

4.6.2 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi determinada em todos os grupos experimentais submetidos às duas formas de tratamento, contendo, cada grupo, 6 animais.

Para a análise da permeabilidade intestinal, os animais receberam por gavagem 0,1 mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA contendo uma atividade de 18,5 MBq. Uma alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA (padrão de dose) foi utilizada para correção do decaimento radioativo do ^{99m}Tc e teve a radioatividade determinada no mesmo tempo dos demais tubos (VIANA *et al.*, 2010).

A permeabilidade foi avaliada após os sete dias de indução da doença e foi realizada por meio da coleta de sangue da veia cava inferior (300 μL), 4 horas após a gavagem do ^{99m}Tc -DTPA. Em seguida, realizou-se a contagem da radioatividade no contador de radiação gama (PerkinElmer Wallac, 1480 Wizard 3). Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de dose e calculados em percentual da dose no sangue conforme a fórmula abaixo (VIANA *et al.*, 2010).

$$\% \text{ dose no sangue} = \text{cpm do sangue} / \text{cpm do padrão de dose} \times 100$$

cpm: contagem por minuto.

4.7 Análise do comprimento do cólon

Após a eutanásia dos camundongos, o cólon de cada animal (n=7) foi seccionado desde a junção com o ceco até o reto (região distal). Após este procedimento mediu-se o comprimento do cólon com o auxílio de uma régua (PORITZ *et al.*, 2007).

4.8 Análise histológica

A análise histológica foi realizada utilizando-se amostras do cólon de 5 animais por grupo de experimentação (CTL, BL5^{1A}, DSS e DSS+BL5^{1A}), tendo sido o processamento do órgão realizado de acordo com o método descrito por Arantes e Nogueira (1997). Desta forma, os cólons foram separados do restante dos intestinos, cortados, estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda anti-mesentérica, tendo sido seu conteúdo totalmente removido sem danos à mucosa. Em seguida, os tecidos foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação.

Decorrido o tempo da pré-fixação, os tecidos foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), com porção distal (próxima ao ânus) voltada para dentro e a porção proximal (próxima ao ceco) localizada mais externamente. Os rolos foram amarrados com linha e fixados por imersão em solução de formol 10% durante 24 horas.

As amostras foram então processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica de rotina.

4.8.1 Coloração Hematoxilina e Eosina

Cortes de 4 µm do cólon dos animais avaliados foram desparafinados em dois banhos de xilol (15 minutos cada), hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada e hidratados em água corrente durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram contracorados pela hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo, em seguida, corados pela eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com Entellan (Merck) e lamínulas de vidro.

4.8.2 Análise das lâminas e documentação fotográfica

Todas as lâminas foram analisadas sequencialmente pela profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes (Departamento de Patologia Geral/ ICB/ UFMG) que não teve acesso aos códigos das mesmas. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). As imagens gravadas foram selecionadas e transferidas para o programa *Power Point* para a montagem das pranchas.

4.8.3 Análise morfométrica

Para análise morfométrica do cólon, foram obtidas fotografias em aumento de 4x, de forma sequencial de modo a abranger toda a área do órgão. A demarcação da extensão da lesão em todos os grupos estudados foi feita com o auxílio do programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível on line no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

Extensão da lesão: Para a realização da análise nos diferentes grupos (n=5), um padrão de lesão foi determinado. De acordo com esse critério foram quantificadas

regiões nas quais a perda total da morfologia intestinal (destruição de criptas, vilosidades e células caliciformes), presença de infiltrados inflamatórios significativos associados a edema, atingissem 2/3 ou mais da área de mucosa do cólon. Além das regiões lesionadas mensurou-se o comprimento total do cólon, sendo os resultados expressos em micrômetros.

4.8.4 Score histológico

A fim de avaliar qualitativamente a associação da colite aguda com as alterações do cólon, utilizou-se o *score* proposto por Wirtz *et al.*, (2007), aplicado a metades proximais e distais do rocambole (aumento de 10x). Para cada região foi atribuído um valor correspondente ao *score*: (0) sem evidência de inflamação; (1) baixo nível de inflamação com focos isolados de infiltrado de células mononucleares (1-2 focos); (2) inflamação moderada com múltiplos focos; (3) inflamação elevada com aumento da densidade vascular e espessamento da parede; (4) inflamação severa com infiltração transmural de leucócitos e perda das células caliciformes. Os valores do *score* de cada animal avaliado (n=5) foram obtidos por meio da média das regiões proximais e distais analisadas.

4.9 Dosagem de citocinas (IL-1 β e IL-10) e quimiocinas [CXCL1 (KC) e CCL11 (eotaxina-1)] no cólon

A expressão de citocinas e quimiocinas no cólon foi avaliada utilizando-se fragmentos do órgão com aproximadamente 100 mg, os quais foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS adicionado de inibidores de protease: PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80 °C para posterior análise. A dosagem das citocinas e quimiocinas foi realizada pelo método de ELISA, sendo que para IL-1 β e CXCL1(KC) foram utilizados 6 animais por grupo experimental (n=6), para CCL11 utilizou-se n=7 e, finalmente, para IL-10 foram utilizados 4 animais (n=4). Os kits para as citocinas e quimiocinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). Os ensaios foram realizados segundo instruções do fabricante (MARTINS *et al.*, 2011).

4.10 Avaliação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) para determinação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos no cólon

4.10.1 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos no cólon. Para a análise, fragmentos do cólon dos animais (n=7) foram removidos e congelados a -80 °C. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão), utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax IKA T10 basic), e centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 10.000 rpm. O precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão NaH₂PO₄.1H₂O 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma) 0,5% e re-homogeneizado. As amostras foram congeladas, em nitrogênio líquido, e descongeladas, sendo esse processo realizado três vezes. Em seguida foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM) (SOUZA *et al.*, 2000). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados expressos em densidade óptica.

4.10.2 Medida da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima EPO foi utilizada para avaliar a quantidade relativa de eosinófilos no cólon dos camundongos (n=6). Desta forma, para cada 100 mg de cólon foi adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2), procedendo-se a homogeneização (Ultra-turrax IKA T10 basic) e centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos) do tecido, sendo o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de NaCl 0,2%, seguido da adição de 500 µL de NaCl 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado

(10.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspenso em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB (Sigma) 0,5%, para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota (1 mL) que foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essa amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL da amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD (Sigma) em tampão Tris-HCl-0,075 µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20 °C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) com filtro de 492 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (VIEIRA *et al.*, 2009).

4.11 Dosagem de imunoglobulina A secretora (sIgA)

O intestino delgado dos animais (n=6) foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo retirado, pesado e lavado com salina fosfatada pH 7,2 [suplementada com inibidor de protease (1µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1mM de PMSF)], na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg de conteúdo, foi centrifugado (5000 rpm, por 30 minutos, a 4°C), e o sobrenadante recolhido e congelado a -80°C para posterior dosagem da imunoglobulina. A determinação da sIgA total foi realizada pelo método de ELISA de captura. Para revestimento das microplacas foram utilizados anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA). Anticorpos conjugados a peroxidases anti-IgA de camundongo (A-4789, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) foram utilizados para a detecção da imunoglobulina. A determinação da concentração de sIgA foi realizada utilizando-se um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). A leitura foi feita, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc. Sunnyvale, USA). A concentração de sIgA foi representada em µg/mL de conteúdo intestinal (MARTINS *et al.*, 2009).

4.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01. Para análise de normalidade dos dados aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram avaliados quanto à significância estatística através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ou Bonferroni. Dados não paramétricos foram avaliados conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, ou teste de Mann Whitney, quando apenas dois grupos foram avaliados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do consumo da solução de DSS durante a indução da colite

O consumo da solução de DSS (3,5%) durante todo o período de indução da colite está evidenciado na figura 9. Não se observou diferença no consumo do agente químico, entre os diferentes grupos, em nenhum tempo de indução da doença.

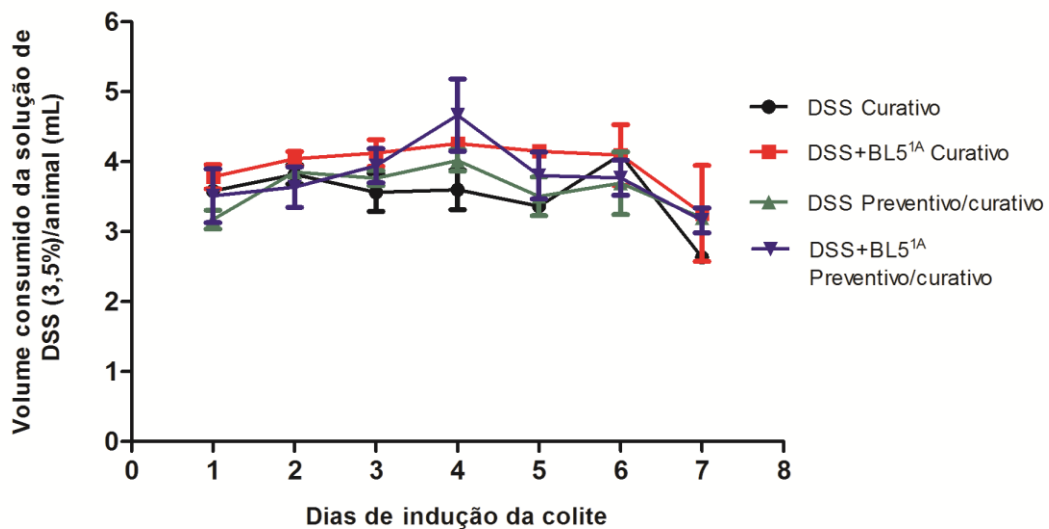


Figura 9: Consumo da solução de DSS (3,5%) durante a indução da colite. A ausência de caracteres (*) indica que não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA two-way, seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($n=8$).

5.2 Análise de parâmetros clínicos

A avaliação ponderal dos animais para verificar variações no peso durante a indução da colite está representada na figura 10. As curvas de desenvolvimento ponderal apresentaram perfil semelhante entre os grupos CTL/BL5^{1A}, e DSS/DSS+BL5^{1A}, em ambos os modelos de tratamento da doença (preventivo/curativo e curativo). Observou-se perda de peso nos animais que receberam o DSS a partir do 6º dia de indução da doença, sendo esta perda significativa apenas no 7º dia. A administração do probiótico não foi capaz de prevenir a perda de peso desencadeada pela administração do agente químico (figuras 10A e 10B).

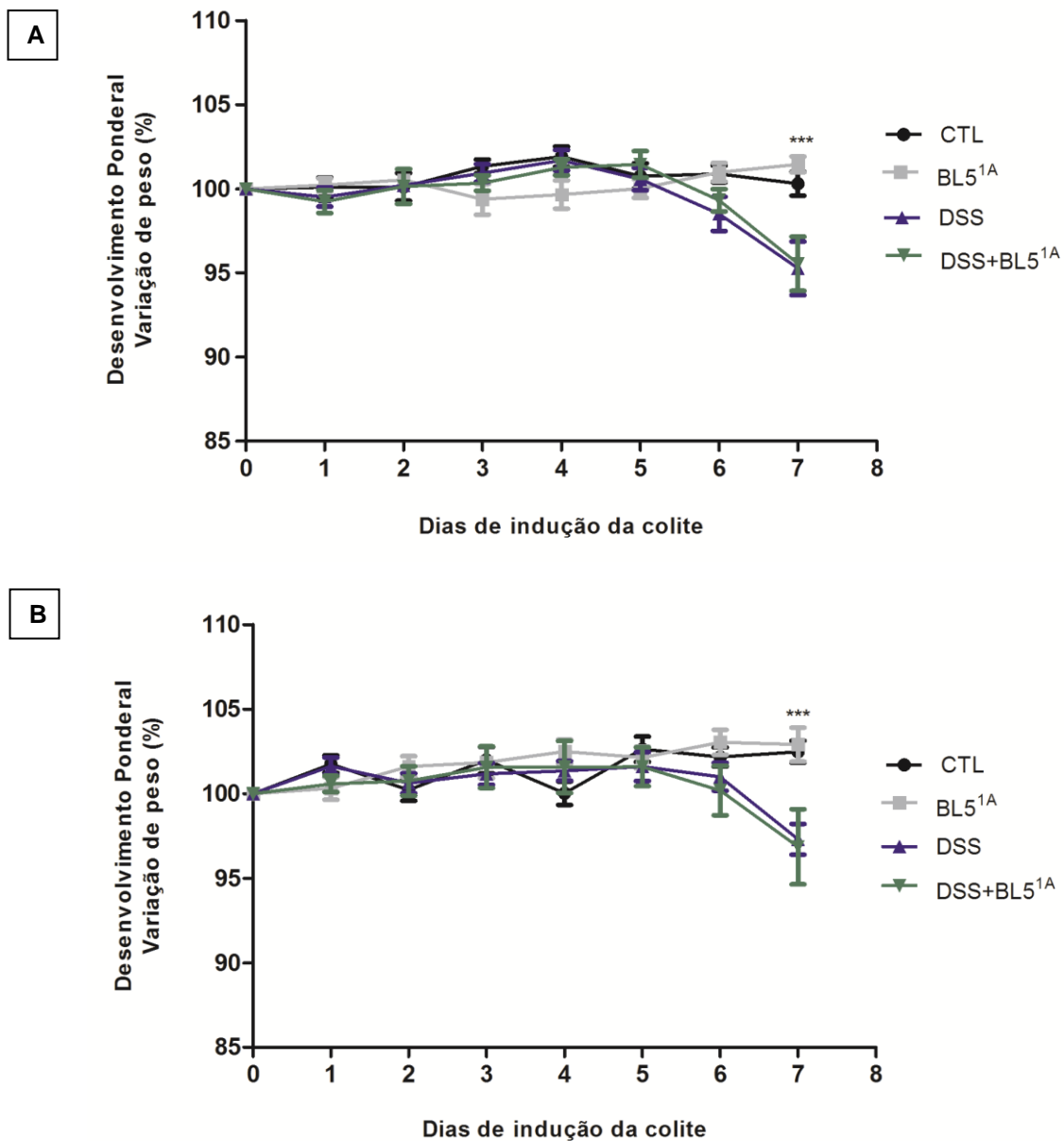


Figura 10: Desenvolvimento ponderal. Variação do peso dos camundongos (%) em relação ao peso no início do tratamento com DSS (dia 0). Os asteriscos mostram diferença estatisticamente significativa (***) = $p < 0,001$) entre os grupos controle (CTL e BL5^{1A}) e os desafiados com DSS (DSS e DSS+BL5^{1A}). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA two-way, seguido pelo pós-teste de Bonferroni (n=8).

Análises realizadas para verificação de alterações nas características das fezes dos animais mostraram que já no primeiro dia de indução da doença os animais dos grupos colite (DSS e DSS+BL5^{1A}) apresentaram alteração na consistência das fezes, as quais tornaram-se amolecidas, apesar de ainda formadas. Essa situação perdurou até os últimos dois dias de indução da doença, quando então as fezes de alguns animais se descaracterizaram, tornando-se muito

amolecidas. A presença de sangue oculto nas fezes foi notada já nas primeiras 24 horas após administração do DSS, sendo que no sexto dia de indução da doença alguns animais apresentaram traços de sangue visíveis nas fezes, e no 7º dia alguns apresentaram sangramento retal. Esse perfil de alterações fecais foi observado nos dois modos de tratamento, preventivo/curativo e curativo.

O *score* clínico, baseado nas avaliações conjuntas de sangramento retal e alterações na consistência das fezes, está apresentado na figura 11. Ao analisá-lo, observou-se diferença estatística entre os grupos controle (CTL e BL5^{1A}) e colite já no primeiro dia de indução da doença, a qual perdurou até o último dia da mesma. Não se observou redução dos sinais da doença pelo probiótico, em nenhuma das duas formas de tratamento.

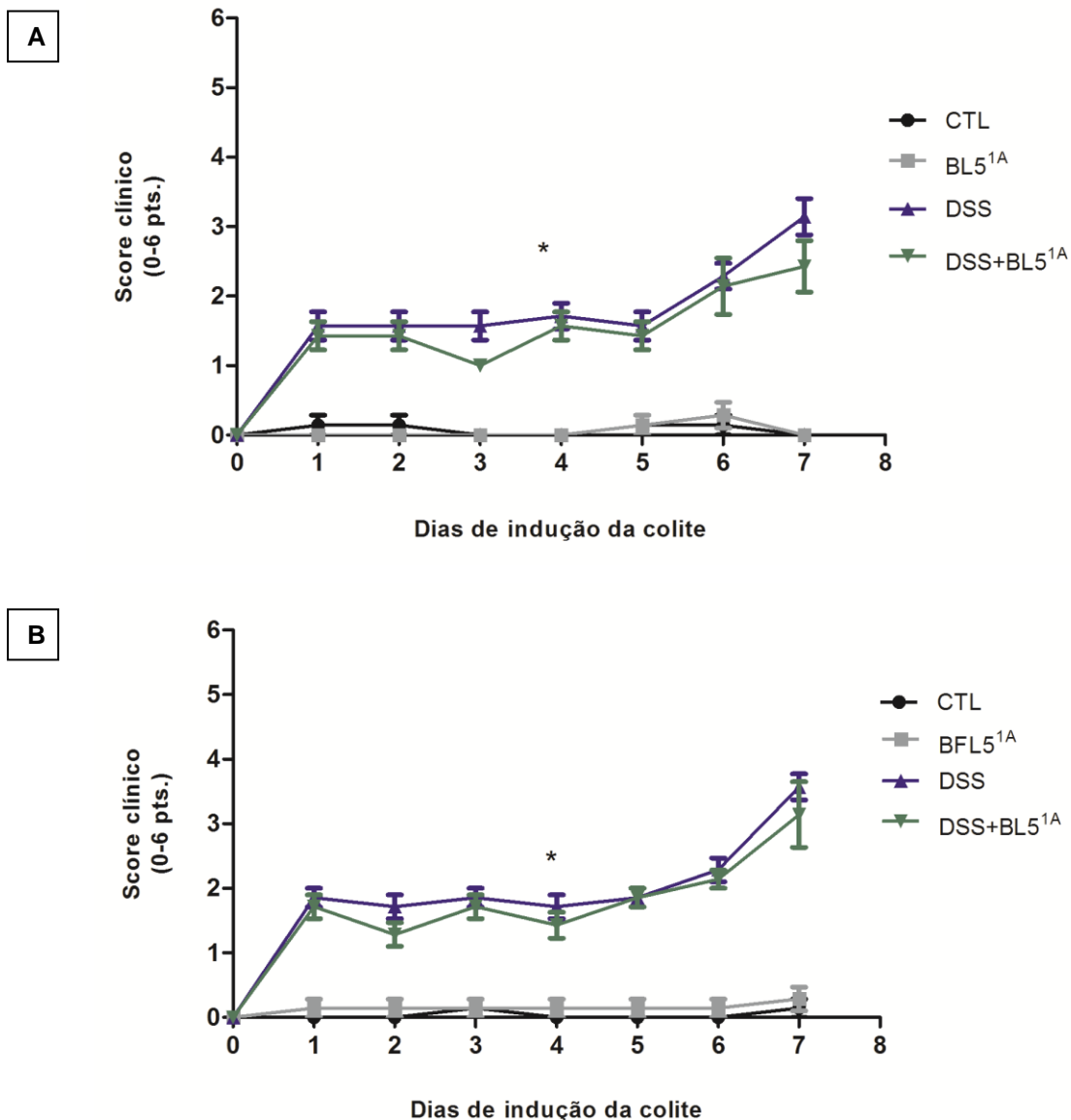


Figura 11: Score clínico. O asterisco mostra diferença estatisticamente significativa (* = $p < 0,05$) entre os grupos controle e colite. (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn ($n=7$).

5.3 Permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal, obtida pela análise da porcentagem de ^{99m}Tc -DTPA encontrada no sangue dos camundongos, mostrou que a administração do DSS promoveu aumento nesse parâmetro, fato que pode ser observado ao se comparar com o grupo CTL. Em ambas as modalidades de tratamento (preventivo/curativo e curativo), a administração do probiótico (grupo DSS+BL5^{1A}) não resultou em redução da permeabilidade. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores encontrados nos grupos CTL e BL5^{1A} ($p > 0,05$), demonstrando que a utilização do probiótico sem a indução da doença não promove alterações na permeabilidade intestinal (figura 12). Observa-se que resultados similares foram encontrados para as duas formas de tratamento.

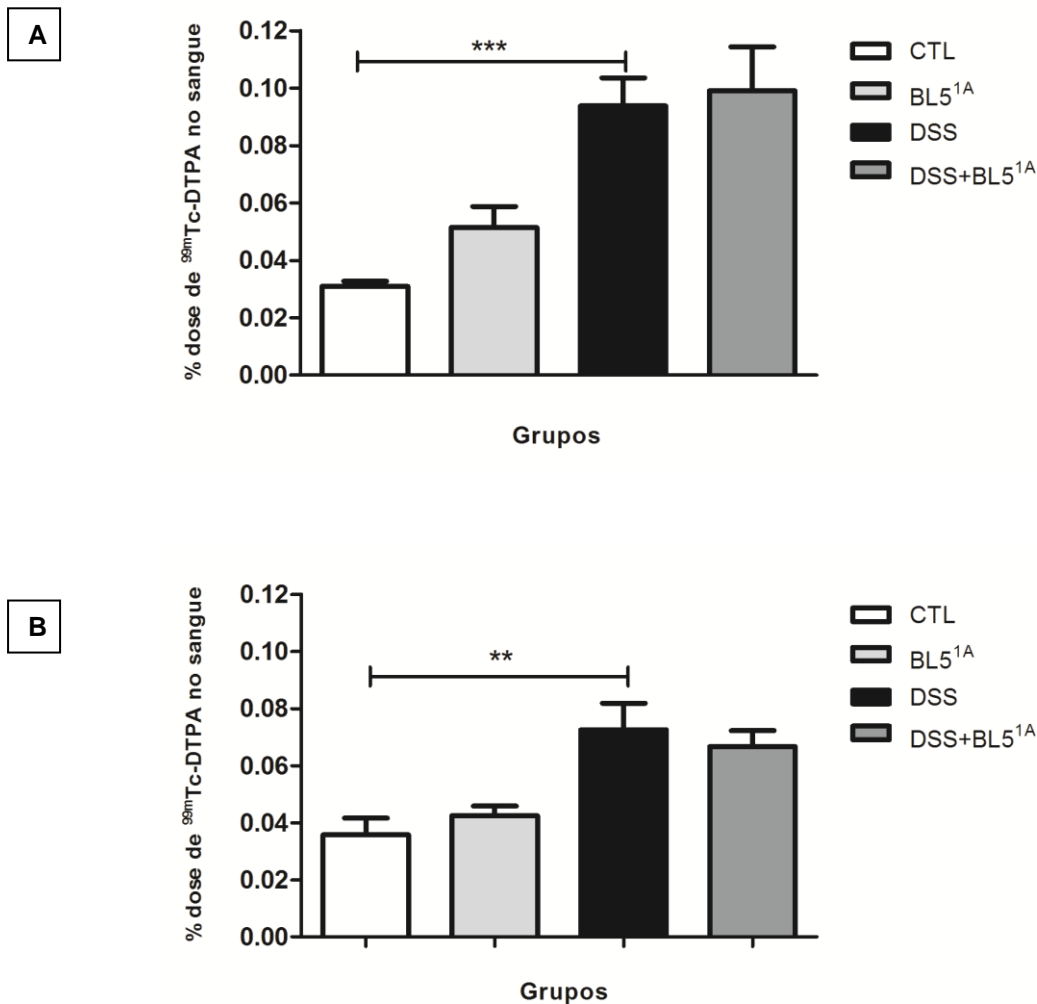


Figura 12: Permeabilidade intestinal. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=6$).

5.4 Comprimento do cólon

A indução da colite ulcerativa promoveu encurtamento do cólon, o qual não foi revertido pela administração do probiótico para ambos os tratamentos preventivo/curativo e curativo (figura 13).

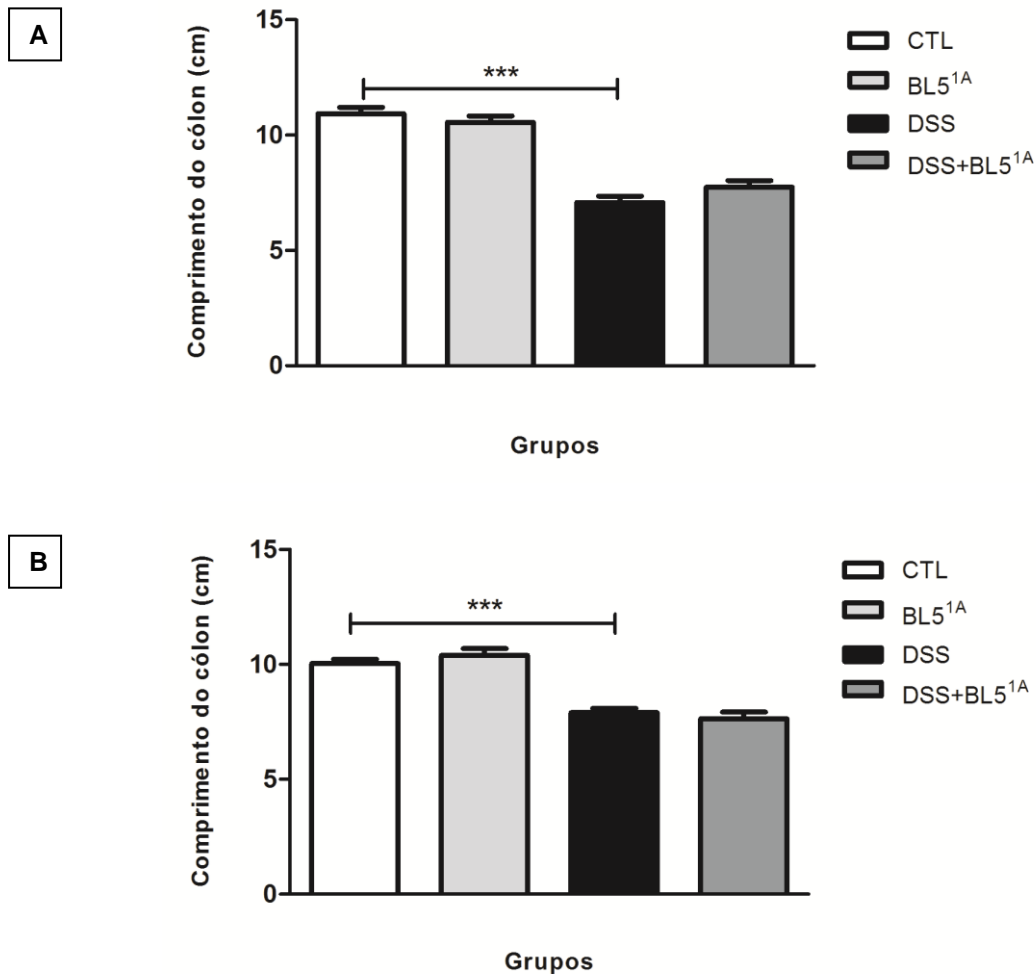


Figura 13: Comprimento do cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (***) = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=7$).

5.5 Análise histológica

5.5.1 Análise histopatológica do cólon

Para avaliação histopatológica do cólon, foram analisadas cinco lâminas de cada grupo experimental (n=5), com cortes histológicos de cólon amostrados pela técnica do rocambole, a qual possibilita a observação e tomada de medidas do segmento colônico em sua totalidade. As fotos representativas das lâminas de camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais de cada tipo de tratamento estão representadas nas figuras 14 e 15.

Ao analisar as lâminas dos animais pertencentes à forma de tratamento preventivo/curativo, observou-se que os animais controle não apresentaram alterações no cólon (figura 14A). Os que receberam somente o probiótico evidenciaram apenas discreto edema da submucosa, com discreto aumento da celularidade nesta área, estando a arquitetura preservada (figura 14B). Embora não medido, há maior número de agregados linfoides e placas de Peyer mais exuberantes em relação ao controle.

A administração do DSS alterou a morfologia do órgão, originando acometimento predominantemente segmentar, acompanhado de intenso edema da submucosa e lesões na mucosa. Observou-se também, áreas de necrose, presença de infiltrado inflamatório contendo polimorfonucleares, e infiltração leucocitária interepitelial (figura 14C). Alguma preservação da arquitetura no terço superior da mucosa foi notada, incluindo a presença de células calciformes em alguns segmentos.

Os animais que receberam o DSS e foram tratados com a bifidobactéria (grupo DSS+BL5^{1A}) apresentaram extensas áreas de acometimento do cólon, com menor intensidade do processo inflamatório, o qual foi acompanhado de edema (figura 14D). O infiltrado na lâmina própria foi predominantemente neutrofílico, e verificou-se a presença de células calciformes no terço superficial da mucosa.

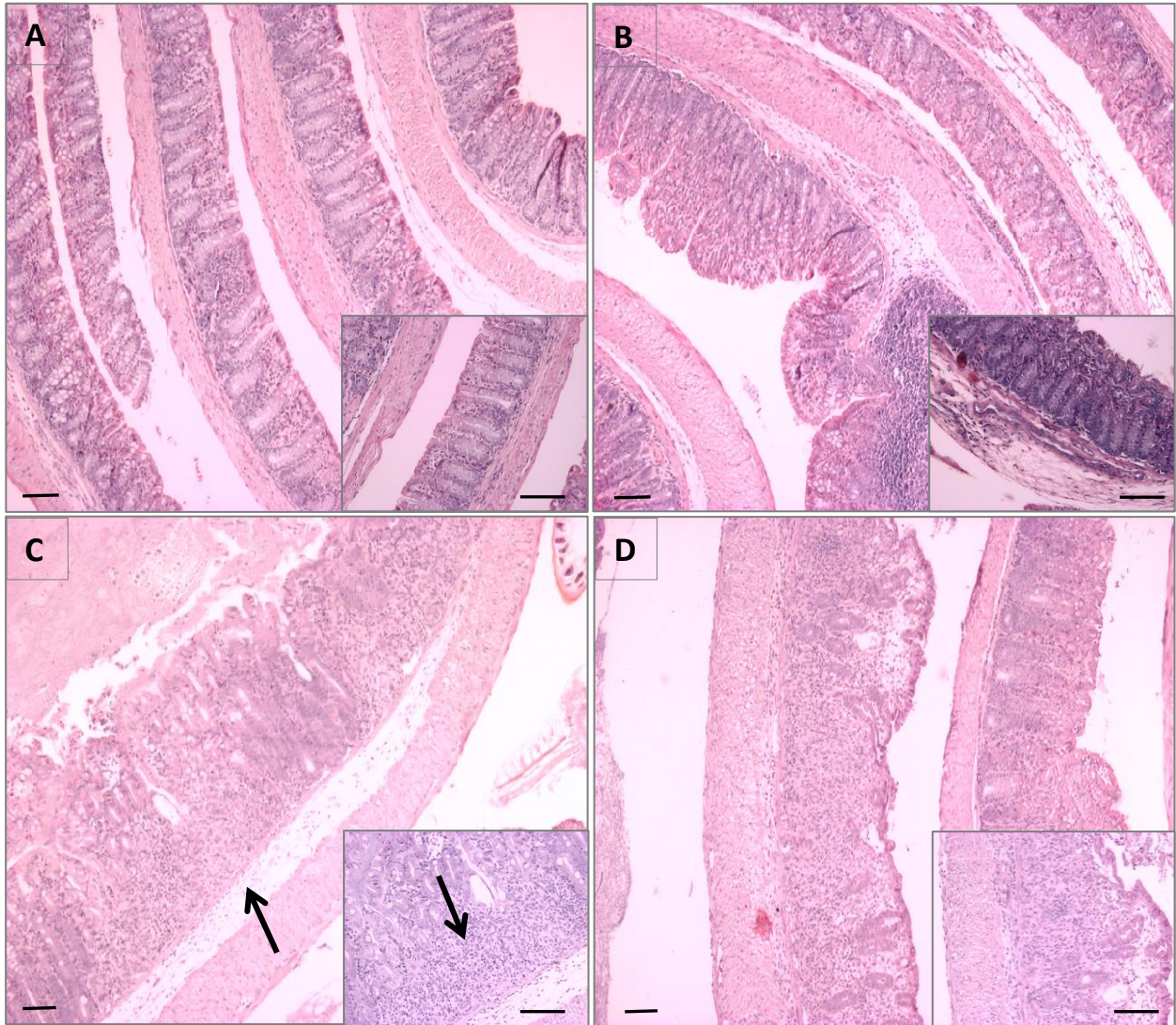


Figura 14: Fotomicrografias do cólon de camundongos Balb/c convencionais tratados com probiótico antes e durante a indução da colite (preventivo/curativo). A) CTL; B) BL5^{1A}; C) DSS, lesões panmurais com infiltrado, destruição tecidual e perda total da arquitetura da parede intestinal, a qual se encontra edemaciada (setas); D) DSS+BL5^{1A}, as lesões são extensas e qualitativamente semelhantes. Coloração HE. Barra de escala = 100 μm (n=5). Legenda: CTL: grupo controle; BL5^{1A}: grupo *B. longum* 5^{1A}, DSS: grupo colite; DSS+BL5^{1A}: grupo colite tratado com *B. longum* 5^{1A}. Aumento de 4x, com inserto no aumento de 10x.

Em relação aos animais pertencentes ao modelo curativo de tratamento, o cólon dos camundongos controle e tratados apenas com o probiótico apresentou aspecto similar, sem importantes alterações da celularidade ou da arquitetura do órgão (figuras 15A e 15B).

A estrutura histológica do cólon dos animais que receberam o DSS apresentou-se alterada, evidenciando acometimento extenso, segmentar, com variáveis graus de intensidade de lesão panmural ou atingindo camadas mucosa e submucosa. O acometimento foi caracterizado por perda da arquitetura das glândulas colônicas, que se encontraram fundidas, com intensas alterações do epitélio de revestimento, incluindo presença de leucócitos interepiteliais, atipias celulares epiteliais e perda das células calciformes. Intenso infiltrado inflamatório contendo neutrófilos, e edema eosinofílico foram observados na lâmina própria, assim como, áreas de necrose na mucosa e submucosa (figura 15C). Em alguns segmentos o processo inflamatório atingiu também a parede muscular e a serosa do órgão.

Os animais tratados com DSS e probiótico (grupo DSS+BL5^{1A}) apresentaram visível preservação da arquitetura do órgão, e nas áreas acometidas, a lesão atingia mucosa e submucosa principalmente, com infiltrado inflamatório e edema menos exuberantes. Atipias regenerativas no epitélio de superfície foram encontradas. As áreas que apresentaram alterações de intensidade semelhante ao grupo DSS foram raras e de pequena extensão (figura 15D).

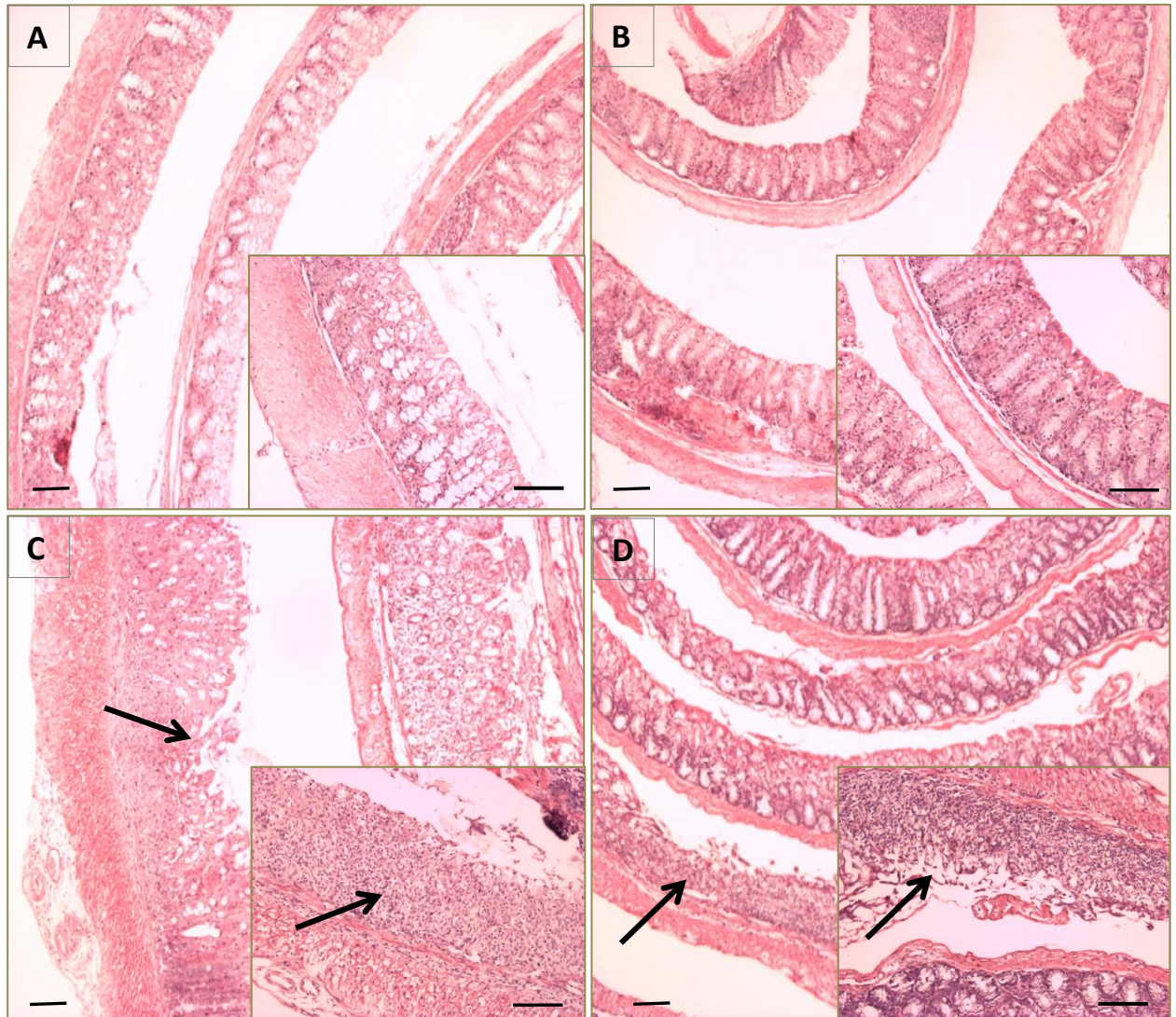


Figura 15: Fotomicrografias do cólon de camundongos Balb/c convencionais tratados com probiótico durante a indução da colite (curativo). A) CTL; B) BL5^{1A}; C) DSS, lesões panmurais com intenso infiltrado, destruição tecidual e perda total da arquitetura da parede intestinal que se encontra edemaciada (setas); D) DSS+BL5^{1A}, as lesões são focais e grande extensão da parede está preservada. Coloração HE. Barra de escala = 100 μ m (n=5). Legenda: CTL: grupo controle; BL5^{1A}: grupo *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, DSS: grupo colite; DSS+BL5^{1A}: grupo colite tratado com *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. Aumento de 4x, com inserto no aumento de 10x.

5.5.2 Análise morfométrica do cólon

A fim de quantificar a extensão da lesão presente no cólon dos animais, realizou-se a análise morfométrica do mesmo. Segundo essa análise observou-se que a administração da bifidobactéria no grupo doente (DSS+BL5^{1A}) reduziu de forma expressiva a extensão da lesão. Os grupos CTL e BL5^{1A} não apresentaram esse tipo de acometimento (figura 16).

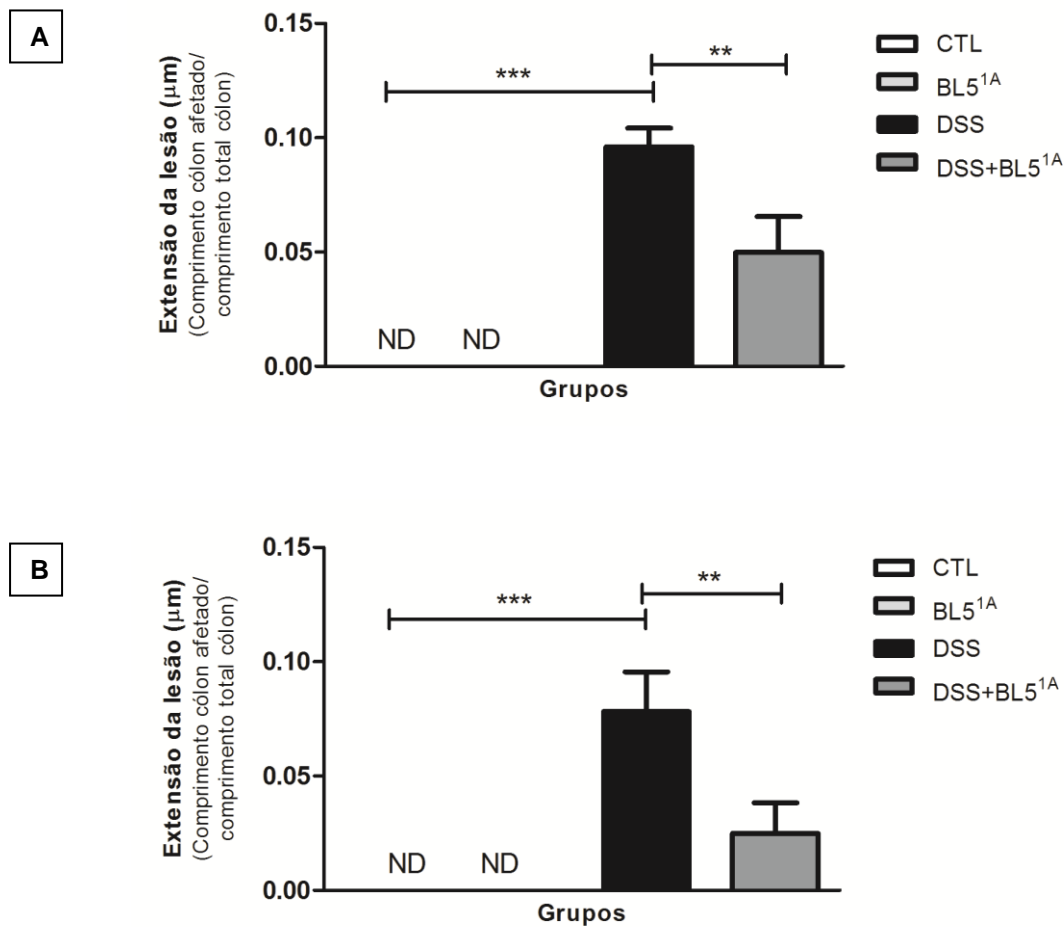


Figura 16: Análise morfométrica do cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. ND: não detectado. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=5$).

5.5.3 Score histológico

Análise qualitativa para verificar alterações histológicas presentes no cólon dos camundongos foi realizada por meio de um sistema de score. Essa

avaliação foi realizada apenas nos grupos DSS e DSS+BL5^{1A}, pois verificou-se por meio da avaliação das lâminas e da análise morfométrica da extensão da lesão, que os grupos CTL e BL5^{1A} não apresentavam grandes alterações da estrutura colônica.

Sendo assim, os resultados foram condizentes com as análises descritivas das lâminas. No modelo preventivo/curativo, as alterações no grupo tratado foram qualitativamente semelhantes ao grupo doente. No modelo curativo, apesar de ter-se visto redução nas lesões e maior preservação da estrutura do órgão no grupo tratado com a bifidobactéria, a redução qualitativa não foi estatisticamente significativa, como pode ser visto na figura 17.

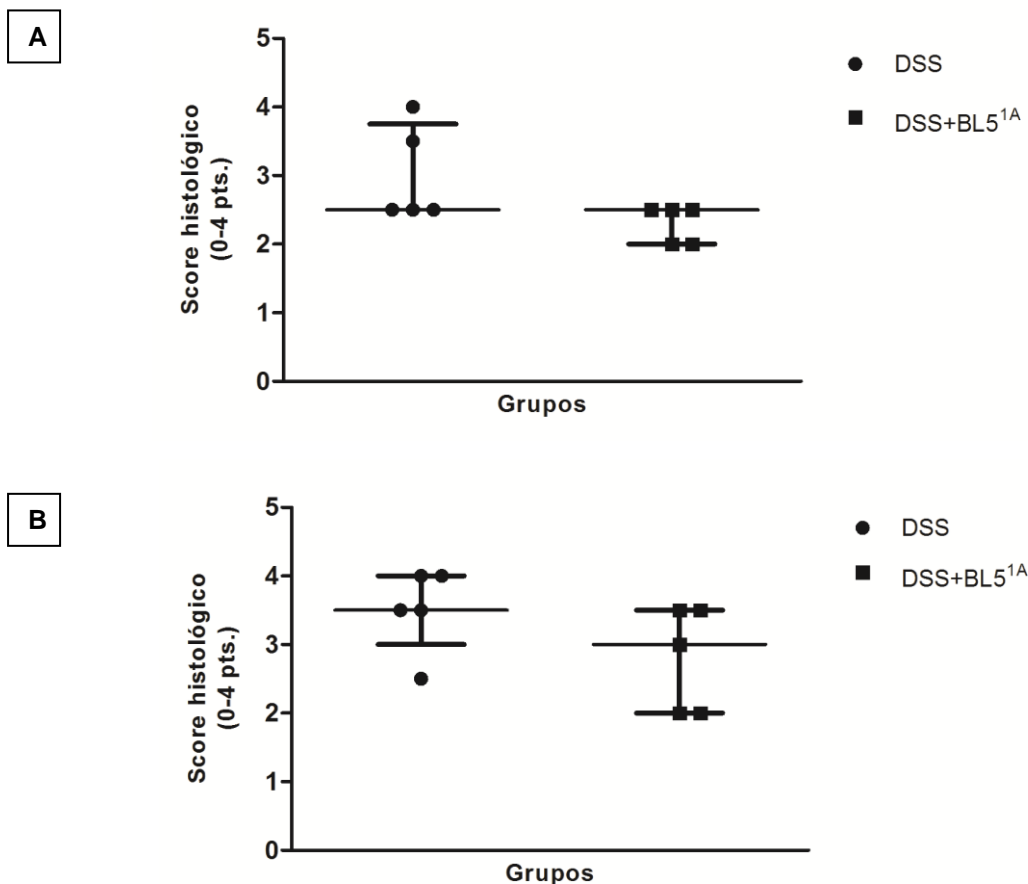


Figura 17: Score histológico. Score: (0) sem evidência de inflamação; (1) baixo nível de inflamação com focos isolados de infiltrado de células mononucleares; (2) inflamação moderada com múltiplos focos; (3) inflamação elevada com aumento da densidade vascular e espessamento da parede; (4) inflamação severa com infiltração transmural de leucócitos e perda das células caliciformes. A ausência de caracteres (*) indica que não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em mediana com variação interquartil. Teste: Mann Whitney ($n=5$).

5.6 Análise de citocinas e quimiocinas no cólon

5.6.1 IL-1 β

A administração do DSS induziu aumento significativo na concentração da citocina IL-1 β no cólon dos animais para ambos os tratamentos preventivo/curativo e curativo. O tratamento com a *B. longum* 5^{1A} (grupo DSS+BL5^{1A}) promoveu redução na concentração dessa citocina, sendo essa redução estatisticamente significante apenas no grupo que recebeu o tratamento curativo. Já no tratamento preventivo/curativo, essa redução foi intermediária entre os grupos CTL e DSS, não se observando diferença entre os mesmos (figura 18).

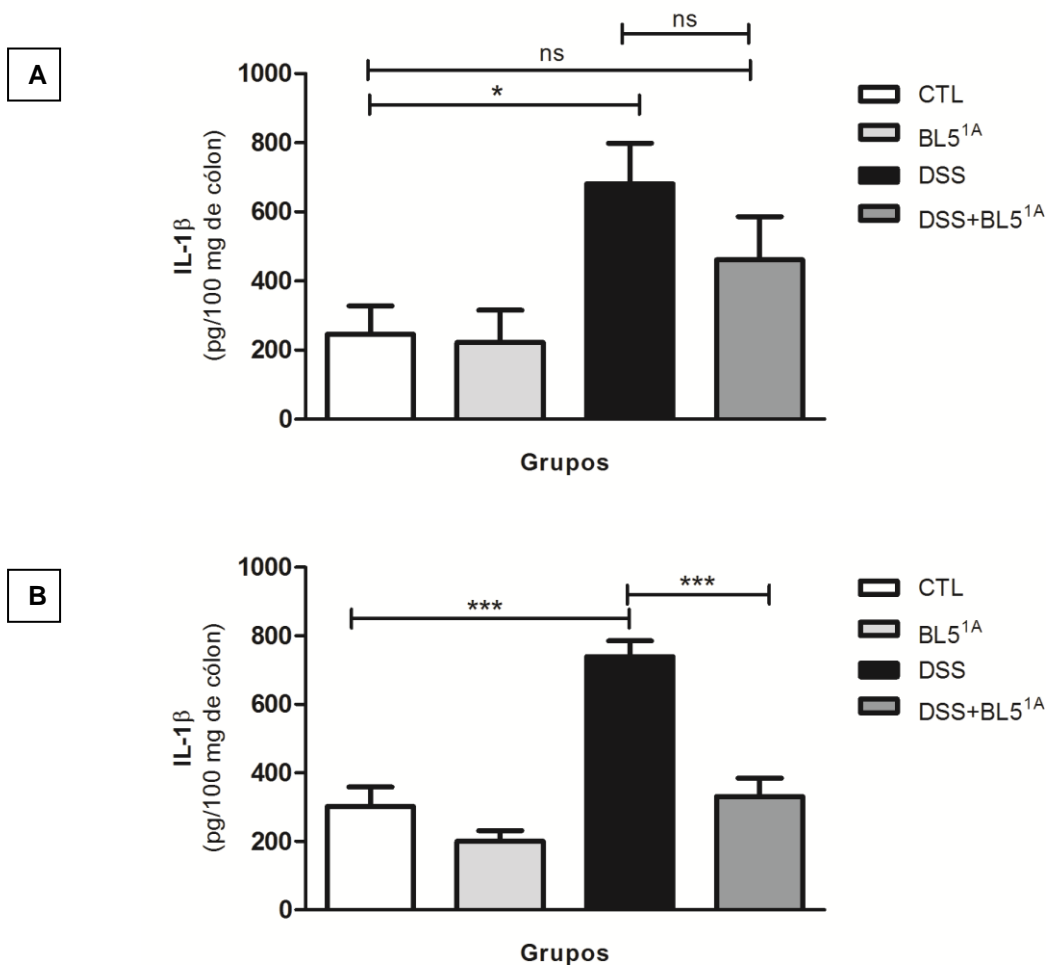


Figura 18: Concentração de IL-1 β no cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$); ns (não significativo). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=6$).

5.6.2 IL-10

A concentração de IL-10 não foi alterada significativamente pela indução da colite e pela administração do probiótico (figura 19).

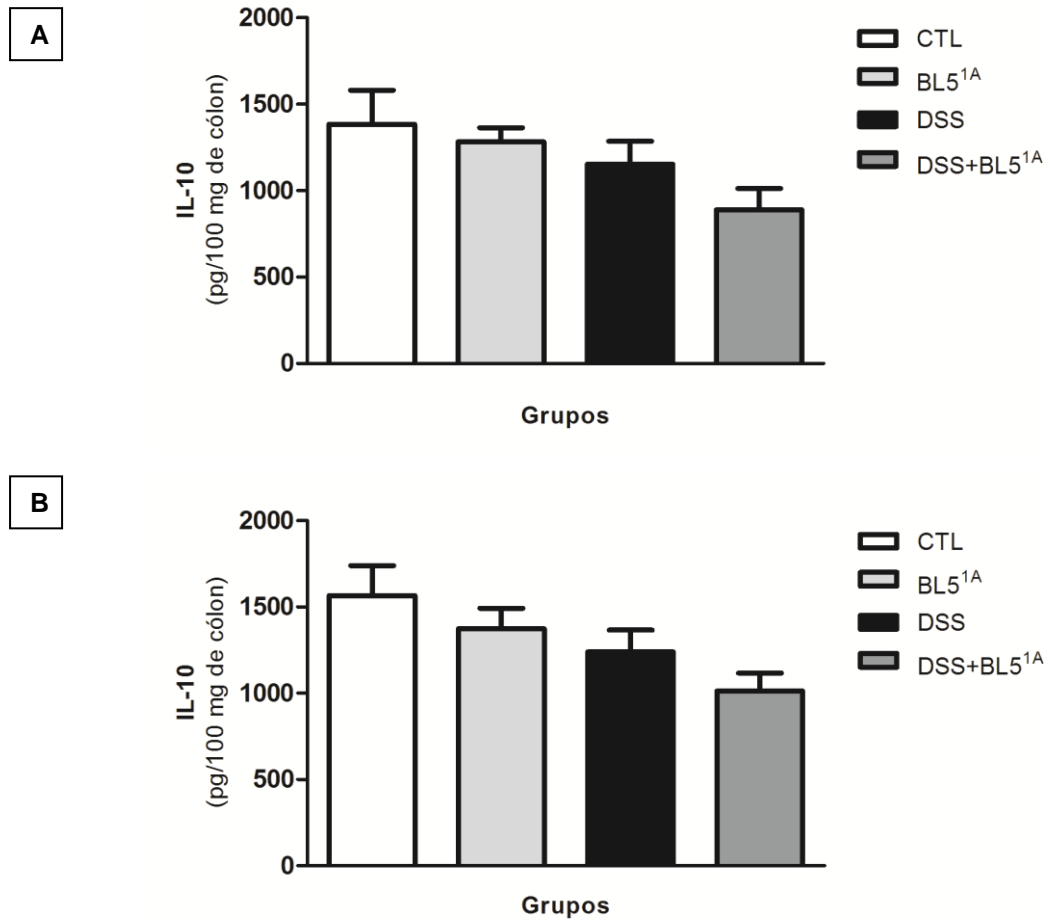


Figura 19: Concentração de IL-10 no cólon. A ausência de caracteres (*) indica que não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=4$).

5.6.3 CXCL1 (KC)

Ao analisar a concentração da quimiocina recrutadora de neutrófilos [CXCL1 (KC)] no cólon, observou-se aumento significativo nos animais pertencentes ao grupo DSS. A administração, de forma preventiva/curativa, da bifidobactéria aos animais com colite não alteraram essa situação, enquanto que o tratamento de maneira curativa resultou na elevação dos níveis dessa quimiocina em relação aos demais grupos (figura 20).

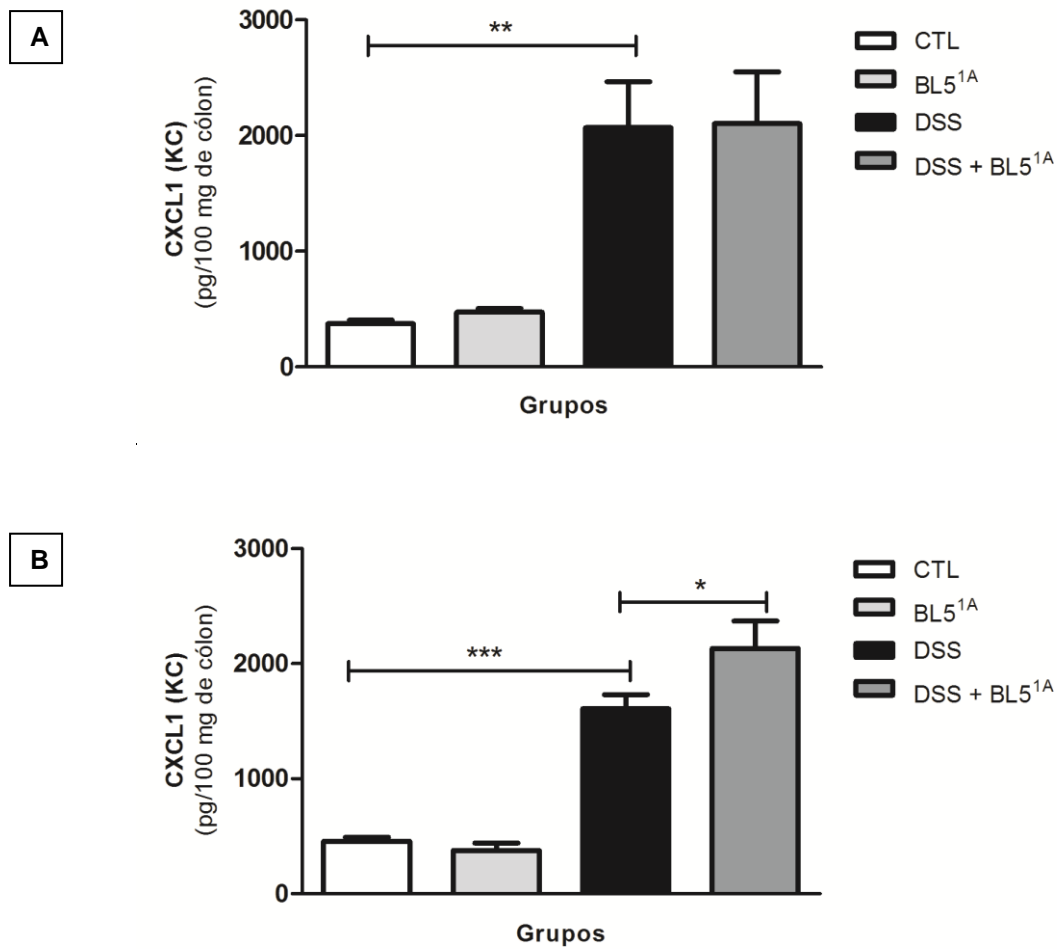


Figura 20: Concentração de CXCL1 (KC) no cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=6$).

5.6.4 CCL11 (Eotaxina-1)

A quimiocina recrutadora de eosinófilos [CCL11 (eotaxina-1)] apresentou-se elevada no cólon após a administração do DSS. O tratamento não foi capaz de reduzir esse aumento (figura 21).

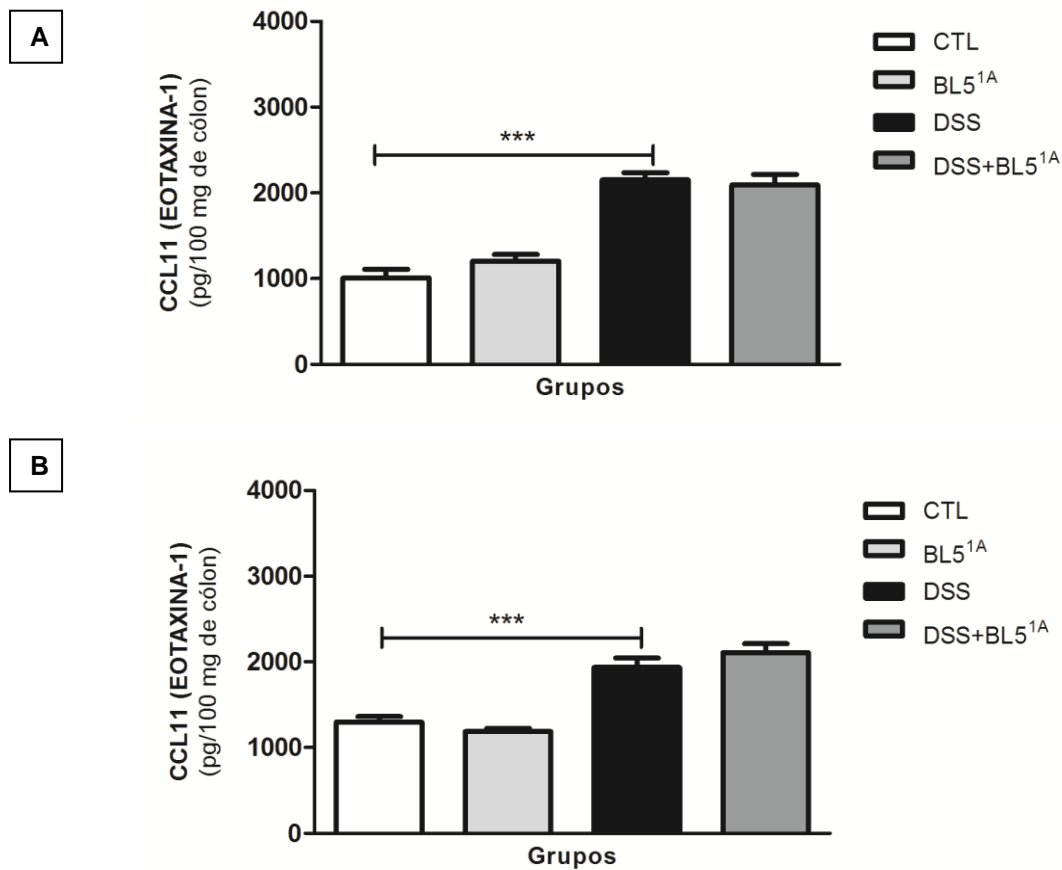


Figura 21: Concentração de CCL11 (eotaxina-1) no cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (***) = $p < 0,001$. (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls (n=7).

5.7 Avaliação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no cólon

5.7.1 MPO

A indução da colite através da administração do DSS promoveu aumento nos níveis da enzima MPO no cólon dos animais para ambos os tratamentos preventivo/curativo e curativo, fato que pode ser observado por meio da comparação entre os grupos CTL e DSS. Porém, a redução dessa concentração somente foi observada no grupo de animais doentes que foi submetido à forma curativa de tratamento (figura 22).

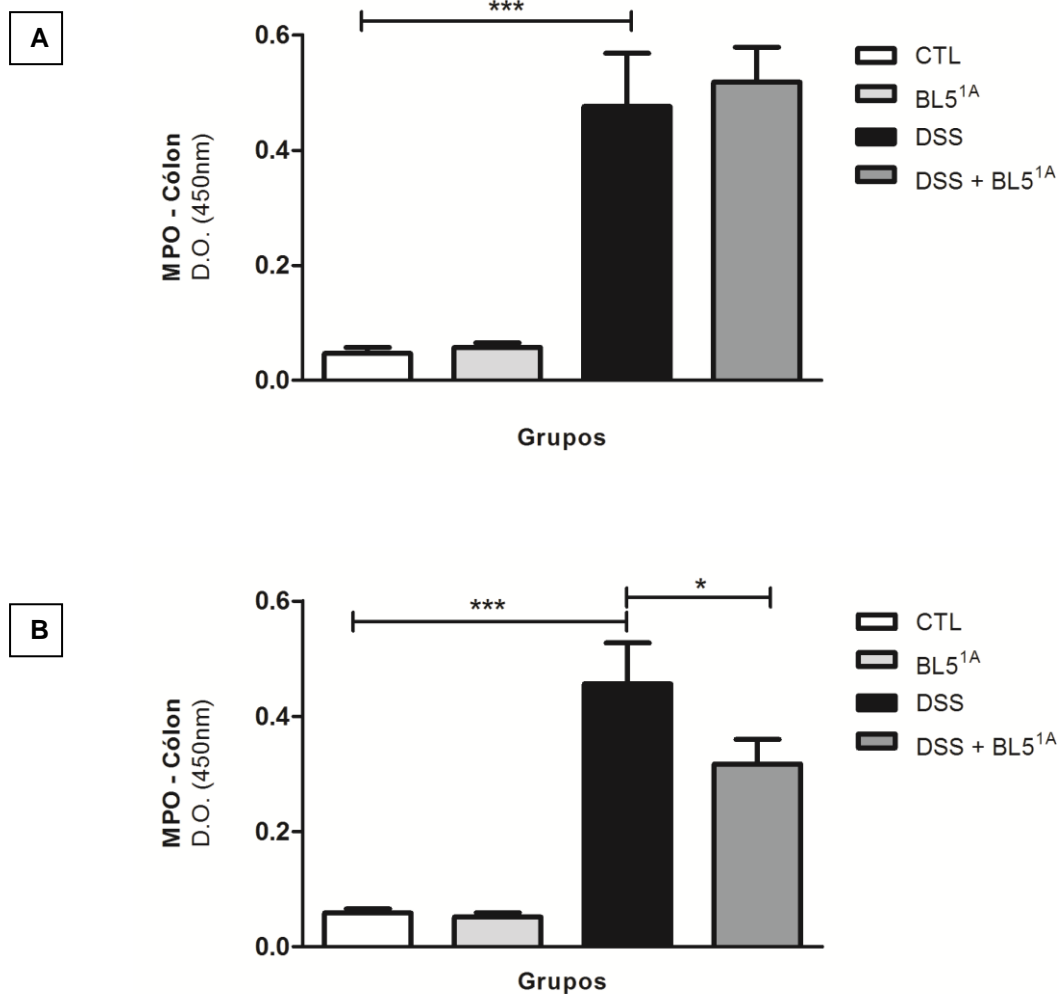


Figura 22: Concentração da enzima mieloperoxidase no cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=7$).

5.7.2 EPO

A concentração de EPO encontrou-se elevada no cólon dos animais do grupo DSS. Redução estatística dessa concentração foi observada apenas no grupo DSS+BL5^{1A} tratado de maneira preventiva e curativa. O tratamento apenas durante a indução da doença não foi efetivo na promoção de melhoria nesse parâmetro (figura 23).

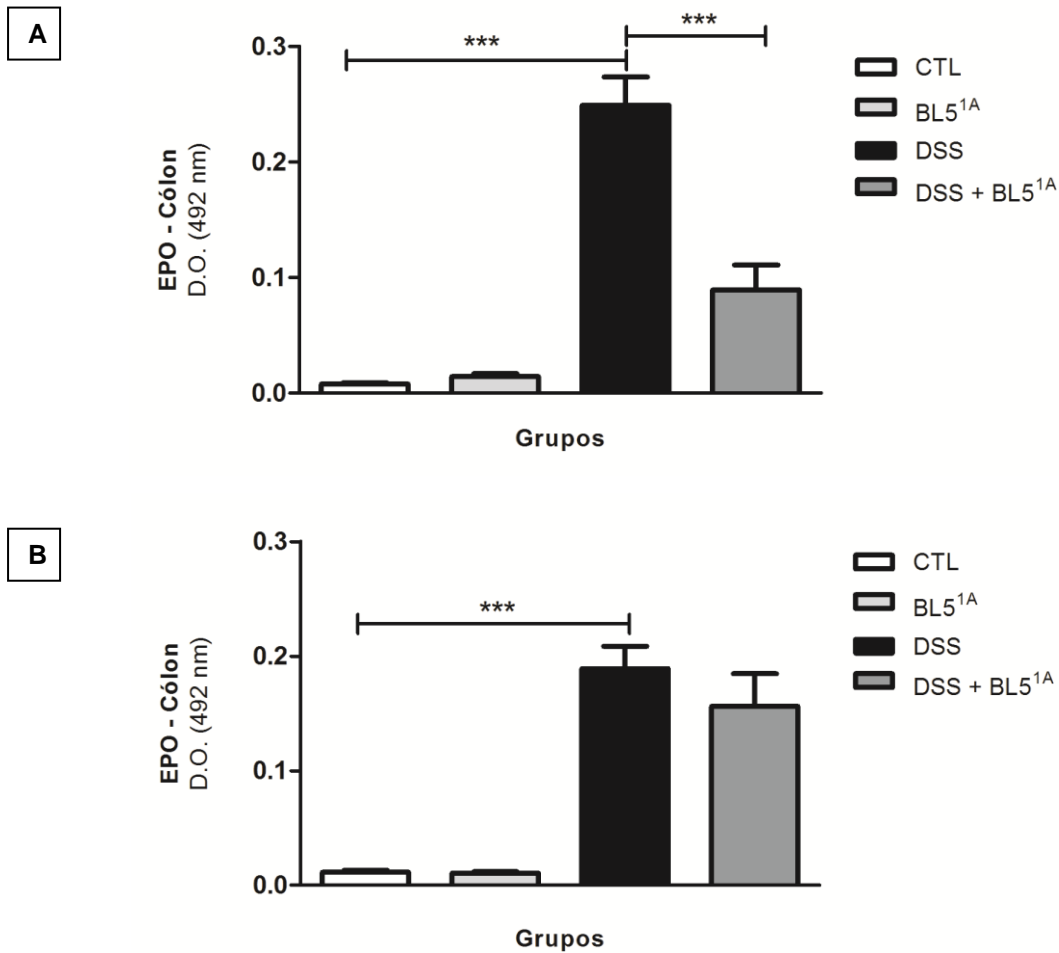


Figura 23: Concentração da enzima peroxidase eosinofílica no cólon. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (***) = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=6$).

5.8 Concentração de IgA no fluido intestinal

A administração do DSS aumentou significativamente a concentração de IgA no fluido intestinal, a qual não foi revertida pela inoculação do probiótico (grupo DSS+BL5^{1A}). O maior tempo de administração da bifidobactéria (modelo de tratamento preventivo/curativo) também promoveu aumento na concentração da imunoglobulina, a qual permaneceu inferior aos níveis apresentados pelo grupo DSS (figura 24).

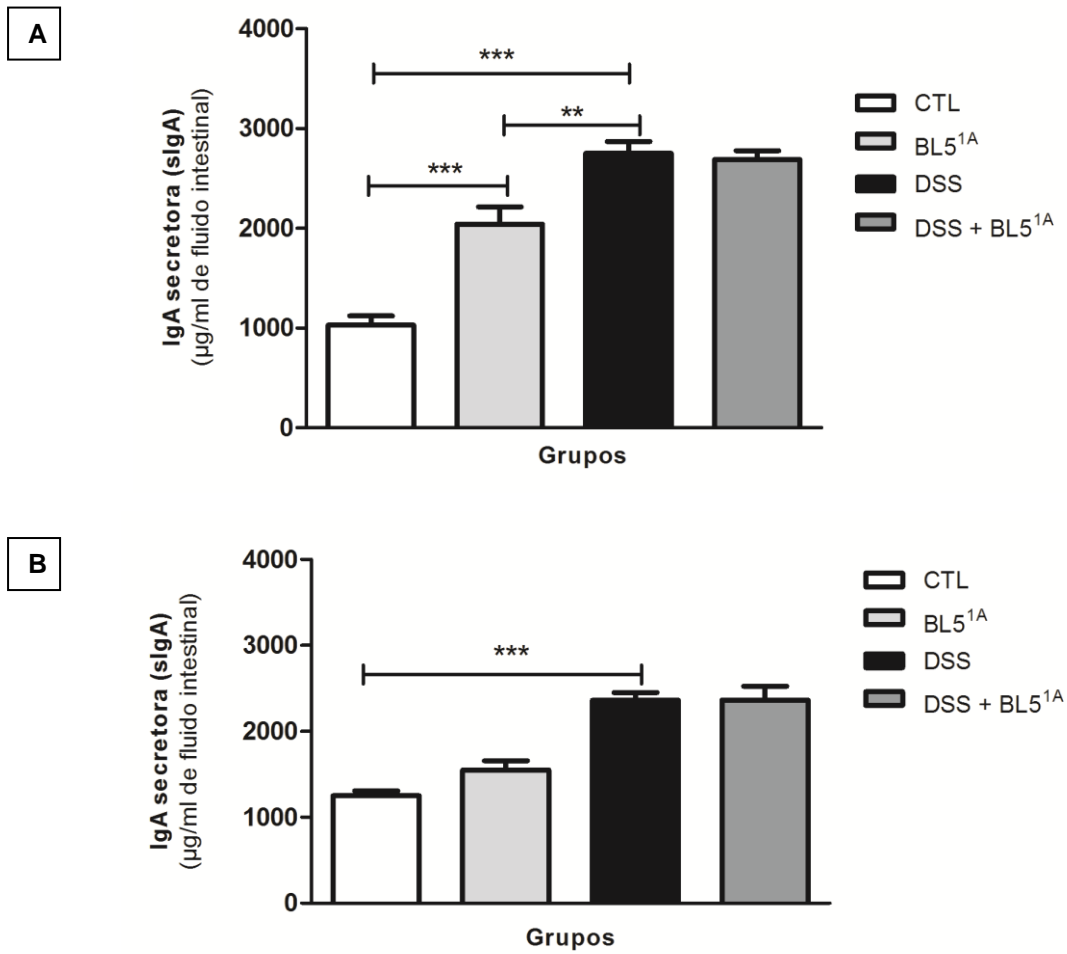


Figura 24: Concentração de sigA no fluido intestinal. Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (A) Modelo preventivo/curativo, (B) Modelo curativo. Dados expressos em média \pm SEM. Teste: ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($n=6$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou avaliar os potenciais efeitos probióticos da bactéria *B. longum* 5^{1A} a fim de determinar sua possível utilização como terapia complementar no tratamento da UC, bem como estipular a melhor forma de administração da bactéria (preventiva/curativa e ou curativa). Sendo assim, optou-se pela utilização de um modelo de indução química por DSS, tendo sido essa opção determinada devido às vantagens apresentadas pelo modelo experimental, como, capacidade de simular diversos aspectos relacionados à doença em humanos, facilidade na reprodução, simples indução e curta duração (PERSE; CERAR, 2012; ROSE; SAKAMOTO; LEIFER, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010).

Para determinação da utilização e eficácia do DSS como agente indutor da UC, aspectos importantes foram analisados, como o peso molecular, o tempo de administração e a concentração do agente irritante. O modelo agudo de colite é obtido na maioria das vezes pela administração contínua do DSS por um período de 4 a 9 dias, em doses de 2 a 5% (KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007; PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010). Entretanto, nesse estudo optou-se por utilizar um modelo contínuo de indução da doença por 7 dias com dose de 3,5% de DSS em camundongos BALB/c. Os resultados obtidos mostraram que tanto a dose quanto o período de indução foram adequados para o desenvolvimento da doença e suas consequências, resultando em um quadro típico sem, no entanto, causar letalidade aos animais.

Durante a indução da doença, o consumo de DSS foi determinado em todos os grupos que receberam o agente químico, a fim de avaliar diferenças no consumo que poderiam suscitar dúvidas a respeito de respostas distintas obtidas para os diversos parâmetros avaliados. Como pode ser observado na figura 9, os resultados não mostraram diferenças no consumo de DSS entre os grupos avaliados. Portanto, não se pode inferir que resultados distintos entre os grupos DSS e DSS+BL5^{1A} foram devido à ingestão desigual do agente químico.

A fim de avaliar a eficiência do probiótico como terapia primária na colite, aspectos clínicos comumente alterados na doença (peso e fezes) foram analisados. As manifestações clínicas características da UC, tais como perda de peso, alteração na consistência e presença de sangue nas fezes, foram observadas nos animais pertencentes ao grupo DSS (figuras 10 e 11). Esses dados estão de acordo com

Poritz *et al.*, (2007), Vieira *et al.*, (2009) e Mennigen *et al.*, (2009). Estes pesquisadores mostraram que a indução aguda da UC por DSS originou alterações semelhantes às observadas no presente estudo, demonstrando, portanto, que os resultados obtidos são congruentes com o modelo de colite desenvolvido na literatura.

Pôde-se verificar também, que as alterações clínicas tornaram-se mais marcantes nos últimos dias de indução da doença, provavelmente porque os animais apresentavam-se mais debilitados, e o quadro da doença mais grave. O mesmo foi evidenciado pelo trabalho de outros autores, nos quais se observou piora cumulativa da perda de peso e dos sintomas clínicos com o passar dos dias de indução da doença (DHARMANI; LEUNG; CHADEE, 2011; MELGAR; KARLSSON; MICHAELSSON, 2005; MENNIGEN *et al.*, 2009; PORITZ *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2009).

O tratamento dos animais com a bifidobactéria (grupo DSS+BL5^{1A}) não foi capaz de reverter ou até mesmo atenuar a perda de peso observada nos animais do grupo DSS, resultado que também é condizente com o encontrado por Mennigen *et al.*, (2009) que utilizaram o probiótico VSL#3. Porém, diferentemente do peso, o tratamento com VSL#3 foi capaz de promover melhora significativa na diarreia e sangramento retal, fato que não foi observado pela administração da *B. longum* 5^{1A}. A diferença encontrada em ambos os estudos pode ser devido ao tipo de probiótico utilizado, uma vez que o VSL#3 é composto por uma mistura de 8 tipos de probióticos, incluindo a *B. longum*. Como a resposta à utilização de um probiótico depende não somente da espécie, mas também da linhagem do mesmo (FAO/WHO, 2002), os mecanismos pelos quais o VSL#3 atuou promovendo melhorias no epitélio intestinal, provavelmente não foram contemplados quando somente a *B. longum* 5^{1A} foi utilizada.

Não houve diferença de resposta entre os grupos submetidos ao modelo preventivo/curativo e curativo e, conforme o esperado, a administração da bifidobactéria aos animais saudáveis não gerou alterações em nenhum dos parâmetros avaliados.

A realização de análises relativas à perda de peso e sangramento retal é importante porque as duas alterações podem denotar dano ao epitélio intestinal com consequente aumento da permeabilidade. A perda de peso pode originar desnutrição, a qual está associada a prejuízo da mucosa e, conseqüentemente,

aumento na permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e apoptose das células epiteliais (ZIEGLER *et al.*, 2003). A perda de sangue nas fezes indica hemorragia e dano ao epitélio do cólon, o qual implica em aumento da permeabilidade intestinal e susceptibilidade a infecções (JADHAV; SHANDILYA; KANSAL, 2013).

Tendo em vista a relação entre os distúrbios clínicos e permeabilidade intestinal e, sabendo que a alteração desse fator é normalmente encontrada em portadores de UC, avaliou-se o efeito do tratamento probiótico na permeabilidade. O método utilizado para essa análise foi a avaliação da passagem do ^{99m}Tc -DTPA presente no lúmen intestinal para o sangue. Esse procedimento é considerado adequado porque o DTPA (PM > 500 Da) é uma macromolécula que raramente atravessa o epitélio intestinal, exceto nos casos que ocorrem injúrias e comprometimento da sua barreira física. Nesses casos de lesão tecidual, a macromolécula consegue atravessar o epitélio intestinal e ser detectada na corrente sanguínea, tendo este método como vantagem a facilidade de detecção do radiotraçador, consistindo simplesmente na contagem da radioatividade presente no sangue coletado (JORGENSEN *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2010).

Aumento da permeabilidade intestinal foi observado nos animais do grupo colite (DSS), fato evidenciado pelo aumento percentual do ^{99m}Tc -DTPA na corrente sanguínea (figura 12). Leonel *et al.*, (2012) também utilizaram o ^{99m}Tc -DTPA para avaliação da permeabilidade intestinal após indução química de colite por DSS. De maneira similar ao presente estudo, os pesquisadores encontraram aumento da permeabilidade no grupo colite, atribuindo esse aumento à perda da arquitetura da mucosa intestinal com consequentes alterações na barreira epitelial e na integridade celular.

O aumento da permeabilidade intestinal em modelo de colite induzida por DSS foi igualmente relatado por outros autores (ANDRADE, 2013; MENNIGEN *et al.*, 2009; PORITZ *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2009; ZAKOSTELSKA *et al.*, 2011).

Sabe-se que a função de barreira do epitélio intestinal está prejudicada em pacientes portadores de UC devido a uma falha na produção e composição do muco, e ou alteração na atividade das junções firmes das IECs, fato que culmina no aumento da permeabilidade intestinal (BAUMGART; CARDING, 2007; GERSEMANN; STANGE; WEHKAMP, 2011; NEURATH, 2014; ORDÁS *et al.*, 2012). O DSS age promovendo um desarranjo organizacional na camada de muco

presente no cólon, assim como, provocando defeitos na integridade da barreira epitelial, com perda e redistribuição de componentes pertencentes às junções firmes, como a zônula oclusiva-1 (ZO-1) e outras proteínas (occludinas, claudinas-1, -3, -4 e -5). Aumento do índice apoptótico celular também é observado pela administração do agente químico (JOHANSSON *et al.*, 2010; NAGALINGAM *et al.*, 2011; NEURATH, 2012; PERSE; CERAR, 2012; SCHWAB *et al.*, 2014; SOLOMON *et al.*, 2010). Dessa maneira, o DSS é capaz de simular as disfunções presentes na barreira epitelial de humanos portadores de UC, levando ao aumento da permeabilidade intestinal.

A disfunção que a administração do DSS causa nos aspectos relativos à produção e secreção de muco no cólon foi observada em experimento realizado por Dharmani, Leung e Chadee (2011), no qual uma dose de 5% de DSS foi administrada a ratos durante 9 dias. Por meio da análise do conteúdo de mucina presente nas células caliciformes ou que foi secretada no lúmen intestinal, os autores notaram que a fase aguda da UC era marcada por uma perda dos estoques luminiais e celulares dessa proteína, e que no sétimo dia de indução da doença evidenciava-se redução no número de células caliciformes em áreas com formação de úlceras, além de perda expressiva da camada de muco.

Outro fator que pode acarretar no aumento da permeabilidade são alterações nas junções firmes. Mennigen *et al.*, (2009) observaram este fato após administrar solução de 3,5% de DSS durante 7 dias a camundongos BALB/c. Estes pesquisadores observaram redução e redistribuição na ZO-1, occludina, claudinas-1, -3, -4 e -5, além de aumento no índice de apoptose das células epiteliais. Resultado semelhante foi obtido por Poritz *et al.*, (2007) que forneceram uma dose de 3% de DSS a camundongos BALB/c. As análises foram realizadas em diferentes tempos de indução da doença (1, 3, 5 e 7 dias), notando-se redução de 50% na ZO-1 após 1 dia de administração do DSS, seguida por mais uma redução de 50% após 3 dias. No quinto dia não se conseguia detectar a zônula oclusiva e, no sétimo dia, os animais perderam totalmente a expressão da mesma. Esses dados corroboram o aumento da permeabilidade observado no presente trabalho.

Os tratamentos dos animais com a *B. longum* 5^{1A} (grupo DSS+BL5^{1A}) não foram capazes de reverter o aumento da permeabilidade, diferentemente do observado por Mennigen *et al.*, (2009) e Zakostelska *et al.*, (2011) quando administraram VSL#3 e lisado de *Lactobacillus casei* DN-114 001, respectivamente.

Em ambos os estudos, os pesquisadores observaram valores de permeabilidade intestinal significativamente reduzidos nos animais que receberam DSS e o probiótico. Esse fato foi justificado pelo reforço que o probiótico exerceu sobre a barreira epitelial, atuando por meio do bloqueio de alterações nas junções firmes, como redução na expressão e redistribuição de suas proteínas.

Desta forma, pode-se especular que o aumento da integridade das junções firmes, ou até mesmo o fortalecimento da barreira de muco intestinal não foram suficientemente modulados pela *B. longum* 5^{1A}. Porém, como análises específicas para avaliação desses parâmetros não foram realizadas, não se pode afirmar o motivo pelo qual a bifidobactéria não conseguiu proteger os animais contra o aumento da permeabilidade.

O encurtamento do cólon é outra característica comumente encontrada na UC e na inflamação resultante da administração do DSS. Acredita-se ser induzido pelo espessamento da parede intestinal, o qual é consequência da inflamação, edema e hipertrofia muscular. O encurtamento do cólon está diretamente associado à severidade da doença e pode ser apontado como uma das causas de diarreia na UC devido à redução do tempo de trânsito intestinal (ARAI *et al.*, 1998; OKAYASU *et al.*, 1990, citado por PORITZ *et al.*, 2007). A análise dos gráficos (figura 13) mostrou que a administração do DSS ocasionou um encurtamento significativo no cólon dos animais quando comparados aos grupos CTL e BL5^{1A}. Entretanto, nenhuma das formas de tratamento (preventivo/curativo e curativo) com a *B. longum* 5^{1A} foi capaz de reverter essa situação.

Encurtamento no cólon de animais submetidos ao desafio com DSS também foi descrito na literatura (ANDRADE, 2013; CHEN *et al.*, 2013; MENNIGEN *et al.*, 2009; PORITZ *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2009; ZAKOSTELSKA *et al.* 2011). Todavia, a administração de diferentes probióticos foi efetiva na redução do encurtamento, tendo sido tal efeito relatado pela utilização do VSL#3 (MENNIGEN *et al.*, 2009), *Lactobacillus acidophilus* (CHEN *et al.*, 2013) e lisado de *Lactobacillus casei* DN-114 001 (ZAKOSTELSKA *et al.* 2011).

Com o propósito de avaliar se a *B. longum* 5^{1A} seria capaz de impedir os danos ocasionados pela utilização do DSS ao cólon, análises histopatológica, morfométrica e qualitativa (score histológico) foram realizadas nessa porção intestinal, uma vez que, conforme descrito, o agente químico age especificamente nessa região (DE FAZIO *et al.*, 2014).

As injúrias ocasionadas no cólon dos animais do grupo DSS (figuras 14C e 15C) foram condizentes com as descritas na literatura (CHEN *et al.*, 2013; JADHAV SHANDILYA; KANSAL, 2013; LEONEL *et al.*, 2012; MENNIGEN *et al.*, 2009; PORITZ *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2009): o DSS causou ulceração na camada epitelial, danos às criptas, denso infiltrado inflamatório na mucosa, áreas de necrose e edema. Apesar de ainda não completamente elucidado, um dos mecanismos de ação pelo qual o DSS causa as alterações típicas da UC é por meio da citotoxicidade às células do epitélio intestinal. Uma vez no interior dos colonócitos, o DSS prejudica funções celulares importantes através da inibição da atividade de enzimas, como as ribonucleases, causando prejuízo no ciclo celular e induzindo apoptose das células do cólon. Esse fato interfere na função de barreira do epitélio intestinal, induzindo, conseqüentemente a entrada de antígenos, microorganismos e do próprio DSS. Ocorre também, estímulo à resposta inflamatória mediante secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios. O recrutamento e infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) causam aumento no dano e disfunção da mucosa por meio da liberação de mediadores tóxicos e radicais livres, perpetuando o ciclo inflamatório e as lesões características da doença (DE FAZIO *et al.*, 2014; LEONEL *et al.*, 2012; PORITZ *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2009).

A presença das lesões observadas na análise histológica foi confirmada através de análise morfométrica desse parâmetro (figura 16). Observou-se conforme análise descritiva da histologia, aumento significativo da extensão de lesões graves no cólon dos animais que receberam apenas o agente indutor da colite, fato que não foi observado nos grupos CTL e BL5^{1A}. Da mesma forma, ao avaliar a extensão da lesão do grupo doente submetido ao tratamento com o probiótico, observou-se em ambos os regimes de tratamento (preventivo/curativo e curativo), que a bifidobactéria foi capaz de prevenir dano grave ao epitélio colônico, assim como originou redução do processo inflamatório (figuras 14D e 15D), segundo descrito pela patologista durante a análise das lâminas.

É importante salientar, que as lesões analisadas por meio da morfometria foram lesões graves, e que lesões no geral, assim como outros parâmetros histológicos típicos da UC não foram quantificados. Sendo assim, ao analisar o *score* histológico constatou-se que não houve diferença qualitativa entre os grupos DSS e DSS+BL5^{1A} (figura 17), ou seja, é provável que a bifidobactéria não tenha protegido de forma significativa outras alterações características da UC, o que vai de

encontro com os resultados obtidos na análise de parâmetros clínicos, de permeabilidade intestinal e do comprimento do cólon. Esses resultados mostram que apesar de exercer um papel protetor importante na inflamação grave da mucosa colônica, a proteção conferida pela bactéria não foi suficiente para melhorar os aspectos clínicos da doença, já que a perda de peso e encurtamento do cólon estão correlacionados com alterações histopatológicas (YAN *et al.*, 2009).

Em relação ao efeito da utilização de probióticos sobre aspectos histológicos, resultados positivos foram encontrados na literatura. A utilização de leite de búfala fermentado com *B. bifidum* e *L. acidophilus* foi eficiente na melhoria de aspectos histológicos (redução da severidade da inflamação, declínio no acúmulo de neutrófilos e atenuação de perda de criptas) em camundongos com colite induzida por DSS (JADHAV SHANDILYA; KANSAL, 2013). Igualmente, a utilização de VSL#3 foi capaz de reduzir a extensão da inflamação em animais com UC (MENNIGEN *et al.*, 2009).

Os animais dos grupos CTL e BL5^{1A} não apresentaram alterações importantes da arquitetura intestinal, tal como pode ser visto nas figuras 14A, 14B, 15A e 15B, e na análise morfométrica da extensão da lesão (figura 16).

As alterações oriundas do dano ao epitélio intestinal promovem a ativação de fatores de transcrição que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais, a IL-1 β (ORDÁS *et al.*, 2012). O DSS também promove aumento significativo da expressão dessa citocina (PERSE; CERAR, 2012). A IL-10 é outra citocina que possui destaque no contexto das IBDs, uma vez que camundongos *knockout* nessa citocina desenvolvem espontaneamente a inflamação intestinal, demonstrando a sua importância no controle das respostas inflamatórias (IMAOKA *et al.*, 2008; RENNICK; FORT, 2000). Portanto, com o intuito de avaliar a resposta imune local induzida pelo modelo de UC e verificar se a administração do probiótico seria eficaz na promoção de um equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, análise da concentração das citocinas IL-1 β e IL-10 foi realizada no cólon.

Conforme consta na figura 18, a ingestão de DSS (grupo DSS) causou aumento significativo na concentração de IL-1 β no cólon dos animais. Yan *et al.*, (2009) observaram de maneira semelhante aumento dos níveis de IL-1 β nos animais que receberam DSS, tendo sido o aumento na produção desta citocina observado já no primeiro dia de indução da doença. Melgar, Karlsson e Michaelsson (2005) também observaram aumento na produção de IL-1 β em camundongos BALB/c que

receberam o sulfato de sódio dextrano, sendo esse aumento correlacionado à piora dos sintomas da fase aguda da doença.

A utilização da *B. longum* 5^{1A} como tratamento da UC experimental promoveu redução na concentração da IL-1 β , entretanto, essa redução foi estatisticamente significativa apenas no grupo que recebeu o tratamento curativo (figura 18B). Já no tratamento preventivo/curativo, essa redução foi intermediária entre os grupos CTL e DSS (figura 18A). A IL-1 β é uma citocina pertencente à família das interleucinas 1 (IL-1) e é produzida por monócitos e macrófagos ativados (ARAI *et al.*, 1998; LIGUMSKY *et al.*, 1990; NEURATH, 2014). Além de atuar juntamente com outros mediadores inflamatórios aumentando a atividade fagocítica dos macrófagos, a IL-1 β também está relacionada com a ativação de neutrófilos (ARAI, *et al.*, 1998; KOBOZIEV *et al.*, 2014; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; PAVLICK *et al.*, 2002).

Visto que a IL-1 β é produzida por macrófagos, pode-se pensar que a diferença entre as respostas obtidas nos modelos de tratamento preventivo/curativo e curativo foi devido a uma atuação diferenciada da *B. longum* 5^{1A} nos macrófagos presentes no intestino, impedindo de maneira mais efetiva a produção e secreção da citocina nos animais que foram tratados apenas durante a indução da doença. Essa correlação entre concentração de IL-1 β e presença de macrófagos no ambiente intestinal foi demonstrada por Leonel *et al.*, (2012) ao mostrarem que a maior porcentagem de macrófagos ativados no cólon de camundongos era diretamente proporcional à concentração da citocina. A conexão entre macrófagos e IL-1 β , em modelo de UC induzida por DSS, foi realizada também por Melgar, Karlsson e Michaelsson (2005), os quais sugeriram que a resposta aguda encontrada (incluindo elevados valores da citocina) era impulsionada pelos macrófagos. Apesar da relação entre macrófagos e IL-1 β , e das evidências presentes na literatura, apenas a realização de análises a respeito do conteúdo de macrófagos no intestino seriam capazes de elucidar melhor a razão pela qual a bifidobactéria está contribuindo para a redução dos níveis desta citocina.

A avaliação da IL-10 no final do período experimental não mostrou diferença estatística entre os grupos em nenhuma das formas de tratamento (figura 19). A IL-10, citocina produzida majoritariamente por monócitos e linfócitos (em menor extensão), possui extrema importância no controle das respostas inflamatórias a antígenos luminais e pode restaurar a tolerância de células T

residentes a bactérias da microbiota, exercendo dessa forma, papel fundamental na regulação da inflamação e injúria tecidual em diversos modelos de UC (LAMMERS *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2009; PAVLICK *et al.*, 2002). Além disso, a IL-10 pode atuar suprimindo a produção de outras citocinas com propriedades pró-inflamatórias, como o IFN- γ (MEDINA *et al.*, 2007).

Diferentemente do presente estudo, pesquisa envolvendo a IL-10 em modelo experimental de UC induzida por DSS, mostrou que a concentração da citocina está reduzida quando a doença está presente (LEONEL *et al.*, 2012). Em relação à capacidade de diferentes espécies e linhagens de bifidobactérias estimularem a produção de IL-10, resultados distintos foram encontrados na literatura. Medina *et al.*, (2007) avaliaram as propriedades imunológicas de sete diferentes linhagens de *B. longum* (*B. longum* BB536, *B. longum* NCC 2705, *B. longum* W 11, *B. longum* NCIMB 8809, *B. longum* ATCC 15707, *B. longum* BIR 324 e *B. longum* BIF 53) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis. Dentre as propriedades imunológicas avaliadas, incluiu-se a capacidade de cada linhagem estimular a produção de IL-10, observando que apesar de todas as células vivas das bactérias terem induzido significativamente a produção da citocina, a magnitude variou dependendo da linhagem. Os autores propuseram que essas bactérias com propriedades imunorreguladoras seriam interessantes para o tratamento de pacientes com IBDs. Experimento semelhante realizado por Imaoka *et al.*, (2008) demonstrou que a utilização de células inviáveis de *B. bifidum* linhagem Yakult e *B. breve* linhagem Yakult promoveu aumento na secreção de IL-10 pelas PBMCs de indivíduos portadores de UC.

Ainda em relação à IL-10, estudo realizado em camundongos isentos de germes objetivou avaliar a capacidade da *B. animalis* var. *lactis* BB-12 induzir a produção da interleucina. Análise da concentração da citocina no cólon dos animais mostrou que camundongos monoassociados com a bifidobactéria não produziram IL-10 em níveis superiores aos produzidos pelos animais controle (isentos de germes) (MARTINS *et al.*, 2009). A diversidade de resultados observados nesses estudos *in vitro* e *in vivo* servem para reafirmar que as funções de determinado probiótico são linhagem dependentes.

Em situações de injúria tecidual, leucócitos pertencentes à linha de frente de defesa do organismo (neutrófilos e eosinófilos) migram para o local afetado na tentativa de neutralizar e eliminar estímulos potencialmente deletérios (SERHAN *et*

al., 2007). A presença de infiltrados dessas células inflamatórias na mucosa intestinal é característica muito comum na UC, dessa maneira, dosagem de quimiocinas recrutadoras (CXCL1 (KC) e CCL11 (eotaxina -1) - figuras 20 e 21, respectivamente) e enzimas específicas (MPO e EPO - figuras 22 e 23, respectivamente) desses dois tipos celulares foi realizada a fim de verificar a constituição dos processos inflamatórios.

Os neutrófilos, primeiros leucócitos a serem recrutados durante um processo inflamatório, promovem abscesso das criptas na UC através da migração para a mucosa e subsequente influxo no lúmen intestinal. Além disso, os neutrófilos ativos circulantes, que estão elevados na doença ativa, são fontes potenciais de citocinas inflamatórias (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007). Sendo assim, visto que a UC induzida por DSS é caracterizada por uma significativa migração de neutrófilos para o cólon (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007; VIEIRA *et al.*, 2009) e, sabendo da importância que essas células possuem no processo inflamatório, a dosagem de CXCL1 (KC) e MPO torna-se relevante para avaliação indireta da presença de neutrófilos no local afetado.

Após quantificação desses indicadores observou-se elevada concentração de CXCL1 (KC) e MPO nos animais do grupo DSS de ambas as formas de tratamento (figuras 20 e 22). Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira *et al.*, (2009) que ao utilizarem modelo de colite aguda induzida por DSS obtiveram aumento significativo de infiltrado de neutrófilos no cólon, medido através da atividade da MPO, além de aumento na produção de CXCL1 no local inflamado. Dharmani, Leung e Chadee (2011) também observaram aumento de MPO no cólon de ratos que consumiram DSS, tendo sido esse aumento corroborado pela elevação concomitante na expressão da CINC-1, quimiocina análoga à IL-8 em humanos que desempenha importante função no recrutamento de neutrófilos em ratos. Níveis aumentados de CXCL1 e MPO, em animais com colite, foram observados também em outros estudos que utilizaram o DSS para induzir a doença (JADHAV; SHANDILYA; KANSAL, 2013; LEONEL *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2009).

Ao utilizar a *B. longum* 5^{1A} para tratamento da colite, observou-se que no modelo preventivo/curativo a bactéria não foi capaz de reduzir a concentração de CXCL1 (KC) e MPO no cólon dos animais do grupo DSS+BL5^{1A} (figuras 20A e 22A). Entretanto, quando se utilizou o tratamento curativo, observou-se aumento de

CXCL1 (KC) e redução de MPO nos animais do grupo DSS+BL5^{1A} quando comparados aos animais do grupo DSS (figuras 20B e 22B).

Sabendo-se da relação existente entre quimiocinas, enzima MPO e infiltrado de neutrófilos, pode-se verificar no presente estudo que os resultados obtidos pela administração de DSS (grupo DSS) são concordantes com o mecanismo de recrutamento de neutrófilos em um processo inflamatório: o aumento da produção da quimiocina CXCL1, aumentou a migração de neutrófilos para o sítio inflamado, fato sugerido pelo aumento de MPO no cólon.

Resultado surpreendente foi encontrado ao avaliar a administração da *B. longum* 5^{1A} apenas durante a indução da doença (tratamento curativo). Nesse caso observou-se que no grupo DSS+BL5^{1A} a quimiocina estava presente em concentrações acima das encontradas no grupo DSS, porém, ao contrário do que se esperaria esse aumento não foi acompanhado pelo aumento da MPO, mas sim pela sua redução, sugerindo um controle da migração de neutrófilos para o sítio inflamado. Pode-se pensar que o ocorrido tenha sido consequência da ação inibitória da bifidobactéria em outra quimiocina participante do recrutamento de neutrófilos, a CCL3. Vieira *et al.*, (2009) e Déruaz *et al.*, (2008) observaram em seus estudos com camundongos, que não apenas a quimiocina CXCL1 possui papel quimioatraente para neutrófilos, mas também, a CCL3 (MIP-1 α). Entretanto, para confirmar este pressuposto, a dosagem da CCL3 torna-se necessária. Outra explicação plausível para essa concentração reduzida de MPO é a relação existente entre a IL-1 β e a enzima, já que essa citocina está envolvida na ativação de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Portanto é possível especular que a redução dos níveis de IL-1 β tenha contribuído para a redução da enzima MPO, apesar de níveis aumentados de CXCL1.

No que diz respeito ao tratamento preventivo/curativo observa-se que a bifidobactéria não foi capaz de reduzir o recrutamento e infiltração de neutrófilos no cólon dos animais, uma vez que os valores de CXCL1 e MPO foram similares aos encontrados pelo grupo DSS. Mais uma vez a relação existente entre IL-1 β e MPO pode ser observada, já que não houve redução significativa dessa citocina e, conseqüentemente, da migração de neutrófilos para a área inflamada. Entretanto, estudos ainda se fazem necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo.

Os eosinófilos, leucócitos granulócitos, também são encontrados no cólon de pacientes portadores de UC e de animais submetidos ao modelo de colite induzida por DSS (AHRENS *et al.*, 2008; BARRIE *et al.*, 2013; FORBES *et al.*, 2004; STEVCEVA *et al.*, 2000). Investigações clínicas mostram que a expressão da eotaxina-1 está positivamente relacionada à concentração de eosinófilos no cólon de pacientes portadores de UC, e que o número de eosinófilos e sua proteína granular (EPO) presentes na mucosa estão diretamente associados à severidade da doença (AHRENS *et al.*, 2008; FORBES *et al.*, 2004). Portanto, com o intuito de verificar a presença de eosinófilos no cólon dos animais, avaliou-se a concentração da CCL11 (eotaxina-1) e da EPO no tecido alvo.

Os resultados obtidos mostram que a indução da colite (grupo DSS) promoveu aumento na concentração da quimiocina CCL11 e da enzima EPO no cólon dos animais (figuras 21 e 23), sugerindo a presença de infiltrado eosinofílico nessa região. Esses dados são corroborados por outros trabalhos que também utilizaram o modelo de colite induzida por DSS em camundongos (LEONEL *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2009). Forbes *et al.*, (2004) utilizando o modelo de UC induzida por DSS observaram que os animais tratados com o agente químico possuíam valores significativamente maiores de eosinófilos no cólon, estabelecendo uma relação direta entre eosinófilos e a patogênese da doença experimental. Notaram também, através da utilização de camundongos deficientes em eotaxina e *knockout* em EPO, a importância da eotaxina no recrutamento dos eosinófilos e da EPO como potente mediadora no desenvolvimento da colite, uma vez que quando a atividade dessa enzima era bloqueada, o desenvolvimento da doença era atenuado.

Ao avaliar o comportamento da *B. longum* 5^{1A} na concentração de CCL11 e EPO no cólon dos animais que receberam DSS, percebe-se que ela não conseguiu reduzir os níveis da eotaxina em nenhuma das formas de tratamento, porém, redução estatística da concentração de EPO foi observada no grupo DSS+BL5^{1A} tratado de maneira preventiva/curativa (figura 23A). O tratamento apenas durante a indução da doença não foi efetivo na promoção de melhoria nesse parâmetro (figura 23B). Resultados adicionais serão necessários para o entendimento do comportamento da CCL11 e da EPO, uma vez que outras citocinas tais como IL-5 e IL-13 estão envolvidas no recrutamento de eosinófilos (FORSYTHE, INMAN, BIENENSTOCK, 2007; HORIE *et al.*, 1997; LAMPINEN *et al.*, 2001; STEVCEVA *et al.*, 2000).

Em relação à sIgA, os dados obtidos mostraram níveis aumentados nos animais que receberam DSS, e, também, naqueles que receberam o agente químico juntamente com o probiótico *B. longum* 5^{1A} nas duas formas de tratamento (figura 24). Lee *et al.*, (2014) e Wang *et al.*, (2011), mostraram aumento de sIgA em modelo experimental de colite induzida por DSS. Isto pode ser explicado pela lesão do epitélio intestinal que permite maior influxo e acesso de antígenos aos órgãos linfoides do intestino, o que contribui para a diferenciação de células B em células produtoras de sIgA (LEE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011).

A administração da *B. longum* 5^{1A} em animais saudáveis também proporcionou aumento da concentração luminal de sIgA, fato observado apenas quando a utilização do probiótico foi realizada por um período de tempo mais prolongado (figura 24A). O aumento dessa concentração de sIgA pode ser explicada pela indução da proliferação, causada pela bifidobactéria, de células produtoras desta imunoglobulina no intestino delgado e grosso de camundongos, como foi visto por Souza *et al.*, (2012) ao ofertarem iogurte contendo a bifidobactéria a camundongos BALB/c.

Em resumo, quando se compara os dois modelos utilizados quais sejam preventivo/curativo e curativo, pode-se concluir que o modelo curativo de tratamento foi mais eficaz na proteção do epitélio intestinal. A *B. longum* 5^{1A} administrada durante a indução da doença preservou a arquitetura intestinal, tornou o edema menos exuberante, reduziu a extensão da lesão grave, provavelmente devido à atenuação da resposta inflamatória mediada pelo menor nível de citocina pró-inflamatória (IL-1 β) e, de infiltrado neutrofílico (MPO). Por outro lado, não se pode deixar de mencionar que aspectos importantes que caracterizam a UC como redução do peso corporal, indicadores clínicos tais como consistência das fezes/presença de sangue nas mesmas, encurtamento do colón e permeabilidade intestinal não foram beneficiados pela administração do probiótico.

7 CONCLUSÃO

1. Os animais que receberam DSS perderam peso, apresentaram aumento do *score* clínico, da permeabilidade intestinal, da citocina IL-1 β , das quimiocinas CXCL1 (KC) e CCL11 (eotaxina-1), das enzimas MPO e EPO e, também da sIgA, em relação ao controle. Além disso, apresentaram alterações do epitélio intestinal, intenso edema da submucosa, lesões na mucosa e intenso infiltrado inflamatório.
2. Ambos os tratamentos, preventivo/curativo e curativo, não apresentaram efeitos benéficos sobre os parâmetros clínicos avaliados, quais sejam perda de peso, consistência e presença de sangue nas fezes.
3. A modalidade curativa de tratamento mostrou-se mais eficaz, contribuindo para a redução da citocina pró-inflamatória IL-1 β , redução de MPO e maior preservação do epitélio intestinal, com menor intensidade do edema e da extensão de lesões graves.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 131-143, 2010.
- AHRENS, R. *et al.* Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 7390-7399, 2008.
- ALFALEH, K.; ANABREES, J.; BASSLER, D. Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis in preterm infants: A meta-analysis. **Neonatology**, v. 97, n. 2, p. 93-99, 2010.
- ALONSO, V. R.; GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 2, p. 21-26, 2013.
- ANDRADE, Samir de Deus Elian. **Efeitos da administração intragástrica de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 em um modelo murino agudo de colite ulcerativa induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS)**. Orientador: Flaviano dos Santos Martins. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- ANDRADE, M. C.; VAZ, N. M.; FARIA, A. M. C. Ethanol-induced colitis prevents oral tolerance induction in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p. 1227-1232, 2003.
- ARAI, Y. *et al.* Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **Cytokine**, v. 10, n. 11, p. 890-896, 1998.
- ARAKI, Y. *et al.* *Proteus mirabilis* sp. Intestinal microflora grow in a dextran sulfate sodium-rich environment. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 203-208, 2010.
- ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, v. 290, n. 1, p. 61-69, 1997.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 6, p. 411-420, 2008.

BARRIE, A. *et al.* Recurrent blood eosinophilia in ulcerative colitis is associated with severe disease and primary sclerosing cholangitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n.1, p. 222-228, 2013.

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-1640, 2007.

BIANCHERI, P. *et al.* Absence of a role for interleukin-13 in inflammatory bowel disease. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 2, p. 370-385, 2014.

BIAVATI, B. *et al.* Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. **Annals of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 117-131, 2000.

BISCHOFF, S. C. *et al.* Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 189, p. 1-25, 2014.

BJARNASON, I.; ANDREW, M.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: An overview. **Gastroenterology**, v. 108, n. 5, p. 1566-1581, 1995.

BORIVIAN, M.; STROBER, W. The mechanism of action of probiotics. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 679-692, 2007.

BOTTACINI, F. *et al.* Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. **Microbial Cells Factories**, v. 13, p. 1-15, 2014.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: Induction, dissemination, and effector functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 6, p. 505-515, 2009.

BRASIL. Secretaria de Assistência à Saúde. **Portaria nº 861, de 4 de novembro de 2002**: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Retocolite Ulcerativa, 2002.

BRAUS, N. A.; ELLIOTT, D. E. FOCIS on FOCiS: Advances in the pathogenesis and treatment of IBD. **Clinical Immunology**, v. 132, n. 1, p. 1-9, 2009.

BRON, P. A.; BAARLEN, P. V.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 66-78, 2012.

CAMPOS, F. G.; *et al.* Imunonutrição em colite experimental: efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 1, p. 48-54, 2002.

CESTARI, Sílvia Helena. **Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia* DC na prevenção e tratamento de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.** Orientador: Luiz Claudio Di Stasi. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

CHASSAING, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n.6, p. 1720-1728, 2011.

CHEN, Y. *et al.* Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol. **Journal of Zhejiang University**, v. 8, n.9, p. 632-637, 2007.

CHEN, C. C. *et al.* Probiotics have clinical, microbiologic, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 2, p. 135-138, 2010.

CHEN, L-L. *et al.* Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 32, p. 5347-5356, 2013.

CHO, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 6, p. 458-466, 2008.

CLEMENTE, J. C. *et al.* The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 18, p. 1713-1725, 2011.

DE FAZIO, L. *et al.* Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 8, p. 2051-2061, 2014.

DÉRUAZ, M. *et al.* Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with anti-inflammatory activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 9, p. 2019-2031, 2008.

DEWULF, N. L. S. *et al.* Adesão ao tratamento medicamentoso de pacientes com doenças inflamatórias intestinais acompanhados no ambulatório de um hospital universitário. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 4, p. 289-296, 2007.

DHARMANI, P.; LEUNG, P.; CHADEE, K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-13, 2011.

DI SABATINO, A. *et al.* New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 2, p. 368-371, 2012.

ELSHERIF, Y.; ALEXAKIS, C.; MENDALL, M. Determinants of weight loss prior to diagnosis in inflammatory bowel disease: a retrospective observational study. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

FAO/WHO (2002). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada, p. 1-11, 2002.

FEDORAK, R. N. Probiotics in the Management of ulcerative colitis. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 11, p. 688-690, 2010.

FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 10, n. 3, p. 286-299, 2004.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications. **Chinese Journal of Digestive Diseases**, v. 6, n. 1, p. 6-9, 2005.

FONTANA, L. *et al.* Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 35-50, 2013.

FORBES, E. *et al.* Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 9, p. 5664-5675, 2004.

FORSYTHE, P.; INMAN, M. D.; BIENENSTOCK, J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 6, p. 561-569, 2007.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 503-514, 2010.

GAVINI, F. *et al.* Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt, in the *Gardnerella vaginalis*. **Anaerobe**, v. 2, n. 3, p. 191-193, 1996.

GENEROSO, S. V. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 6, p. 477-484, 2010.

GENEROSO, S. V. *et al.* Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 261-269, 2011.

GERSEMANN, M.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 27, p. 3198-3202, 2011.

GLOCKER, E.; GRIMBACHER, B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 1, p. 41-48, 2012.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar**, n. 64, p. 12-22, 1999.

GUARNER, F. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 34, n. 3, p. 147-154, 2011.

GUERRA, P. VP. *et al.* Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 34, p. 3916-3921, 2011.

HALFVARSON, J. Genetics in twins with Crohn's disease: less pronounced than previously believed? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 1, p. 6-12, 2011.

HALME, L. *et al.* Family and twin studies in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 23, p. 3668-3672, 2006.

HENDERSON, P. *et al.* Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 1, p. 382-395, 2011.

HO, GT.; LEES, C.; SATSANGI, J. Ulcerative colitis. **Medicine**, v. 39, n. 4, p. 224-228, 2011.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010.

HORIE, S. *et al.* Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. **Internal Medicine**, v. 36, n. 3, p. 179-185, 1997.

IMAOKA, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. **World Journal of Gastroenterology**, 14, n. 16, p. 2511-2516, 2008.

JADHAV, S. R.; SHANDILYA, U. Kr.; KANSAL, V. K. Exploring the ameliorative potential of probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on dextran sodium sulphate induced colitis in mice. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 1, p. 21-27, 2013.

JOHANSSON, M. E. V. *et al.* Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

JOHANSSON, M. E. V. *et al.* Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 22, p. 3635-3641, 2011.

JORGENSEN, V. L. *et al.* Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1790-1796, 2006.

KANAUCHI, O.; ANDOH, A.; MITSUYAMA, K. Effects of the modulation of microbiota on the gastrointestinal immune system and bowel function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 42, p. 9977-9983, 2013.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573-621, 2010.

KAWADA, M.; ARIHIRO, A.; MIZOGUCHI, E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 42, p. 5581-5593, 2007.

KHANNA, P. V. *et al.* Use of animal models in elucidating disease pathogenesis in IBD. **Seminars in Immunopathology**, v. 36, n. 5, p. 541-551, 2014.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319-330, 2010.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental Animals**, v. 48, n. 3, p. 137-143, 1999a.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS- induced colitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 1, p. 67-70, 1999b.

KOBOZIEV, I. *et al.* Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 122-133, 2014.

KOKESOVÁ, A. *et al.* Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 5, p. 478-484, 2006.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KUGATHASAN, S.; FIOCCHI, C. Progress in basic inflammatory bowel disease research. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 16, n. 3, p. 146-153, 2007.

KULLMANN, F. *et al.* Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 16, n. 4, p. 238-246, 2001.

LAMMERS, K. M. *et al.* Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p.165-172, 2003.

LAMPINEN, M. *et al.* IL-5 and TNF- α participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 9, p. 2004-2009, 2001.

LAROUI, H. *et al.* Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with the medium-chain-length fatty acids in the colon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2012.

LEAHY, S. C. *et al.* Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1303-1315, 2005.

LEE, K-H. *et al.* Bacterial β -(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells. **Immunobiology**, v. 219, n. 10, p. 802-812, 2014.

LEONEL, A. J. *et al.* Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 8, p. 1396-1407, 2012.

LIGUMSKY, M. *et al.* Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease – enhanced production during active disease. **Gut**, v. 31, n. 6, p. 686-689, 1990.

LINSALATA, M. *et al.* The influence of *Lactobacillus brevis* on ornithine decarboxylase activity and polyamine profiles in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Helicobacter**, v. 9, n. 2, p. 165-172, 2004.

LONNERMARK, E. *et al.* Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 2, p. 106-112, 2010.

LOW, D.; NGUYEN, D. D.; MIZOGUCHI, E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 1341-1357, 2013.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298-306, 2011.

MARTINS, F. S. *et al.* Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 6, p. 623-630, 2009.

MARTINS, F. S. *et al.* Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses 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, n. 4, p. 359-364, 2011.

MARTINS, F. S. *et al.* Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.

MASLOWSKI, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-1286, 2009.

MASLOWSKI, K. M.; MACKAY, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2011.

MEDINA, M. *et al.* Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, n. 3, p. 531-538, 2007.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 6, p. 1328-1338, 2005.

MENNIGEN, R. *et al.* Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 5, p. 1140-1149, 2009.

MIYAKE, T. *et al.* Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. **Microbiology and immunology**, v. 42, n. 10, p. 661-667, 1998.

MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Animal models of IBD: linkage to human disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 578-587, 2010.

MOAL, V. L.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 315-337, 2006.

MOAYYEDI, P. *et al.* The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. **Gut**, v. 59, n. 3, p. 325-332, 2010.

MOLODECKY, N. A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54, 2012.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331-341, 2003.

NAGALINGAM, N. A. *et al.* Microbial ecology of the murine gut associated with the development of DSS-colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 4, p. 917-926, 2011.

NAGALINGAM, N. A.; LYNCH, S. V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 5, p. 968-980, 2012.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 18-26, 2007.

NEURATH, M. F. Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. **Digestive Diseases**, v. 30, p. 91-94, 2012.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, p. 329-342, 2014.

OKAYASU, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.

ORDÁS, I. *et al.* Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606-1619, 2012.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1-4, p. 279-289, 2002.

PARKES, G. C.; WHELAN, K.; LINDSAY, J. O. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 8, p. 717-725, 2014.

PAVLICK, K. P. *et al.* Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 311-322, 2002.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 2014.

PHILIPPE, D. *et al.* Treatment with *Bifidobacterium Bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 45-49, 2011.

PICARD, C. *et al.* Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 495-512, 2005.

PONDER, A.; LONG, M. D. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical Epidemiology**, p. 237-247, 2013.

PORITZ, L. S. *et al.* Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. **Journal of Surgical Research**, v. 140, n. 1, p. 12-19, 2007.

RAO, R. K.; SAMAK, G. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. **Current Nutrition and Food Science**, v. 9, n. 2, p. 99-107, 2013.

REIFF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n.1, p. 25-33, 2010.

RENNICK, D. M.; FORT, M. M. Lessons from genetically engineered animal models XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 278, n. 6, p. 829-833, 2000.

RIETDIJK, S. T.; D'HAENS, G. R. Recent developments in the treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 14, n. 6, p. 282-287, 2013.

ROSE, W. A. 2nd; SAKAMOTO, K.; LEIFER, C. A. Multifunctional role of dextran sulfate sodium for *in vivo* modeling of intestinal diseases. **BMC Immunology**, p. 1-13, 2012.

RUPA, P.; MINE, Y. Recent advances in the role of probiotics in human inflammation and gut health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 34, p. 8249-8256, 2012.

SANDERS, K. M. *et al.* Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 633-645, 2012.

SANTOS, R. G. C. *et al.* Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 34, n.4, p. 408-413, 2010.

SAROWSKA, J. *et al.* The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, n. 5, p. 759-766, 2013.

SCHWAB, C. *et al.* Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. **The ISME Journal**, v. 8, n. 5, p. 1101-1114, 2014.

SELLERS, R. N.; MORTON, D. The colon: from banal to brilliant. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 1, p. 67-81, 2014.

SERHAN, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SGOURAS, D. N. *et al.* *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 12, p. 1378-1386, 2005.

SHIOU, S-R. *et al.* Synergistic protection of combined probiotic conditioned media against neonatal necrotizing enterocolitis-like intestinal injury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2013.

SILVA, B. C. *et al.* Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9458-9467, 2014.

SLAVIN, J. Why whole grains are protective: biological mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 129-134, 2003.

SOARES, Anne Danieli Nascimento. **Pré-tratamento com glutamina dietética reduz o estresse térmico, a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana, em modelo experimental de hipertermia passiva.** Orientador: Valbert Nascimento Cardoso. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SOLOMON, L. *et al.* The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, p. 235-239, 2010.

SOUZA, D. G. *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 8, p. 1800-1808, 2000.

SOUZA, T. C. *et al.* Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} are differentially affected by technological variables in fermented milks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1184-1192, 2012.

SOUZA, T. C. *et al.* In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 2013.

SPEKHORST, L. M. *et al.* Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 41, p. 15374-15381, 2014.

STEVCEVA, L. *et al.* Eosinophilia is attenuated in experimental colitis induced in IL-5 deficient mice. **Genes and Immunity**, v. 1, n. 3, p. 213-218, 2000.

STROBER, W.; FUSS, I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1756-1767, 2011.

SWANSON, G. *et al.* Diagnostic medical radiation in inflammatory bowel disease: how to limit risk and maximize benefit. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 11, p. 2501-2508, 2013.

THOMPSON, N. P. *et al.* Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. **BMJ**, v. 312, n. 7023, p. 95-96, 1996.

TISSIER, H. Recherches sur la flora intestinale normale et pathologique du nourrisson (état normal et pathologique). Thèse de médecine de l'Université de Paris. 253 p., 1900.

TISSIER, H. Des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. **Critical Reviews of the Society for Biology**, p. 359-361, 1906.

TURRONI, F.; SINDEREN, D. V.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 37-44, 2011.

UENO, N. *et al.* Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2235-2250, 2011.

UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2021-2026, 2009.

VAINER, B. *et al.* Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. **Cytokine**, v. 12, n. 10, p. 1531-1536, 2000.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VERMEIRE, S.; ASSCHE, G. V.; RUTGEERTS, P. Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 321-326, 2012.

VIANA, M. L. *et al.* Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 218-223, 2010.

VIEIRA, A. T. *et al.* Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2382-2391, 2009.

VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, F. S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-12, 2013.

WANG, K-Y. *et al.* Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*- containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 3, p. 737-741, 2004.

WANG, F. *et al.* Effect of enteral nutrition on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, n. 6, p. 453-458, 2011.

WIRTZ, S. *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, n.3, p. 541-546, 2007.

YAN, Y. *et al.* Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. 1-8, 2009.

YUE, C. *et al.* Lipopolysaccharide-induced bacterial translocation is intestine site-specific and associates with intestinal mucosal inflammation. **Inflammation**, v. 35, n. 6. p. 1880-1888, 2012.

ZAKOSTELSKA, Z. *et al.* Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1-11, 2011.

ZHANG, Y-Z.; LI, Y-Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n.1, p. 91-99, 2014.

ZIEGLER, T. R. *et al.* Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 229-261, 2003.

ZOCCO, M. A. *et al.* Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 11, p. 1567-1574, 2006.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 359 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Efeitos da Bifidobacterium longum 51A em Modelo Experimental de Colite Ulcerativa", que tem como responsável VALBERT NASCIMENTO CARDOSO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/12/2013. Este certificado espira-se em 10/12/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 359 / 2013, related to the Project entitled "Effects of Bifidobacterium longum 51A in Experimental Model of Ulcerative Colitis", under the supervision of VALBERT NASCIMENTO CARDOSO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/12/2013. This certificate expires in 10/12/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 10/12/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br