

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA GERAL

**PAPEL DA MICROBIOTA E EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE
PROBIÓTICO NA TOXOPLAMOSE EXPERIMENTAL MURINA**

Bruna Bernardo Nascimento

BELO HORIZONTE

2015

BRUNA BERNARDO NASCIMENTO

**PAPEL DA MICROBIOTA E EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE
PROBIÓTICO NA TOXOPLAMOSE EXPERIMENTAL MURINA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Geral da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Patologia área de
concentração em Patologia Investigativa.**

Orientadora: Prof. Rosa Maria Esteves Arantes

Co-orientador: Prof. Flaviano dos Santos Martins

Belo Horizonte/MG

2015

Nascimento, Bruna Bernardo.
N244p Papel da microbiota e efeito da administração de probiótico na toxoplasmose experimental murina [manuscrito]. / Bruna Bernardo Nascimento. -- Belo Horizonte: 2015.

120f.: il.

Orientador: Rosa Maria Esteves Arantes.

Coorientador: Flaviano dos Santos Martins.

Área de concentração: Patologia Geral.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Toxoplasmose. 2. Toxoplasma. 3. Microbiota. 4. Probióticos/farmacologia. 5. Vida livre de Germes. 6. Sistema Imunológico. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Martins, Flaviano dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 725

A Deus, por ser essencial em minha vida,
autor de meu destino, meu guia, socorro
presente na hora da angústia. Seu fôlego de
vida em mim me foi sustento e me deu
coragem para questionar realidades e propor
sempre um novo mundo de possibilidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho, me dando força e coragem durante toda esta caminhada.

À Prof^a. Dr^a. Rosa Arantes, por ter aceitado me orientar e por todos os ensinamentos e dedicação despendidos para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flaviano Martins por ter aceitado me co-orientar e por ter fornecido as ferramentas necessárias para a realização desse trabalho;

Aos colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. Jacques Nicoli, Prof. Dr. Ricardo Wagner e ao Msc. Breno Veloso, Prof. Dr. Valbert Nascimento, Prof^a. Simone Generoso, Prof^a. Dr^a. Danielle Souza, por nos fornecerem estrutura e essencial ajuda para o desenvolvimento, execução e análise dos experimentos que não tínhamos condições de desenvolver em nosso próprio laboratório.

A Prof^a. Dr^a. Elizabeth Neumann, Prof^a. Dr^a. Liliane Martins dos Santos e a Prof^a. Dr^a. Catherine Ropert por disporem de parte de seu tempo para participar da banca examinadora da minha dissertação.

Aos professores do programa de pós-graduação, por contribuírem na formação do meu conhecimento.

Às Amigas Dr^a. Christiane Cartelle e Dr^a. Maria Noviello, por toda sua dedicação, companheirismo e amizade.

Às amigas do NIPE: Bel, Camila França, Joana, Luiza, Mayra e a todas alunas de iniciação científica. Com vocês aprendi muito mais do que ciência, aprendi a sinceridade de um olhar, o conforto de uma palavra amiga, a dar e receber carinho despretensioso, a valorizar o companheirismo e a sorrir (muito!) todos os dias. Obrigada por fazerem do nosso laboratório um ambiente de muito amor.

Aos amigos da Microbiologia: Anna Karolina, Adriano Cloves, Ariane Martins, Bárbara Porto, Bruno Pinheiro, Camila Villanoeva, Carolina Araújo, Éricka Souza, Fabiana Tiago, Fernanda Abrantes, Felipe Machado, Julliana Ribeiro (e Rodrigo Holanda), Kelly Grillo, Leonardo Acúrcio, Lorena Vivien, Luciana Mara, Luciana, Mayra Galvão, Mário Abatemarco, Marliete Carvalho, Quésia Damasceno, Rafael Bastos, Rafaella Avelar, Renata Lacerda, Samir Elian, Silvia Pietra, Spencer Santos, Yasmin Chalfoun, gostaria de agradecer a todos vocês que fizeram parte dessa minha caminhada e que tornaram os meus dias mais suaves com a amizade de vocês.

A minha querida e dedicada IC, Rebeca Pedra por sua disponibilidade, ajuda e esforço para que este trabalho se concretizasse.

A Clélia e Vânia pelo carinho e pelo trabalho técnico.

Agradeço esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Neide e Luiz, minhas irmãs Sheilla e Kenya e meus dois preciosos sobrinhos Nicole e Lucas. E ao meu noivo, Sam por todo incentivo, paciência e amor dedicados a mim durante todos estes anos.

A minha linda e amada avó Nair, pelo exemplo de trabalho e dedicação deixados. A toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Às agências de fomento Capes, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro;

Sem dúvida, esse trabalho é fruto do esforço de muitas pessoas, sou muito grata por tê-las em minha trajetória até aqui. Juntos construímos coisas maravilhosas, e com certeza vocês seguirão sempre comigo.

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof^ª. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes
- Dra. Christiane Teixeira Cartelle
- Dra. Maria de Lourdes Noviello

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Laboratório de Toxoplasmose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
- Prof^ª. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso

Laboratório de Interação Micro-organismo Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Danielle da Glória de Souza

Apoio Financeiro:



“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns no mundo sendo causada pelo *Toxoplasma gondii*, o qual provoca uma das respostas inatas pró-inflamatórias mais potentes dentre todos os agentes de doenças infecciosas. A inflamação e a infecção intestinais são frequentemente acompanhadas por desequilíbrio da microbiota intestinal, podendo gerar uma resposta inflamatória exacerbada. A microbiota intestinal tem um papel importante na manutenção da homeostase no hospedeiro e pode proteger este último contra as infecções por agentes patogênicos. Dessa forma, interessa-nos estudar as relações que ocorrem entre os micro-organismos e seu hospedeiro através da utilização de um modelo animal isento de germes (GF). Também as terapias que modulam a microbiota, tais como os probióticos, que podem melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e, quando administrados em quantidades suficientes, são capazes de conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Muitos estudos mostram que os animais GF, quando infectados por patógenos podem, em alguns casos, se mostrarem mais resistentes e, em outros, mais susceptíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da microbiota e o efeito da administração de probiótico na toxoplasmose experimental murina. Na curva de sobrevivência, os animais convencionais (CV) infectados oralmente por *T. gondii* não apresentaram diferença estatística quando comparados aos animais GF infectados. Entretanto, o desenvolvimento da doença em ambos os animais aconteceu de forma distinta. Enquanto nos animais CV ocorreu aumento da permeabilidade intestinal com modificação discreta das citocinas pró-inflamatórias intestinais, nos animais GF infectados não ocorreu aumento da permeabilidade intestinal e há pouca modificação da mucosa intestinal. Alterações significativas foram observadas no fígado e no cérebro de animais CV em comparação com os animais GF. Os pulmões de ambos, animais CV e GF, apresentaram lesões significativas que podem explicar a mortalidade similar. Em nossos estudos utilizamos dois probióticos (*Saccharomyces boulardii* (SB) e *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)) que foram administrados em animais CV diariamente por via oral em uma dose de 10^8 UFC/mL (durante 10 dias antes e 8 dias após a infecção) e os animais foram infectados com 10 cistos de *T. gondii*. Os animais tratados com SB apresentaram aumento da sobrevivência, inibição da perda de peso, diminuição da permeabilidade intestinal e clara e mensurável proteção das lesões intestinais causadas pelo parasito, além de proteção das lesões pulmonares. Entretanto, os animais tratados com EcN não apresentaram proteção na sobrevida, na perda de peso e nas lesões pulmonares, apesar de apresentarem redução da permeabilidade intestinal e proteção das lesões intestinais. O tratamento com SB produz uma imunomodulação local e sistêmica, enquanto que o tratamento com EcN foi capaz apenas de realizar modificações locais, após infecção pela cepa (TgCTBr07) de *T. gondii*.

Palavras-chave: Toxoplasmose; *T. gondii*; microbiota; gnotobiótico; probióticos; sistema imunológico.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most common worldwide zoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, which provokes one of the most potent pro-inflammatory innate responses among all infectious diseases. Inflammation and infection intestinal are often accompanied by imbalance of the intestinal tract, which can generate an exacerbated inflammatory response. The intestinal microbiota plays an important role in maintaining homeostasis within the host and can protect the latter against infection by pathogenic agents. We intend to study the host parasites relationships using a germ-free (GF) animal model. Also, therapies that modulate the microbiota like probiotics are capable of improving the intestinal microbial balance, and when administered in sufficient quantities, are able to confer beneficial effects resulting in increased resistance against pathogens. The objective of this study was to evaluate the role of microbiota and the effect of the administration of probiotics in murine experimental toxoplasmosis. The survival rates of conventional (CV) and germ-free (GF) animals orally infected by *T. gondii*, did not present statistical difference. However, the development of disease in both animals assumed distinct forms. CV infected animals presented increased intestinal permeability, severe colitis and modification of pro-inflammatory intestinal cytokines but GF infected animals did not increase intestinal permeability and only slightly modified the intestinal mucosa. The lesions were more severe in liver and brain of CV animals. Both groups had significant lung injuries what could explain the similar mortality index. In our studies we used two probiotics (*Saccharomyces boulardii* (SB) and *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)) which were administered orally to CV animals, at a daily dose of 10^8 CFU/mL (for 10 days before infection and 8 days after infection). The animals were infected with 10 cysts of *T. gondii*. The animals treated with SB showed increased survival, inhibition of weight loss, decreased intestinal permeability, and clear and measurable protection from intestinal lesions caused by the parasite, in addition to protection from pulmonary lesions. However, EcN-treated animals showed no protection in survival and weight loss, and showed no protection against pulmonary lesions despite enabling the reduction of intestinal permeability, and protection against intestinal lesions. Treatment with SB produces a local and systemic immunomodulation, whereas treatment with EcN was only able to make local changes after infection with the strain (TgCTBr07) *T. gondii*.

Keywords: Toxoplasmosis; *T. gondii*; microbiota; gnotobiotic; probiotics; immune system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das duas camadas de muco recobrando a superfície das células epiteliais do intestino.....	25
Figura 2. Alguns dos potenciais mecanismos de ação dos probióticos. Probióticos podem fornecer efeitos benéficos às células do epitélio intestinal por numerosas vias.	31
Figura 3. Delineamento para desenvolvimento da curva de mortalidade	38
Figura 4. Delineamento experimental com identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados	39
Figura 5. Papel da microbiota na sobrevivência (A) e no desenvolvimento ponderal (B) em camundongos infectados oralmente com cistos de <i>T. gondii</i> (TgCTBr07).....	44
Figura 6. Avaliação da permeabilidade intestinal dos animais convencionais e dos animais isentos de germes	45
Figura 7. Dosagem da Imunoglobulina A secretora no conteúdo intestinal	46
Figura 8. Fotomicrografias de intestino delgado, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	47
Figura 9. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras do intestino delgado	48
Figura 10. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no intestino delgado.	48
Figura 11. Avaliação da dosagem de citocinas e quimiocinas TNF- α (A), IFN- γ (B), RANTES/CCL5 (C), IL-10 (D), TGF- β (E) no intestino delgado de camundongos convencionais e isentos de germes.	49
Figura 12. Fotomicrografias de fígado, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	51
Figura 13. Score histológico do fígado de amostras coradas em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	52
Figura 14. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no fígado.	52
Figura 15. Fotomicrografias de baço, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	53
Figura 16. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no baço.....	54
Figura 17. Fotomicrografias de pulmão, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	55
Figura 18. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras de pulmão	56
Figura 19. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no pulmão.	56
Figura 20. Fotomicrografias de cérebro, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	57
Figura 21. Curva de sobrevivência de camundongos convencionais infectados por <i>T. gondii</i> cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e tratados com probióticos.....	58

Figura 22. Desenvolvimento ponderal animais convencionais infectados oralmente com <i>T. gondii</i> e tratados ou não com probiótico	59
Figura 23. Avaliação da permeabilidade intestinal tratados ou não com probiótico	60
Figura 24. Dosagem de Imunoglobulina A secretora no conteúdo intestinal dos animais convencionais..	61
Figura 25. Fotomicrografias de intestino delgado, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	63
Figura 26. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras do intestino delgado	64
Figura 27. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no intestino delgado de animais convencionais	65
Figura 28. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no intestino delgado de animais convencionais	65
Figura 29. Avaliação da dosagem de citocinas e quimiocinas TNF- α (A), IFN- γ (B), CCL5/RANTES (C), IL-10 (D) e TGF- β (E) no intestino delgado de camundongos convencionais	66
Figura 30. Fotomicrografias de fígado, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	68
Figura 31. Score histológico do fígado de amostras coradas em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	69
Figura 32. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no fígado de animais convencionais	69
Figura 33. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no fígado de animais convencionais	70
Figura 34. Fotomicrografias de baço, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	71
Figura 35. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no baço de animais convencionais.....	72
Figura 36. Fotomicrografias de pulmão, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	73
Figura 37. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras pulmão.....	74
Figura 38. Fotomicrografias de cérebro, corado em H&E, de camundongos <i>Swiss</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc-DTPA: Ácido Dietilenotriaminopentacético Marcado com Tecnécio

Bc: *Bacillus clausii*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BL: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}

BSA: Albumina Sérica Bovina

CCL5/RANTES: quimiocina expressa e secretada por células T

CEBIO: Centro de Bioterismo

CETEA: Comitê de Ética para Experimentação Animal

CPM: Contagem por Minuto

CTL: Controle

CV: Animal Convencional

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917

ELISA: (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) - teste imunoenzimático

FAO: (*Food and Agriculture Organization*) - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

GN: gnotobiótico

H&E: Hematoxilina & Eosina

HETAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

GF: Animal Isentos de Germes/Germ-free

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon gama

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

Linfócito Treg: Linfócito T regulatório

LP: Lâmina Própria

MBq: Megabequerel

MPO: Mieloperoxidase

MRS: *de Man, Rogosa e Shape*

NAG: N-acetil glicosaminidase

NF-κB: Fator Nuclear Kappa B

NK: Células T *natural killer*

NO: Óxido Nítrico

OPD: *o*-fenilenodiamina

PBS: Tampão Fosfato de Sódio

pH: Potencial hidrogeniônico

rpm: Rotações por minuto

SB: *Saccharomyces boulardii*

sIgA: Imunoglobulina A secretora

TgCTBr - *Toxoplasma gondii*-Congenital *Toxoplasmosis*-Brasil

TGF-β: Fator de Transformação do Crescimento Beta

TGI: Trato Gastrointestinal

TMB: Tetrametilbenzidine

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

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

YPG: Extrato de Levedura, Fosfato e Glicose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.2 Resposta Imune Inata e Toxoplasmose	21
2.3 Trato gastrointestinal e microbiota.....	23
2.4 Toxoplasmose oral como modelo de IBD.....	26
2.4 Modelo animal gnotobiótico	28
2.5 Probiótico.....	30
2.5.1 <i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A}	32
2.5.2 <i>Bacillus clausii</i>	32
2.5.3 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	32
2.5.4 <i>Saccharomyces boulardii</i>	33
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais	35
4.1.1 Animais isentos de germes (GF).....	35
4.1.2 Animais Convencionais (CV).....	35
4.2 Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>.....	35
4.3 Probióticos	36
4.4 Desenho Experimental	36
4.4.1. Animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por <i>T. gondii</i>	36
4.4.2 Animais convencionais infectados oralmente por <i>T. gondii</i> e tratados ou não diariamente com 4 probióticos diferentes.....	37
4.5 Determinação da Permeabilidade Intestinal.....	40

4.6 Dosagem de sIgA.	40
4.7 Processamento das amostras para dosagens de citocinas e quimiocinas.	40
4.7.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida dos níveis de citocinas e quimiocinas.	41
4.8 Processamento das amostras para dosagens de MPO E NAG.	41
4.8.1 Ensaio para detecção dos níveis de Mieloperoxidase (MPO) tecidual.	42
4.8.2 Ensaio para detecção dos níveis de N-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual.	42
4.9 Análise histológica.	42
4.9.1 Análise morfológica.	43
4.9.2 Análise semiquantitativa do fígado.	43
4.10 Análises estatísticas.	44
5 RESULTADOS	44
5.1 Papel da microbiota na toxoplasmose experimental murina.	44
5.1.1 Curva de sobrevivência e desenvolvimento ponderal de animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por <i>T. gondii</i>	44
5.1.2 Permeabilidade intestinal e produção de sIgA de animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por <i>T. gondii</i>	45
5.1.3 Intestino Delgado	46
5.1.4 Fígado	49
5.1.5 Baço	53
5.1.6 Pulmão	54
5.1.7 Cérebro	56
5.2 Experimento piloto para escolha de probióticos.	58
5.2.1 Curva de sobrevivência dos animais convencionais tratados com probióticos	58
5.2.2 Análise do desenvolvimento ponderal dos animais convencionais tratados com probióticos. .	59
5.3 Efeito da administração de probióticos na toxoplasmose experimental murina.	59
5.3.1 Permeabilidade intestinal dos animais convencionais.	59
5.3.2 Dosagem de sIgA no fluido intestinal animais convencionais	60
5.3.3 Intestino Delgado	61
5.3.4 Fígado	67

5.3.5 Baço.....	70
5.3.6 Pulmão.....	72
5.3.7 Cérebro.....	74
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A	99
ANEXO B	100
ANEXO C	101
ANEXO D	120

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal tem um papel importante na manutenção da homeostase no hospedeiro e pode proteger este último contra as infecções por agentes patogênicos (MARTINS et al., 2013, SANDERS et al., 2013). Entretanto, a inflamação e a infecção intestinais são frequentemente acompanhadas por desequilíbrio da microbiota podendo então gerar uma resposta inflamatória exacerbada (SEKIROV e FINLAY, 2009).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que pode infectar uma grande variedade de células, em praticamente todos os animais de sangue quente. Ele tem ampla distribuição mundial e, em geral, cerca de um terço da população humana são soropositivas para o parasito (TENTER et al. 2000).

A infecção aguda na maioria dos casos passa despercebida, e os parasitas persistem durante a vida em forma de cistos, principalmente, nos tecidos do cérebro e músculo. A infecção pelo *T. gondii* é adquirida por via oral pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos do parasita ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (REMINGTON et al., 1995). Após a ingestão de cistos ou oocistos são liberados no intestino delgado bradizoítos ou esporozoítos que invadem rapidamente a mucosa intestinal e convertem-se em taquizoítos. As células infectadas ao secretar moléculas citotóxicas, tais como óxido nítrico (NO) e quimiocinas, atraem células do sistema imunológico, tais como, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, monócitos e as células T (MENNECHET et al., 2002). Essas células, por sua vez, secretam citocinas, tais como IL-12, que estimula a resposta imune adaptativa. As células dendríticas são responsáveis por capturar os antígenos parasitários e processá-los para apresentação e para estimular as células T. Na lâmina própria, as células T CD4⁺ sinergizam com os enterócitos infectados para secretar citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α . O IFN- γ ativa os macrófagos, células dendríticas e os enterócitos para produzir moléculas microbicidas como NO e elimina o parasita. Após a multiplicação e ruptura das células infectadas, taquizoítos invadem células vizinhas e disseminam através do sangue e sistema linfático (BUZONI-GATEL et al., 2006).

Tendo em vista que a toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns no mundo e que provoca uma das respostas inatas pró-inflamatórias mais potentes entre todos os agentes de doenças infecciosas (MILLER et al., 2009), terapias que modulem a microbiota poderiam ser usadas com sucesso para interferir nas doenças causadas por vários protozoários, como a terapia probiótica.

O interesse no uso de agentes microbianos vivos (probióticos) tem aumentado nesses últimos anos com o propósito de prevenção ou tratamento de um grande número de distúrbios gastrointestinais. Probióticos são micro-organismos viáveis capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e, quando administrados em quantidades suficientes, são capazes de conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, resultando em um aumento da resistência contra patógenos (FAO/WHO, 2002). Esses micro-organismos agem por meio de uma variedade de mecanismos para fornecer benefício ao seu hospedeiro, incluindo: a competição com potenciais patógenos por nutrientes ou sítios de adesão nos enterócitos, o estímulo à produção de muco pelas células caliciformes, a ação sobre a integridade da barreira da mucosa, a produção de substâncias antagonistas contra patógenos e a imunomodulação local e sistêmica (GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010). Dessa forma, tem sido proposto o uso de probióticos para diversas enfermidades que acarretam o trato intestinal em seres humanos e animais, principalmente aquelas em que a microbiota indígena tem função relevante na patogênese (SANDERS et al., 2013).

No intestino, os probióticos interagem com as células epiteliais, as placas de peyer, e as células do sistema imunológico. Estas interações resultam em aumento do número de células produtoras de IgA acompanhada pela produção de IgM e IgA secretora que são particularmente importantes para a imunidade da mucosa, servindo como barreira contra os organismos patogênicos (PERDIGON et al., 1995; SZAJEWSKA et al., 2001). Além disso, os probióticos, através de moléculas ainda mal caracterizadas podem também afetar as células dendríticas, que são responsáveis pelo recolhimento dos antígenos do intestino e a sua apresentação às células T, levando à sua diferenciação a T-helper (Th1, Th2) ou T-regulador de linfócitos (Treg) (KONSTANTINOV et al., 2008). Probióticos podem modular a liberação de citocinas (TNF- α IFN- γ , IL-10, IL-12) que desempenham um papel central na manutenção do equilíbrio delicado entre os mecanismos de defesa necessários e aqueles agressivos (ARVOLA et al., 1999).

Recentemente, foram isolados por nossos colaboradores 27 cepas de *T. gondii* a partir do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais. Esses isolados foram denominados de TgCTBr01 a TgCTBr27 (*Toxoplasma gondii* Congenital Toxoplasmosis from Brazil) e apresentaram diferentes perfis genéticos e de virulência em camundongos (CARNEIRO et al., 2013). Um dos isolados obtidos deste trabalho (ETIC 0298/06 e adendo COEP-UFMG/062/06) foi utilizado para a padronização e execução desse estudo. Dessa forma nosso objetivo foi avaliar o papel da microbiota e o efeito da administração oral de probiótico na sobrevivência e no desenvolvimento da patologia

intestinal em camundongos infectados oralmente com cistos de *T. gondii* cepa TgCTBr07. Como probiótico usamos *Saccharomyces boulardii*, uma levedura com efeitos já descritos como benéficos em diversas outras patologias pelo nosso grupo (GENEROSO et al., 2011; MARTINS et al., 2005; NEVES et al., 2002; LIMA FILHO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2000; PERET FILHO, et al., 1998; BRANDÃO et al., 1998; RODRIGUES et al., 1996; DIAS et al., 1995). Além disto, utilizamos a *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor®, Ardeypharm, Canadá) que é uma linhagem probiótica amplamente utilizada e alguns estudos *in vivo* já demonstraram sua atividade probiótica promissora em animais e humanos (SCHIERACK et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um parasito intracelular obrigatório, cujo nome do gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente. *T. gondii* pode infectar uma grande variedade de células em praticamente todos os animais de sangue quente. Ele tem uma distribuição mundial e, em geral, cerca de um terço da população humana são soropositivas para o parasito (TENTER et al., 2000). No entanto, cumpre salientar que a soroprevalência em humanos varia conforme a região geográfica, grupo étnico, hábitos e condições socioeconômicas da população exposta (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

O ciclo do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, a fase sexuada ocorre apenas em felídeos, seu hospedeiro definitivo, sendo o gato doméstico o hospedeiro mais importante do ponto de vista epidemiológico para a toxoplasmose humana. A fase assexuada ocorre em inúmeros hospedeiros intermediários e consiste em dois estágios de vida distintos dependendo da fase da infecção: aguda ou crônica. Na fase aguda há predominância de taquizoítos com alta taxa de proliferação e conseqüente ativação de uma forte resposta inflamatória pelo hospedeiro que desencadeia a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos, de multiplicação lenta e metabolismo baixo e que formam os cistos teciduais e caracterizam a fase crônica da infecção com pouca resposta inflamatória (PACHECO-SOARES & de SOUZA, 2010).

As duas principais formas envolvidas na transmissão do parasito são o cisto tecidual (contendo bradizoítos) e o oocisto (contendo esporozoítos). Os hospedeiros definitivos eliminam em suas fezes oocistos imaturos, não esporulados, que em condições ambientais

propícias como temperatura, umidade e oxigenação ideais, esporulam e se tornam infectantes (TENTER et al., 2000; MONTOYA & LIESENFELD, 2004). A ingestão do oocisto pode ocorrer através de água e alimentos contaminados (HILL et al., 2005). O ciclo do *T. gondii* pode ser mantido, também, apenas nos hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito proveniente da ingestão de cistos teciduais de outro hospedeiro intermediário infectado (TENTER et al., 2000). Além da ingestão de oocistos, a transmissão oral ocorre também pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais que são formas de resistência do parasito formadas nos tecidos de mamíferos ou aves (GROSS et al., 2004).

Os bradizoítos de *T. gondii* são mais resistentes às enzimas digestivas (pepsina e tripsina) do que os taquizoítos (DUBEY et al., 1998). Portanto, a ingestão de cistos teciduais viáveis por um hospedeiro imunocomprometido, geralmente resultará em uma infecção com *T. gondii*. Apesar do cisto tecidual ser menos resistente às condições ambientais comparado aos oocistos, eles são relativamente resistentes à mudanças de temperatura e permanecem infecciosos em carne picada ou carcaça por até 3 semanas, sob refrigeração (1°C a 4°C) (DUBEY, 1990). Cistos teciduais também sobrevivem a congelamento (-1°C a -8°C) por mais de uma semana (KOTULA et al., 1991). A maioria dos cistos não sobrevivem à temperaturas iguais ou menores que -12°C, mas ocasionalmente alguns cistos podem sobreviver. Em contraste, os cistos teciduais em carne são inativados por aquecimento (67°C) (DUBEY, 2000).

A cinética de invasão e disseminação são caracterizadas pela detecção de parasitas na superfície do epitélio e da lâmina própria (LP) do intestino delgado, na maior parte da metade distal, em 1h após a ingestão (DUBEY et al., 1997) e nos linfonodos mesentéricos em 24h após a infecção (DUBEY et al., 1997; MCLEOD, et al., 1984). Parasitas individuais também poderiam ser detectados em placas de Peyer 1h após a infecção (LIESENFELD, 2002). A disseminação da LP para o sangue periférico, pulmão e fígado foi observada entre 2 e 4 dias após a infecção (DUBEY et al., 1997) e a formação de cistos no cérebro histologicamente detectáveis em 10 dias após a infecção (LIESENFELD, 2002). Estes estudos sugerem que o *T. gondii* pode infectar a mucosa intestinal através da invasão direta das células epiteliais na metade distal do intestino delgado. No entanto, o local exato da entrada e tipo de célula inicialmente invadida pelo parasita (por exemplo, células epiteliais e/ou células M sobrepondo placas de Peyer) continuam não elucidadas (LIESENFELD, 2002). O tipo de célula invadida deve ser de importância para a indução de imunidade por células apresentadoras de antígenos,

como agentes patogênicos absorvidos pelas células M, provavelmente interagem com as células dendríticas, ao passo que a invasão através de células epiteliais que recobrem a lâmina própria provavelmente resultará na interação inicial com os macrófagos e suas consequências para a resposta imunológica do hospedeiro (JOHNSON et al., 1997).

2.2 Resposta Imune Inata e Toxoplasmose

Os mecanismos inatos de resistência aos protozoários parecem ser semelhantes aos que operam nas doenças bacterianas e virais. Após a ingestão de oocistos ou cistos a primeira barreira física é a mucosa de toda a extensão do trato gastrointestinal que age como resposta inata, no caso de transmissões orais (BUZONI-GATEL et al., 2006). A capacidade de atravessar rapidamente barreiras epiteliais e atingir a corrente sanguínea em poucas horas pós-infecção pode ser um importante componente de disseminação *in vivo*, não só no intestino, mas especialmente em locais imuno privilegiados (BARRAGAN & SIBLEY, 2003). Quando os parasitos invadem a mucosa intestinal, enfrentam uma barreira física formada por uma camada de células epiteliais chamadas enterócitos, unidas por junções oclusivas (*tight junctions*). Os enterócitos infectados pelos parasitos sofrem alterações morfológicas e fisiológicas que induzem à secreção de moléculas citotóxicas, tais como o óxido nítrico (NO). Os protozoários estimulam ambas as respostas imunes, mediada por células e humoral. Normalmente, anticorpos controlam os níveis de parasitas extracelulares na circulação e fluidos teciduais, enquanto a resposta celular é direcionada contra parasitas intracelulares (BUZONI-GATEL et al., 2006; BRUNET, 2001).

A aquisição oral de um parasita pode resultar em uma resposta imune inata robusta no hospedeiro infectado. Esta resposta inclui a ativação de neutrófilos, macrófagos do tecido, monócitos, células dendríticas e eosinófilos. Muitas destas células reativas de fase precoce são essenciais para a proteção, bem como o estabelecimento da imunidade, a longo prazo para o parasita (REIS E SOUSA et al., 1997; LIU et al., 2006).

Os neutrófilos são um dos primeiros tipos de células que chegam ao local da infecção e liberam várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias em resposta ao *Toxoplasma*. Os polimorfonucleares (PMN) recrutados no local da infecção podem depois participar no recrutamento e ativação de outras células do sistema imunológico, tais como macrófagos e as células dendríticas que desempenham o papel principal entre a resposta imune inata e adaptativa. As células dendríticas são uma importante fonte de IL-12 durante a infecção por *T. gondii* e outros patógenos microbianos, e também apresentam antígenos aos linfócitos T. Durante a infecção com *T. gondii* ambos os neutrófilos humanos e de camundongos produzem

IL-12 e TNF- α , bem como várias quimiocinas, quando estimulados com antígenos de *T. gondii* (DENKERS et al., 2004). A IL-12 estimula diretamente células NK a produzir IFN- γ , que é um importante inibidor da multiplicação intracelular do parasita. A IL-12 é conhecida também como responsável por efetivar resposta tipo Th1 em infecção murina por *T. gondii*, bem como conduzir a proliferação do tipo 1 de células T CD4⁺ e CD8⁺, que também produzem IFN- γ (REIS E SOUSA et al., 1997). Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas secretam IL-12 durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*, embora as células dendríticas pareçam ser a fonte mais importante (REIS E SOUSA et al., 1997; LIU et al., 2006).

Os macrófagos são conhecidos como mediadores da resposta imune inata do hospedeiro a uma grande variedade de patógenos microbianos. IFN- γ é o principal indutor da ativação clássica de macrófagos. Os macrófagos ativados de camundongos adquirem atividade antimicrobiana. Isso é em grande parte dependente da produção de intermediários reativos de nitrogênio. Por exemplo, o tratamento com IFN- γ pode levar à privação de triptofano intracelular e ferro, que pode ser prejudicial para a replicação de *T. gondii* em macrófagos e enterócitos murino (DIMIER & BOUT, 1998). Além disso, os macrófagos são importantes para a destruição de micro-organismos intracelulares já que produzem óxido nítrico (NO), substância letal para alguns protozoários (BUTCHER & DENKERS, 2002; STAFFORD et al., 2002)

Células dendríticas com a sua capacidade para produzir IL-12, são os principais ativadores da resposta imune do tipo Th1, após a infecção de camundongos com *T. gondii*. Os granulócitos podem também contribuir para a produção antecipada de IL-12. O macrófago ativado inibe ou mata o *T. gondii* intracelular (REIS E SOUSA et al., 1997). No entanto, o parasita pode contrariar em parte essas ações, mesmo nas fases iniciais da infecção. *T. gondii* pode explorar células apresentadoras de antígenos como os chamados cavalos de Tróia por regulação baixa de moléculas da superfície celular e interferência com vias de apoptose (COURRET et al., 2006; LAMBERT et al., 2006). Citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IFN- γ e TNF- α) e citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10, TGF- β) estão ambas envolvidas no equilíbrio desta resposta. A proporção de células T é aumentada durante a infecção aguda. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são ambos citotóxicos para células infectadas por *T. gondii* (BARNES & POWRIE, 2009). Dentro de duas semanas após a infecção, os anticorpos IgG, IgM, IgA, e IgE contra muitas proteínas de *T. gondii* podem ser detectados. Produção de anticorpos IgA em superfícies mucosas parecem proteger o hospedeiro contra a reinfeção. A reinfeção pode acontecer, mas não parece resultar em doença ou em transmissão congênita do parasita (GELENEKY, 2013).

Normalmente, a resposta imune celular e humoral ocorrem na exposição ao *Toxoplasma*. Os anticorpos junto com o complemento destroem organismos extracelulares. Eles então diminuem o número de micro-organismos entre as células, mas terão pouca ou nenhuma influência nas formas intracelulares do parasita. Esse mecanismo de destruição ocorre quando as células T sensibilizadas secretam IFN- γ que ativa os macrófagos, capacitando-os a matar micro-organismos intracelulares por permitir a fusão do fagossomo e lisossomo. Algumas células T também secretam citocinas que agem diretamente na replicação do *Toxoplasma* (BRUNET, 2001). Além disso, as células T citotóxicas podem destruir taquizoítos e células infectadas por *Toxoplasma*. Assim, as respostas imunes mediadas por células e anticorpos atuam juntas para assegurar a eliminação do estágio de taquizoítos desse organismo. Entretanto, taquizoítos de *Toxoplasma* podem se transformar em cistos contendo bradizoítos (BUZONI-GATEL et al., 2006).

A maioria dos protozoários adquiriram mecanismos evolutivos para escapar da resposta imune dos seus hospedeiros. O *T. gondii* pode evitar a migração de neutrófilos e a fagocitose. Essa imunossupressão pode promover a sobrevivência do parasita (VAN GISBERGEN et al., 2005). Além da imunossupressão, os protozoários desenvolveram evolutivamente duas outras técnicas evasivas efetivas. Uma envolve tornar-se não antigênico, e a outra envolve a capacidade de alterar os antígenos de superfície rápida e repetidamente. No caso do *T. gondii*, o seu estado cístico não é antigênico, portanto não estimula uma resposta imune (BARRAGAN & SIBLEY, 2003).

Como os protozoários podem escapar da resposta imune, não é surpreendente que eles invadam preferencialmente os indivíduos imunossuprimidos. Os organismos que são normalmente controlados pelo sistema imune, como as formas císticas do *T. gondii*, podem crescer e produzir uma doença grave em animais imunossuprimidos. Por essa razão, a toxoplasmose aguda é comumente observada nos humanos imunossuprimidos transplantados, com terapia contra o câncer ou com AIDS (KASPER & BUZONI-GATEL, 1998) tornando ainda mais importante os estudos sobre a sua patogênese e controle.

2.3 Trato gastrointestinal e microbiota

A superfície mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é a maior superfície corporal em contato com o meio externo (200 a 300 m²). Ela representa um ecossistema complexo que combina epitélio gastrointestinal, células imunes e microbiota residente (MCCRACKEN & LORENZ, 2001). As células-tronco no epitélio intestinal originam os enterócitos, células

caliciformes, células enteroendócrinas e células de Paneth. As células epiteliais intestinais formam uma barreira físico-química importante contra patógenos, possuem células de defesa, além de residir diversos micro-organismos que atuam na maioria das vezes como fator de proteção ao hospedeiro (MACDONALD, 2003).

As células colunares, também conhecidas como enterócitos, no intestino delgado, ou colonócitos, no intestino grosso, compreendem mais de 80% de todos os tipos celulares. As células de Paneth migram para a base da cripta do intestino delgado, enquanto os outros tipos celulares migram da cripta para as vilosidades do intestino delgado. As células caliciformes estão presentes em todo o intestino, mas aumentam em densidade da porção proximal para a distal. As células enteroendócrinas, com o sistema nervoso sistêmico, estão dispersas em todo o intestino (FURNESS et al., 1999).

Em camundongos, o desenvolvimento do epitélio gastrointestinal começa a partir da primeira semana de gestação e se estende até o dia 21 pós-natal. Entretanto, em seres humanos, o desenvolvimento ocorre, principalmente, durante o primeiro trimestre de gestação, mas segue um programa de desenvolvimento similar àquele observado em roedores (MONTGOMERY et al., 1999).

As células epiteliais intestinais possuem um ciclo de vida de, aproximadamente, 2-5 dias e, durante a morte, são exfoliadas, junto com as bactérias aderentes, o que auxilia na eliminação de patógenos. As células de Paneth possuem uma vida maior, sobrevivendo por mais de 20 dias, ao final dos quais são fagocitadas (MACDONALD, 2003).

A forte barreira física formada pelas células epiteliais é devido às complexas junções intercelulares compostas por junções oclusivas, junções aderentes e desmossomas. As junções oclusivas, componentes mais apicais do complexo juncional, criam uma barreira semipermeável entre as células, que podem ser reguladas e servem como barreira de permeabilidade (SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004).

Vários patógenos exploram as junções oclusivas para modular a permeabilidade intestinal e facilitar a própria entrada no tecido (HOFMAN, 2003). Outros patógenos utilizam as células M, que circulam o sistema linfóide associado à mucosa (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000; NEUTRA et al., 2001), como rota de entrada e, após atravessar essas células, encontram as células fagocíticas, em especial os macrófagos, que estão presentes no folículo (JEPSON & CLARK, 1998; SANSONETTI & PHALIPON, 1999; CLARK & JEPSON, 2003).

A superfície de todo trato gastrointestinal é amplamente revestida por uma camada de muco produzida pelas células caliciformes e pelo epitélio presente nas vilosidades, que são encontradas na região do intestino delgado, cólon e no reto (MAGALHÃES, 2007). Esse muco é espesso e atua como uma rede pegajosa que funciona como uma barreira física de proteção que deixa o epitélio intestinal impenetrável por diversas espécies de bactérias (MALOY & POWRIE, 2011), pois além de fornecer essa barreira física, o muco é composto por glicoproteínas, principalmente a mucina, e moléculas bactericidas, como as defensinas e IgA secretora (Fig. 1).

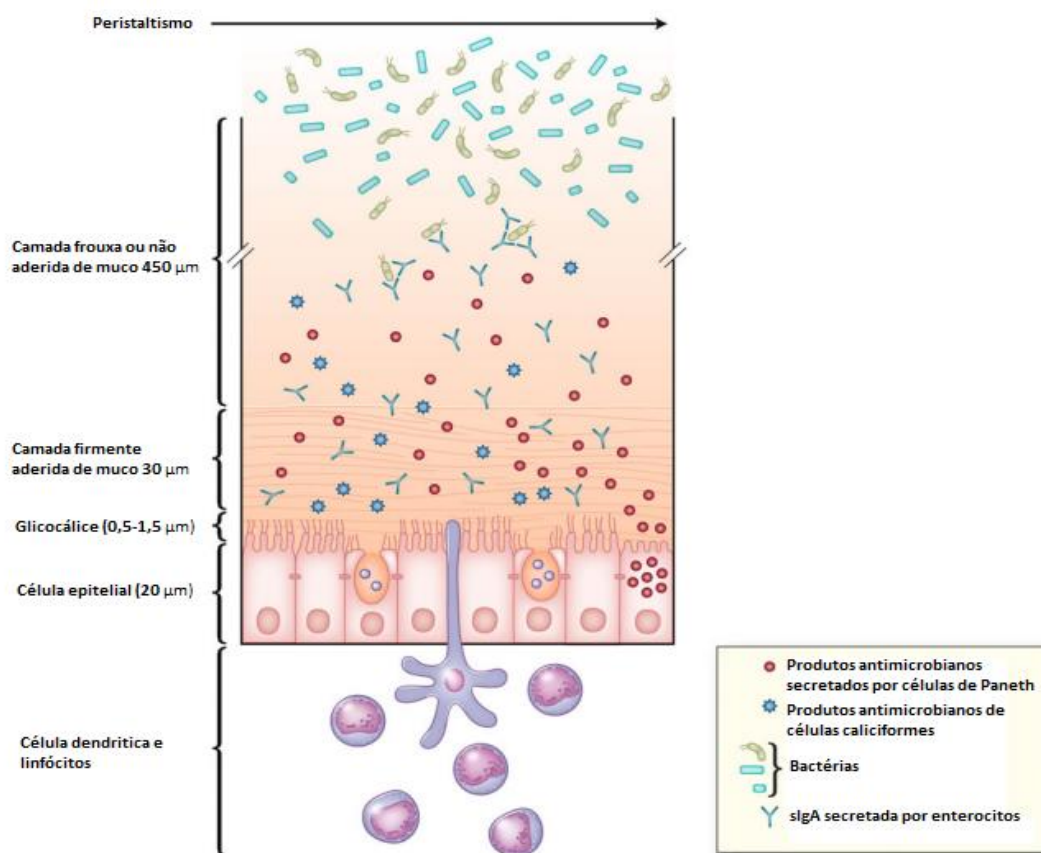


Figura 1. Representação esquemática das duas camadas de muco recobrimo a superfície das células epiteliais do intestino. A superfície da célula epitelial intestinal é coberta por duas camadas de muco. Uma camada exterior, frouxamente aderida e outra camada interior, firmemente aderida. As células de Paneth, os enterócitos e as células caliciformes secretam produtos antimicrobianos e secretam IgA secretora. Células dendríticas e linfócitos também podem ser visualizados, estando presentes na lâmina própria, atuando na resposta do hospedeiro a possíveis alterações no equilíbrio intestinal. Fonte: KIM & HO, 2010 (Adaptado).

O epitélio intestinal não é apenas uma barreira física que previne os patógenos de ganharem acesso aos órgãos, ele também fornece uma superfície onde o organismo do hospedeiro pode monitorar o ambiente e, se necessário, ativar uma potente resposta imune pela liberação de moléculas sinalizadoras, como as citocinas e as quimiocinas que, juntos com

a microbiota residente, fornecem uma linha de defesa contra micro-organismos patogênicos (MOAL & SERVIN, 2006).

O sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos entéricos inclui imunidade adaptativa e imunidade inata. A resposta imune adaptativa é observada 4 a 7 dias após a infecção, e esse mecanismo envolve a geração de memória imunológica e a expansão de receptores com especificidade relevante. Em contraste, o sistema imune inato é mobilizado nos primeiros dias para controlar a infecção (MEDZHITOV, 2001).

Os hospedeiros fornecem habitat e nutrição para a comunidade microbiana e obtém muitos benefícios de seus hóspedes (microorganismos) que contribuem com funções metabólicas (recuperação de energia e nutrientes), defensivas (efeito barreira contra invasores) e trofismo (regulação imune, desenvolvimento neuro-endócrino). Vários estados de doença ou desordens tem sido associados com a mudança na composição ou função da microbiota entérica, incluindo doenças inflamatórias intestinais, obesidade e a síndrome metabólica. (GUARNER, 2012).

2.4 Toxoplasmose oral como modelo de IBD

A doença inflamatória intestinal (IBD) abrange doenças idiopáticas como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Embora as características da doença de Crohn e da colite ulcerativa sejam diferentes, ambas as doenças envolvem inflamação intestinal crônica. A etiologia destas doenças é desconhecida e as respostas imunitárias que desequilibra a microbiota indígena são discutidas como componentes críticos. O desenvolvimento de modelos murinos com certas características da IBD permite avançar na compreensão dos mecanismos patogênicos subjacentes a esta afecção.

A evidência experimental indica que as células T CD4⁺ desempenham um papel importante como células efetoras na maioria dos modelos (POWRIE, 1995; NEURATH et al., 1996). Por outro lado, a indução de inflamação intestinal através de células T CD8⁺ reativas a proteína de choque térmico 60 foi também recentemente relatada (STEINHOFF et al., 1995). Quando relacionados com o desenvolvimento da doença gastrointestinal em os seres humanos, o paradigma Th1/Th2 podia oferecer um conceito útil para o entendimento da inflamação. O perfil de citocinas em pacientes com a doença de Crohn e na maioria dos modelos de IBD murino é dominado pela produção de IL-12 e IFN- γ (POWRIE, 1995; NEURATH et al., 1996), enquanto que o perfil de citocinas em colite ulcerativa é dominado por IL-5 e IL-15 em humanos (FUSS et al., 1996). Assim, parece haver grandes paralelos na imunopatogênese da doença e as infecções de Crohn causada por agentes indutores de uma

resposta imune do tipo Th1. Além disso, em muitos destes modelos, a doença foi evitada ou pelo menos melhorada por tratamento precoce com IL-10 (ASSEMAN et al., 1999). O modelo de patologia intestinal induzida por *T. gondii* foi descrito como um modelo murino de IBD, não só quanto ao papel das citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, IFN- γ , TNF- α , e iNOS, mas também quanto à imunomodulação da IL-10 e TGF- β (LISENFIELD, 2002).

Como demonstrado para os modelos murinos de IBD, incluindo camundongos IL-2^{-/-} (SADLACK et al., 1993) e IL-10^{-/-} (KUHN et al., 1993) e 2,4,6-trinitrobenzeno ácido sulfônico - colite induzida (NEURATH et al., 1995), a contribuição da microbiota intestinal indígena também se verifica no desenvolvimento da patologia intestinal induzida por *T. gondii*. Portanto, os paralelos estabelecidos entre modelos murinos de IBD e o modelo aqui relatados não incluem apenas mecanismos imunológicos, mas também a dependência da presença da microbiota. A este respeito, os polimorfismos no locus do gene NOD2 parece resultar em reconhecimento alterado de componentes dos agentes microbianos patogênicos e/ou ativação de NF κ B, foram recentemente associados com a susceptibilidade à doença de Crohn (HUGIT et al., 2001; OGURA et al., 2001).

A infecção por via oral com *T. gondii* induz necrose maciça das vilosidades e das células da mucosa no íleo de camundongos C57BL/6 no prazo de 7 dias. Estas alterações histológicas são mediadas por células T CD4⁺ e portanto, envolvem alterações imunológicas semelhantes aquelas observadas em modelos de doença de Crohn que não estão relacionados a agentes infecciosos. Nosso modelo de infecção por via oral com *T. gondii* tem a vantagem de elevada reprodutibilidade em um curto espaço de tempo (7 dias). Já que os camundongos morrem, o modelo não é adequado para examinar o curso da doença na fase crônica. No entanto, o modelo deve ser útil para investigar o papel da microbiota nos mecanismos patológicos de doenças inflamatórias intestinais. Além disso, uma vez que as cepas de *T. gondii* modificadas e deletadas para a proteína imunodominante SAG-1 não apresentam imunopatologia no intestino, um modelo de IBD é pela primeira vez estabelecido por uma única proteína em camundongos normais (KASPER et al., 2001).

Além disso, o modelo de infecção oral com *T. gondii* provou ser útil para testar potenciais substâncias anti-inflamatórias em murinos. Por exemplo, anticorpos monoclonais contra citocinas e subconjuntos de células T, além de TNF- γ já utilizado em ensaios clínicos (por exemplo, o anti-TNF- γ). Em contraste, os modelos induzidos por químicos para IBD parecem mais úteis para estudar a inflamação inespecífica e a cicatrização; enquanto que os modelos induzido por polímeros e micro-organismos podem ajudar elucidar a influência da imunidade inata. Modelos baseados em complexos de histocompatibilidade/células T, e

camundongos nocauteados para alguns genes podem ajudar a correlacionar genes específicos com o mecanismo patogênico das IBD. Apesar das respostas imunológicas semelhantes, a variedade de agentes indutores em modelos murinos aponta para mecanismos heterogêneos da doença em seres humanos. Portanto, o conhecimento combinado adquirido em diferentes modelos de IBD deve proporcionar os fundamentos para melhorias na prevenção e tratamento das IBD em humanos.

2.4 Modelo animal gnotobiótico

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os micro-organismos e seu hospedeiro é a utilização de um modelo animal isento de germes (GF). Neste caso, deve-se, primeiro, definir as funções celulares na ausência de micro-organismos e depois avaliar os efeitos da adição de um único micro-organismo ou de uma população definida de micro-organismos. A criação de animais sob condições isentas de germes tem desenvolvido um campo científico para este propósito: a gnotobiologia. O termo gnotobiótico (GN) foi proposto para designar o campo de investigação interessado na criação de animais e plantas que estão livres de todos os micro-organismos ou associados somente a espécie conhecidas (TREXLER, 1978). A palavra gnotobiologia é derivada do grego onde, “gnotos” significa conhecido e “bios” vida (GUSTAFSSON, 1948).

Os animais isentos de germes (GF) são, de um certo modo, uma extensão do conceito de cultura pura, permitindo o estudo das interações entre o hospedeiro e os micro-organismos sem a interferência da microbiota indígena (GORDON & PESTI, 1971, TREXLER, 1978).

Desde a década de 1950, quando a produção de ratos e camundongos isentos de germes foi estabelecida, o uso desse modelo animal nas ciências biomédicas vem se expandindo. A tecnologia da gnotobiologia depende da habilidade de controlar a composição do ambiente no qual o organismo se desenvolve e funciona. O uso combinado de organismos geneticamente manipulados e gnotobióticos têm o potencial de fornecer novas e importantes informações sobre como uma bactéria afeta o desenvolvimento normal, o estabelecimento e a manutenção do sistema imune associado à mucosa e as funções célula epitélio. Além do mais, gnotobiologia pode ajudar no estudo sobre as etiologias de doenças infecciosas, condições inflamatórias agudas e crônicas (FEDORAK, 1995; SARTOR, 1995) e, possivelmente, na gênese de tumores (GORBACH & GOLDIN, 1990).

Os animais GF apresentam uma série de aspectos fisiológicos, morfológicos e imunológicos diferentes daqueles encontrados na presença da microbiota normal. Os animais GF requerem uma nutrição diferenciada, sendo necessário incluir em sua dieta vitamina K

exógena e vitamina B (WOSTMANN, 1981). Animais isentos de germes possuem área total da superfície do intestino delgado menor (MESLIN, 1973). As vilosidades do intestino delgado são maiores e as criptas são mais curtas e contêm menos células (ALAM *et al.*, 1994). Esses animais possuem um grande aumento do ceco, devido, em grande parte, ao acúmulo de muco, que não é degradado pela ausência das bactérias (GUSTAFSSON *et al.*, 1970). Além disso, apresentam menor espessura da parede intestinal, menor motilidade gastrointestinal, menor diferenciação epitelial e linfonodos reduzidos (GUARNER, 2012). Apresentam também menores níveis de óxido nítrico no intestino delgado (SOBKO, 2004), menores níveis de IgA (MOREAU *et al.*, 1978) e a placa de Peyer é reduzida em número e tamanho (GORDON, 1959).

O experimento gnotobiótico (GN) oferece considerável potencial como uma ferramenta no estudo das relações micro-organismo-hospedeiro, porque retrata o hospedeiro quando livre de germes, ou quando modificado por micro-organismos conhecidos ou outras associações; permite o estudo da relação inter-microbiana dentro do organismo do hospedeiro; pode ser usado no estudo de algum fator exógeno ou endógeno onde as ações isoladas de tais fatores podem ou não serem afetadas pela microbiota associada no hospedeiro.

Os equipamentos e procedimentos correntemente em uso que permitem a manutenção do “status” GN de animais experimentais incluem, em essência, equipamentos para transferência do feto maduro do útero para o interior de isoladores de plástico, estéreis, supridos com filtros de ar e luvas de borracha. Procedimentos de rotina incluem criação e manutenção de animais gnotobióticos em isoladores, esterilização de dietas, água, cama e outros utensílios, por autoclavagem, irradiação ou filtração, quando aplicável (DUCLUZEAU, 1989).

Como os animais gnotobióticos permitem o estudo e reprodução de mecanismos de interação entre micro-organismos e hospedeiro, que não são observados por meio de experimentos *in vitro* (GORDON & PESTI, 1971), eles constituem um excelente modelo na avaliação do potencial probiótico de certos micro-organismos (FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; NARDI *et al.*, 1991, NEUMANN *et al.*, 1998; NICOLI & RAIBAUD, 1990; PERET FILHO *et al.*, 1998, RODRIGUES *et al.*, 1996, RODRIGUES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 1999). Muitos estudos mostram que os animais isentos de germes, quando infectados por patógenos podem, em alguns casos, se mostrarem mais resistentes e, em outros, mais susceptíveis (VIEIRA *et al.*, 1998).

2.5 Probiótico

Segundo a Organização Mundial da Saúde: “Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Para ser considerado probiótico o micro-organismo não pode ser patogênico, tem que resistir ao ambiente gastrointestinal e permanecer nesse local em quantidades elevadas, além de ser capaz de conferir algum benefício à saúde do hospedeiro. Os principais micro-organismos usados como probióticos são bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mas algumas linhagens de *E. coli* e *Bacillus* spp. também são incluídas dentro desse grupo. A única levedura que atualmente possui efeito probiótico comprovado em humanos é a *Saccharomyces boulardii* (VIEIRA, TEIXEIRA & MARTINS, 2013).

Esses micro-organismos agem por meio de uma variedade de mecanismos para fornecer benefícios ao seu hospedeiro, incluindo: a competição com potenciais patógenos por nutrientes ou sítios de adesão nos enterócitos, o estímulo à produção de muco pelas células caliciformes, a ação sobre a integridade da barreira da mucosa, a produção de substâncias antagonistas contra patógenos e a imunomodulação local e sistêmica (Figura 2) (GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010). Dessa forma, tem sido proposto o uso de probióticos para diversas enfermidades que acarretam o trato intestinal em seres humanos e animais, principalmente aquelas em que a microbiota indígena tem função relevante na patogênese (SANDERS *et al.*, 2013).

Os probióticos têm sido utilizados com sucesso para tratar várias doenças causadas por protozoários, incluindo criptosporídeos (PICKERD *et al.*, 2004), giardíase (BESIRBELLIOGLU *et al.*, 2006) e coccidiose (DALLOUL *et al.*, 2005). Eles também tem sido efetivos contra infecções por helmintos, *Trichinella spiralis* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2001) e *Toxocara canis* (BASUALDO *et al.*, 2007).

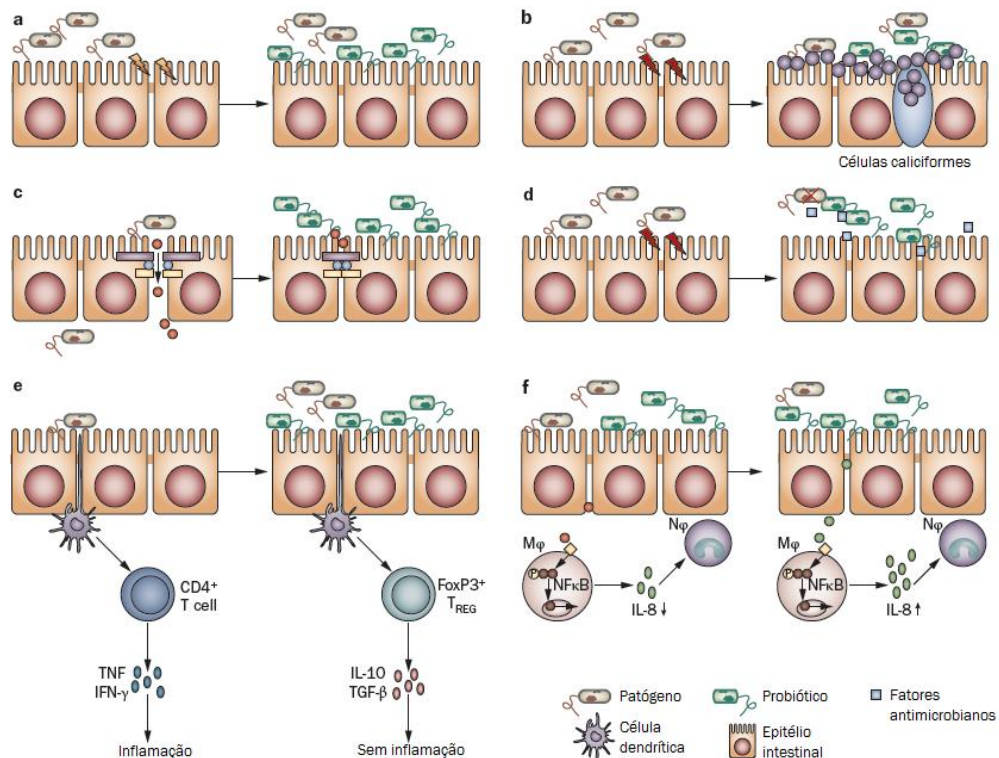


Figura 2. Alguns dos potenciais mecanismos de ação dos probióticos. Probióticos podem fornecer efeitos benéficos às células do epitélio intestinal por numerosas vias. Algumas linhagens podem bloquear a entrada de patógenos para dentro das células epiteliais (a) ao fornecerem uma barreira física (resistência à colonização) ou (b) ao fortalecerem a barreira de muco, estimulando a liberação de mucinas pelas células caliciformes. (c) Outros micro-organismos mantêm a permeabilidade intestinal aumentando a integridade das junções oclusivas, por exemplo, pelo aumento da expressão de Zona ocludina 1 (uma proteína das junções oclusivas) ou prevenindo a redistribuição das proteínas dessas junções, o que evita a passagem de moléculas para dentro da lâmina própria. (d) Alguns probióticos produzem substâncias antimicrobianas. (e) Algumas linhagens estimulam o sistema imunológico por meio das células dendríticas que, então, se translocam para os linfonodos e induzem células TReg a produzirem citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF- β . (f) Outros probióticos (ou seus produtos) podem, também, impedir a resposta imune inata atuando na ativação do NF- κ B, com conseqüente diminuição na produção de IL-8 e no recrutamento de neutrófilos para o local de injúria (lado esquerdo) ou eles podem, também, fazer o inverso, aumentando o recrutamento de células inflamatórias (lado direito). Legenda: M ϕ : Macrófagos; N ϕ : Neutrófilos; Célula Treg: Linfócito T Regulatório. Fonte: GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010 (Adaptado).

2.5.1 *Bifidobacterium longum* 5^{1A}

O gênero *Bifidobacterium* é composto por bactérias Gram-positivo (ou seja, apresentam parede celular com uma espessa camada de peptidoglicano contendo polissacarídeos, proteínas e ácidos teicóicos), não produtoras de gases, catalase-negativo e de elevado conteúdo guanina e citosina no DNA. Essas bactérias são bastonetes desprovidos de flagelos e incapazes de formar esporos. Sua morfologia é variável (pleomórfica), podendo apresentar-se como bastonetes curvos e, geralmente, são bifurcados em forma de V ou Y (forma bífida) (ARUNACHALAM, 1999; GOMES & MALCATA 1999; LEAHY et al., 2005). São descritas, ainda, como anaeróbios obrigatórios (SCARDOVI, 1986) – algumas linhagens podem ser bastante aerotolerantes (SIMPSON et al., 2004) –, possuindo pH ótimo para crescimento entre 6,5 e 7,0 (MATSUMOTO et al., 2004) e temperatura ótima de crescimento entre 37°C e 41°C, não crescendo em temperaturas inferiores a 25-28°C ou superiores a 43-45°C (ARUNACHALAM, 1999; GOMES & MALCATA, 1999; LARROIA & MARTIN, 1991; SCARDOVI, 1986).

Bifidobacterium longum 5^{1A} é uma bactéria gram-positiva que foi isolada a partir de fezes de uma criança saudável, tendo sido identificada por ferramentas moleculares e mantida no Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG. Esta bactéria demonstrou ser eficaz contra a prisão de ventre em crianças num ensaio clínico humano (GUERRA et al., 2011). Além disso, *B. longum* 5^{1A} demonstrou ser capaz de proteger camundongos infectados oralmente contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (SOUZA et al., 2012).

2.5.2 *Bacillus clausii*

Bacillus clausii (Sanofi-Aventis®, Enterogermina, América do Sul) são bactérias gram-positivo, formadora de esporos, aeróbios estritos e catalase-positivo (FULLER, 1989). Estimulam a proliferação de células CD4⁺ e atividade linfocítica nas placas de Peyer (BARANWAL & SINGHI, 2008). Além disso, *B. clausii* é capaz de sobreviver ao ambiente estomacal e colonizar o intestino mesmo na presença de antibióticos (DUC et al., 2004). Também estimula a produção de IgA (FIORINI et al., 1985). *B. clausii* foi usado por 40 anos na Itália com excelente tolerabilidade e sem relato de efeitos colaterais (SENESI et al., 2001).

2.5.3 *Escherichia coli* Nissle 1917

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) foi originalmente isolada pelo fisiologista, microbiologista e médico alemão Alfred Nissle (1874-1965) em 1917, durante uma pesquisa em busca de linhagens selvagens de *E. coli* com atividade antagonista contra patógenos

entéricos. Tal descoberta ocorreu durante a Primeira Guerra Mundial, sendo esta linhagem isolada das fezes de um oficial que apresentara uma alta resistência a todas as desordens intestinais, altamente prevalentes no sudeste da Europa. (ALTENHOEFER et al., 2004; SCHULTZ, 2008). EcN (Mutaflor®, Ardeypharm, Canadá) é uma bactéria Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, uma linhagem probiótica amplamente utilizada e alguns estudos *in vivo* já demonstraram sua atividade probiótica promissora em animais e humanos (SCHIERACK et al., 2011). Apesar de seu sucesso a aplicação terapêutica, é pouco conhecida as características benéficas deste probiótico, já que seu genoma foi totalmente sequenciado, tornou-se evidente que esta linhagem, em contraste com outras linhagens não patogênicas, exibe um padrão específico de fatores de adaptação (por exemplo, microcinas, adesinas, proteases), mas não apresenta fatores de virulência como *E. coli* α -hemolisina. O antagonismo expressivo existente de EcN contra outros membros da microbiota intestinal é baseado em parte na produção de microcinas (SCHULTZ, 2008; BURES et al., 2011).

2.5.4 *Saccharomyces boulardii*

Em meados de 1920, na Indochina, um microbiologista francês, Henri Boulard, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas a fim de produzir um bom vinho. Durante esta época houve uma epidemia de cólera em uma das vilas que ele visitava e ele foi informado que a população local preparava um chá da casca de uma fruta local (lichia) para aliviar e até mesmo parar a diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta, na verdade, estava recoberta por uma levedura, e a eficácia contra a diarreia se devia a esta levedura, que foi chamada de *Saccharomyces boulardii* (FLORASTOR, 2003). A *S. boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce à 37°C) e, atualmente, de uso muito difundido na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da microbiota e o efeito da administração oral de probiótico na sobrevida e no desenvolvimento da patologia em camundongos convencionais e isentos de germes *Swiss* infectados oralmente com cistos de *Toxoplasma gondii*.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver curva de sobrevida em animais convencionais e isentos de germes infectados por *T. gondii*, observados por no mínimo 30 dias.

- Avaliar o desenvolvimento ponderal em camundongos convencionais infectados e em camundongos isentos de germes infectados por *T. gondii*, após 8 dias de infecção.
- Verificar se há alteração da permeabilidade e integridade intestinal entre os animais convencionais e isentos de germes infectados por *T. gondii*, após 8 dias de infecção.
- Detectar potenciais diferenças na anatomia patológica dos órgãos vulneráveis (intestino, fígado, baço, pulmão e cérebro) dos camundongos convencionais e isentos de germes infectados por *T. gondii*, após 8 dias de infecção.
- Avaliar o papel da microbiota na infecção por *T. gondii* em animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por *T. gondii*, determinando: Níveis de IgA secretora no conteúdo intestinal; Níveis de MPO e NAG; Níveis de citocinas anti-inflamatória (IL-10, TGF- β); Níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α); Nível da quimiocina (RANTES/CCL5); após 8 dias de infecção.
- Avaliar a sobrevivência de animais convencionais infectados por *T. gondii* comparativamente com animais convencionais infectados e tratados com quatro tipos de probiótico diferentes (*Bacillus clausii*, *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Escherichia coli* Nissle 1917 e *Saccharomyces boulardii*), observados por no mínimo 30 dias.
- Avaliar o desenvolvimento ponderal em camundongos convencionais infectados comparativamente aos animais tratados com os probióticos acima citados.
- Verificar se há alteração da permeabilidade e integridade intestinal nos grupos experimentais, após 8 dias de infecção.
- Detectar potenciais diferenças na anatomia patológica dos órgãos vulneráveis (intestino, fígado, baço, pulmão e cérebro) dos camundongos dos grupos tratados e não tratados, após 8 dias de infecção.
- Avaliar o efeito dos probióticos (*S. boulardii* e *E. coli* Nissle 1917) na infecção por *T. gondii* em animais experimentais comparativamente com os animais não tratados, determinando: Níveis de IgA secretora no conteúdo intestinal; Níveis de MPO e NAG; Níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β); Níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α); Nível da quimiocina (RANTES/CCL5); após 8 dias de infecção.
- Discutir os prováveis mecanismos de ação da microbiota e dos probióticos, indicar o potencial protetor dos mesmos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

4.1.1 Animais isentos de germes (GF).

Foram utilizados camundongos GF de 6 a 7 semanas de idade, fêmea, da linhagem NIH/Swiss (Taconic, Germantown, USA). Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, USA) e manuseados de acordo com técnicas já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Os animais receberam ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água, esterilizados por calor úmido, *ad libitum*. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands), em estante ventilada do Laboratório de Fisiologia e Ecologia de Micro-organismo do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG.

4.1.2 Animais Convencionais (CV).

Foram utilizados camundongos convencionais de 6 a 7 semanas de idade, da linhagem *Swiss*, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas modelo ALE. MIL.01.03 (Alesco), no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água, esterilizados por calor úmido. Um ciclo diurno/noturno de 12h foi mantido no biotério, assim como aeração e temperatura controladas. A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida respeitando as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2006)”. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob protocolo número 394/2013 (Anexo A).

4.2 Infecção por *Toxoplasma gondii*

O trabalho realizado por Carneiro e colaboradores teve como resultado o isolamento de 27 cepas de *T. gondii* a partir do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais. Esses isolados foram denominados de TgCTBR1 a

TgCTBR27 (*Toxoplasma gondii* Congenital Toxoplasmosis from Brazil) e apresentaram diferentes perfis genéticos e de virulência em camundongos (CARNEIRO et al., 2013). O isolado obtido deste trabalho (TgCTBr07) foi utilizado para a padronização e execução desse projeto de pesquisa. Cérebros de camundongos *Swiss* cronicamente infectados com uma cepa de virulência intermediária foram macerados a seco em tubos de hemólise e posteriormente foi adicionado 1ml de tampão fosfato (PBS) estéril, essa solução foi homogeneizada com auxílio do vórtex. A contagem dos cistos foi feita em 10µl da solução em lâmina e lamínula (18x18), sob microscopia de luz, os mesmos foram diluídos para a concentração de 10 cistos em 100µl de PBS estéril. Para a manutenção da cepa, o volume e a concentração previamente estabelecidos foram inoculados nos animais pelo método de gavagem. Animais com 30 dias de infecção se tornam elegíveis para o repique da cepa ou utilização dos seus cistos em ensaios experimentais. Animais de 6 a 7 semanas foram infectados por inoculação intragástrica com 100µl de PBS contendo 10 cistos de *T. gondii*, conforme descrito acima.

4.3 Probióticos

A bactéria *Bifidobacterium longum*^{51A} foi repicada em caldo MRS (de Man, Rogosa e Shape) (Difco, Detroit, MI, USA), e crescida, sob condições de anaerobiose (Forma Scientific Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, à 37°C e sem agitação por 48h. As culturas de *Bacillus clausii* foram realizadas caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) durante 24 horas à 37 °C. A bactéria *Escherichia coli* Nissle 1917 foi cultivada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), à 37°C e sem agitação por 24 horas. As culturas de *S. boulardii* foram obtidas por inoculação de uma preparação liofilizada comercial de levedura (Floratil®, Merck, Rio de Janeiro, Brasil), e em crescimento durante a noite à 37°C, com agitação, em caldo YPG (extrato de levedura 1%, peptona a 2%, e 2% de glicose). A cultura foi, em seguida, concentrada no mesmo meio para obter 9,0 log de unidades formadoras de colônias (UFC) ml⁻¹. Para a administração oral dos animais as bactérias e leveduras foram centrifugadas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%), no momento da inoculação.

4.4 Desenho Experimental

4.4.1. Animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por *T. gondii*.

4.4.1.1 Curva de Sobrevida

Para a curva de sobrevida utilizamos 20 animais, sendo 10 animais convencionais e 10 animais isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária

(TgCTBr07) por meio de inoculação intragástrica e foram acompanhados durante todo o período experimental.

4.4.1.2. Análise da permeabilidade intestinal

Para a análise da permeabilidade intestinal 12 animais convencionais e 12 animais isentos de germes foram divididos em 4 grupos (n=6 em cada grupo): (CTL-CV) grupo controle – CV; (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária; (CTL-GF) grupo controle – GF; (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária.

4.4.1.3. Dosagem de sIgA, citocinas e quimiocinas e análise histopatológica

Foram usados 10 animais convencionais e 10 animais isentos de germes divididos em 4 grupos (n=5 em cada grupo): (CTL-CV) grupo controle – CV; (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária; (CTL-GF) grupo controle – GF; (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

4.4.2 Animais convencionais infectados oralmente por *T. gondii* e tratados ou não diariamente com 4 probióticos diferentes.

4.4.2.1 Curva de sobrevivência dos animais convencionais infectados oralmente por *T. gondii* e tratados ou não diariamente com probiótico.

Os animais foram divididos em cinco grupos (10 animais/grupo), conforme esquema abaixo. Os animais receberam 0,1 mL de probiótico diariamente a uma concentração de 10^8 UFC/mL e foram infectados por inoculação intragástrica com 0,1 mL de PBS contendo 10 cistos de *T. gondii*, no 10º dia experimental. Os animais foram acompanhados diariamente por 50 dias.

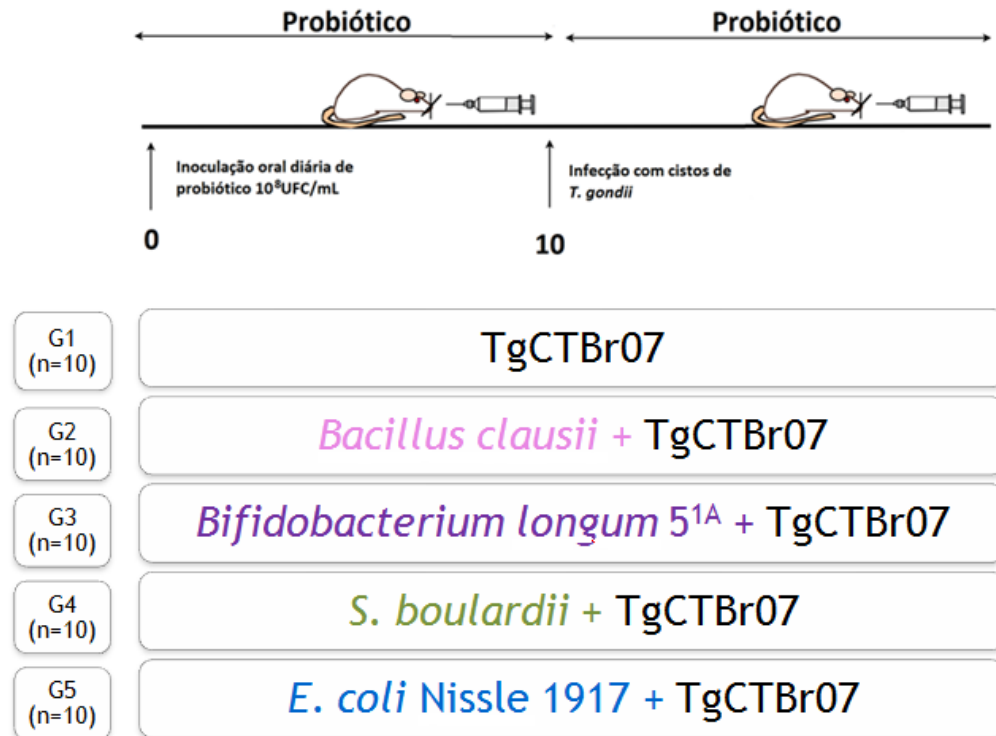


Figura 3. Delineamento para desenvolvimento da curva de sobrevivência. Os animais receberam 0,1 mL de probiótico diariamente a uma concentração de 10⁸ UFC/mL e foram infectados por inoculação intragástrica com 0,1 mL de PBS contendo 10 cistos de *T. gondii*, no 10^o dia experimental. Legenda: TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; Bc: *Bacillus clausii*; BL: *B. longum*^{51A}; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917; SB: *Saccharomyces boulardii*.

4.4.2.2 Animais convencionais infectados oralmente por *T. gondii* e tratados ou com *Saccharomyces boulardii* e *E. coli* Nissle 1917.

Após curva de sobrevivência, dois probióticos foram eleitos para estudo. Os animais foram divididos em 6 grupos, conforme esquema abaixo:

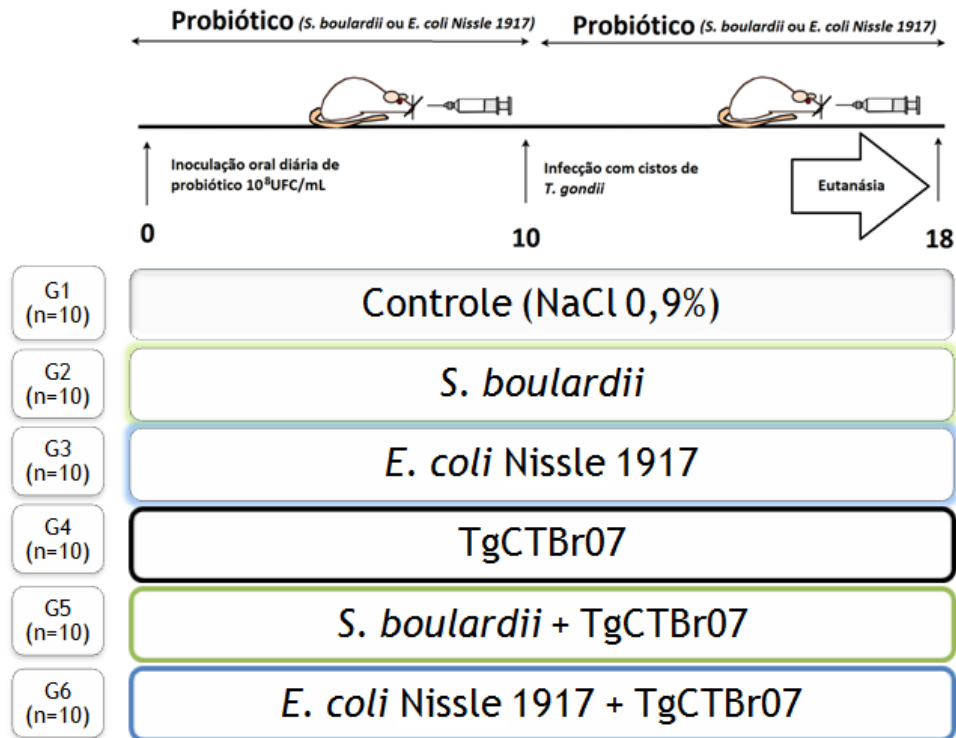


Figura 4. Delineamento experimental com identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados. Os animais receberam 0,1 mL de probiótico diariamente a uma concentração de 10^8 UFC/mL e foram infectados por inoculação intragástrica com 0,1 mL de PBS contendo 10 cistos de *T. gondii*, no 10º dia experimental. Após 8 dias de infecção os animais foram eutanasiados. Legenda: CTL: controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; Sb: *Saccharomyces boulardii*; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917.

Os animais foram pesados durante todo o período experimental, para análise do desenvolvimento ponderal. Ao final do experimento, todos os animais foram anestesiados para coleta do sangue, através do plexo-axilar e o soro separado. Após essa coleta, eles foram sacrificados por deslocamento cervical, e foram coletados intestino delgado, fígado, baço e pulmão para dosagem enzimáticas e análises histológicas, o cérebro para análise histológica, além do fluido intestinal para avaliar os níveis de sIgA. Foi ainda realizado um experimento para medir a permeabilidade intestinal por meio da quantificação do ^{99m}Tc -DTPA no sangue dos camundongos após os tratamentos.

4.5 Determinação da Permeabilidade Intestinal.

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no plasma após a administração intragástrica de ^{99m}Tc -DTPA (Ácido Dietilenotriaminopentacético Marcado com Tecnécio). No 8º dia experimental, todos os camundongos (n=6) receberam, por inoculação intragástrica, 0,1 mL de solução contendo 18,5 MBq (Megabequerel) de ^{99m}Tc -DTPA. Após 240 minutos, os animais foram anestesiados e tiveram sangue coletado e pesado para determinação da radioatividade (VIANA et al. 2010). Os dados foram expressos como % dose, usando a seguinte equação: % Dose = (CPM de sangue/CPM de dose administrada) x 100, onde CPM representa contagem por minuto.

4.6 Dosagem de sIgA.

O intestino delgado foi removido, pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, na proporção de 500 mg do conteúdo/2,0 ml de PBS, foi centrifugado (5000 rpm, por 30 min, a 4°C), o sobrenadante foi recolhido e congelado a -86°C, para posterior dosagem de imunoglobulinas. A determinação do nível de sIgA total foi realizada pelo método de ELISA de captura. Para revestimento das placas, foram utilizados anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) de camundongo, desenvolvido em cabra. Utilizou-se os anticorpos, desenvolvidos em cabra, conjugados com a peroxidase, anti-IgA (A-4789, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) de camundongo para detecção das sIgA. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As unidades de densidade óptica foram determinadas, a 492 nm, em um leitor de placas (ELISA READER, 2550, BioRad Laboratories, Hercules, USA) e a concentração de sIgA foi dada em µg/g de conteúdo intestinal.

4.7 Processamento das amostras para dosagens de citocinas e quimiocinas.

Foram pesados 100 mg dos órgãos e homogeneizados em 1,0 mL de uma solução para extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO₄ 10mM, PMSF 0,1mM, cloreto de benzetonio 0,1mM, EDTA 10mM, tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20mM KI, aprotinina), na relação de 10% peso/volume, e posteriormente centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes recolhidos e estocados a -80°C, para posterior análise.

4.7.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida dos níveis de citocinas e quimiocinas.

O ensaio imunoenzimático foi realizado a partir do sobrenadante do extrato do intestino delgado obtido conforme procedimento descrito acima. A concentração utilizada para os anticorpos e reagentes foi baseada nos protocolos dos fabricantes (R&D Systems, e Pharmingen). Placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram inicialmente, recobertas com anticorpo purificado, 100µl/poço em PBS 1X pH 7,4, específico para a molécula em análise (TNF α , IFN γ , RANTES/CCL5, TGF- β e IL-10) e incubadas por 18 horas a 4°C. Numa segunda etapa, as placas foram lavadas em PBS 1X acrescido de Tween 20 e bloqueadas em BSA 1% em PBS 1X (200µl/poço) por 2 horas sob agitação. Amostras do sobrenadante do extrato do intestino delgado foram diluídas 1:3 em BSA 1% PBS foram adicionadas (100µl/poço), seguindo de incubação 18 horas a 4°C. Posteriormente, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após 1 hora, foi utilizada uma solução de streptavidina acoplada a enzima peroxidase (HRP, 1:4000) na concentração de 5µl/ml, seguindo de incubação por 20 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição de 100µl/poço do cromógeno OPD 4mg/ml, contendo H₂O₂ (2µl) em tampão citrato pH 5,0 e a absorbância lida em espectrofotômetro a 492nm. A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão correspondente.

4.8 Processamento das amostras para dosagens de MPO E NAG.

A detecção das atividades de MPO e NAG foram feitas no “pellet”, após processamento das amostras para dosagens de citocinas e quimiocinas. Desta maneira, o pellet foi ressuspendido em 1,9 mL de “Buffer 1” (0,1M NaCl, 0,02M NaPO₄, 0,015M NaEDTA; pH 4,7), homogeneizado por 1 minuto; 0,8 mL de NaCl 0,2% foi adicionado e homogeneizado novamente; 0,8mL de NaCl 1,6% com 5% de glicose foi adicionado, homogeneizado. Após esta etapa, o volume total (1,9mL) foi dividido em dois tubos, 0,8mL para cada tubo, para MPO e NAG, respectivamente. Estas amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos, a uma velocidade de 10.000 rpm e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Para o ensaio de NAG, as amostras foram ressuspendidas e homogeneizadas em 0,8mL de salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100 centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 10.000 rpm e o ensaio foi feito com o sobrenadante destas amostras. Para o ensaio de MPO, as amostras foram ressuspendidas e homogeneizadas em 0,8 mL de “Buffer 2” (0,05M Na₃PO₄, 0,5% HETAB; pH5,4), congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após esta etapa, as amostras para MPO foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

4.8.1 Ensaio para detecção dos níveis de Mieloperoxidase (MPO) tecidual.

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. O ensaio utiliza 25 µL de sobrenadante das amostras de tecidos previamente processadas 25µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) com concentração final de 1,6mM, 100µL de tampão fosfato (0,05M Na₃PO₄, 0,5% HETAB; pH 5,4) com H₂O₂ diluído numa concentração final de 0,003% v/v. A reação se inicia pela adição de tetrametilbenzidina as amostras em placas de 96 poços, a 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa adicionou-se 100 µL de H₂SO₄ 4M para término da reação. As reações foram lidas em leitor de ELISA em uma densidade óptica de 450nm.

4.8.2 Ensaio para detecção dos níveis de N-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual.

A avaliação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) foi utilizada como índice de recrutamento de macrófagos nos tecidos. A reação foi iniciada pela adição de 100µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (sigma), diluídos em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄ 0,1M, pH4,5), em placas de 96 poços, por 10 minutos a 37°C. Ao final desta etapa adicionou-se 100µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6) para término da reação. As reações foram lidas em leitor de ELISA em uma densidade óptica de 405nm.

4.9 Análise histológica.

O processamento do intestino delgado foi realizado de acordo com o método descrito por Calvert e colaboradores (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997). Seguindo essa metodologia, os órgãos foram cortados separadamente, estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Estes 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. Os órgãos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal em direção à proximal. Os rolos amarrados com linha e os demais órgãos (fígado, baço, pulmão e cérebro) foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas. As amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para interpretação histológica de rotina e os aspectos qualitativos decorrentes da infecção por *T. gondii* foram avaliados.

4.9.1 Análise morfométrica.

Pulmão: Para as análises morfométrica das áreas lesionadas no pulmão foram obtidas imagens no microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) de toda área do corte histológico, onde foram considerados dez campos do órgão, no aumento de 10x nas lâminas coradas por H&E, mensurando a área septal e a área total amostrada. Os resultados foram representados na razão entre área septal e a área total, e indica o score da lesão pulmonar.

Intestino: Para quantificar o grau de acometimento do intestino delgado foram considerados dez campos do órgão, no aumento de 4x nas lâminas coradas por H&E, o perímetro total das imagens e o perímetro total das áreas com presença e sinais de lesão (estes definidos pela perda da arquitetura do intestino, erosões superficiais e área de inflamação da camada epitelial). Os resultados foram representados como extensão da lesão intestinal e indicam o score da lesão intestinal. As imagens 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). Para as medições foi utilizado o programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível on line no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

4.9.2 Análise semiquantitativa do fígado.

As amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e examinadas em microscópio de luz. O score histológico foi determinado nas amostras do fígado que foram fixados em solução de formol a 4% por 24 horas de acordo com os seguintes parâmetros avaliados a partir de: de 0 a 4 (0, sem alterações no parênquima e sem aumento de celularidade; 1, Foco isolado de células inflamatórias mononucleares (<10 células), no máximo um foco por todos os campos; 2, Focos de infiltrados distribuídos no parênquima (>10 células por foco), até 2 focos por campo; 3, Focos frequentes 2 a 6 por campo; 4, Focos frequentes e convalescentes acompanhados de necrose >5 por campo. Toda a extensão das amostras (n=5). de dois experimentos repetidos foram examinadas com a objetiva de 10X.

4.10 Análises estatísticas.

Os resultados obtidos de no mínimo dois experimentos independentes foram avaliados quanto à significância estatísticas pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ou Bonferroni. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste Log Rank Survival. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças $< 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Papel da microbiota na toxoplasmose experimental murina.

5.1.1 Curva de sobrevivência e desenvolvimento ponderal de animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por *T. gondii*.

Os animais convencionais infectados com a cepa TgCTBr07 de *T. gondii* não apresentaram diferença na sobrevivência (Fig. 5A) quando comparados aos animais isentos de germes ($p=0,2417$). Entretanto, aos 7 dias de infecção os animais isentos de germes preveniram a perda de peso em relação aos animais convencionais ($p<0,001$). Esta diferença foi pontual e não se manteve após 8 dias de infecção (Fig. 5B).

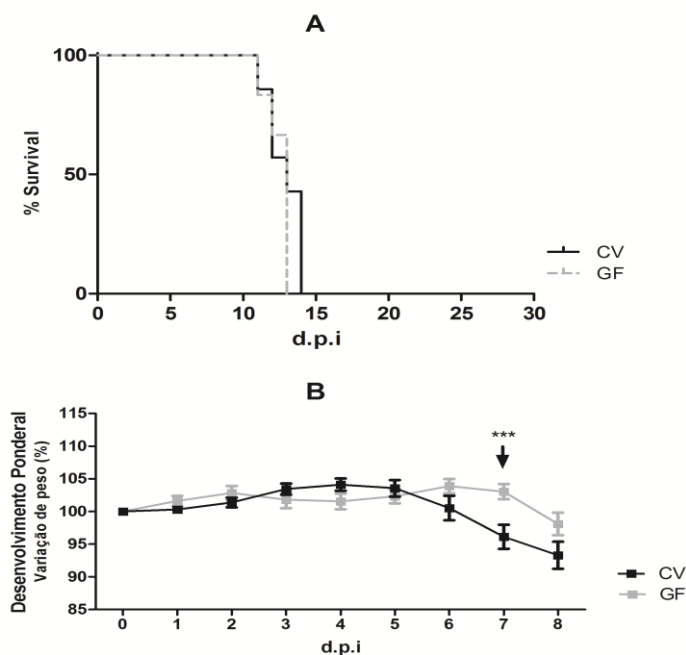


Figura 5. Papel da microbiota na sobrevivência (A) e no desenvolvimento ponderal (B) em camundongos infectados oralmente com cistos de *T. gondii* (TgCTBr07). Curva de sobrevivência foi analisada pelo teste Log Rank Survival, $n=10$; Desenvolvimento ponderal foi analisado pelo teste ANOVA two-way, seguido por pós-teste de Bonferroni, $n=10$; (***)= $p<0,001$). Legenda: CV: convencionais; GF: germ-free.

5.1.2 Permeabilidade intestinal e produção de sIgA de animais convencionais e isentos de germes infectados oralmente por *T. gondii*.

A avaliação da permeabilidade intestinal foi obtida pela quantificação da radiação emitida pelo ^{99m}Tc -DTPA translocado do intestino para o sangue. Os animais convencionais do grupo infectado tiveram a permeabilidade intestinal aumentada significativamente quando comparados aos animais dos grupos controles e ao grupo de animais isentos de germes infectados com *T. gondii* ($p < 0,001$), conforme figura 6.

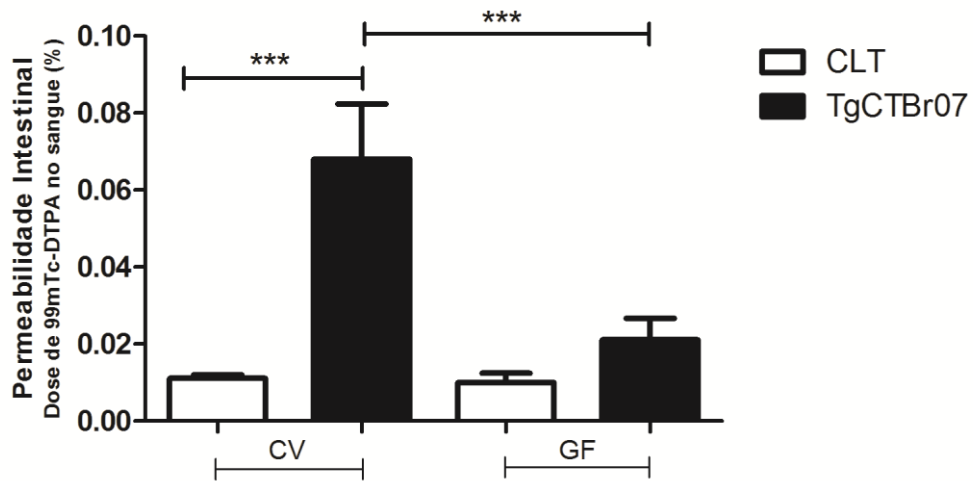


Figura 6. Avaliação da permeabilidade intestinal dos animais convencionais e dos animais isentos de germes. Os animais convencionais e isentos de germes foram infectados pela cepa TgCTBr07 de *T. gondii* e eutanasiados ao oitavo dia experimental. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls. (***) $p < 0,001$, ($n = 5$). Legenda: CTL: controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; CV: convencionais; GF: germ-free.

A produção de sIgA (Fig. 7) nos animais controle convencionais é estatisticamente maior em relação aos animais controle isentos de germes. Enquanto a produção de sIgA aumentou significativamente na presença de infecção nos animais convencionais, o mesmo não aconteceu nos animais GF.

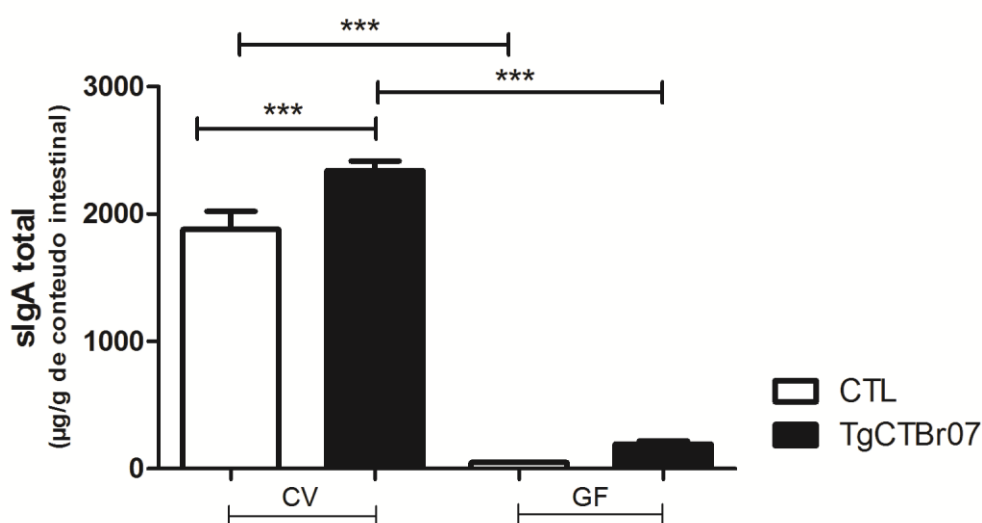


Figura 7. Dosagem da Imunoglobulina A secretora no conteúdo intestinal. Os animais convencionais e isentos de germes foram infectados pela cepa TgCTBr07 de *T. gondii* e eutanasiados ao oitavo dia experimental. Legenda: CTL: controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Newman-Keuls (n=6); * =p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001).

5.1.3 Intestino Delgado

5.1.3.1 Análise histopatológica e morfométrica do intestino delgado.

O íleo e jejuno dos animais convencionais infectados com a cepa TgCTBr07 de *T. gondii* apresentam alterações histológicas de distribuição e intensidade semelhantes. Houve perda focal da integridade da camada mucosa em algumas regiões, grande variabilidade na altura das vilosidades jejunais, aumento da celularidade na mucosa e submucosa, com edema de topo de vilosidades frequentes, associado a perda da borda em escova. Observamos áreas de degeneração das células epiteliais de revestimento, principalmente na superfície das vilosidades (Fig. 8D).

O íleo e jejuno dos animais isentos de germes infectados com a cepa TgCTBr07 de *T. gondii* apresentaram alterações de distribuição e intensidade semelhantes. Houve perda focal da integridade da camada mucosa em algumas regiões, grande variabilidade na altura das vilosidades jejunais, discreto aumento da celularidade na mucosa e submucosa. As alterações degenerativas epiteliais da mucosa foram mais discretas que nos animais convencionais infectados por *T. gondii* (Fig. 8H).

Os animais convencionais infectados por *T. gondii* (TgCTBr07) apresentaram maior extensão de lesão quando comparados aos animais controles e aos animais isentos de germes infectados por *T. gondii*, conforme representação gráfica (Fig. 9).

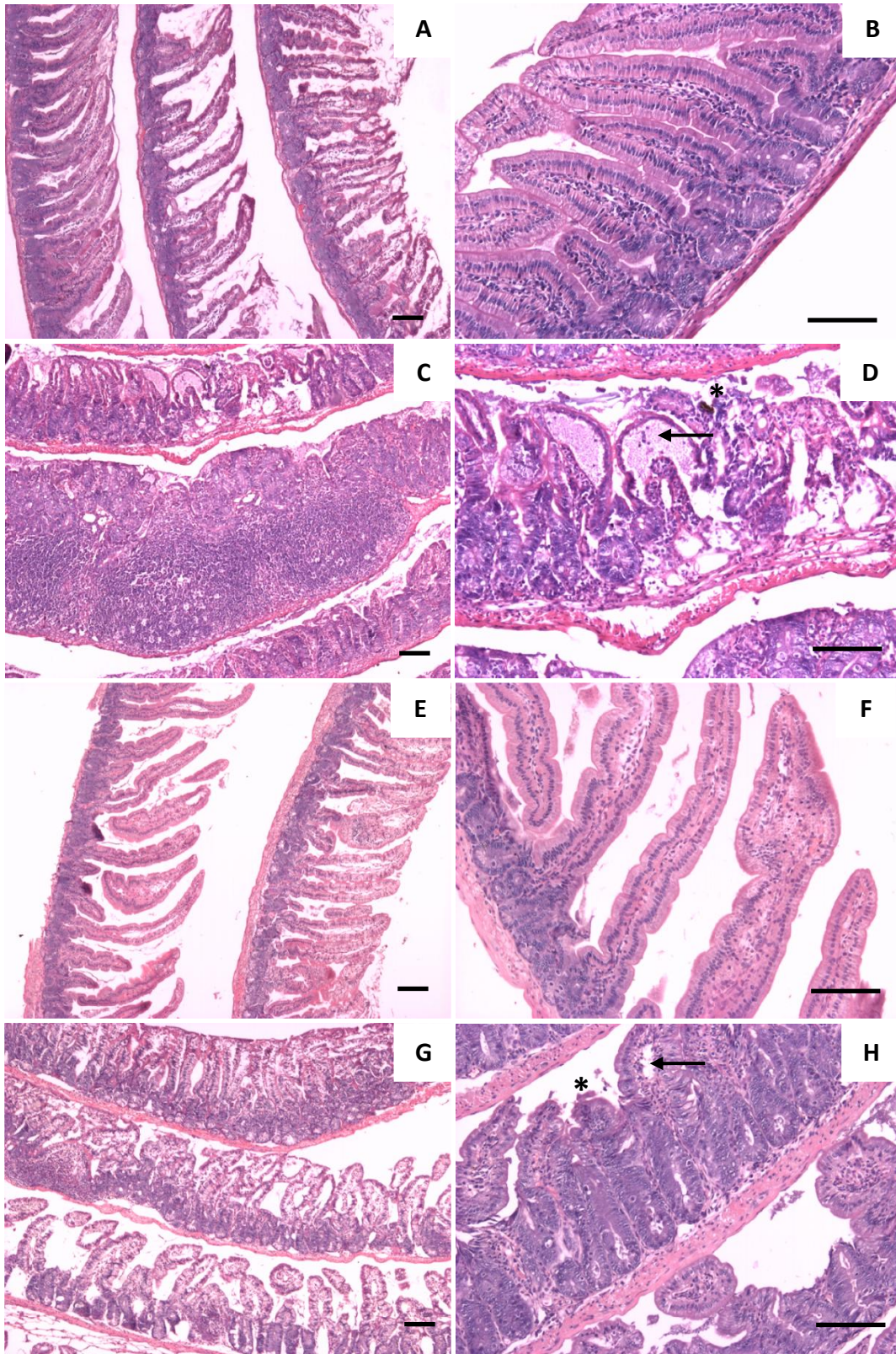


Figura 8. Fotomicrografias de intestino delgado, corado em H&E, de camundongos Swiss. (CTL-CV) grupo controle – CV (A e B); (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária (C e D); (CTL-GF) grupo controle – GF (E e F); (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária (G e H). Em D e H as setas indicam edema de topo de vilosidades e o * indica áreas de perda de integridade epitelial. Aumento de 4X e 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

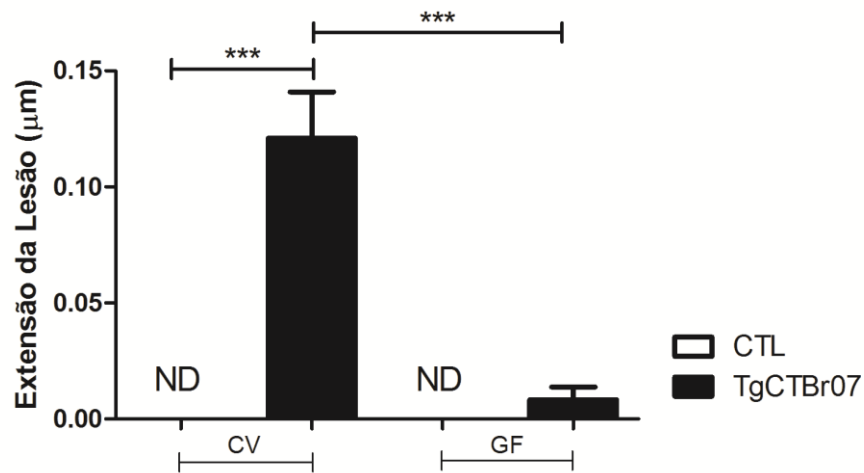


Figura 9. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras do intestino delgado. A amostragem abrangeu a maior área possível do órgão, sob aumento de 4x nas lâminas coradas por H&E, mensurando o perímetro total amostrado e baseado neste perímetro foram avaliados os perímetros com lesão. Legenda: CTL: controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls *** $p < 0,001$ ($n = 4$)).

5.1.3.2 Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras de intestino delgado.

A avaliação qualitativa da presença de neutrófilos e macrófagos foi feita, respectivamente, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO (Fig. 10A) e NAG (Fig. 10B) no intestino delgado. Os animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram diminuição da atividade de mieloperoxidase quando comparados aos animais isentos de germes infectados. Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem de NAG.

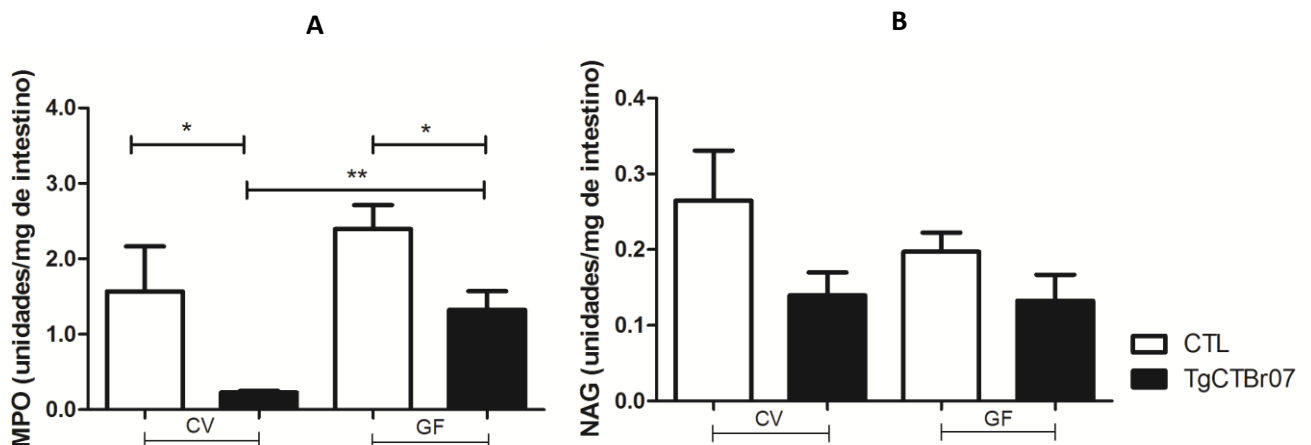


Figura 10. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no intestino delgado. Legenda: CLT: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.1.3.3 Dosagem de citocinas nas amostras de intestino delgado.

Os níveis de TNF- α (Fig. 11A) foram elevados nos animais convencionais infectados por *T. gondii* em comparação aos animais controle e aos animais isentos de germes infectados por *T. gondii*. Entretanto, os níveis de IFN- γ (Fig. 11B) foram mais elevados nos animais infectados por *T. gondii*, quando comparados aos controles. Os níveis da quimiocina RANTES/CCL5 (Fig. 11C) foram elevados nos animais convencionais infectados por *T. gondii* em comparação aos animais controle e aos animais isentos de germes infectados por *T. gondii*. Por outro lado, os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 (Fig. 11D) e TGF- β (Fig. 11E) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

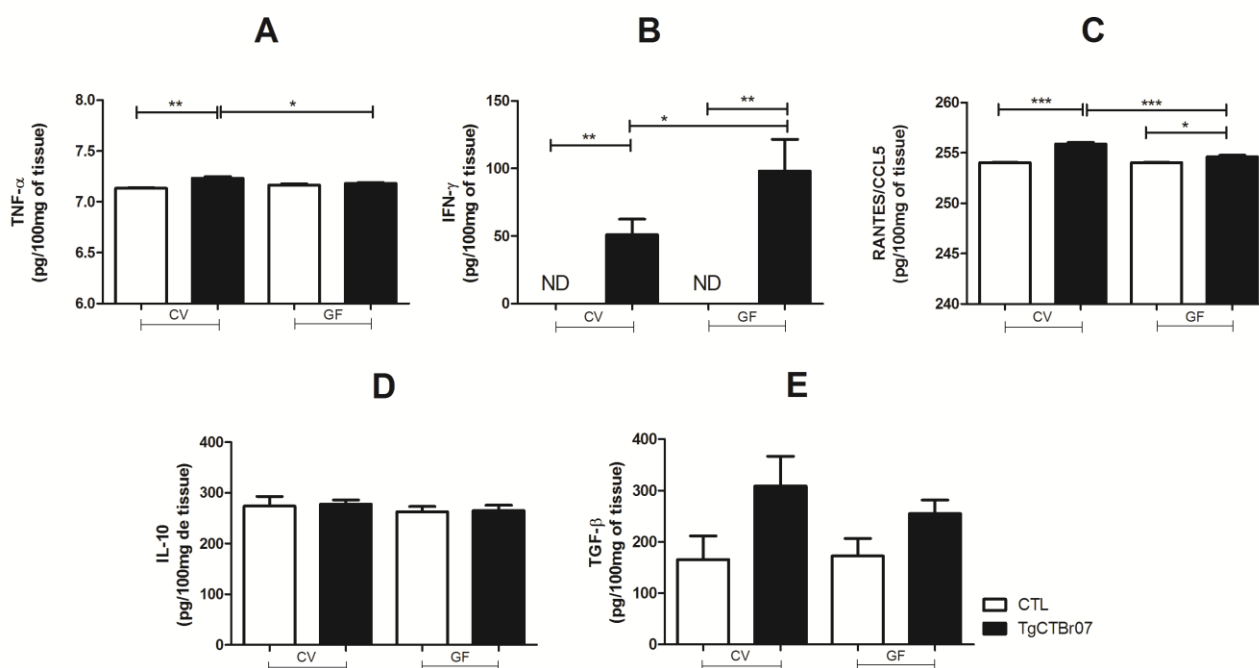


Figura 11. Avaliação da dosagem de citocinas e quimiocinas TNF- α (A), IFN- γ (B), RANTES/CCL5 (C), IL-10 (D), TGF- β (E) no intestino delgado de camundongos convencionais e isentos de germes. Os animais convencionais e isentos de germes foram infectados pela cepa TgCTBr07 de *T. gondii* e eutanasiados ao oitavo dia experimental. Legenda: CTL: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls (n = 6); * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

5.1.4 Fígado

5.1.4.1 Análise histopatológica e avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras de fígado.

Os fígados dos animais CV infectados com a cepa TgCTBr07 de *T. gondii* apresentaram frequentes e difusos focos de infiltrado inflamatório misto de

polimorfonucleares e mononucleares, que permeiam o parênquima hepático com intensas alterações vacuolares dos hepatócitos (Fig. 12C e D). Os fígados dos animais isentos de germes infectados apresentaram focos esparsos e menores em volume. As alterações degenerativas dos hepatócitos são muito discretas.

No score histológico (Fig. 13) observamos que o fígado dos animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram focos de infiltrados inflamatórios frequentes quando comparados aos animais isentos de germes infectados. Este resultado está de acordo com os resultados de infiltrado de neutrófilos e macrófagos, por meio da medida das enzimas MPO e NAG (Fig. 14), respectivamente.

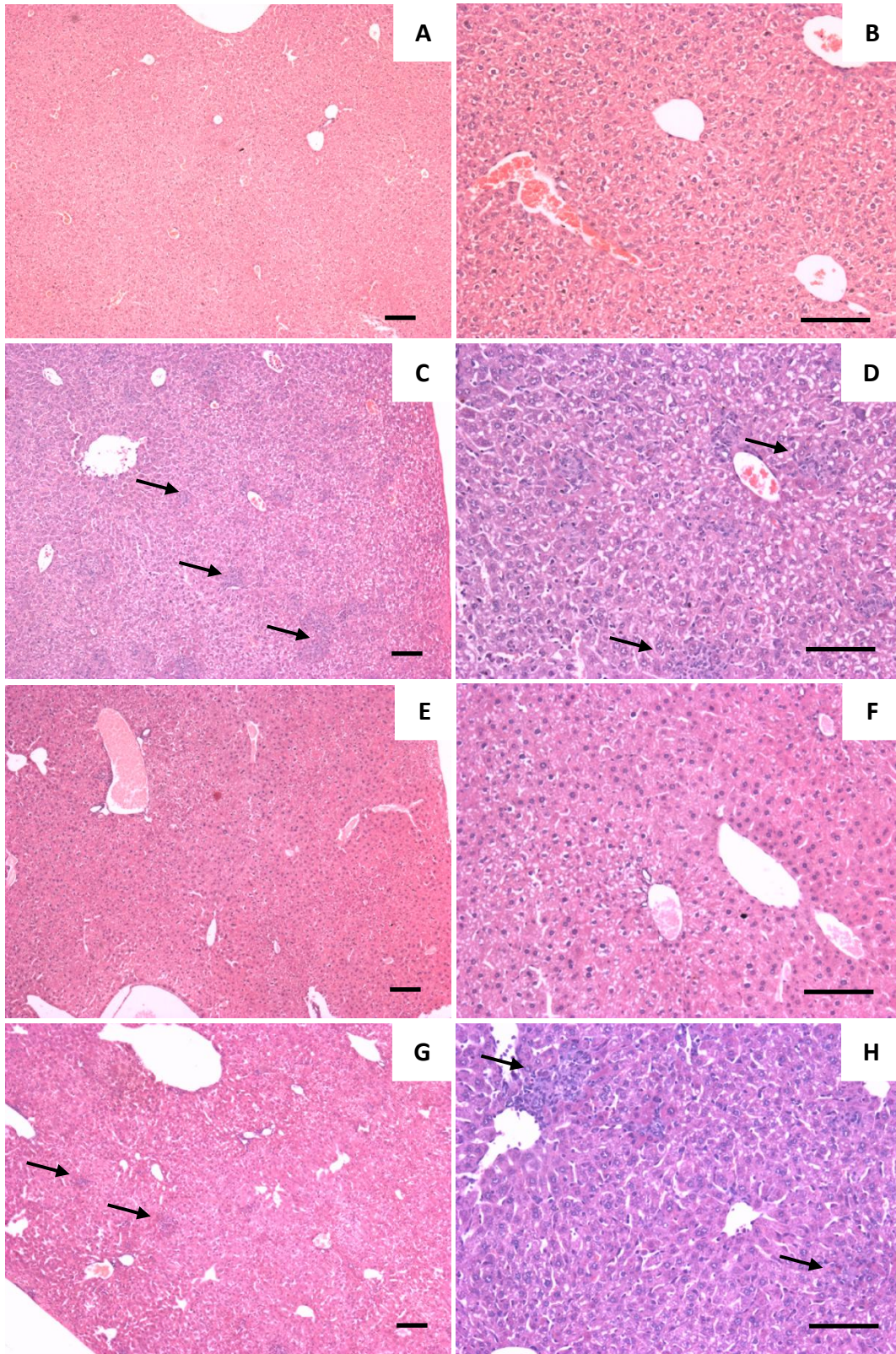


Figura 12. Fotomicrografias de fígado, corado em H&E, de camundongos *Swiss*. (CTL-CV) grupo controle – CV (A e B); (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária (C e D); (CTL-GF) grupo controle – GF (E e F); (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária (G e H). Em C, D, G e H as setas indicam focos de infiltrado inflamatório. Aumento de 4X e 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

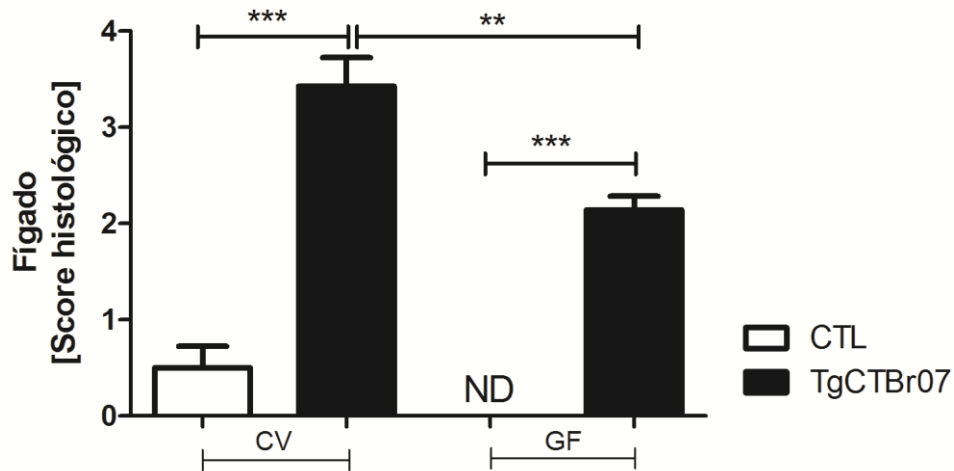


Figura 13. Score histológico do fígado de amostras coradas em H&E, de camundongos Swiss. Os parâmetros utilizados para pontuação histológica foram descritas em Materiais e Métodos. Legenda: CTL: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Bonferroni (n = 6); * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

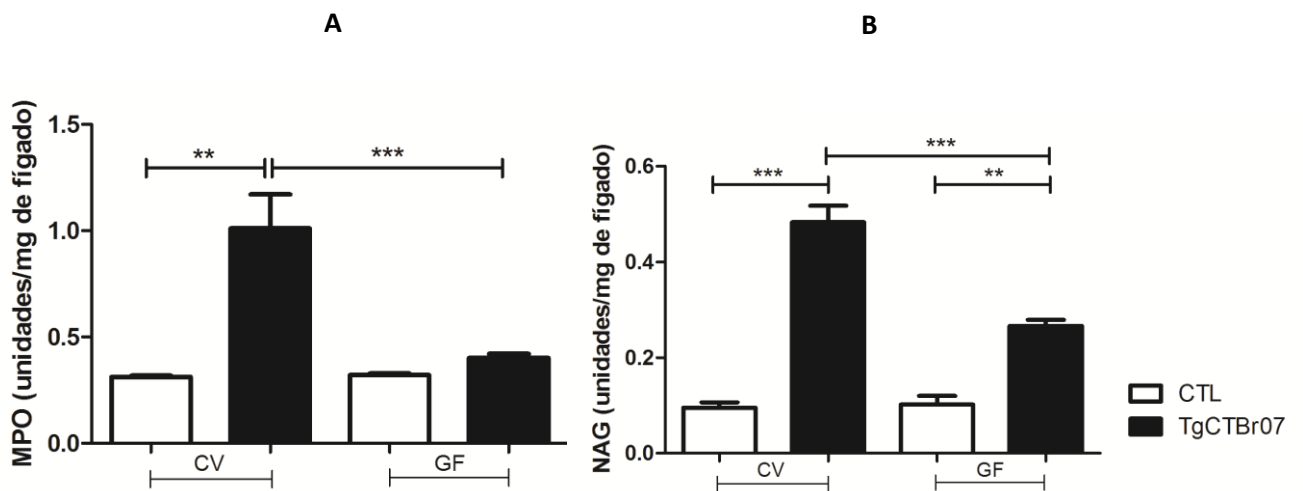


Figura 14. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no fígado. Legenda: CTL: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls (n = 6); * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

5.1.5 Baço

5.1.5.1 Análise histopatológica e avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras de baço.

A histopatologia presente no baço é semelhante em camundongos convencionais e isentos de germes, exceto por uma ligeira diminuição dos folículos e celularidade da polpa vermelha. A infecção induz o aumento na celularidade nos centros germinativos e na polpa vermelha em animais CV, com quase nenhuma alteração nos animais GF (Fig. 15).

A avaliação da população de neutrófilos e macrófagos no baço, por meio da medida das enzimas MPO e NAG (Fig. 16), respectivamente, demonstrou que os animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram maior recrutamento de ambas as células quando comparados aos animais isentos de germes infectados.

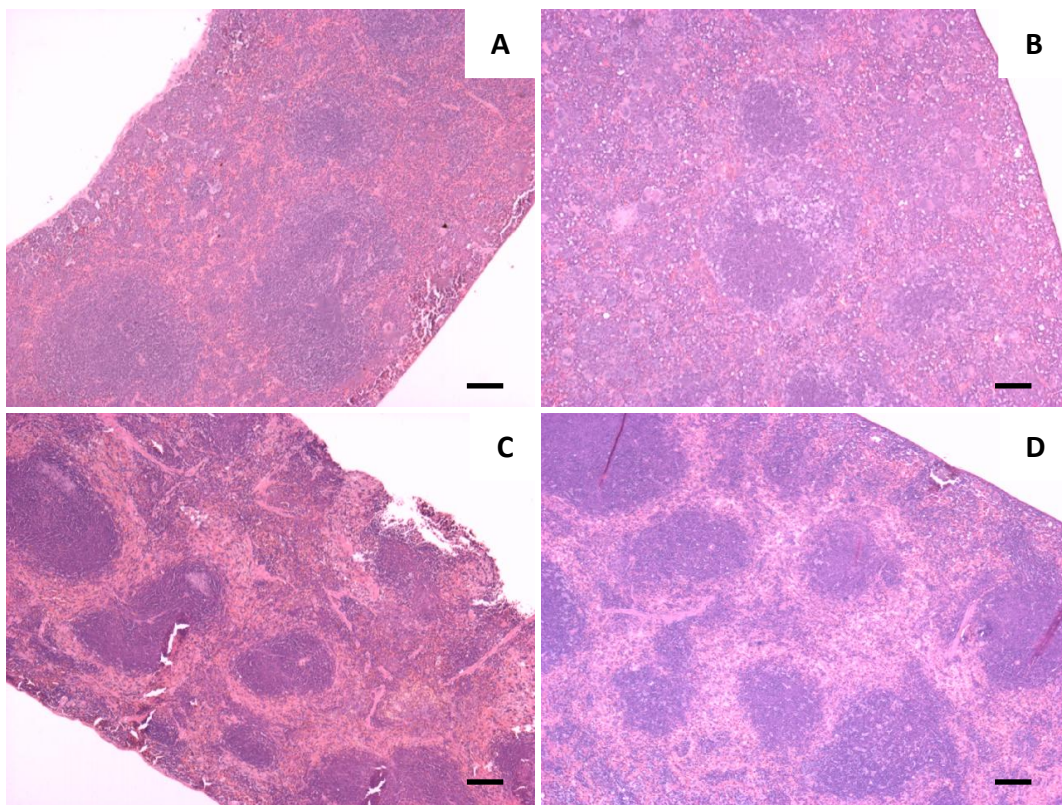


Figura 15. Fotomicrografias de baço, corado em H&E, de camundongos Swiss. (CTL-CV) grupo controle – CV (A); (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária (B); (CTL-GF) grupo controle – GF (C); (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária (D). Aumento de 4X (n=4). Barra de escala representa 100 μm .

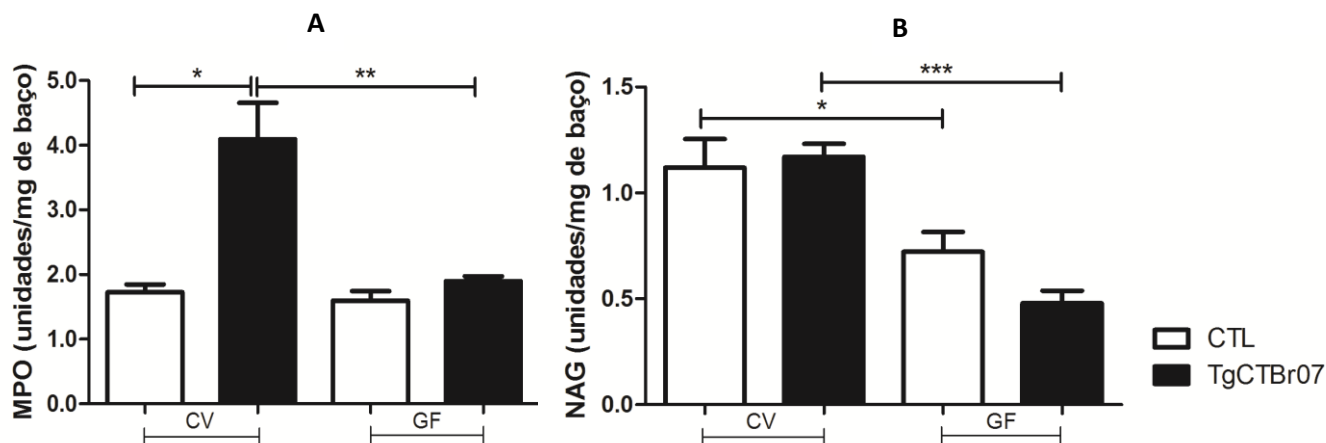


Figura 16. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos (A) e macrófagos (B), por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO e NAG, respectivamente, no baço. Legenda: CTL: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; CV: convencionais; GF: germ-free. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls (n = 6); * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

5.1.6 Pulmão

5.1.6.1 Análise histopatológica e avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) nas amostras de pulmão.

No pulmão a avaliação da área de tecido septal e sua celularidade indicam um parâmetro de acometimento do órgão. Nos animais CV (17A e 17B) e GF (Fig. 17E e 17F) não infectados o percentual de tecido septal/área total do órgão representa, respectivamente 54% e 44%, conforme figura 19. Note-se que os animais isentos de germes têm septos muito delicados e com poucas células (Fig. 17E e 17F), o que reflete na medida comparativa aos animais CV.

Nos animais infectados estes parâmetros sobem significativamente tanto nos animais convencionais (Fig. 17C e 17D) como nos animais isentos de germes infectados (Fig. 17G e 17H) inclusive com maiores valores discretamente (Fig. 18) para os animais isentos de germes infectados o que parece corresponder ao padrão histológico onde há grande redução dos espaços aerados, mais por aumento dos focos de atelectasia do que pelo grau de recrutamento celular e conseqüente aumento da celularidade, uma vez que os animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram através da medida qualitativa da mieloperoxidase (MPO), infiltrado de neutrófilo no pulmão significativamente maior quando comparado aos animais isentos de germes infectados (Fig. 19).

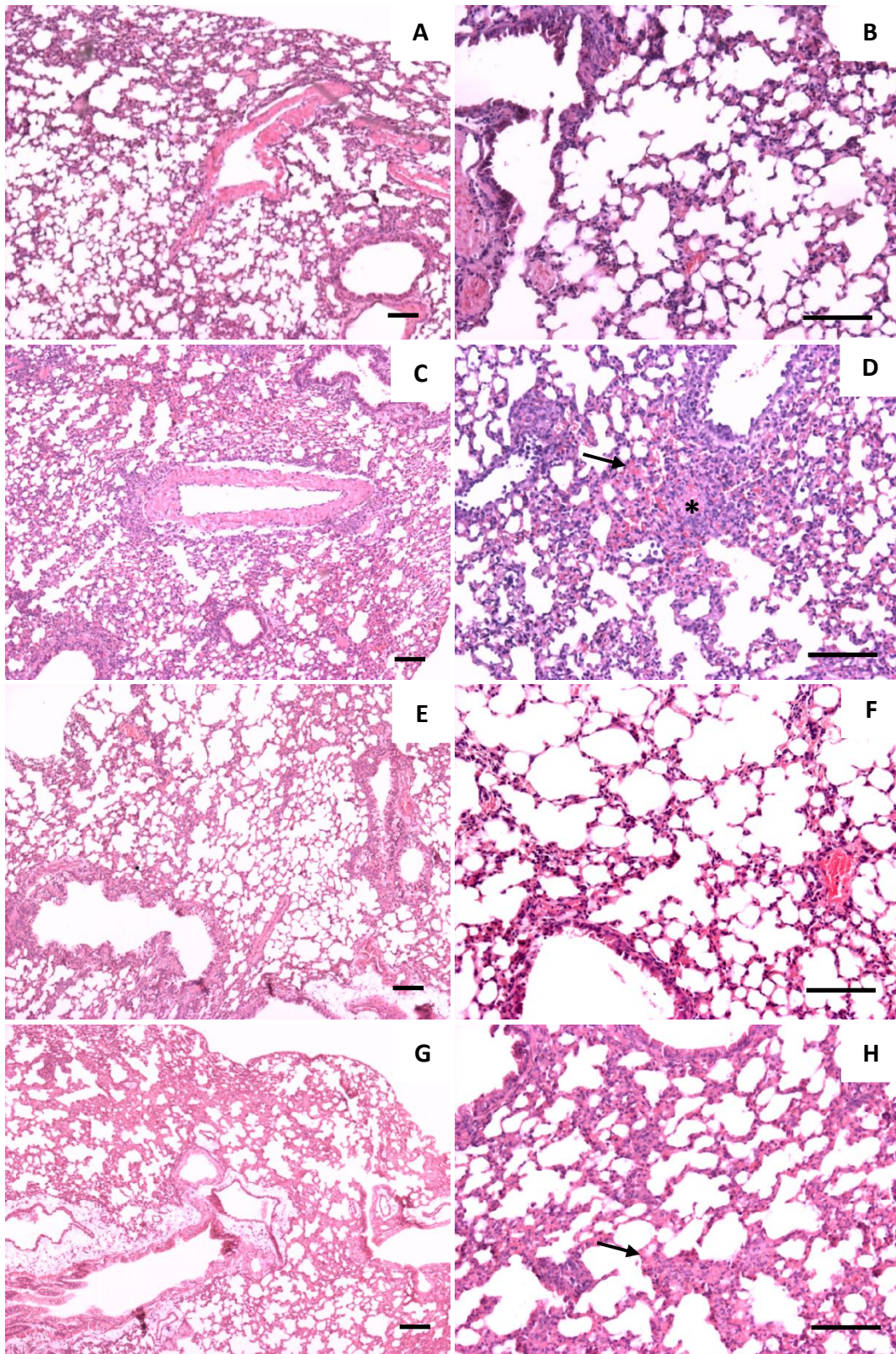


Figura 17. Fotomicrografias de pulmão, corado em H&E, de camundongos Swiss. Grupo controle animais convencionais (A e B); Grupo de animais convencionais infectados com *T. gondii* (C e D); Grupo controle de animais isentos de germes (E e F); Grupo de animais isentos de germes monoassociados com *T. gondii* (G e H). Setas indicam alargamento dos septos alveolares e * indica aumento da celularidade. Aumento de 4X e 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

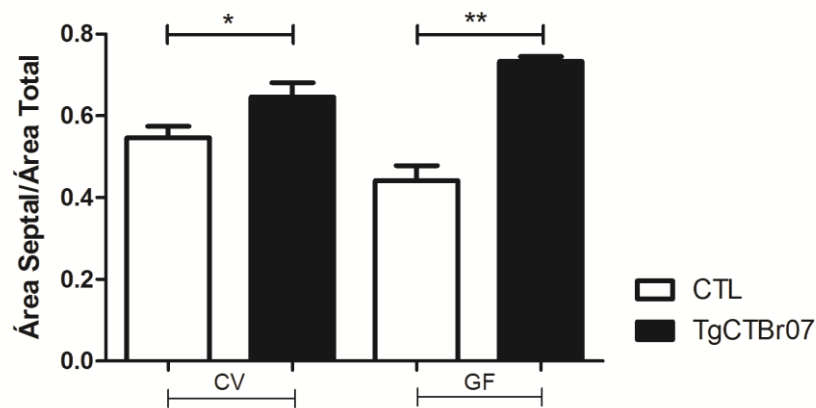


Figura 18. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras de pulmão. A amostragem abrangeu a dez campos do órgão, no aumento de 10x nas lâminas coradas por H&E, mensurando a área septal e a área total amostrada. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ** $p < 0,01$; $p < 0,05$; $n = 4$).

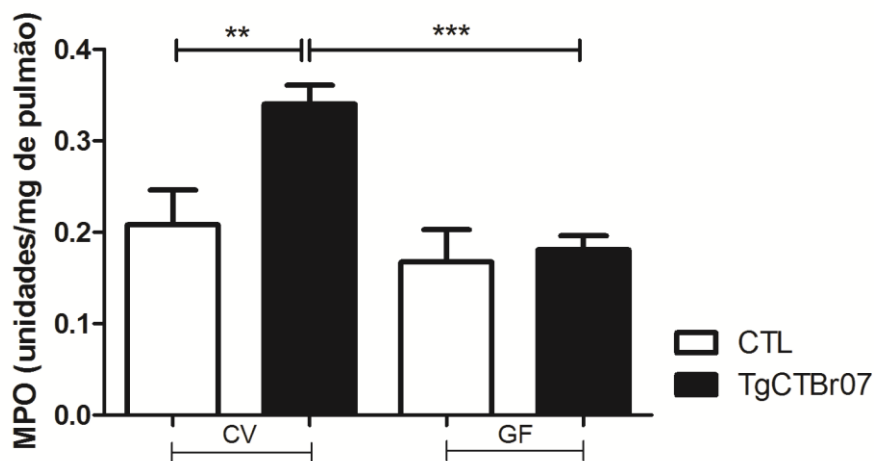


Figura 19. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no pulmão. Legenda: CLT: Grupo controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; GF: germ-free; CV: convencionais (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.1.7 Cérebro

5.1.7.1 Análise histopatológica do cérebro

Após oito dias de infecção os animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram moderadas modificações das meninges com aumento da vascularidade cerebral (Fig. 20B). Neste mesmo tempo não há alterações significativas nas meninges ou parênquima dos cérebros de animais isentos de germes infectados por *T. gondii* (Fig. 20D).

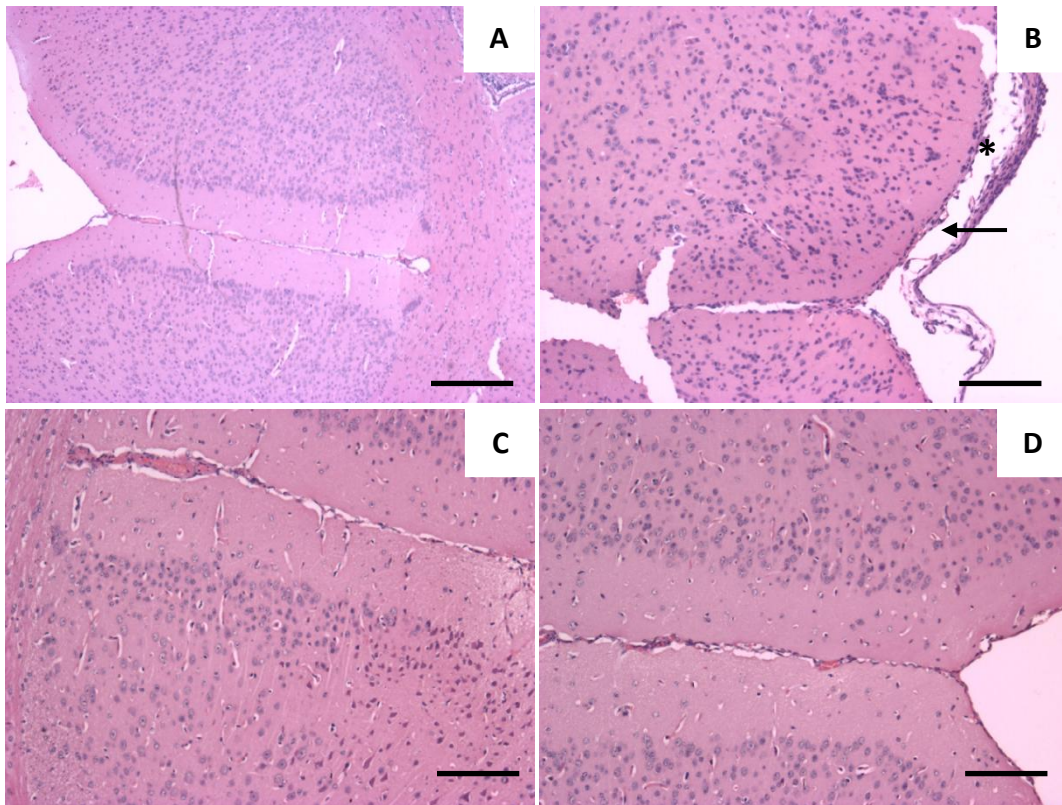


Figura 20. Fotomicrografias de cérebro, corado em H&E, de camundongos *Swiss*. (CTL-CV) grupo controle – CV (A); (TgCTBr07-CV) grupo infectado – CV camundongos convencionais que foram infectados com cepa de virulência intermediária (B); (CTL-GF) grupo controle – GF (C); (TgCTBr07-GF) grupo infectado – GF camundongos isentos de germes que foram infectados com cepa de virulência intermediária (D). Em B, seta indica edema e * indica aumento da celularidade. Aumento de e 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

5.2 Experimento piloto para escolha de probióticos

5.2.1 Curva de sobrevivência dos animais convencionais tratados com probióticos

Em um experimento piloto foram testados os efeitos preventivos/curativos de quatro probióticos na curva de sobrevivência dos animais convencionais infectados com *Toxoplasma gondii*.

Os animais que foram tratados com *B. clausii* e *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (Figura 21A e 21B) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo de animais infectados ($p < 0,001$), bem como os animais tratados com *S. boulandii* (Figura 21D) ($p < 0,0001$). Os animais que foram tratados com *E. coli Nissle* 1917 (Figura 21C) não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo de animais não tratados.

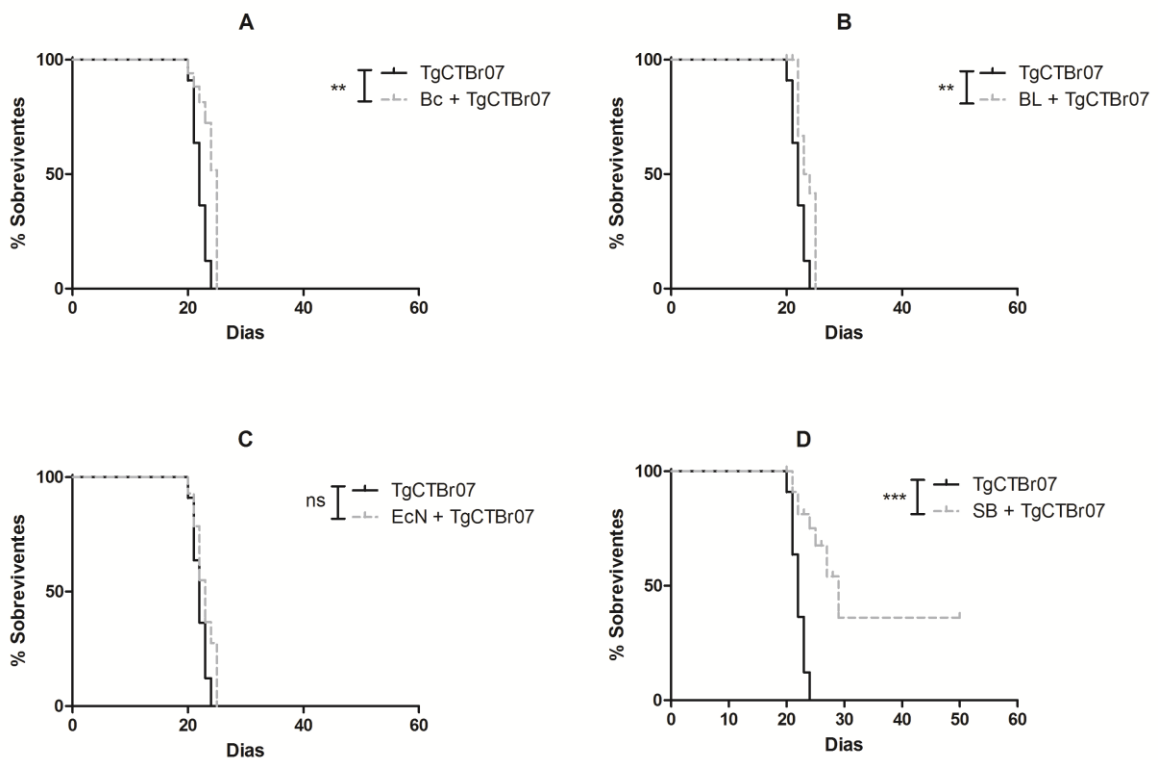


Figura 21. Curva de sobrevivência de camundongos convencionais infectados por *T. gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e tratados com probióticos. (A) *B. clausii* + TgCTBr07, $p=0,0019$, (B) *B. longum* 5^{1A} + TgCTBr07, $p=0,0074$, (C) *E. coli Nissle* 1917 + TgCTBr07, $p=0,1295$ e (D) *S. boulandii* + TgCTBr07, $p < 0,0001$, pelo *Log Rank Survival*, $N=10$. Os experimentos de mortalidade foram realizados em duplicata e apresentaram resultados compatíveis.

5.2.2 Análise do desenvolvimento ponderal dos animais convencionais tratados com probióticos.

Os animais tratados com os probióticos *B. clausii*, *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *S. boulardii* apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos animais infectados após 8 dias de infecção. Os animais tratados com o probiótico *E. coli* Nissle 1917 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos animais infectados (Figura 22).

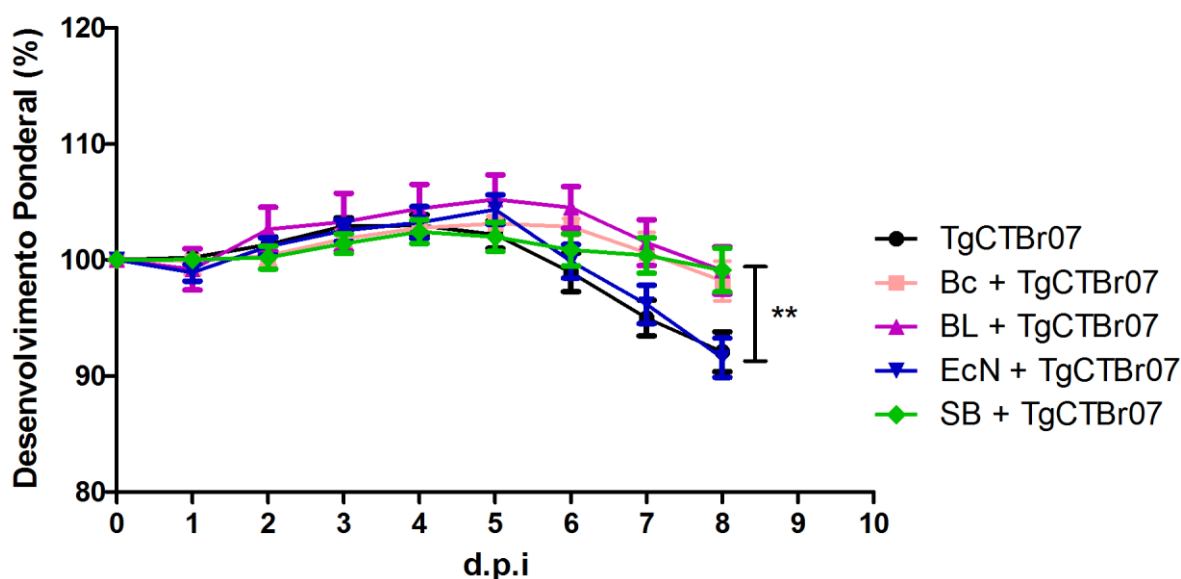


Figura 22. Desenvolvimento ponderal animais convencionais infectados oralmente com *T. gondii* e tratados ou não com probiótico. Variação do peso dos camundongos (em porcentagem) em relação ao peso do primeiro dia de infecção por *T. gondii* (dia 0). Os animais convencionais foram pesados diariamente após infecção. Legenda: TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária, Bc: *Bacillus clausii*; BL: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917; SB: *Saccharomyces boulardii*. Teste: ANOVA two-way, seguido por pós-teste de Bonferroni (n = 10).

5.3 Efeito da administração de probióticos na toxoplasmose experimental murina.

A partir do resultado da curva de sobrevivência e do resultado de desenvolvimento ponderal elegemos para o estudo os probióticos *S. boulardii* e *E. coli* Nissle 1917.

5.3.1 Permeabilidade intestinal dos animais convencionais.

Os animais do grupo TgCTBr07 tiveram sua permeabilidade intestinal aumentada significativamente quando comparados aos animais dos grupos controle ($p < 0,001$). Os animais convencionais que foram tratados com probiótico *S. boulardii* e *E. coli* Nissle 1917 ($p < 0,05$) apresentaram redução da permeabilidade intestinal em relação ao grupo de animais apenas infectados, conforme demonstrado na figura 23.

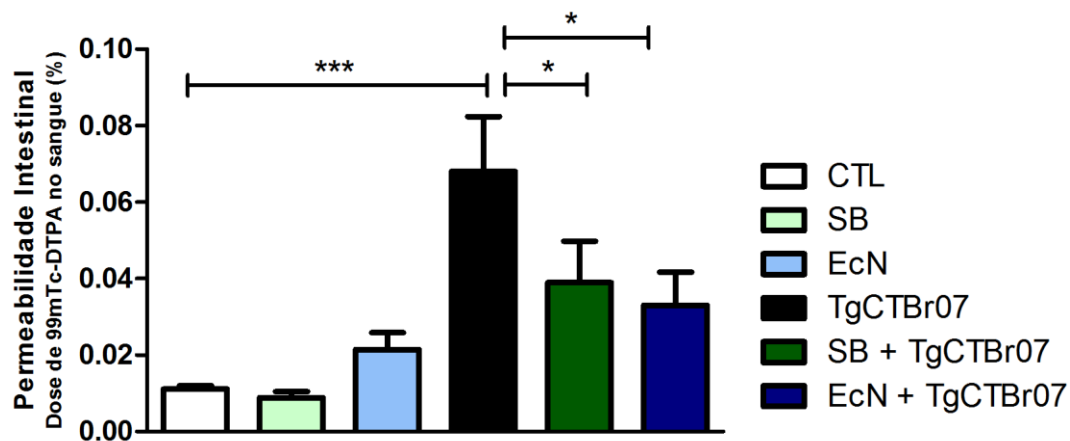


Figura 23. Avaliação da permeabilidade intestinal tratados ou não com probiótico. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls. (* = $p < 0,05$), (n= 5). Legenda: CTL: controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa TgCTBr07; Sb: *Saccharomyces boulardii*; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917;

5.3.2 Dosagem de sIgA no fluido intestinal animais convencionais

A IgA existe em duas subclasses, IgA1 e IgA2, diferenciadas pelo peso de suas cadeias. Na lâmina própria é secretada pela maioria das células plasmáticas intestinais IgA polimérica (pIgA) em forma de 5 dímeros. A pIgA é transportada para o lúmen intestinal por um receptor de imunoglobulina polimérica, sendo que o mesmo é clivado para liberar a IgA secretada (sIgA). No lúmen intestinal, sIgA atua como primeira linha de defesa que limita o acesso de antígenos intestinais à circulação sanguínea e controla a microbiota intestinal (PABST, 2012).

A colonização do intestino é importante para promover a produção de IgA e a ativação funcional das células plasmáticas secretoras da mesma. A sIgA atua reduzindo a densidade de micro-organismos associados a esta superfície, assim como restringindo a penetração destas bactérias através do epitélio intestinal (KELLY & MULDER, 2012; DUERKOP, VAISHNAVA & HOOPER, 2009).

Em nossos experimentos para dosagem de sIgA obtivemos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo infectado, entretanto os animais que foram tratados tanto com *S. boulardii* quanto com *E. coli* Nissle 1917 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 24).

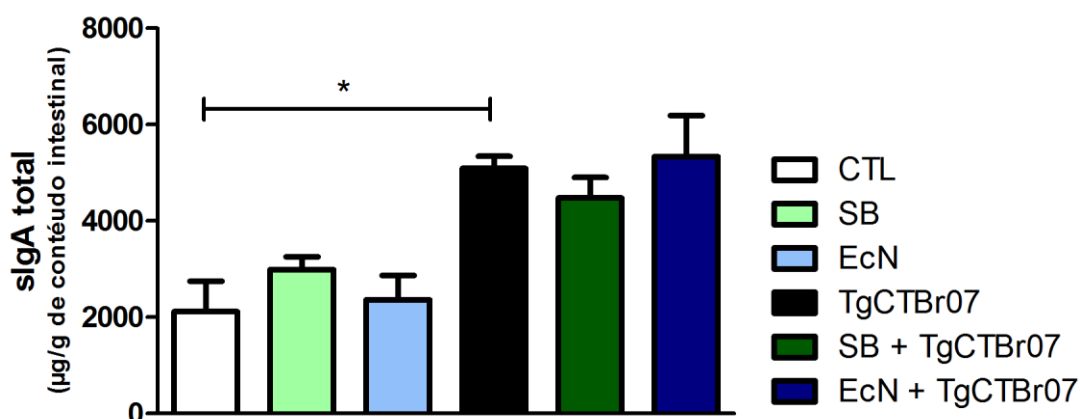


Figura 24. Dosagem de Imunoglobulina A secretora no conteúdo intestinal dos animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, * $p < 0,05$. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$). Legenda: CTL: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulandii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.3 Intestino Delgado

5.3.3.1 Análise histopatológica e morfométrica do intestino delgado

O íleo e jejuno dos animais convencionais infectados com TgCTBr07 apresentam alterações de distribuição e intensidade semelhantes. Há perda focal da integridade da camada mucosa em algumas regiões, grande variabilidade na altura das vilosidades jejunais, aumento da celularidade na mucosa e submucosa, com edema de topo de vilosidades frequentes, associado à perda da borda em escova. Há áreas de degeneração das células epiteliais de revestimento, principalmente na superfície das vilosidades (Fig. 25B). Os animais tratados apenas com *Saccharomyces boulandii* – SB (Fig. 25C) ou *Escherichia coli* Nissle 1917 - EcN (Fig. 25E) apresentam alterações muito discretas no jejuno, íleo e cólon, em geral áreas de rebaixamento da altura da mucosa com sinais de hiperemia dos vasos da mucosa e submucosa. Não é afetada a altura média da mucosa e os sinais de infiltração celular são discretos, mas os aspectos indicam que ambos os probióticos modificam a celularidade intestinal e os parâmetros de resposta vascular (Fig. 25A, C e E).

Os animais infectados tratados com EcN (EcN + TgCTBr07) apresentam tanto no cólon quanto no íleo e jejuno algum grau de proteção quanto a integridade e celularidade da mucosa, regularidade da altura de vilosidades e hiperemia dos vasos da lâmina própria e submucosa (Fig. 25F). No entanto, há variação entre os animais e o grau de proteção observado é menor que no grupo SB + TgCTBr07 (Fig. 25D) para o íleo e o jejuno. No cólon (dados não mostrados), no entanto, é bastante marcada a semelhança dos aspectos

histológicos destes animais com aqueles considerados normais, controle não infectado, principalmente considerando que os animais não infectados tratados com probióticos apresentam parâmetros de acometimento mais intenso que os animais controle não infectados.

Os animais infectados e tratados com SB (SB + TgCTBr07) apresentam principalmente no íleo e jejuno claro grau de proteção evidenciados por regularidade da altura da mucosa, celularidade da lâmina própria semelhante aos controles não infectados, edema discreto e apenas raros sinais de degeneração epitelial focais. No cólon destes animais discretas alterações persistem, embora observa-se que os sinais de infecção não foram intensos no cólon dos animais convencionais.

Os animais infectados por *T. gondii* (TgCTBr07) apresentaram maior extensão de lesão quando comparados aos animais controles e aos animais infectados por *T. gondii* e tratados com SB e EcN (SB + TgCTBr07 e EcN + TgCTBr07), conforme representação gráfica (Fig. 26).

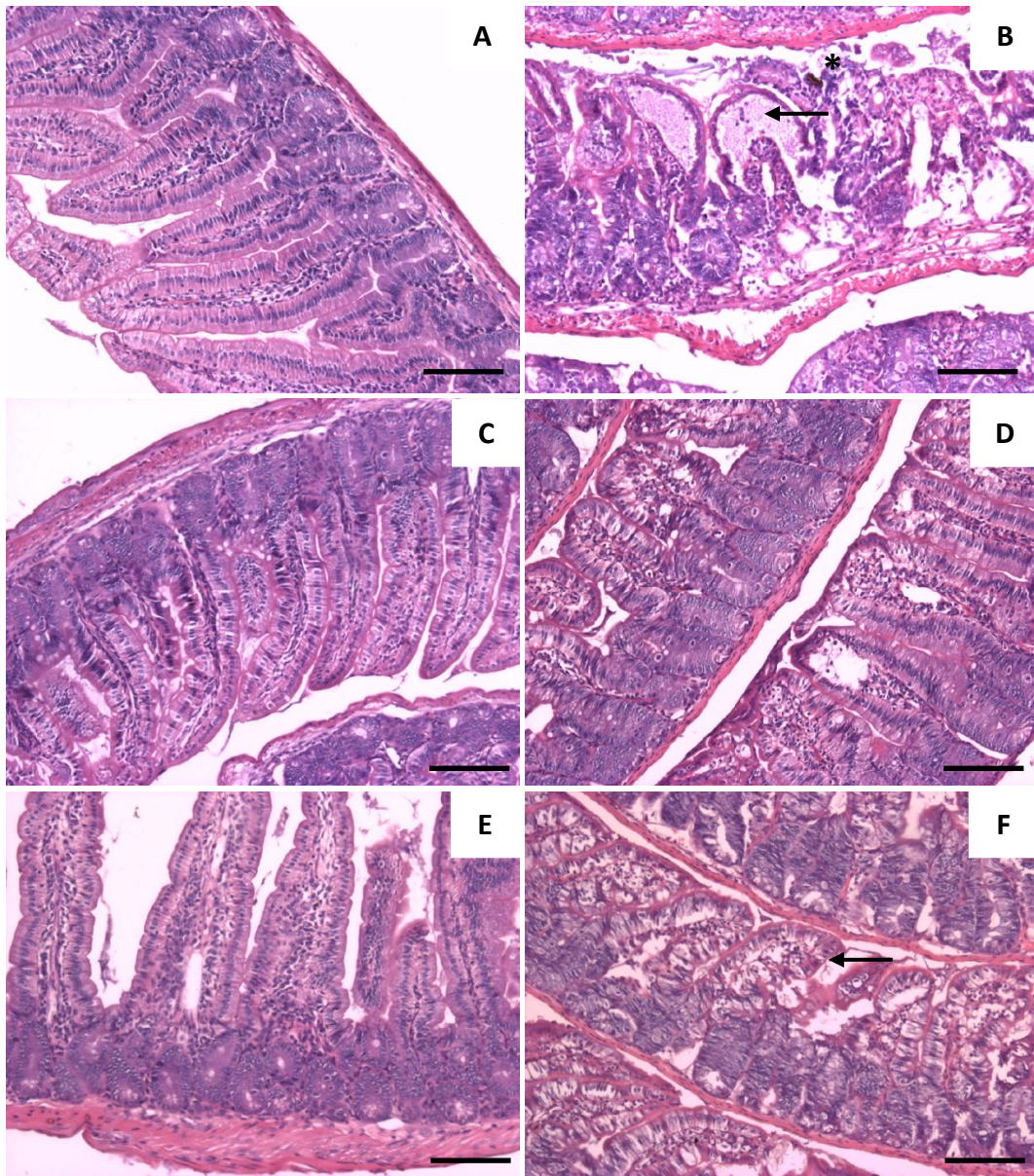


Figura 25. Fotomicrografias de intestino delgado, corado em H&E, de camundongos Swiss. (A) CTL; (B) TgCTBr07; (C) SB; (D) SB + TgCTBr07; (E) EcN (F) EcN + TgCTBr07. Legenda: CTL: Controle (NaCl 0,9%); TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. Em B e F as setas indicam edema de topo de vilosidades e o * indica áreas de perda de integridade epitelial. Aumento de 10X (n=4). Barra de escala representa 100 µm.

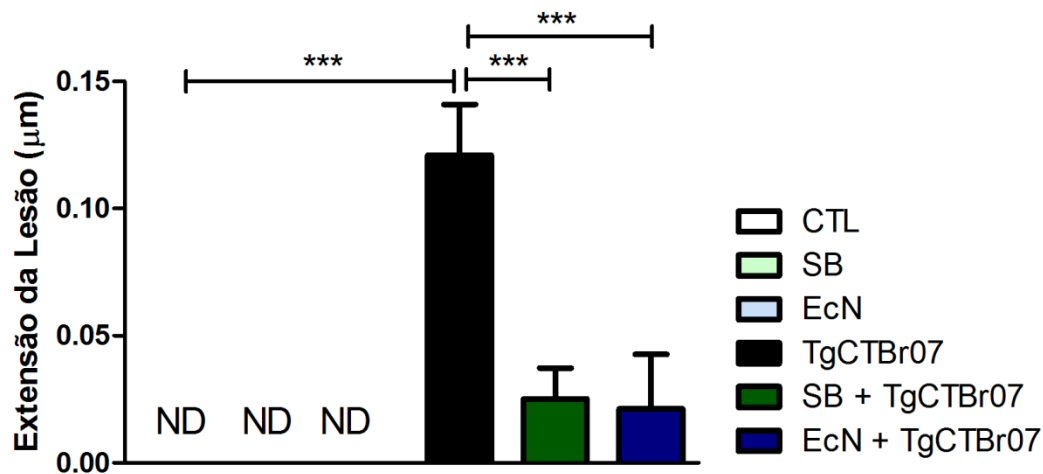


Figura 26. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras do intestino delgado. A amostragem abrangeu a maior área possível do órgão, sob aumento de 4x nas lâminas coradas por H&E, mensurando o perímetro total amostrado e baseados neste perímetro foram avaliados os perímetros com lesão. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls *** $p < 0,001$ ($n = 4$)). Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.3.2 Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras de intestino delgado

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, na maior parte, em grânulos de neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células fagocíticas recrutadas para o local da infecção onde fagocitam e matam patógenos pela liberação de compostos antimicrobianos de seus grânulos e pela produção de ROI e NO. Por meio da avaliação da enzima MPO, observamos que o grupo SB + TgCTBr07 e o grupo EcN + TgCTBr07 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TgCTBr07 (Fig. 27).

Os macrófagos são as células fagocíticas mais importantes do organismo vertebrado e desempenham um papel central na detecção e eliminação de agentes patogênicos. Juntamente com as células dendríticas, que proporcionam a primeira linha de defesa mediada por células e é fundamental para limitar a disseminação inicial e/ou o crescimento de organismos infecciosos e na imunomodulação (STAFFORD et al., 2002). A atividade da enzima NAG, como medida indireta da atividade de macrófagos, foi avaliada por meio de testes enzimáticos utilizando como substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina. Por meio da avaliação da atividade da enzima de NAG, observamos que o grupo SB + TgCTBr07 e o grupo EcN + TgCTBr07 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TgCTBr07 (Fig. 28).

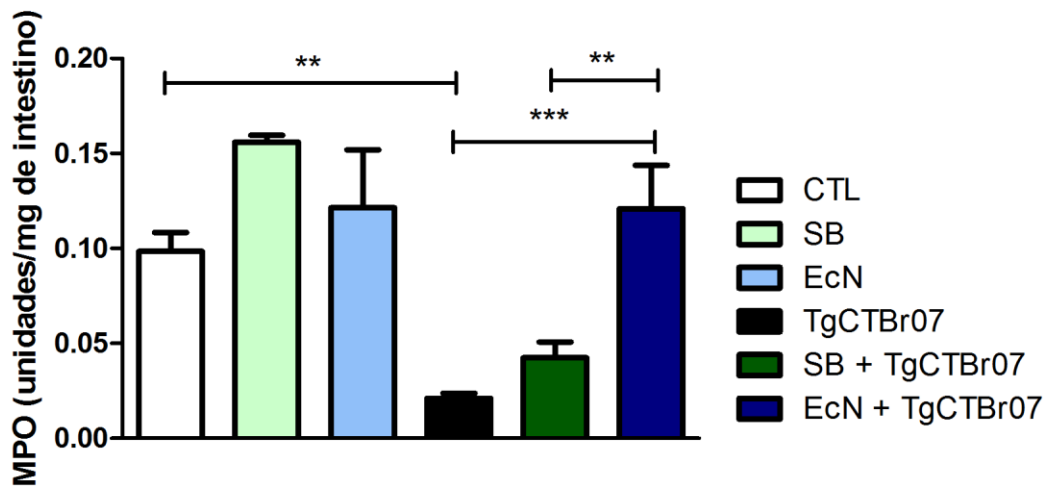


Figura 27. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no intestino delgado de animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$). Legenda: CTL: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

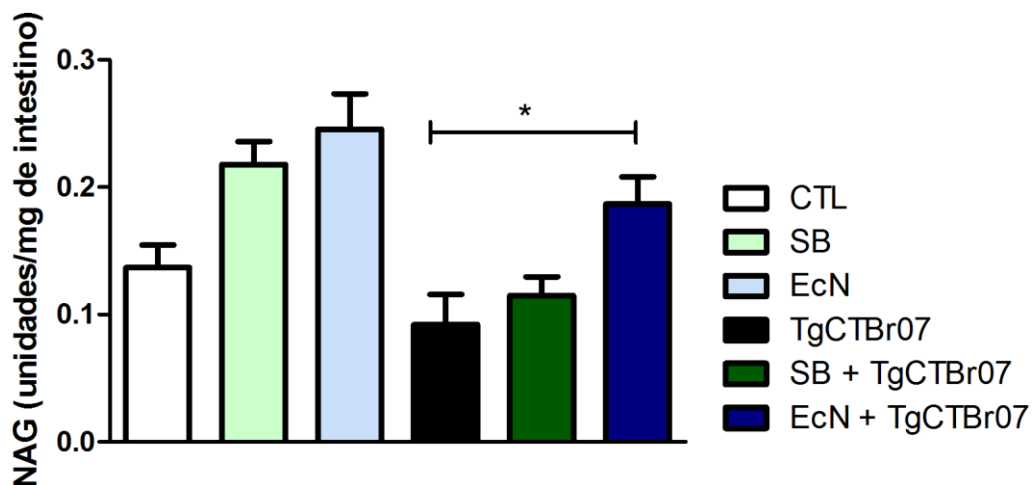


Figura 28. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no intestino delgado de animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$). Legenda: CTL: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.3.3 Dosagem de citocinas nas amostras de intestino delgado

O intestino delgado dos animais convencionais foi submetido ao protocolo de extração de citocinas e posterior dosagem por ELISA. Realizamos dosagem TNF- α que é uma citocina pró-inflamatória, no intestino delgado dos animais convencionais e observamos que os animais infectados com TgCTBr07 apresentaram diferenças muito discretas mas estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Entretanto não houve diferença quando tratado com ambos os probióticos (Fig. 29A). Na dosagem de IFN- γ no intestino delgado dos animais convencionais observamos que os animais que receberam probiótico ($p < 0,01$) tiveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de animais infectados (TgCTBr07) (Fig. 29B). Na dosagem da quimiocina RANTES/CCL5 os animais infectados (TgCTBr07) tiveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, entretanto não houve diferença entre os grupos tratados com ambos os probióticos, conforme figura 29C. Verificamos que os níveis de TGF- β e IL-10 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Fig. 29D e E).

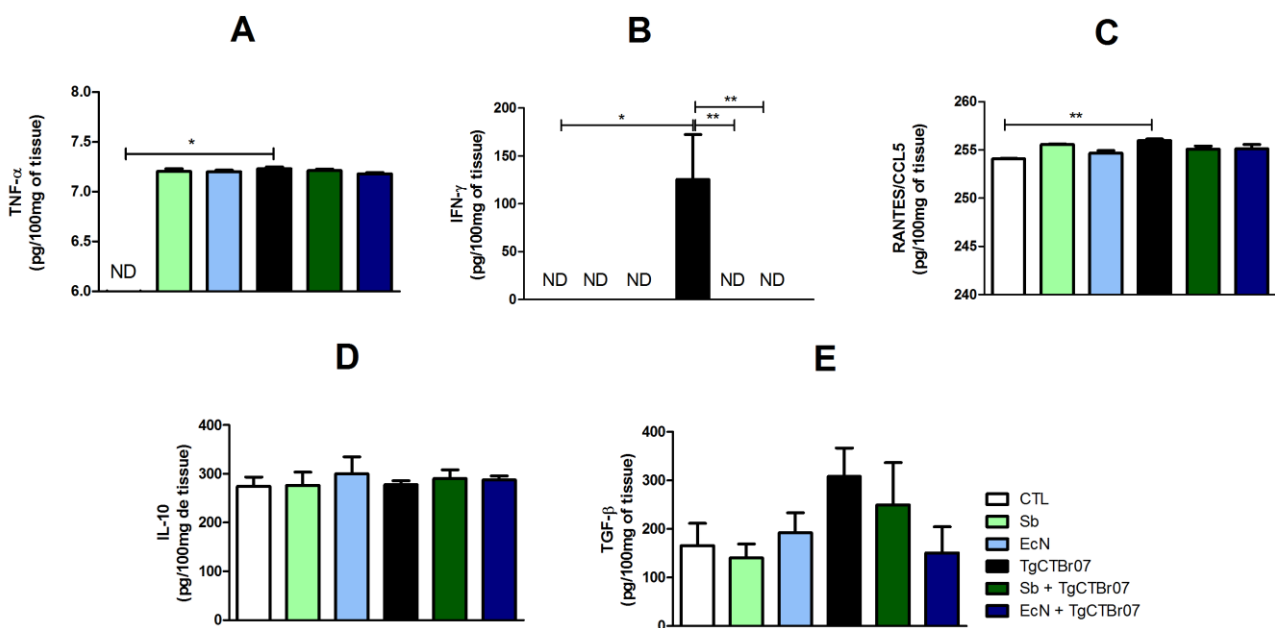


Figura 29. Avaliação da dosagem de citocinas e quimiocinas TNF- α (A), IFN- γ (B), CCL5/RANTES (C), IL-10 (D) e TGF- β (E) no intestino delgado de camundongos convencionais. Os animais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07). Os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA ao oitavo dia pós-infecção. Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. (Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.3.4 Fígado

5.3.4.1 Análise histopatológica e avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras no fígado de animais convencionais.

O fígado é frequentemente acometido quando taquizoítos penetram em hepatócitos e células de Kupffer e se multiplicam. Eventualmente, a morte de células infectadas evolui para focos de necrose, frequentemente acompanhadas por infiltrados inflamatórios mononucleares (FRENKEL, 1988).

No fígado dos animais convencionais tratados com SB há proteção significativa observada em todos os animais estudados em relação aos animais infectados por TgCTBr07. No fígado dos animais convencionais infectados e tratados com EcN (EcN + TgCTBr07) também ocorre proteção, embora menos eficaz (Fig. 30).

Na avaliação do score observamos proteção dos grupos SB + TgCTBr07 e EcN + TgCTBr07 em relação ao grupo de animais apenas infectados TgCTBr07 (Fig. 31). Na avaliação macroscópica dos órgãos, os fígados dos animais convencionais infectados apresentaram-se hipertrofiados, resultado que está de acordo com a dosagem de MPO (Fig. 32) e com a dosagem de NAG (Fig. 33) onde observamos que há aumento do infiltrado de neutrófilos e macrófagos para o fígado dos animais convencionais infectados.

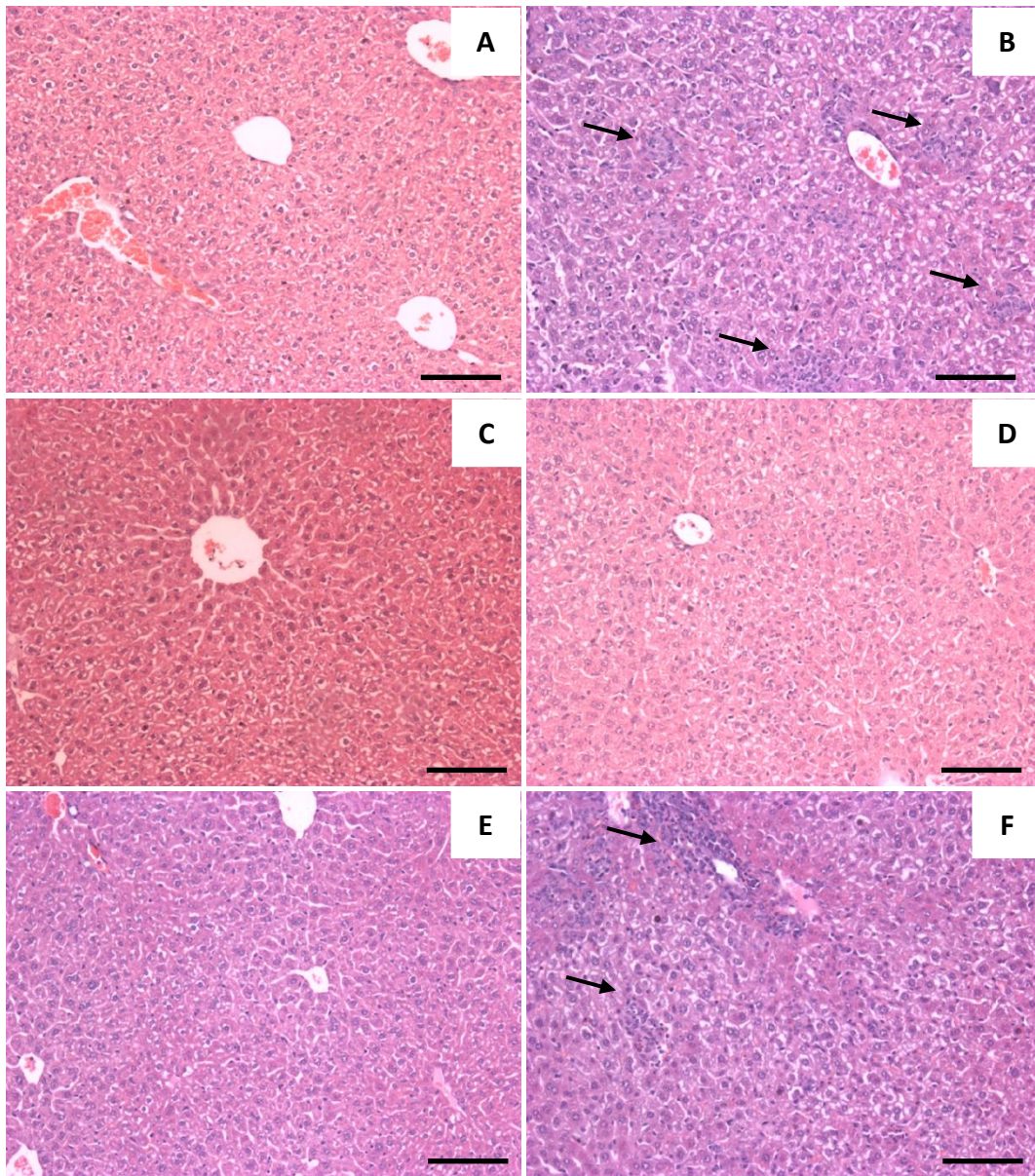


Figura 30. Fotomicrografias de fígado, corado em H&E, de camundongos Swiss. (A) CTL; (B) TgCTBr07; (C) SB; (D) SB + TgCTBr07; (E) EcN (F) EcN + TgCTBr07. Legenda: CTL: Controle (NaCl 0,9%); TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. bouvardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. Em B e F as setas indicam focos de infiltrado inflamatório. Aumento de 10X (n=4). Barra de escala representa 100 µm.

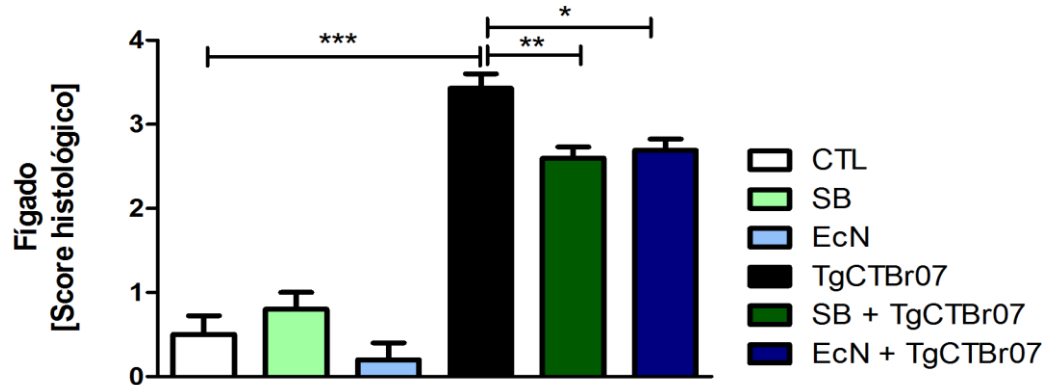


Figura 31. Score histológico do fígado de amostras coradas em H&E, de camundongos Swiss. Os parâmetros utilizados para pontuação histológica foram descritas em Materiais e Métodos. Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Bonferroni (n = 6); * = p<0,05; **= p<0,01; ***=p<0,001).

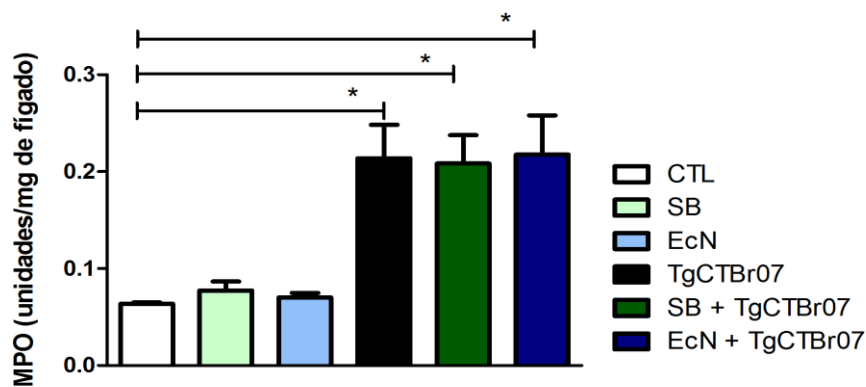


Figura 32. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO no fígado de animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *T. gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, * p<0,05. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls (n = 6). Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

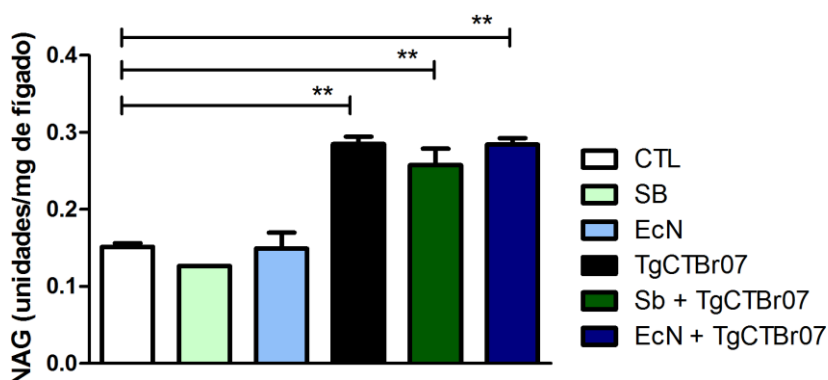


Figura 33. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no fígado de animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, ** $p < 0,01$. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$). Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.5 Baço

5.3.5.1 Análise histopatológica e avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) nas amostras no baço de animais convencionais.

O baço dos animais infectados apresenta aumento discreto na celularidade dos centros germinativos e na polpa vermelha, há também aumento das células dendríticas e discreto aumento dos linfócitos periarteriolares. Nos animais não infectados tratados com ambos os probióticos há discreto aumento da celularidade dos folículos linfóides. Nas associações da infecção e tratamento com os probióticos há discreto aumento da celularidade da polpa vermelha com presença de megacariócitos e evidências de hematopoiese extramedular, mais acentuada nos animais tratados por EcN, que também apresentam menor celularidade dos centros germinativos.

Na avaliação macroscópica dos órgãos, os baços dos animais convencionais infectados apresentaram-se hipertrofiados, entretanto ao avaliar a dosagem de MPO não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (dados não mostrados). Entretanto, nas dosagens de NAG (Fig. 35) observamos que há aumento do infiltrado de macrófagos para o baço dos animais convencionais infectados, e redução estatisticamente significativa entre os animais infectados e os animais tratados com *S. boulardii* ** $p < 0,01$ ou com *E. coli* Nissle 1917 *** $p < 0,001$.

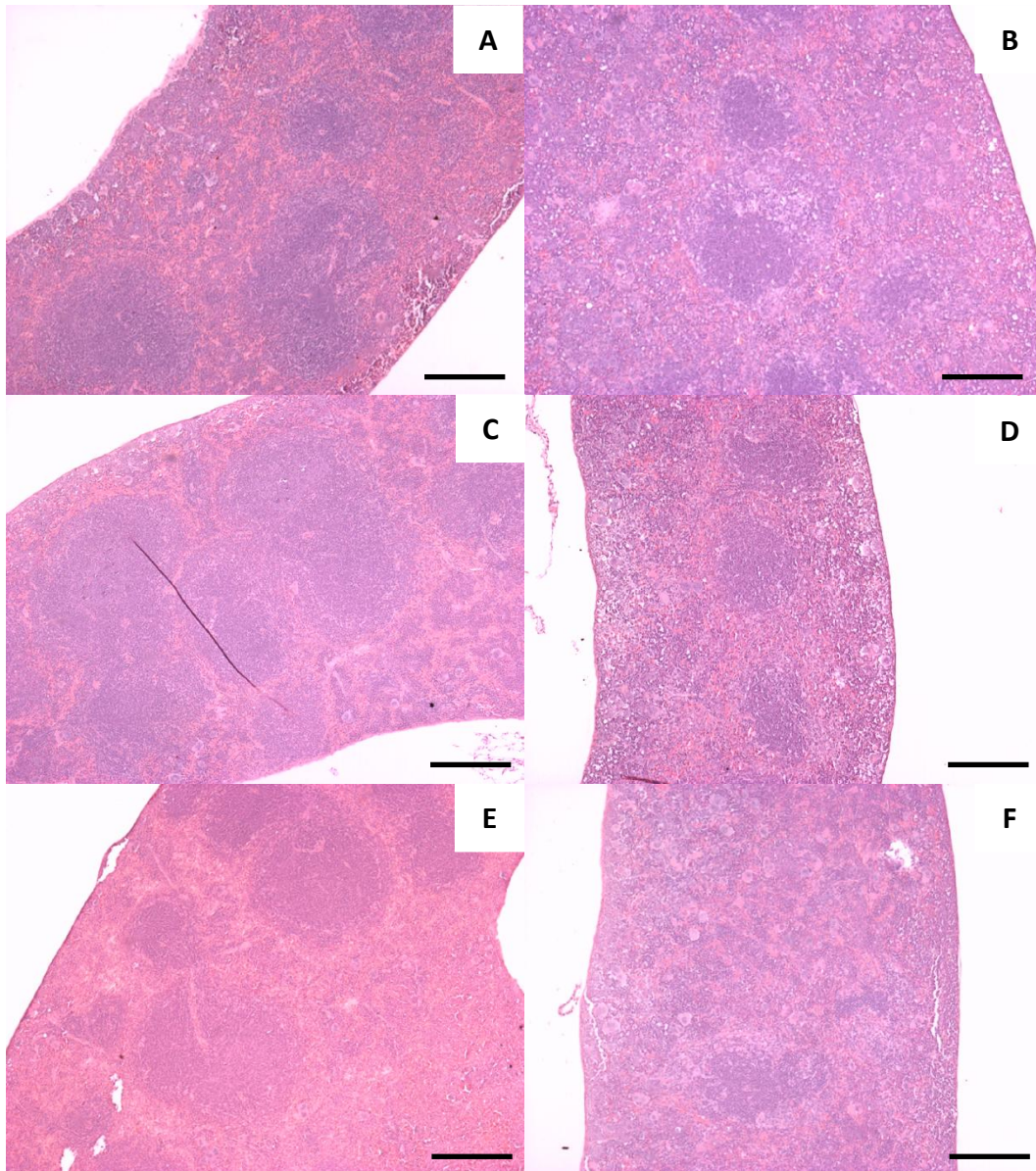


Figura 34. Fotomicrografias de baço, corado em H&E, de camundongos Swiss. (A) CTL; (B) TgCTBr07; (C) SB; (D) SB + TgCTBr07; (E) EcN (F) EcN + TgCTBr07. Legenda: CTL: Controle (NaCl 0,9%); TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. Aumento de 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

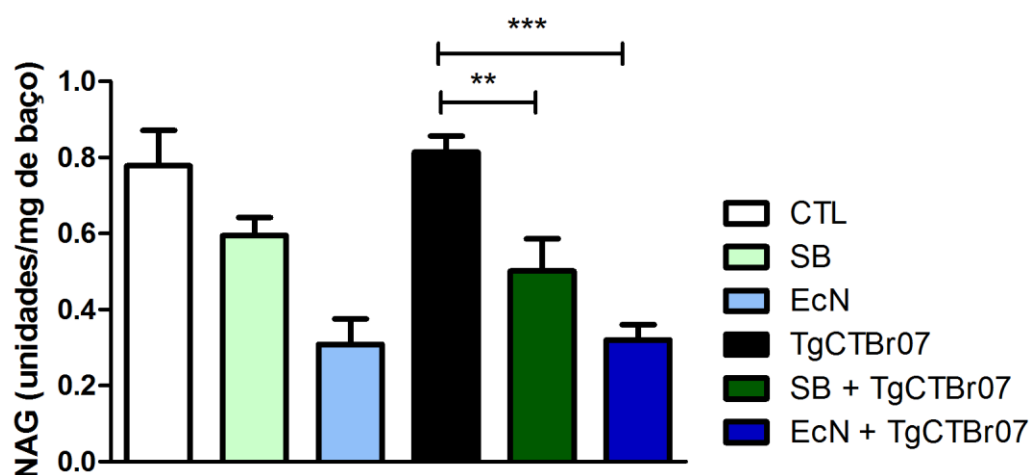


Figura 35. Avaliação qualitativa da presença de macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas NAG no baço de animais convencionais. Os animais convencionais foram tratados por 10 dias com probiótico e infectados com cisto de *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) e após serem infectados continuaram sendo tratados com probiótico diariamente por mais oito dias. O * representa diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ($n = 6$). Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.6 Pulmão

5.3.6.1 Análises histopatológicas do pulmão

Os animais tratados apenas com *S. boulardii* (Fig. 36C) e *E. coli* Nissle 1917 (Fig. 36E) puras não provocam modificações consideráveis nos pulmões dos animais convencionais. No pulmão dos animais convencionais infectados com *T. gondii* (Fig. 36B) indicam um parâmetro de acometimento do órgão na avaliação da área do tecido septal (Fig. 37) e sua celularidade, o que parece corresponder ao padrão histológico onde há grande redução dos espaços aerados, mais por aumento dos focos de atelectasia do que pelo grau de recrutamento celular e conseqüente aumento da celularidade.

O tratamento com SB + TgCTBr07 (Fig. 36D) nos animais convencionais produz uma redução acentuada nos parâmetros da infecção retornando os valores a níveis próximos ao controle. Paradoxalmente, tratamento com EcN + TgCTBr07 (Fig. 36F) nos animais convencionais se reflete em pouca proteção, com valores de 62% (Fig. 37).

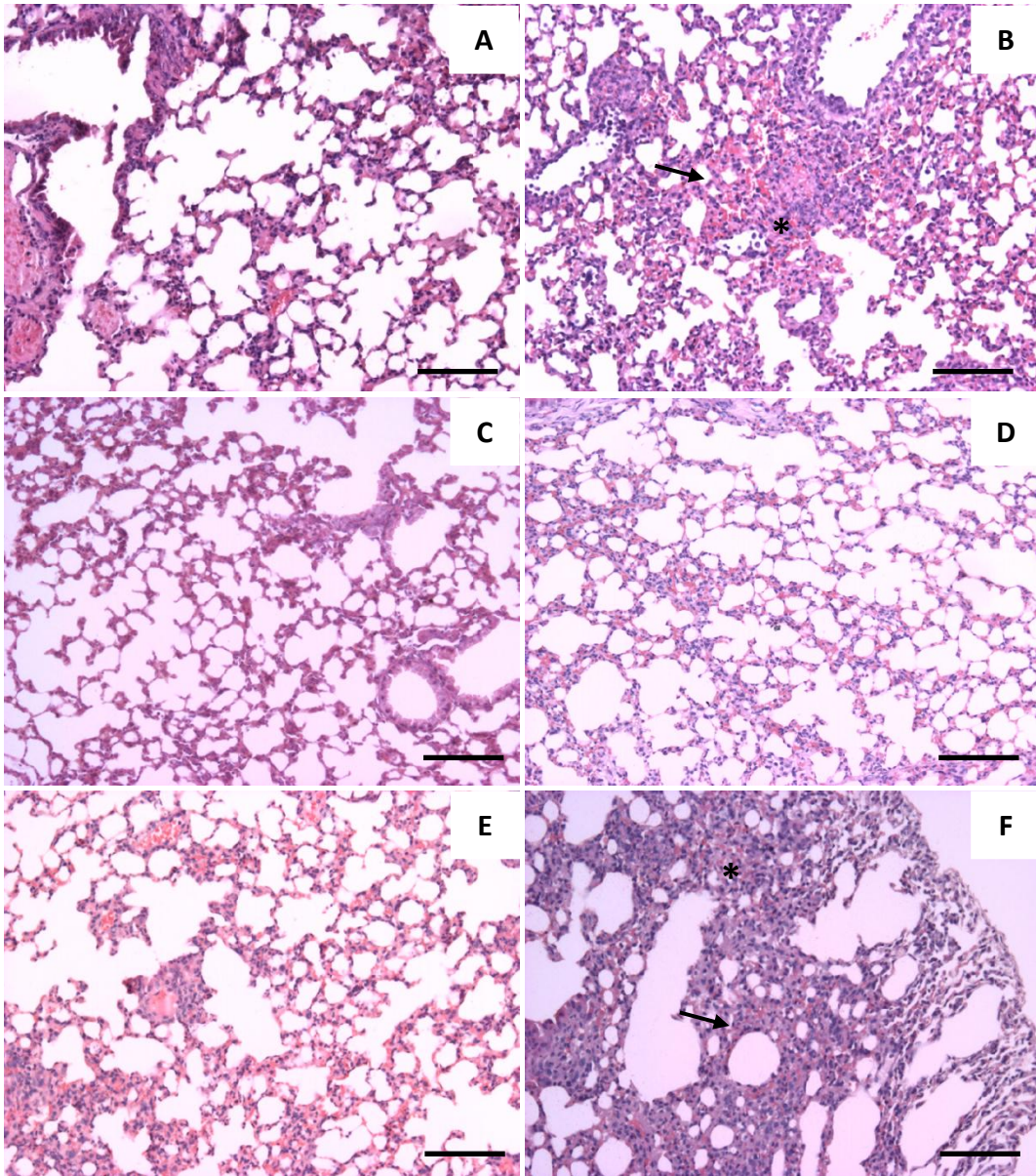


Figura 36. Fotomicrografias de pulmão, corado em H&E, de camundongos Swiss. (A) CTL; (B) TgCTBr07; (C) SB; (D) SB + TgCTBr07; (E) EcN (F) EcN + TgCTBr07. Legenda: CTL: Controle (NaCl 0,9%); TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. boulandii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. Em B e F as setas indicam alargamento dos septos e * indica aumento da celularidade. Aumento de 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μm.

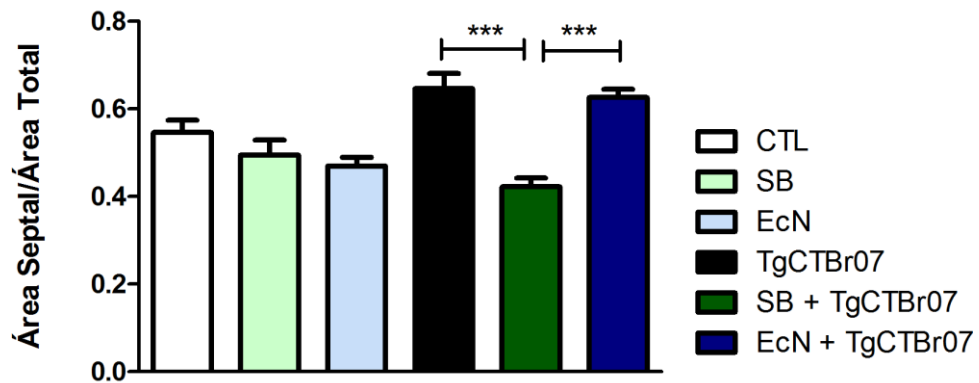


Figura 37. Análise dos parâmetros morfométricos das amostras de pulmão. A amostragem abrangeu a dez campos do órgão, no aumento de 10x nas lâminas coradas por H&E, mensurando a área septal e a área total amostrada. (Teste: ANOVA one-away, seguido por pós-teste de Newman-Keuls ** $p < 0,01$; $p < 0,05$; $n = 4$). Legenda: CLT: Controle; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. bouvardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917.

5.3.7 Cérebro

5.3.7.1 Análises histopatológicas do cérebro

Após oito dias de infecção os animais convencionais infectados por *T. gondii* apresentaram moderadas modificações das meninges com aumento da vascularidade cerebral (Fig. 38B). Neste mesmo tempo não há alterações significativas nas meninges ou parênquima dos cérebros dos grupos SB + TgCTBr07 (Fig. 38C) e EcN + TgCTBr07 (Fig. 38D).

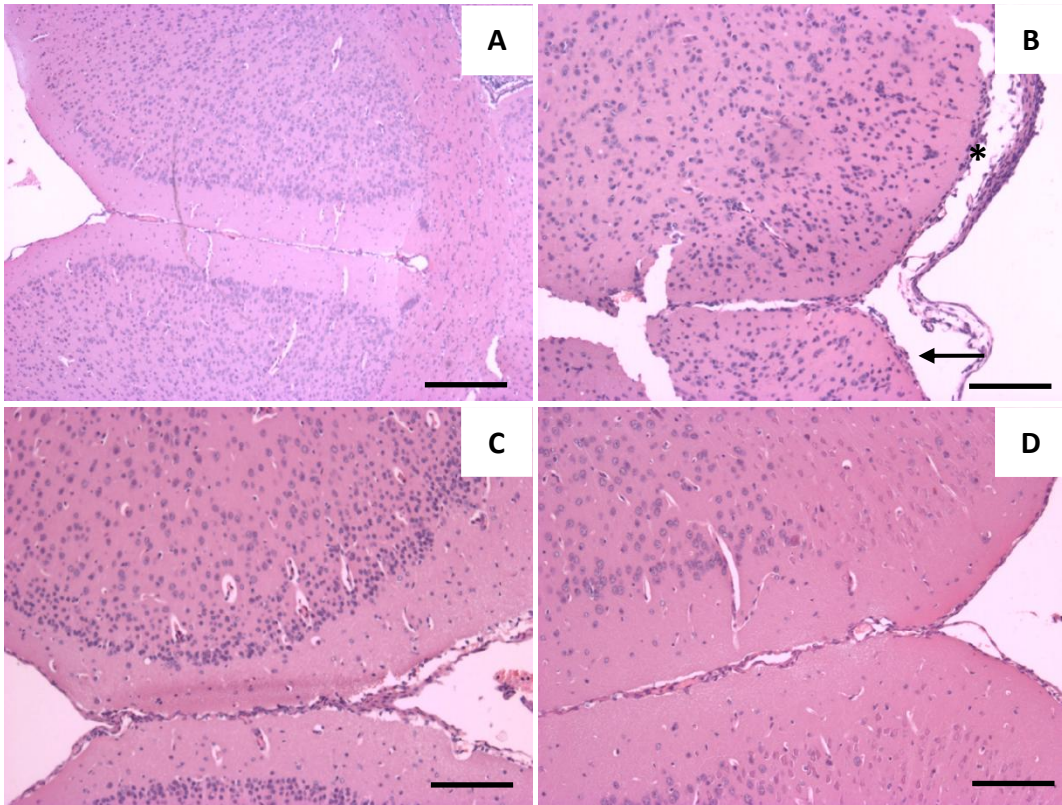


Figura 38. Fotomicrografias de cérebro, corado em H&E, de camundongos *Swiss*. (A) CTL; (B) TgCTBr07; (C) SB + TgCTBr07; (D) EcN + TgCTBr07. Legenda: CTL: Controle (NaCl 0,9%); TgCTBr07: *T. gondii* cepa de virulência intermediária; SB: *S. bouvardii*; EcN: *E. coli* Nissle 1917. Em B a seta indica edema e o * indica aumento da celularidade. Aumento de 10X (n=4). Barra de escala representa 100 μ m.

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que o *Toxoplasma gondii* infecta o hospedeiro pela via oral e induz uma cascata de eventos imunológicos que envolvem respostas imunes inatas e adaptativas. Em animais C57BL/6 o parasita também induz uma forma grave de inflamação intestinal, muito semelhante à doença inflamatória intestinal que é caracterizada pela perda da arquitetura epitelial intestinal, encurtamento de vilosidades, influxo maciço de células inflamatórias para a lâmina própria e placas de necrose (LIESENFELD et al., 2001), conforme reproduzido neste trabalho com animais *Swiss*.

Para o desenvolvimento do nosso trabalho utilizamos camundongos *Swiss* que são animais alogênicos que desenvolvem histopatologia semelhante a observada em animais C57BL/6, que apresentaram necrose maciça das vilosidades e das células da mucosa intestinal no sétimo dia de infecção (LIESENFELD, 2002), propiciando uma base de comparação para nosso estudo.

Recentemente, Carneiro e colaboradores genotiparam 25 de 27 amostras de *T. gondii* obtidas do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita pela técnica de PCR-RFLP. Em nosso trabalho utilizamos um isolado de *T. gondii* de virulência intermediária (TgCTBr07).

Nossa estratégia experimental visou comparar o acometimento em diversos órgãos (intestino, fígado, baço, pulmão, encéfalo), após a infecção oral com inóculo de 10 cistos de *T. gondii*, na presença (animais convencionais-CV) ou na ausência de microbiota (animais isentos de germes-GF).

Para estudar as relações que ocorrem entre os micro-organismos e seu hospedeiro o modelo gnotobiótico é uma importante estratégia experimental e permite o estudo das interações entre o hospedeiro e os micro-organismos sem a interferência da microbiota indígena (GORDON & PESTI, 1971, TREXLER, 1978). Os animais podem ser mantidos em condições estéreis (utilizando isoladores para criação de animais isentos de germes) e especificamente colonizados com microorganismos.

Nós avaliamos comparativamente os aspectos anatomopatológicos decorrentes da infecção, a permeabilidade intestinal, a curva de sobrevivência e parâmetros imunológicos (citocinas, MPO, NAG, sIgA) a fim de compreender o papel da microbiota no desenvolvimento da patologia em murinos. Considerando que a via de entrada de *T. gondii* é através do intestino, nós hipotetizamos que as interações celulares complexas e ainda mal

compreendidas que regulam as respostas aos antígenos da microbiota normal, na presença de uma barreira epitelial intacta, poderiam ser afetadas em condições livre de germes.

Em estudos realizados por Heimessat e colaboradores (2006) foi demonstrado que bactérias gram-negativo presentes no intestino delgado agravam o desenvolvimento da íleite induzida por *T. gondii*. Estes autores demonstraram que a histopatologia do íleo agrava-se ao longo dos primeiros 8 dias após infecção por *T. gondii* ocorrendo inflamação discreta a partir de 3 a 5 dias para grave necrose aos 8 dias. Estes resultados são correlacionados com um aumento de bactérias comensais gram-negativo no intestino, como *E. coli* e *Bacteroides/Prevotella*, acompanhado por uma perda pronunciada da diversidade bacteriana, gerando um desequilíbrio na microbiota. Neste sentido estudamos também o efeito de probióticos selecionados (levedura e bactérias) no desenvolvimento da toxoplasmose pelos parâmetros mencionados acima. Discutiremos inicialmente nossos resultados comparativos entre animais CV e GF infectados, a fim de contribuir para o entendimento do papel da microbiota na patologia induzida pelo *T. gondii* em murinos. Em seguida discutiremos os resultados da intervenção preventiva/curativa de alguns probióticos na curva de sobrevivência e no desenvolvimento da patologia em animais CV.

Na curva de sobrevivência dos animais convencionais e isentos de germes infectados não houve diferença estatística ($p = 0,24$), e a maioria dos animais de ambos os grupos morreram do 11º ao 14º dia. Além disso, os animais convencionais apresentaram sinais clínicos descritos na infecção pelo *T. gondii*, tais como pelagem arrepiada, arqueamento postural e atividade motora, enquanto os animais GF infectados não apresentaram a mesma clínica. Os animais CV tiveram uma ligeira redução do ganho de peso a partir do 6º a 8º dia quando comparados aos animais GF infectados. A relativa preservação de animais GF poderia estar relacionada com o já descrito aumento do limiar de dor dos animais GF, uma vez que o contato com a microbiota comensal seria necessário para o desenvolvimento de hipernocicepção inflamatória (AMARAL et al., 2007). Definimos que o oitavo dia após infecção seria o dia de eutanásia nos experimentos subsequentes, baseado nos resultados de desenvolvimento ponderal onde no oitavo dia os animais CV apresentaram já significativa perda de peso e havia sinais clínicos, embora ainda não apresentassem mortalidade.

A função da barreira intestinal inclui a habilidade do epitélio em separar o conteúdo luminal potencialmente prejudicial, por conter bactérias e endotoxinas, do ambiente interno do corpo. Alterações na quantidade e/ou na composição do muco podem levar a uma resposta inflamatória (LINDEN et al., 2008). As mucinas formam a primeira barreira entre o conteúdo do intestino e as células epiteliais, protegendo-os contra o contato direto com bactérias

comensais e seus componentes, e sua produção pode ser interrompida como causa ou em consequência de inflamação intestinal. Em nossas mãos, tanto animais CV como animais GF infectados mostraram escassez de células caliciformes em áreas lesadas.

A imunoglobulina A secretora (sIgA) é um dos principais mecanismos de defesa humoral que assegura a função de barreira de superfícies mucosas e impede tanto a aderência de bactérias às superfícies mucosas quanto a penetração de antígenos no ambiente interno do organismo (MESTECKY et al., 1999; HOLMGREN & CZERKINSKY, 2005; BRANDTZAEG, 2010). No lúmen intestinal, sIgA atua como primeira linha de defesa que limita o acesso de antígenos intestinais à circulação sanguínea e controla a microbiota intestinal (PABST, 2012). A colonização do intestino é importante para promover a produção de IgA e a ativação funcional das células plasmáticas secretoras da mesma, desempenhando um papel importante no controle da penetração de antígenos através do intestino. Nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, onde podemos evidenciar maior produção de IgA em animais CV quando comparados aos animais GF (MOREAU et al., 1978). Após a infecção oral por *T. gondii*, a produção de sIgA nos animais CV é significativamente maior quando comparados com os animais GF. Apenas a sIgA, contudo, não parece ser suficiente para reduzir a densidade e a penetração de micro-organismos através do epitélio intestinal, conforme descrito em outros estudos (KELLY & MULDER, 2012; DUERKOP, VAISHMAVA & HOOPER, 2009), pois ambos os animais sucumbem à infecção, apesar de lesões intestinais de menor intensidade nos animais GF.

Qualquer prejuízo à barreira intestinal contribui para a translocação dessas bactérias e de seus componentes para a circulação portal e sistêmica (MACFIE et al., 2004; GATT et al., 2007; YAN et al. 2009), devido ao aumento da permeabilidade intestinal. Há inclusive evidências do papel desta barreira influenciando o desempenho do sistema imune, uma vez que quase 80% das células imunologicamente ativas do corpo pertencem ao sistema imunológico associado à mucosa (HILL et al., 2010; CHUNG & KASPER, 2010). Foi demonstrado que a falta da microbiota influencia a migração ou permanência de monócitos/macrófagos. Os monócitos Ly6C (hi) que colonizam o intestino dos neonatos em um influxo dependente de CCR-2 se diferenciam em macrófagos maduros anti-inflamatórios em um processo que é altamente dependente da microbiota e que se continua ao longo da vida adulta dos animais a fim de manter a população “normal” de macrófagos intestinais (BAIN et al., 2014).

Em nosso estudo observamos que camundongos convencionais infectados oralmente por *T. gondii* apresentam não só maior gravidade e extensão de acometimento pela íleite (Fig. 8C e D), mas também aumento de permeabilidade intestinal quando comparados aos animais isentos de germes infectados oralmente por *T. gondii* (Fig. 6), a despeito da sobrevida similar. A menor permeabilidade intestinal dos GF se correlaciona com menor grau de acometimento histopatológico. A íleite induzida por *T. gondii* é causada por uma imunopatologia do tipo Th-1, caracterizada por um aumento mediado por células T CD4⁺ em mediadores pró-inflamatório, incluindo IFN- γ , TNF- α , e NO (HEIMESAAT et al., 2006).

Macrófagos infectados com *Toxoplasma* são juntamente com células dendríticas e neutrófilos, uma fonte importante de IL-12 no início da infecção (ALIBERTI, 2005). IL-12 é uma citocina crucialmente importante na ativação de células natural killer (NK) para produção de IFN- γ , tanto como para conduzir a proliferação das células T CD4⁺ e CD8⁺ que também produzem IFN- γ (REIS e SOUZA et al, 1997). As células NK possuem vários receptores de quimiocinas que facilitam este processo, o mais importante dentre eles parece ser CCR5. Redução da migração da célula NK ao local da infecção é visto em camundongos CCR5^{-/-} infectados por *T. gondii*. Embora isso leve a uma resposta inflamatória reduzida à infecção, camundongos CCR5^{-/-} eventualmente sucumbem devido ao aumento da parasitemia (KHAN et al., 2006). Em nossos estudos os níveis de TNF- α e RANTES/CCL5 intestinal diferiram muito pouco entre os animais CV infectados por *T. gondii* e os grupos CTL e GF infectados, o que nos faz questionar seu significado biológico, a despeito da significância estatística. Apesar dos níveis de TNF- α e RANTES/CCL5 serem mais elevados nos animais CV infectados, tanto animais CV como animais GF sucumbem à infecção, portanto a morte dos animais não pode ser explicada pelo perfil de citocinas. Em nível local, no entanto, há correlação entre a gravidade da íleite em camundongos CV e os níveis de TNF- α induzida por *T. gondii*.

Uma variedade de vias dependentes de IFN- γ que podem ser ativadas para limitar a infecção aguda pelo *T. gondii* ressaltam a importância desta citocina na resistência a este parasito altamente bem sucedido. A produção de IFN- γ é significativamente aumentada em animais infectados CV e GF. No entanto, os animais GF produzem pelo menos duas vezes mais IFN- γ do que o CV. Foi descrito que a neutralização de IFN- γ , TNF- α e NO previne necrose do íleo e mortalidade dos camundongos, demonstrando que as lesões têm causa inflamatória maior do que destruição celular direta pelo parasito (LIESENFELD et al., 1996, LIESENFELD et al., 1999). No entanto, em nossas mãos a maior produção de IFN- γ por

camundongos GF infectados não está correlacionada com agravamento da patologia ou da mortalidade nestes animais.

Embora, as reações pró-inflamatórias sejam essenciais para a resistência à infecção por *T. gondii* uma resposta descontrolada conduz a uma patologia. O hospedeiro precisa equilibrar a resposta para maximizar a eliminação do patógeno, minimizando os danos a si mesmo (SHAW et al, 2006). Os micro-organismos patogênicos induzem a maturação de células dendríticas que conduzem à ativação de células T efetoras indispensáveis para controlar as infecções e para a prevenção de uma infecção subsequente com o mesmo ou patógeno relacionado (RESCIGNO et al., 2009).

A produção de IL-10 e TGF- β leva a ativação de células T reguladoras que inibem a resposta imune e induzem tolerância da mucosa (BARNES & POWRIE, 2009). A citocina anti-inflamatória IL-10 desempenha um papel crítico atenuando as respostas inflamatórias pela infecção por *T. gondii*. Conforme demonstrado por Gazzinelli e colaboradores (1996), camundongos IL-10^{-/-} são incapazes de neutralizar os efeitos inflamatórios do IFN- γ e sucumbem durante a fase aguda da doença com patologia acentuada. Entretanto, em nosso trabalho com o tempo de infecção e o inóculo de 10 cistos não detectamos produção significativa de IL-10, em ambos os grupos.

Outras citocinas anti-inflamatórias envolvidas na regulação da imunopatologia são TGF- β e IL-27. TGF- β secretada por linfócitos epiteliais intestinais está envolvida no controle da patologia intestinal após infecção oral por *T. gondii* (MENNECHET et al., 2004). Em relação aos níveis de TGF- β , apesar da ausência de significância estatística, animais CV e GF infectados apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparados aos seus controles não infectados. Além disso, os níveis de IFN- γ correlacionaram-se inversamente com os níveis de TGF- β em ambos os grupos.

Os neutrófilos estão normalmente presentes na corrente sanguínea onde sobrevivem somente por algumas horas depois de serem liberados da medula óssea. Eles são as primeiras células fagocíticas recrutadas para o local de infecção onde eles fagocitam e matam os patógenos via liberação de componentes antimicrobianos de seus grânulos, produção de compostos reativos de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO) (VAN GISBERGEN et al., 2005).

Os macrófagos são as células fagocíticas mais importantes na detecção e eliminação de patógenos. Juntamente com as células dendríticas eles fornecem a primeira linha de defesa mediada por células, e são cruciais na limitação inicial da disseminação e/ou crescimento de micro-organismos infecciosos e na modulação das reações imunológicas (STAFFORD et al., 2002). Para avaliar a constituição dos infiltrados inflamatórios, que são descritos na literatura

como sendo caracterizados principalmente pela presença de neutrófilos e macrófagos, realizamos experimentos que dosaram enzimas específicas desses dois tipos celulares, mieloperoxidase (MPO) e n-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente. A atividade de mieloperoxidase em amostras biológicas, a despeito das inconsistências e problemas de reprodutibilidade, tem sido usada para indicar indiretamente o conteúdo de neutrófilos nos tecidos. Discute-se que a atividade enzimática de MPO medida por nosso ensaio pode variar consideravelmente mesmo na presença de quantidade similar de proteína MPO no tecido, em parte devido à presença de polimorfismos, inibidores endógenos e outras peroxidase (PULLI et al, 2013).

Nossos resultados apontam uma diminuição da atividade de MPO intestinal em animais infectados CV e GF em relação aos seus controles não infectados. Além disso, a atividade de MPO dosada no intestino dos animais CV infectados (com patologia intestinal mais grave) foi menor do que atividade de MPO nos animais GF infectados, que apresentavam proteção em relação aos danos teciduais, menor permeabilidade e ausência de infiltrado inflamatório detectável pela microscopia óptica. Podemos sugerir que além do tempo examinado no qual há informações na literatura de que os parasitas já teriam migrado para a circulação, o *T. gondii* induz uma supressão da migração celular para o intestino conforme descrito por Van Gisbergen (2005) e colaboradores e por Bliss e colaboradores (2001), o que parece estar ocorrendo em ambos os grupos experimentais infectados. No entanto, outra explicação para uma diminuição da dosagem da atividade em relação aos controles que é estatisticamente significativa e foi repetida e confirmada em nossas amostras, poderia ser o fato de que na ausência de microbiota e estímulo degranulatório a enzima estaria preservada no interior das poucas células presentes na mucosa dos animais GF ao invés de ter sido liberada para o espaço extracelular como é descrito nos animais CV, onde no intestino sua atividade sofreria ação dos muito abundantes inibidores (PULLI et al, 2013). Para corroborar este raciocínio lembramos que os resultados da atividade de MPO nos demais órgãos internos estudados, mostraram correlação entre a presença de infiltrado inflamatório e as dosagens enzimáticas. No intestino, a medida da atividade de NAG não foi diferente entre animais infectados e não infectados de ambos os grupos. Vale ressaltar que os dados de MPO descritos na literatura como representativos de um processo inflamatório envolvendo a presença de infiltrado neutrofilico nem sempre foram comparadas com a histopatologia, embora outros estudos tenham estudado especificamente a correlação entre inflamação intestinal e os níveis da enzima (SMITH & CASTRO, 1978)

A fim de obter informações sobre as diferenças na evolução da doença em consequência do estado GF estudamos o fígado, baço, pulmões e cérebro aos 8 dias após a infecção, pouco antes da morte dos animais. Após a multiplicação e ruptura das células infectadas, taquizoítos invadem células vizinhas e disseminam através do sangue e sistema linfático (BUZONI-GATEL et al., 2006). De acordo com a literatura o fígado é frequentemente acometido quando taquizoítos penetram em hepatócitos e células de Kupffer, se multiplicam e matam as células infectadas, produzindo focos de necrose no parênquima, frequentemente acompanhadas por infiltrados inflamatórios, predominantemente de mononucleares (FRENKEL, 1988). Observamos tais achados tanto no grupo CV quanto no grupo GF. Contudo, os focos de infiltrados inflamatórios e lesão necrótica no fígado dos animais GF infectados ocorrem de maneira significativamente menos grave quando comparada aos animais CV infectados por *T. gondii* (Fig. 12 e 13), bem como os demais marcadores de atividade inflamatória tais como MPO e NAG (Fig. 14).

O baço dos animais convencionais infectados com *T. gondii* após 8 dias de infecção apresentou redução da área dos folículos linfóides com perda da arquitetura habitual organizando-se em estruturas nodulares atípicas (Figura 15B). Segundo Frenkel (1988), pacientes humanos ou animais que morrem de toxoplasmose apresentam falência imunológica caracterizada por depleção linfocitária. Os níveis de MPO foram elevados nos camundongos CV infectados em comparação com seus controles. Também estes níveis são significativamente maiores nos CV que nos GF infectados, que não são diferentes de seus controles basais. (Fig. 16).

Os pulmões dos animais infectados oralmente por *T. gondii*, tanto CV como os animais GF infectados apresentaram lesões de intensidade semelhantes caracterizadas por aumento de celularidade septal, espessura do septo e extensas áreas de atelectasia. Nossa impressão é que a patologia pulmonar poderia ser a causa da insuficiência respiratória e *causa mortis* dos animais (Fig. 17). Outros autores atribuem também às lesões nos pulmões a letalidade em camundongos (FRENKEL, 1988; DUBEY et al., 2012). Boyle e colaboradores (2007) reportaram que após infecção oral por cistos de *T. gondii*, os parasitos chegam ao pulmão rapidamente, antes que outros órgãos da cavidade abdominal fossem infectados. Corroborando nosso achado histopatológico, a quantificação da extensão da lesão pulmonar por medida da relação entre área septal e área total mostrou que o alargamento dos septos às custas de atelectasia e aumento da celularidade ocorre de forma similar após a infecção tanto nos animais GF como nos CV.

Os camundongos CV infectados com *T. gondii* apresentaram alterações patológicas de grau discreto a moderado, no cérebro, quando comparados aos camundongos GF infectados. Os animais GF infectados não apresentaram sequer a discreta meningite com infiltração predominante de mononucleares que foi detectada nos animais CV. A ausência de lesões cerebrais importantes durante a fase aguda da toxoplasmose após infecção oral em camundongos também já foi observada em outros trabalhos (LIESENFELD et al. 1996, SMILEY et al. 2005, DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ et al. 2006, MORDUE et al. 2001, DUBEY et al. 2012). Por ser um local imunologicamente privilegiado, acredita-se que o cérebro seja o último órgão a ser atingido pelos taquizoítos. A barreira hematoencefálica atrasa o influxo de células infectadas, a chegada de mediadores de inflamação e de anticorpos ao cérebro, que passa a ter maior importância patológica na fase crônica da infecção (FRENKEL 1988, DUBEY et al. 2012). Em nossas mãos a condição GF parece proteger contra a inflamação induzida por *T. gondii* no início deste período de infecção, levantando questões sobre a evolução da doença crônica nestes animais, o que não pode ser estudado em função da mortalidade precoce induzida pela cepa utilizada por nós.

Em um segundo bloco de resultados, descrevemos o experimento piloto no qual testamos os efeitos preventivos/curativos de quatro probióticos na curva de sobrevivência dos animais convencionais infectados com *T. gondii*, dos quais selecionamos a levedura *S. boulardii* (SB) e a bactéria gram-negativa *E. coli* Nissle 1917 (EcN) como potenciais bioterapêuticos na infecção com a cepa de virulência intermediária (TgCTBr07) isolada no Brasil de *T. gondii*. *S. boulardii* foi escolhido por apresentar proteção na curva de sobrevivência e desenvolvimento ponderal de maior significância estatística. *E. coli* Nissle 1917 foi eleita para estudo por contraste, por não apresentar diferença estatística em relação aos demais probióticos analisados. Além disso, as bactérias gram-negativas têm sido associadas com agravamento da imunopatologia intestinal nos quadros de toxoplasmose experimental murina (HEIMESAAT et al., 2006).

O tratamento com *S. boulardii* foi capaz de prevenir a perda de peso, aumentar a sobrevivência e diminuir a permeabilidade intestinal; sintomas observados na fase aguda da infecção murina por *T. gondii*. Além disso, este tratamento foi capaz de prevenir as alterações histopatológicas intestinais e diminuir os níveis de IFN- γ , uma importante citocina pró-inflamatória. Observamos que os animais tratados apenas com *S. boulardii* apresentam alterações intestinais muito discretas, em geral sinais de edema e de hiperemia dos vasos da mucosa e submucosa. Não foi afetada a altura da mucosa e os sinais de infiltração celular são discretos, mas os achados indicam que o probiótico modifica a celularidade intestinal e a

permeabilidade vascular. O intestino delgado dos animais desafiados com *T. gondii* (TgCTBr07) apresentou alterações de distribuição e intensidade semelhantes às descritas na literatura (LIESENFELD, 2002). As alterações são segmentares com focos de maior intensidade intercalados por áreas normais ou pouco afetadas. Houve clara e mensurável proteção das lesões intestinais nos animais tratados com *S. boulardii* os quais apresentaram homogeneidade e regularidade da altura da mucosa, celularidade das criptas intestinais e da lâmina própria semelhante aos controles, além de edema muito mais discreto associado a infrequentes e focais fenômenos degenerativos epiteliais. A clara redução do infiltrado polimorfonuclear, das alterações vasculares e necrótico-degenerativas observada no grupo tratado com o probiótico associam-se com redução da permeabilidade induzida pelo parasito, bem como redução das citocinas pró-inflamatórias, e aumento dos produtos de macrófagos (NAG).

A produção de IFN- γ também ativa macrófagos para produzir TNF- α que sinergiza com IFN- γ para iniciar a produção de molécula microbicida, NO (MILLER et al., 2007). Em nossos estudos observamos que as citocinas pró-inflamatória (TNF- α e IFN- γ) apresentaram níveis elevados no grupo TgCTBr07, entretanto o grupo SB + TgCTBr07 apresentou redução para os níveis de IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória já descrita nas infecções por *T. gondii* (LIESENFELD et al.,1996; LIESENFELD et al.,1999). Em nosso estudo o tratamento com *S. boulardii* também foi capaz de diminuir em níveis estatisticamente significativos a permeabilidade intestinal dos animais que foram infectados por *T. gondii*.

Por outro lado, embora EcN seja incapaz de prevenir perda de peso e aumentar a sobrevivência, preveniu o aumento da permeabilidade intestinal, o aumento dos níveis de INF- γ e protegeu quanto aos parâmetros histopatológicos ainda que em menor grau que a levedura, a despeito de não impedir o aumento dos níveis de TNF- α de forma significativa.

As células NK possuem vários receptores de quimiocinas, o mais importante dentre eles parece ser CCR5. Redução da migração da célula NK no intestino foi observado em camundongos CCR5^{-/-} infectados por *T. gondii*. Embora isso leve a uma resposta inflamatória reduzida à infecção, camundongos CCR5^{-/-} eventualmente sucumbem devido ao aumento da parasitemia (KHAN et al., 2006). Em nossos estudos os níveis de CCL5/RANTES foram similares em todos os grupos, embora estatisticamente elevados no grupo infectado TgCTBr07 quando comparado aos controles não infectados. Desta forma tratamento com os dois probióticos estudados não teve reflexo biológico nas dosagens de CCL5/RANTES. A despeito do papel descrito para IL-10 e TGF- β na toxoplasmose não verificamos diferenças nos níveis IL-10 e de TGF- β entre os grupos.

As dosagens de MPO estão muito diminuídas no intestino dos animais infectados não tratados em relação aos seus controles não infectados. Já os animais tratados com EcN apresentaram aumento da atividade de MPO, sendo comparáveis aos controles. Tal resultado poderia indicar o que já vem sendo descrito na literatura como um mecanismo de resistência do *T. gondii*, uma vez que já foi descrita uma diminuição na migração de células inflamatórias para o intestino na fase aguda da infecção. Os probióticos poderiam ajudar a reverter este efeito. Outras limitações do método já foram discutidas acima.

Avaliamos a histopatologia e estratificamos os grupos por critérios de acometimento inflamatório do fígado, o que resultou em uma análise semiquantitativa onde levamos em consideração a extensão da inflamação e da necrose no parênquima hepático. Nossos resultados mostram que o grupo infectado apresentou grandes focos de infiltrado inflamatório e necrose ocupando grande extensão do parênquima obtendo um escore 4 na maioria das amostras analisadas (Fig. 31). Os grupos tratados com os probióticos apresentaram redução no escore indicando proteção, o que se correlaciona com o parâmetro de diminuição da permeabilidade já discutido acima. MPO e NAG aumentaram na presença de infecção, mas não sofreram alteração pelo tratamento com os probióticos. Quanto a dosagem de NAG houve aumento significativo em animais tratados com EcN e SB em relação aos infectados, que por sua vez não diferem significativamente dos controles.

Os baços de animais infectados exibiram alterações características de uma hiperplasia reacional embora com pequena participação dos centros germinativos. As alterações induzidas pelos probióticos ou pela associação da infecção incluem discreta diminuição da celularidade dos centros germinativos, correlacionáveis com as menores dosagens de NAG. As dosagens de MPO não variaram entre os grupos (não mostrados).

A análise da histopatologia do pulmão mostrou uma pneumonite intersticial de grau moderado, associada com grande redução da área alveolar em decorrência de atelectasias e espessamento septal nos animais infectados. Nas áreas peribronquiais e peribronquioalveolares o infiltrado é composto por mononucleares e polimorfonucleares. Estas alterações foram quantificadas morfometricamente e nossos resultados mostraram que apenas os animais tratados com SB protegem consideravelmente o pulmão destas lesões.

A ausência de proteção pela EcN se correlaciona com a ausência de proteção quanto á mortalidade reforçando a hipótese de que o acometimento pulmonar seja a *causa mortis* nestes animais.

No cérebro a inflamação meníngea aguda e discreta reatividade vascular induzida pelo *T. gondii* foram evitadas pelo tratamento com ambos os probióticos.

7 CONCLUSÃO

A microbiota possui um papel significativo no desenvolvimento da patologia ocasionada pelo *T. gondii*. Apesar de, na curva de sobrevivência, os animais convencionais (CV) infectados oralmente por *T. gondii* não apresentarem diferença estatística quando comparados aos animais GF infectados, o desenvolvimento da doença em ambos os animais acontece de forma distinta. Enquanto nos animais CV ocorre aumento da permeabilidade intestinal com modificação das citocinas pró-inflamatórias intestinais, nos animais GF infectados não ocorre aumento da permeabilidade intestinal e não há modificação significativa da mucosa intestinal. Alterações significativas foram observadas no fígado e no cérebro de animais CV em comparação com os animais GF. Os pulmões de ambos animais CV e GF apresentaram lesões significativas que podem explicar a mortalidade similar. Os animais tratados com SB apresentaram aumento da sobrevivência, inibição da perda de peso, diminuição da permeabilidade intestinal e clara e mensurável proteção das lesões intestinais causadas pelo parasito, além de proteção das lesões pulmonares. Entretanto, os animais tratados com EcN não apresentaram proteção na sobrevida, na perda de peso e nas lesões pulmonares, apesar de apresentarem redução da permeabilidade intestinal e proteção das lesões intestinais. O tratamento com SB produz uma imunomodulação local e sistêmica, que protege quanto á sobrevida. EcN, apesar de não proteger quanto á curva de mortalidade, induz melhora, embora menos acentuada das lesões intestinais e hepáticas. No baço houve redução das dosagens de NAG, com ambos os probióticos.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M.; MIDTVEDT, T.; URIBE, A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germ-free rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 29, p.445–451, 1994.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, p.162–170, 2005.
- ALTENHOEFER, A.; OSWALD, S.; SONNENBOM, U.; ENDERS, C.; SCHULZE, J.; HACKER, J.; OELSCHLAEGER, T.A. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.40, p.223-229, 2004.
- AMARAL, F.A.; SACHS, D.; COSTA, V.V.; FAGUNDES, C.T.; CISALPINO, D.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; SILVA, T.A.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 105 p.2193–2197, 2007.
- 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 p.61-69, 1997.
- ARUNACHALAM, K.D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, v.19, p.1559-1597, 1999.
- ARVOLA, T.; LAIHO, K.; TORKKELI, S.; MYKKÄNEN, H.; SALMINEN, S.; MAUNULA, L.; ISOLAURI, E. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics*, v.104, p.e64, 1999.
- ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M.W.; COFFMAN, R.L.; POWRIE, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, v.190, p.995–1004, 1999.
- BAIN, C.C.; BRAVO-BLAS, A.; SCOTT, C.L.; GOMEZ PERDIGUERO, E.; GEISSMANN, F.; HENRI, S.; MALISSEN, B.; OSBORNE, L.C.; ARTIS, D.; MOWAT, A.M. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol.*, v.10, p.929-37, 2014.
- BARANWAL, A.K.; SINGHI, S.C. Probiotic Use in the Critically ill *J Trop Pediatr.*, v.75, p.621-627, 2008.
- BARNES, M.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*, v.31, p.401–411, 2009.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.*, v.11, p.426-30, 2003.
- BASUALDO, J.; SPARO, M.; CHIODO, P.; CIARMELA, M.; MINVIELLE, M. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. *Ann Trop Med Parasitol.* v.101, p.559–62, 2007.

BAUTISTA-GARFIAS, C.R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; LÓPEZ, M.G. AGUILAR-FIGUEROA, B.R. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. **Parasite**, v.8, p.226–8, 2001.

BESIRBELLIOGLU BA, ULCAIY A, CAN M, ERDEM H, TANYUKSEL M, AVCI IY, et al. *Saccharomyces boulardii* and infection due to *Giardia lamblia*. **Scand J Infect Dis.**, v.38, p.479–81, 2006.

BLISS, S.K.; GAVRILESCU, L.C.; ALCARAZ, A.; DENKERS, E.Y. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infect. Immun.**, v.69, p.4898–4905, 2001.

BOYLE, J.P., SAEIJ, J.P., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: inconsistent dissemination patterns following oral infections in mice. **Exp Parasitol.**, v.116 p.302-5, 2007.

BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 564-568, 1998.

BRANDTZAEG, P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. **Curr Opin Gastroenterol.**, v.26 p.554–563, 2010.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int. Immunopharmacol.** v.1, p.1457–1467, 2001.

BURES, J.; SMAJS, D.; KVETINA, J.; FÖRSTL, M.; SMARDA, J.; KOHOUTOVA, D.; KUNES, M.; CYRANY, J.; TACHECI, I.; REJCHRT, S.; LESNA, J.; VORISEK, V.; KOPACOVA, M. Bacteriocinogeny in experimental pigs treated with indomethacin and *Escherichia coli* Nissle. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, p.609-17, 2011.

BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infect. Immun.**, v.70, p.5216–5224, 2002.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L.C.; KASPER, L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cell. Microbiol.**, v.8, p.535–544, 2006.

CALVERT, R.J.; OTSUKA, M.; SATCHITHANANDAM, S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **J. Nutr.**, v.119, p.1610-1616, 1989.

CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N., VITOR, R.W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v.51, p.901-7, 2013.

CHUNG, H.; KASPER, D.L. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. **Curr Opin Immunol.**, v.22, p.455–460, 2010.

- CLARK, M.A.; JEPSON, M.A. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, p. 17-39, 2003.
- COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v.107, p.309-16. 2006.
- DALLOUL, R.A.; HYUN, S.; LILLEHOJ, B.; NADA, M.; TAMIM, C.; TIMOTHY, A.; ET, A.L. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.28, p.351–61, 2005.
- DENKERS, E.Y.; BUTCHER, B.A.; DEL RIO, L.; KIM, L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. **Immunol Rev.**, v.201, p.191–205, 2004.
- DIAS, R.S.; BAMBIRRA, E.A.; SILVA, M.E.; NICOLI, J.R. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p. 323-325, 1995.
- DIMIER, I.H.; BOUT, D.T. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. **Immunology**, v.94, p.488–495, 1998.
- DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; KLUN, I.; KHAN, A.; NIKOLIC, A.; KNEZEVIC-USAJ, S.; BOBIC, B.; SIBLEY, L.D. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. **Microbes Infect.**, v.8, p.2206-12, 2006.
- DUBEY, J.P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. **Parasitology**, v.116, p.43–50, 1998.
- DUBEY, J.P. The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures. In: Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E., editors. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris: Springer-Verlag; p. 271-5, 2000.
- DUBEY, J.P.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; MCLEOD, R. Oral oocysts-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, v.139, p.1-13, 2012.
- DUBEY, J.P.; KOTULA, A.W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C.D.; LINDSAY, D.S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J Parasitol.**, v.76, p.201–4, 1990.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev.**, v.11, p.267–99, 1998.
- DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.; BLIXT, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.83, p.870–882, 1997.
- DUC, L.H.; HONG, H.A.; BARBOSA, T.M., HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl Env Microbiology**, v.70, p.2161-71, 2004.

DUCLUZEAU, R. Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In BERGOGNE-BEREZIN, E. (eds.). **Microbial Ecology and Intestinal Infections**. Paris: Springer-Verlag, p.7-29, 1989.

DUERKOP, B.A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L.V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. **Immunity**, v.31, p.368-76, 2009.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. May;11p., 2002.

FEDORAK, R.N. Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease, p. 71-95. In KIRSTNER, J.B.; SHORTER, R.G. (ed.). **Inflammatory Bowel Disease**, 4th, ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md, 1995.

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

FIORINI G, CIMMINIELLO C, CHIANESE R. *Bacillus subtilis* selectively stimulates the synthesis of membrane bound and secreted IgA. **Chemioterapia**, V.4, P.310-12, 1985.

FLORASTOR, 2006. Disponível em <http://www.florastor.com>. Acesso em 20 de janeiro de 2015.

FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol Today** v.4, p.273-8, 1988.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol.**, v.66, p.365–378, 1989.

FURNESS, J.B.; KUNZE, W.A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G922-G928, 1999.

FUSS, I.; NEURATH, M.; BOIRIVANT, M.; et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphocyte secretion profiles in inflammatory bowel disease. **J Immunol**, v.157, p.1261–70, 1996.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v.7, p.503-14, 2010.

GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.25, p.741-757, 2007.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHEEVER, A., KÜHN, R., MÜLLER, W., TRINCHIERI, G., SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, v.157, p.798–805, 1996.

GELENEKY, M. Toxoplasmosis in pregnancy - questions in clinical practice. **Klin Mikrobiol Infekc Lek.**, v.19, p.48-51, 2013.

GENEROSO, S.V.; VIANA, M.L.; SANTOS, R.G.; ARANTES, R.M.; MARTINS, F.S.; NICOLI, J.R.; MACHADO, J.A.; CORREIA, M.I.; CARDOSO, V.N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **Eur. J. Nutr.**, v.50, p.261-269, 2011.

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

GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. **Rev. Infect. Dis.**, v.12, p.S252–S261, 1990.

GORDON, H.A. Morphological and physiological characterization of germfree life. **Ann N Y Acad Sci**, v.78, p.208–20, 1959.

GORDON, H.A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as tool in the study of host microbial relationships. **Bacteriol. Rev.**, v. 35, p.390-429, 1971.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann. Ist.Super. Sanità**, v.40, p.65-70, 2004.

GUARNER, F. The enteric microbiota. **Morgan & Claypool Life Sciences**, 2012.

GUERRA, P. V. et al. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World J Gastroenterol**, v.17, n.34, Sep 14, p.3916-21. 2011.

GUSTAFSSON, B.E. Germ-free rearing of rats, general techniques. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.** 111(Suppl. LXX), 1948.

GUSTAFSSON, B.E.; MIDTVEDT, T.; STRANDBERG, K. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germ-free rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.5, p. 309-314, 1970.

HEIMESAAT, M.M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H.K.; DUNAY, I.R.; MOTER, A.; GESCHER, D.M.; SCHUMANN, R.R.; GÖBEL, U.B.; LIESENFELD, O. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunology**, v.177, p.8785-8795, 2006.

HILL, D.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v.6, p.41-61, 2005.

HILL, D.A., ARTIS, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. **Annu Rev Immunol.**, v.28, p.623–667, 2010.

HOFMAN, P. Pathological interactions of bacteria and toxins with the gastrointestinal epithelial tight junctions and/or the zonula adherens: an update. **Cell Mol. Biol.**, v.49, p.65-75, 2003.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med.**, v.11, p.S45–S53, 2005.

- HUGIT, J.P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, p.599–603, 2001.
- JEPSON, M.A.; CLARK, M.A. Studying M cells and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v.6, p.359-365, 1998.
- JOHNSON, A.M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitol Today.**, v.13, p.393–7, 1997.
- KASPER, L.; BUZONI-GATEL, D.; BOOTHROYD, J.; GRIGG, M.; DUTTA, C.; MENNECHET, F. Oral toxoplasmosis: a murine model for human IBD? In: Abstracts of the International Congress on Toxoplasmosis (Freising, Germany, 2001). Available at <http://www.t-gondii.de>
- KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, v.14, p.150–156, 1998.
- KELLY, D.; MULDER, I.E. Microbiome and immunological interactions. **Nutrition Reviews**, v.70, p.S18-30, 2012.
- KHAN, I.A.; THOMAS, S.Y.; MORETTO, M.M.; LEE, F.S.; ISLAM, S.A. et al. (2006) CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathog.**, v.2, p.e49, 2006.
- KIM, Y.S.; HO, S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol.**, v.12, p.319-30, 2010.
- KONSTANTINOV, S.R.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; BRUIJNS, S.C.; SINGH, S.K.; VALENCE, F.; MOLLE, D.; LORTAL, S.; ALTERMANN, E.; KLAENHAMMER, T.R.; VAN KOOYK, Y. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proc Natl Acad Sci.**, v.105, p.19474-9. 2008.
- KOTULA, A.W.; DUBEY, J.P.; SHARAR, A.K.; ANDREWS, C.D.; SHEN, S.K.; LINDSAY, D.S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J Food Prot.**, v.54, p.687–90, 1991.
- KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 301-332, 2000.
- KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v.75, p.263–74, 1993.
- LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cell Microbiol.**, v.8, p.1611-23. 2006.
- LAROIA, S.; MARTIN, J.H. Methods for enumeration and propagating bifidobacteria. **Cultured Dairy Products Journal**, v.26, p.32-33, 1991.
- LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **J Appl Microbiol.**, v.98, p.1303-15. 2005.

- LIESENFELD, O. Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.S96–101, 2002.
- LIESENFELD, O.; HOIL, K.; DANIEL, P.; THU, A.N.; CHANDAN, V.P.; HISAMI, W.; TORU, A.; ALAN, S.; JACK, S. R.; YASUHIRO, S. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.**, v.21, p.365-376, 1999.
- LIESENFELD, O.; JAN, K.; JACK, S. R.; YASUHIRO, S. Association of CD4⁺ T Cell-dependent, Interferon- γ -mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.184, p.597-607, 1996.
- LIESENFELD, O.; NGUYEN, T.A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **J Parasitol.**, v.87, p.1491-3, 2001.
- LIMA FILHO, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* ssp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 365-371, 2000.
- LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G.; KOROLIK, V.; MCGUCKIN, M.A.; Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunol.**, v.1, p.183–197, 2008.
- LIU, C.H.; FAN, Y.T.; DIAS, A.; ESPER, L.; CORN, R.A.; BAFICA, A.; MACHADO, F.S.; ALIBERTI, J. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.**, v.177, p.31–35, 2006.
- MACDONALD, T.T. The mucosal immune system. **Parasite immunology**, v.25, p.235-46, 2003.
- MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. **Br. Med. Bull.**, v.71, p.1-11, 2004.
- MAGALHÃES, J.G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S.E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Semin Immunol.**, v.19, p.106-15, 2007.
- MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Typhimurium*. **Vet. Microbiol.**, v.79, p.183-189, 2001.
- MALOY, K.J.; POWRIE, J.F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, p.298-306, 2011.
- MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F.C.P.; SOUSA, LIRLÂNDIA P.; ARAÚJO, H.R.C.; PIMENTA, P.F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation

as ones of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, p.270-279, 2013.

MARTINS, F.S.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; PENNA, F.J.; NICOLI, J.R. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, p. 151-155, 2005.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.109-113, 2004.

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

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of na innovative biotherapeutic agent. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v.6, p.157-171, 1993.

MCLEOD, R.; ESTES, R.G.; MACK, D.; COHEN, H. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. **J Infect Dis.**, v.149, p.234-44, 1984.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.1, p.135-145, 2001.

MENNECHET, F.J.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N.; LI, W.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Lamina propria CD4⁺ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **J. Immunol.**, v.168, p.2988-2996, 2002.

MENNECHET, F.J.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N.; MINNS, L.A.; LUANGSAY, S.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4⁺ T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.34, p.1059-1067, 2004.

MESLIN, J.C.; SACQUET, E.; GUENET, J.L. Action of bacterial flora on the morphology and surface mucus of the small intestine of the rat. **Ann Biol Anim Biochim Biophys**, v.13, p.203-14, 1973.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M.W.; ELSON, C.O. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. **Gut**, v.44, p.2-5, 1999.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N, C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.39, p. 23-39, 2009.

MOAL, L.V.; SERVIN, A.L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: **Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota**, v.19, p.315-37, 2006.

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

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**. 363:1965-76, 2004.

MORDUE, D.G.; MONROY, F.L.A.; REGINA, M.; DINARELLO, C.A.; SIBLEY, L.D. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J Immunol.**, v.167, p.4574-84, 2001.

MOREAU, M.C.; DUCLUZEAU, R.; GUY-GRAND, D.; MULLER, M.C. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. **Infect Immun.**, v.21, p.532-9, 1978.

NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germ-free mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 31, p. 239-243, 1991.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV- H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Braz. J. Med. Biol.Res.**, v. 31, p.1565-1573, 1998.

NEURATH, M.; MEYER, Z.U.M.; BÜSCHENFELDE, K.H. Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. **J Invest Med**, v.44, p.516-21, 1996.

NEURATH, M.F.; FUSS, I.; KELSALL, B.L.; STUBER, E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med**, v.182, p.1281-90, 1995.

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

NEVES, M.J.; ETCHEBEHERE, L.; BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; LIMA, M.E.; NICOLI, J.R. Partial characterization of cholera toxin binding on membranes of *Saccharomyces boulardii*. **Microecol. Ther.**, v. 29, p. 185-190, 2002.

NICOLI, J.R.; RAIBAUD, P. In vivo and in vitro antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp. from human intestinal flora in mice. **Microecol. Ther.** v. 20, p. 141-146, 1990.

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, p.603-6, 2001.

PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p.821-32, 2012.

PACHECO-SOARES, C.; DE SOUZA, W. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, v.86, p.11-7, 2000.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G., GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **J Dairy Sci**, v.78, p.1597-606, 1995.

PERET FILHO, L.A.; PENNA, F.J.; BAMBIRRA, E.A.; NICOLI, J.R. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 111-116, 1998.

PICKERD, N.; TUTHILL, D. Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment. **Postgrad Med J.**, v.80, p.112–3, 2004.

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

POWRIE, F.T. cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. **Immunity**, v.3, p.171–4, 1995.

PULLI, B.; MUHAMMAD, A.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, K.L.C.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, J.J.; CHEN, J.W. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PLoS One**, 2013 v.8 p.7, 2013.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R.N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.**, v.186, p.1819–1829, 1997.

REMINGTON, J.S.; DESMONTS, G.; MCLEOD, R. *Toxoplasmosis*. In: Remington JS, Klein JO. eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. **Philadelphia: WB Saunders**, p.140–243, 1995.

RESCIGNO, M.; DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. **J Clin Invest.**, v.119, p.2441–2450, 2009.

RODRIGUES, A.C.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.1-12, 2000.

RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **J Appl Bacteriol.**, v.81, p.251-6, 1996.

SADLACK, B.; MERZ, H.; SCHORLE, H.; SCHIMPL, A.; FELLER, A.C.; HORAK, I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. **Cell**, v.75, p.253–61, 1993.

SANDERS, M.E.; GUARNER, F., GUERRANT, R.; HOLT, P.R.; QUIGLEY, E.M.; SARTOR, R.B.; SHERMAN, P.M.; MAYER, E.A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**. v.62, p.787-796, 2013.

SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. **Semin. Immunol.**, v. 11, p. 193-203, 1999.

SARTOR, R. B. 1995. Microbial factors in Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation, p. 96–124. In J. B. Kirsner and R. G. Shorter (eds.), Inflammatory bowel disease, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. p.1418-1434, 1986.

SCHIERACK, P; KLETA, S; TEDIN, K; BABILA, J.T; OSWALD, S; OELSCHLAEGER, T.A; HIEMANN, R; PAETZOLD, S; WIELER, L.H. *E. coli* Nissle 1917 affects *Salmonella* adhesion to porcine intestinal epithelial cells. **PloS One**, v.6, e14712, 2011.

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

SCHULTZ, M. Clinical Use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, p.1012-1018, 2008.

SEKIROV, I.; FINLAY, B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. **J Physiol.**, v.587, p.4159–4167, 2009.

SENESI, S.; CELANDRONI, F.; TAVANTI, A.; GHELARDI, E. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p.834–839, 2001.

SHAW, M.H., FREEMAN, G.J., SCOTT, M.F., FOX, B.A., BZIK, D.J., BELKAID, Y., YAP, G.S., Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN- γ dependent IL-10 reactivation. **J. Immunol.**, v.176, p.7263–7271, 2006.

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

SILVA, M. E. Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Belo Horizonte, 1986.

SIMPSON, P.J. et al. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.54, p.401-6, 2004.

SMILEY, S.T.; LANTHIER, P.A.; COUPER, K.N.; SZABA, F.M.; BOYSON, J.E.; CHEN, W.; JOHNSON, L.L. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. **J Immunol.** v.174, p.7904-11, 2005.

SMITH, J.W; CASTRO, G.A. Relation of peroxidase activity in gut mucosa to inflammation. **Am J Physiol.**, v. 234, p.R72-9, 1978.

SOBKO, T.; REINDERS, C.; NORIN, E.; MIDTVEDT, T.; GUSTAFSSON, L.E.; LUNDBERG, J.O. Gastrointestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.287 p.993–7, 2004.

SOUZA, T. C. et al. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. **J Appl Microbiol**, v.112, n.6, Jun, p.1184-92. 2012.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.28, p.187–248, 2002.

STEINHOFF, U.; BRINKMANN V, KLEMM U, et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. **Immunity**, v.11, p.349–58, 1999.

SZAJEWSKA, H. et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. **J Pediatr.**, v.138, p.361-5. 2001.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, M.L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.**, v.30, p.1217-1258, 2000.

TREXLER, P.C. A rationale for the development of gnotobiotics. **Lab. Anim.**, v. 12, p.257-262, 1978.

VAN GISBERGEN, K.P.; GEIJTENBEEK, T.B.; VAN KOOYK, Y.; Close encounters of neutrophils and DCs. **Trends Immunol.** v.26, p.626–631, 2005.

VIANA, M.; SANTOS, R.; GENEROSO, S.; et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition.** v.26, p.218-233, 2010.

VIEIRA, L. Q.; OLIVEIRA, M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C. Parasitic infection in germ-free animals. **J. Med. Biol. Res.**, v.31, p. 105-110, 1998.

VIERIA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; MARTINS, F.S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Front Immunol.**, v.12, p.1-12, 2013.

WOSTMANN, B.S. The germfree animal in nutritional studies. **Annu Rev Nutr.**, v.1, p.257–79, 1981.

YAN, Y.; KOLACHALA, V.; DALMASSO, G.; NGUYEN, H.; LAROUI, H.; SITARAMAN, S.V.; MERLIN, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS ONE**, v.29, p.4, 2009.

ANEXO A



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 394 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Efeito da Administração Oral de Probiótico na Toxoplasmose Experimental Murina", que tem como responsável ROSA MARIA ESTEVES ARANTES, 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 25/03/2014. Este certificado espira-se em 25/03/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 394 / 2013, related to the Project entitled "Effect of Oral Administration of Probiotic in Experimental Murine Toxoplasmosis", under the supervision of ROSA MARIA ESTEVES ARANTES, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/03/2014. This certificate expires in 25/03/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 25/03/2014.

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 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B

PONE-D-15-07757

Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice
PLOS ONE

Dear Dr. Arantes,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-15-07757.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,

PLOS ONE

ANEXO C

Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice

Bruna Bernardo Nascimento¹, Christiane Teixeira Cartelle¹, Maria de Lourdes Meirelles Noviello¹, Breno Veloso Pinheiro², Rebeca Cardoso Pedra¹, Simone de Vasconcelos Generoso⁴, Valbert Nascimento Cardoso⁴, Danielle da Glória Souza³, Jacques Robert Nicoli³, Ricardo Wagner de Almeida Vitor², Flaviano dos Santos Martins³, Rosa Maria Esteves Arantes^{1*}

¹Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author: Arantes RME, ¹Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: +55.31.34092884/96. Fax: +55.31.34092879. e-mail: rosa@icb.ufmg.br

Running head: Influence of indigenous microbiota in murine experimental toxoplasmosis

Abstract

The indigenous intestinal microbiota promotes host animal homeostasis and may protect the host against pathogens. Germ-free animals provide an important tool for the study of interactions between host and microbiota. Toxoplasmosis represents one of the most common zoonoses worldwide. Its causing agent, *Toxoplasma gondii*, causes a severe innate pro-inflammatory response. In this study, we assess the role of indigenous microorganisms in disease development utilizing a murine toxoplasmosis model, which includes conventional (CV) and germ-free (GF) mice. CV and GF mice orally inoculated with *T. gondii* had similar survival curves. However, disease developed differently in the two animal groups. In CV mice, intestinal permeability increased and levels of intestinal pro-inflammatory cytokines were altered. In GF animals, there was little alteration in the intestinal mucous layer, but the liver and lungs displayed larger lesions. We conclude that, despite similar survival curves, CV animals succumb to an exaggerated immune response, whereas GF mice fail to produce an adequate systemic response.

Keywords: Toxoplasmosis; *Toxoplasma gondii*; microbiota; germ-free mice.

Introduction

Intestinal microbiota plays an important role in host animal homeostasis [1-2]. Infections frequently cause changes to this microbiota, which may in turn lead to an exaggerated inflammatory response [3]. Gnotobiotic experiments utilize germ-free hosts, or hosts with modified intestinal microbiotas. These experiments isolate the direct effects of exogenous and endogenous factors from effects potentially mediated by the interaction with intestinal microorganisms. In this sense, previous reports have shown that germ-free animals may become more or less susceptible to infection by different pathogens [4].

The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* can infect a great variety of cells in warm-blooded animals. *T. gondii* has a broad worldwide distribution, and approximately one-third of the human population is serum positive for the parasite [5]. The acute phase of infection usually goes undetected, and human hosts may go through life with cysts in brain and muscle tissues. Infection occurs when an individual ingests raw or undercooked meat containing cysts, or water and foods contaminated with oocysts [6] that release bradyzoites or sporozoites in the small intestine. Once in the intestine, the parasite rapidly invades the intestinal mucosa, where it becomes a tachyzoite capable of infecting mucosal and submucosal cells. Infected cells secrete cytotoxic molecules that attract neutrophils, macrophages, monocytes and T-cells [7]. Immune cells, in turn, secrete cytokines that stimulate the adaptive immune response. Dendritic cells capture and process parasite antigens for presentation and stimulation of T-cells. CD4⁺ T-lymphocytes in the lamina propria, in synergy with infected enterocytes, secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ . The latter induces macrophages, dendritic cells and enterocytes to produce microbicidal molecules such as NO, which should eliminate the parasite [8]. However, *T. gondii* turns infected immune cells less responsive to IFN- γ , and thus less effective against the parasite [9].

In humans, toxoplasmosis can be fatal, especially for fetuses and immunocompromised individuals. In immunocompetent individuals, however, the immune response effectively impairs tachyzoite replication, and protozoans form cysts containing the slowly-dividing bradyzoites. This change characterizes the second (chronic) phase of the infection [10].

In the current study, we assessed the potential role of the indigenous microbiota on the development and outcome of toxoplasmosis by comparing the clinical, histopathological and

immunological parameters of conventional (CV) versus germ-free (GF) mice that were orally inoculated with *T. gondii*.

Materials and methods

Animals

Germ-free (GF) and conventional (CV) 6-8 weeks-old female NIH Swiss mice (Taconic, Germantown, NY, USA) were used in this study. Water and commercial autoclavable diets (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) were sterilized by steam and administered *ad libitum*. GF mice were housed in flexible plastic isolators (Standard Safety Equipment Company, McHenry, IL, USA) and handled according to established procedures. Experiments with gnotobiotic mice were carried out in micro-isolators (Uno Roestvaststaal, BV, Zevenaar, The Netherlands). CV animals were maintained in a ventilated animal caging system (Alesco Ltda., Campinas, SP, Brazil). GF and CV mice were housed in an animal facility with controlled lighting (12-h light-dark cycle), humidity (60-80%) and temperature (22±1°C). All experimental procedures were carried out according to the standards set forth by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and the Brazilian College for Animal Experimentation (2006). The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CEUA/UFMG, protocol n° 394/2013).

Experimental infection

Cysts were obtained from the brains of Swiss mice that were chronically infected with the intermediate virulence strain TgCTBr07. Brains were macerated in hemolysis tubes, after which 1mL of sterile PBS was added and the solution was homogenized. Cysts were counted under light microscopy, and the final concentration was adjusted to 10 cysts per 0.1mL of sterile PBS. Animals were then inoculated by oral gavage, and, in 30 days, cysts were available for either strain maintenance or experimental use [11].

Experimental design

Survival curves were generated with 10 CV and 10 GF animals. Intestinal permeability analysis involved 12 CV animals and 12 GF animals divided into four groups of 6 individuals: control CV (CTL-CV), infected CV (TgCTBr07-CV), control GF (CTL-GF), and infected GF (TgCTBr07-GF). Histological and immunological analyses involved 20 CV and 20 GF mice as grouped as above, with 10 individuals per group. At the end of the

experimental period, all animals were anesthetized and blood was collected from the axillary plexus. Following this procedure, animals were euthanized by cervical dislocation, and the small intestine, liver, spleen, lungs and brain were collected for further analysis, as well as the intestinal fluid for the assessment of secretory Immunoglobulin A (sIgA) levels.

Intestinal permeability

Intestinal permeability was determined by measuring radioactivity diffusion in the blood after intragastric administration of diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) labeled with 18.5 mebecquerel (MBq) of ^{99m}-technetium (DTPA-^{99m}Tc). After 8 days of infection, all mice received 0.1 mL of DTPA - ^{99m}Tc solution by gavage. After 240 mins., all animals (6 per group) were anesthetized and the blood was collected and placed in appropriate tubes for radioactivity determination [12] (VIANA et al., 2010). The data were expressed as % dose, using the following equation: % Dose = (cpm of blood/cpm of administered dose) x 100, where cpm represents counts per minute.

Intestinal sIgA levels

After killing, the small intestines of mice from all groups were removed, and the contents were withdrawn, weighed, and suspended in PBS using 500 mg of intestinal content per 2.0 mL PBS supplemented with an anti-protease cocktail. After centrifugation at 2,000 g and 4 °C for 30 mins., the supernatant was collected and kept frozen at -80 °C until use. Immunoglobulin levels in intestinal fluid were evaluated by ELISA using goat anti-mouse IgA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) and horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgA (A-4789, SIGMA). Color was developed with o-phenylene-diamine (OPD, Sigma), and absorbance at 492 nm was determined with an ELISA plate reader. The immunoglobulin concentrations were determined using a purified mouse IgA standard (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)

Mieloperoxidase (MPO) activity assay

The extent of neutrophil accumulation in the tissue (intestine, liver, spleen and lung) was measured by assaying myeloperoxidase activity (MPO), as previously described. Briefly, the tissue (1g of tissue per 1.9 mL of buffer) was homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 mol/L NaCl, 0.02 mol/L NaPO₄, 0.015 mol/L Na-ethylenediaminetetraacetic acid), centrifuged at 10,621 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brazil) for 10 mins. and the pellet was subjected to hypotonic lyses (1.5 mL of 0.2% NaCl solution followed 30 seconds later by the addition of an equal volume of a solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose). Next, the pellet was

resuspended in 0.05 mol/L NaPO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and re-homogenized. One mL aliquots of the suspension were transferred into 1.5-mL Eppendorf tubes (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brazil) followed by three freeze-thaw cycles using liquid nitrogen. The aliquots were then centrifuged for 15 mins. at 10,621 g, the pellet was resuspended to 1 mL and samples were diluted before assay. Myeloperoxidase activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in optical density (OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mmol/L) and H₂O₂ (0.5 mmol/L). Results were expressed as the total number of neutrophils by comparing the OD of tissue supernatant with the OD of murine peritoneal neutrophils processed in the same way. Neutrophils were isolated from the peritoneum cavity of mice injected with 3 mL of casein 5%. A standard curve of neutrophil (95% purity) numbers versus OD was obtained by processing purified neutrophils as described above and assaying for MPO activity [13].

N-acetylglucosaminidase (NAG) activity assay

As a surrogate measure of macrophage activity, NAG activity was determined by enzymatic testing with the substrate p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine (Sigma-Aldrich). Tissue fragments were weighed and re-suspended at a ratio of 100 mg of tissue for 1.0 mL of 0.9% saline solution at 4°C containing 0.1% v/v Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany). The homogenized solutions were centrifuged at 10,621 x g, for 10 mins., at 4°C. Supernatants were then immediately collected and used for the NAG assay, performed according to the manufacturer's instructions. Results were expressed in relative units.

Intestinal cytokine levels

The concentration of TNF-α, IFN-γ, RANTES/CCL5, IL-10 and TGF-β in samples was measured in the intestine by using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). These samples were weighed and homogenized in 1 mL of PBS (0.4 M NaCl and 10 mM NaPO₄) containing antiproteases (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KI aprotinin A) and 0.05% Tween 20. Samples were then centrifuged for 10 mins. at 12,000 × g, and the supernatant was immediately used for ELISAs at a 1:3 dilution in PBS [14], using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Histopathological analysis

Intestines were stretched on filter paper and opened from the antimesenteric border. Intestinal contents were cleared without damage to the mucosal layer. Tissue samples were then pre-fixed for 10 mins. in a container with Bouin's solution with 2% glacial acetic acid. The pre-fixed intestines were placed on a flat surface and rolled from the distal to the proximal side with the mucosal layer facing inwards [15-16]. The intestinal rolls and other organs (liver, spleen, lung and brain) were then fixated by immersion in a 4% formaldehyde solution for 24h. Samples were routinely processed, embedded in paraffin and submitted to microtomy, so that 4 µm-thick histological pieces were obtained. Slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis.

Morphometric analysis

Tissue images were captured with a Cool SNAP-Proof Color video camera (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) and transferred to the computer using the Image-Pro Express software version 4.0 for Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Measurements were taken using the ImageJ software (version 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA – available online at <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

For small intestine analyses, 10 photomicrographs of H&E stained slides were obtained with the 4x objective lens of an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The extent of intestinal lesion was defined as the ratio between the total perimeter of affected areas and the total perimeter of the organ. Affected areas were those presenting lesion signs defined by the loss of tissue architecture, superficial erosion and epithelial inflammation). For the lung morphometric analyses, the 10x objective lens was used and results were expressed as the ratio between septal and total areas.

Semi-quantitative liver analysis

Liver samples stained with H&E were analyzed under light microscopy. A histopathological score was given according to the following metric: 0 – no alterations to the parenchyma and no increase in cellularity; 1 – A maximum of one isolated focus of inflammatory mononuclear cells (<10 cells) in all fields; 2 – Up to two infiltrated foci per field distributed in the parenchyma (>10 cells per focus); 3 – Frequent foci, 2 to 6 per field; 4 – Frequent and convalescent foci (>5 per field) accompanied by necrosis. All samples from two repeated experiments were examined with the 10x objective lens, n=5.

Statistical analysis

Statistical significance was determined for a minimum of two independent experiments using analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls or Bonferroni tests. The survival curve was analyzed with the Log Rank Survival test. GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for graph development and statistical analyses. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

Survival rates do not differ between CV and GF animals infected with *T. gondii*

Survival rates did not differ significantly between *T. gondii*-infected CV (TgCTBr07-CV) mice and infected GF (TgCTBr07-GF) mice ($p=0.2417$; Fig. 1A). At day 7 of infection, CV animals had lost more weight than GF animals ($p<0.001$). This difference, however, was no longer present on day 8 (Fig. 1B).

***T. gondii* infection increases sIgA production and intestinal permeability in CV but not GF mice**

Control CV (CTL-CV) animals produced more sIgA than CTL-GF mice (Fig. 1C). Moreover, infection significantly increased sIgA production in CV but not in GF mice (Fig. 1C). CTL-CV and CTL-GF mice had similar intestinal permeability. However, infection resulted in greatly increased permeability in CV but not GF animals (Fig. 2E).

***T. gondii*-induced lesions in the small intestine are larger in CV than in GF mice**

The ileum and jejunum of TgCTBr07-CV mice displayed histopathological alterations with similar distribution and intensity. There was focal loss of integrity in the mucosal layer, considerable height variation of the jejunal villi, increased cellularity in the mucosal and sub-mucosal layers, and edema on the top of villi associated with loss of the brush border. There were areas of epithelial cell degeneration, especially on the surface of villi (Fig. 2B).

The ileum and jejunum of TgCTBr07-GF mice also displayed alterations with similar distribution and intensity, albeit to much lesser degrees than those observed in TgCTBr07-CV mice. The mucosal layer in GF mice was mostly preserved, and only subtle epithelial

degeneration was observed (Fig. 2D). Moreover, morphometric analysis showed that lesions were larger in TgCTBr07-CV compared to both control groups and to TgCTBr07-GF mice (Fig. 2F).

The presence of neutrophils and macrophages was assessed through the activity of specific enzymes in the small intestine: MPO (Fig. 2G) and NAG (Fig. 2H), respectively. The TgCTBr07-CV mice had decreased MPO activity when compared to controls and to TgCTBr07-GF mice. There were no significant differences in NAG activity among groups.

Regarding TNF- α (Fig. 3A), levels were similar between the two control groups and were elevated in TgCTBr07-CV, but not TgCTBr07-GF mice. Levels of IFN- γ (Fig. 3B) were elevated by infection in CV and GF mice but more so in the latter. Levels of chemokine RANTES/CCL5 (Fig. 3C) were elevated by infection in CV and GF mice but more so in the former. Finally, levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 (Fig. 3D) and TGF- β (Fig. 3E) were not significantly different among groups.

More neutrophils and macrophages are recruited by the liver in TgCTBr07-CV than in TgCTBr07-GF mice

Livers of TgCTBr07-CV mice displayed numerous diffuse inflammatory foci mixing polymorphonuclear and mononuclear cells in the hepatic parenchyma along with intense vacuolar alterations to hepatocytes (Fig 4B). On the other hand, livers of TgCTBr07-GF mice were better preserved with sparse foci of smaller volume and subtle degeneration of hepatocytes (Fig. 4D). Quantitatively, the histopathology score of hepatic lesions was also significantly lower in TgCTBr07-GF compared to TgCTBr07-CV mice (Fig. 4E). These results are aligned with the analyses of MPO and NAG activities in the liver (Figs. 4F and 4G, respectively).

More neutrophils and macrophages are recruited by the spleen in TgCTBr07-CV than in TgCTBr07-GF mice

CV (Fig. 5A) and GF (Fig. 5C) mice presented similar spleen histopathology except for a slight decrease of the follicles and red pulp cellularity, i.e. infection induces an increase in the cellularity of germinal centers and red pulp cellularity in CV animals (Fig. 5B), with almost no alteration in GF animals (Fig. 5D).

The assessment of neutrophil and macrophage spleen populations through MPO and NAG activities, respectively (Figs. 5E and F), showed that TgCTBr07-CV mice recruited more immune cells to the organ than TgCTBr07-GF animals.

Pulmonary lesions are similar in TgCTBr07-CV and TgCTBr07-GF mice.

The ratio of septal tissue area to total tissue area was used as a measure of lung lesion. In CTL-CV and CTL-GF animals, ratios were 54% and 44%, respectively (Fig. 6E). CTL-GF, when compared to CTL-CV mice, had noticeably thinner septal tissue with fewer cells (Fig. 6A and C). *T. gondii* infection elevated the ratio of septal tissue in CV mice (Fig. 6B) and slightly more so in GF animals (Fig. 6D and E). In GF animals, the reduction of air space largely resulted from atelectasis, whereas in TgCTBr07-CV mice, lung MPO activity increased significantly and septal tissue grew with infiltrated neutrophils (Figs. 6B, 6D and 6F).

TgCTBr07-GF mice are protected against early meningitis.

Eight days after infection, TgCTBr07-CV mice displayed moderate alterations of the meninges and increased cerebral vascularity, whereas no changes were detectable in TgCTBr07-GF mice (Figs. 7B and D).

Discussion

Previous studies have shown that C57BL/6 mice orally infected with *T. gondii* developed intestinal histological abnormalities [17]. In the current work, we utilized Swiss mice, allogeneic animals that develop similar intestinal problems [17], which allow us to compare our results with those of other studies. One group of authors recently genotyped 25 of 27 *T. gondii* samples obtained from the peripheral blood of newborn infants with congenital toxoplasmosis using PCR-RFLP. Here, we used one of the isolated strains with intermediate virulence (TgCTBr07), which kills animals within the initial two weeks after infection, not allowing lesions to become chronic. [11].

T. gondii orally infects the host, quickly inducing a cascade of immunological events that involves innate and adaptive responses. In C57BL/6 mice, the parasite also induces severe intestinal inflammation, characterized by loss of epithelial architecture, shortened villi, and massive influx of inflammatory cells in the lamina propria and necrotic plaques [18], much like we observed here in infected CV animals (Fig. 2B).

Our experimental approach aimed at comparing the development of lesions in several organs, including the intestine, liver, spleen, lung and brain, after oral inoculation with 10

cysts, in conventional mice and mice with no microbiota (GF). In addition to anatomic-pathological aspects, we evaluated intestinal permeability, survival curves, and immunological parameters (cytokines, MPO, NAG, sIgA) to shed light on the role of the microbiota on murine disease development. Considering the route of entry of *T. gondii* through the intestine, we hypothesized that the complex and poorly understood cell interactions that regulate responses to antigens of the normal bacterial microbiota in the presence of an intact epithelial barrier could be affected in GF conditions. However, survival curves were similar for infected CV and GF mice, and most animals from both groups died between days 11 and 14 after inoculation. Nevertheless, TgCTBr07-CV but not TgCTBr07-GF mice developed clinical signs of *T. gondii* infection that have previously been described in mice, such as erectile body hair, postural arching, and excessive motor activity. Moreover, CV animals experienced slightly lower weight gain compared to GF animals starting between days 6 and 8 after infection. The relatively better clinical status of GF mice might be related to the reported heightened pain threshold of these animals [14].

In the present study, TgCTBr07-CV mice had larger lesions and more severe ileitis (Fig. 2B and D) compared to TgCTBr07-GF mice (Fig. 2E), despite similar survival curves (Fig. 1A) Previous studies showed that *T. gondii*-induced ileitis worsens during the first eight days post infection, from mild inflammation (3-5 days) to severe necrosis (8 days). This development parallels a rise in commensal Gram-negative gut bacteria identified as *E. coli* and *Bacteroides/Prevotella*, accompanied by a pronounced loss of bacterial diversity [19].

We also showed increased intestinal permeability in TgCTBr07-CV mice compared to TgCTBr07-GF mice. The intestinal barrier, among many other purposes, provides a filter that separates potentially harmful luminal contents from the internal environment of the body. Thus, any harm to this barrier might contribute to the translocation of luminal contents, such as bacteria and toxins, to the portal and systemic circulation [20-22]. Evidence suggests this barrier is involved in immune system performance, and almost 80% of immunologically active cells in the body are located in the intestinal mucosa [23-24]. Changes in the amount and/or the composition of mucus may lead to inflammatory responses [25]. Mucins form the first barrier between the gut contents and epithelial cells, protecting them from direct contact with commensal bacteria and their components, and may be disrupted as a result of intestinal inflammation. Caliciform cells were scarce in affected areas of infected CV and GF animals. Polymeric sIgA participates in the humoral defense mechanism, ensuring the barrier function of mucosal surfaces by preventing both the adherence of bacteria to mucosal surfaces and the penetration of antigens into the organism's internal environment [27-28]. The intestinal

microbiota promotes the activation of plasma cells that produce and secrete sIgA. Our results (Fig. 1C) are aligned with previous work showing a more pronounced sIgA production in CV than in GF animals [29,30]. Nevertheless, elevated sIgA was not sufficient to counter the effects of *T. gondii* on the intestinal wall, nor did it stop bacterial and pathogen translocation through the intestinal epithelium, as previously described [31-32].

T. gondii-induced ileitis results from a Th-1-type immunopathology characterized by T cell-mediated elevation of pro-inflammatory mediators including IFN- γ , TNF- α and NO [19]. We found the same profile in cytokines associated with *T. gondii*-infected CV mice. *Toxoplasma*-infected macrophages are, along with dendritic cells and neutrophils, an important source of IL-12 at the beginning of infection [33]. The IL-12 cytokine is crucial for the activation of natural killer (NK) cells that produce IFN- γ [34]. NK cells have several chemokine receptors that facilitate this process, among them the CCR5. Reduced NK cell migration to the infection site has been reported for CCR5^{-/-} mice inoculated with *T. gondii*. This impairment results in a lower inflammatory response to infection, and infected CCR5^{-/-} mice eventually die of parasitemia [35]. In the current study, TNF- α (Fig. 3A) and RANTES/CCL5 (Fig. 3C) levels were significantly elevated in the intestines of infected CV animals in comparison to control and infected GF animals. Nevertheless, both CV and GF animals succumbed to infection after similar periods. Our results show a correlation between the severity of ileitis in CV mice and the infection-induced TNF- α level.

A significant increase in IFN- γ was observed in infected animals, both CV and GF (Fig. 3B). However, GF animals produced at least twice as much IFN- γ as CV mice. Blocking IFN- γ , TNF- α , and NO activity prevents ileum necrosis and mouse mortality, demonstrating that inflammation, and not direct parasite action, causes lesions [36-37]. However, in the current study, elevated production of IFN- γ by infected GF mice did not correlate with increased pathology or mortality.

An adequate pro-inflammatory response provides essential protection against *T. gondii* infection; however, an exaggerated or uncontrolled response will often result in pathology. The host must balance the response in order to maximize pathogen elimination while minimizing damage to itself [38-39]. Production of IL-10 and TGF- β leads to the activation of regulatory T cells that inhibit the immune response and induce mucosal tolerance [40]. The anti-inflammatory cytokine IL-10 attenuates host response to *T. gondii*. As previously shown, IL-10^{-/-} mice do not neutralize IFN- γ and usually die during the acute phase of diseases [41]. Other anti-inflammatory cytokines involved in immunopathology regulation include TGF- β and IL-27. Intestinal epithelial lymphocytes secrete TGF- β , which acts on the control of

intestinal pathology after oral infection with *T. gondii* [7]. In the current study, we did not detect significant IL-10 production in any of the experimental groups, a finding that may have resulted from the number of inoculated cysts (10) or from the short time that elapsed after infection until the time samples were collected (8 days). Regarding TGF- β , despite the lack of significance, GF- and CV-infected animals showed higher levels of the cytokine when compared to their non-infected controls. Also, the levels of IFN- γ correlated inversely to the levels of TGF- β in both groups.

We also assessed systemic differences between CV and GF animals by evaluating lesions to the liver, spleen, lungs and brain eight days after infection. The liver is frequently targeted by tachyzoites that kill hepatocytes and Kupffer cells, creating necrotic foci and mononuclear cell infiltrates [42]. Infection was significantly less damaging to the livers of GF than CV mice (Figs. 4B and 4D). Additionally, inflammation markers MPO and NAG were also more elevated in infected CV livers (Figs. 4F and 4G). Thus, the presence of an indigenous microbiota was associated with increased bacterial translocation and with more severe hepatic lesions induced by the parasite.

The spleens of TgCTBr07-CV mice, collected eight days after infection, had reduced lymphoid follicle areas, atypical nodular structures, and loss of the usual architecture (Fig. 5B). Death of humans and animals with toxoplasmosis is often preceded by lymphocyte depletion [42]. Levels of MPO and NAG were elevated in the spleens of infected CV mice compared to CTL-CV animals, but not in the organs of infected GF animals (Figs. 5E and F).

The lungs of TgCTBr07-CV mice had lesions characterized by increased septal cellularity caused by neutrophils, as evidenced by the elevated MPO activity (Fig. 6F). Both CV and GF mice had increased septal thickness and extensive areas with atelectasis (Fig. 6B and D) quantified as a ratio of septal to total tissue (Fig. 6E). This sort of pulmonary pathology could have caused respiratory failure and, ultimately, death. In fact, other authors have attributed *T. gondii* lethality in mice to pulmonary lesions [42-43]. Previous work showed that, after oral infection with *T. gondii*, parasites rapidly reach the lungs before other organs in the abdominal cavity are infected [44].

TgCTBr07-CV mice had subtle to moderate meningitis that was predominantly mononuclear and that was not seen in TgCTBr07-GF mice (Figs. 7B and D). The absence of brain lesions in mice during the acute phase of toxoplasmosis has been previously reported [37, 43, 45, 46, 47]. The brain may be the last organ to be affected by tachyzoites because of its enhanced immunological protection. The blood-brain barrier slows the influx of infected cells, inflammation mediators and antibodies into the brain, which has greater pathological

relevance during the chronic phase of infection [42, 43]. Our results suggest that the GF condition may protect against toxoplasma-induced inflammation during the early period of infection.

Conclusion

Intestinal microbiota plays a significant role in the early progression of toxoplasmosis. Although TgCTBr07-CV and TgCTBr07-GF mice had similar survival curves, disease development differed between the two animal lines. A large increase in intestinal permeability and alterations of pro-inflammatory cytokines were observed in CV but not GF mice. Infection also resulted in more severe lesions in the liver, lungs and brain of CV animals. Inflammation markers were also more elevated in the spleen, liver and lungs of CV mice. Paradoxically, an elevation was also seen in the intestines of GF mice, which had less severe ileitis. Thus, we suggest that infected CV animals succumb to an exacerbated response of the immune system, whereas infected GF mice fail to produce an adequate systemic response.

Acknowledgments

B.B. Nascimento received a MSc scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil). C.T. Cartelle and M.L.M. Noviello were funded by PNPd/CAPES grant 2248/2011. R.M.E Arantes received a CNPq Research Fellowship, CNPq Grant 458832/2014-6 and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil), Grant PPM/2014.

Figure Legends

Fig. 1. Survival curves (A), ponderal indexes (B), and sIgA levels (C) of CV and GF mice orally infected with *T. gondii* (TgCTBr07). Survival curves were analyzed with Log Rank Survival, n=10; ponderal indexes were submitted to two-way ANOVA followed by Bonferroni tests, n=10; sIgA levels were submitted to a one-way ANOVA test, followed by the Newman-Keuls test, n=6; * =p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001). CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain; CV: conventional mice; GF: germ-free mice.

Fig. 2. Intestinal pathology eight days post-infection in CV and GF animals. A-D: Photomicrographs (10x objective lens) of H&E stained small intestine sections from Swiss mice. (A) Control CV mice and (C) control GF mice; (B) infected CV mice with severe lesions in the mucous layer, edema on top of villi (arrow) and loss of epithelial integrity (*); (D) infected GF mice with mild ileitis. Scale represents 100 μm (n=4). (E) Intestinal permeability in CV and GF animals infected with the TgCTBr07 strain of *T. gondii* (n=5). (F) Lesion morphometry: the entire extension of the intestine was analyzed with a 4x objective lens in H&E stained slides. Bars represent the ratios of lesion perimeters to total organ perimeters (n=4). (G) Measure of intestinal neutrophils through MPO activity (n=6). (H) Measure of intestinal macrophages through NAG activity (n=6). CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain; CV: conventional mice; GF: germ-free mice. One-way ANOVA test, followed by Newman-Keuls test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Fig. 3. Intestinal cytokine and chemokine levels in CV and GF mice: TNF- α (A), IFN- γ (B), RANTES/CCL5 (C), IL-10 (D), TGF- β (E). CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain; CV: conventional mice; GF: germ-free mice. One-way ANOVA test, followed by Newman-Keuls test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Fig. 4. Liver pathology eight days post-infection in CV and GF animals. A-D, Photomicrographs (10x objective lens) of H&E stained liver sections from Swiss mice. (A) Control CV mice and (C) control GF mice; (B) infected CV mice with a larger number of inflammatory foci (arrows) than (D) infected GF mice. Scale represents 100 μm (n=4). (E) Liver histological score of CV and GF mice, obtained as described in Materials and Methods (n=5). (F) Surrogate assessment of neutrophil infiltration (MPO), (n=6). (G) Surrogate assessment of macrophage infiltration (NAG), (n=6). CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain; CV: conventional mice; GF: germ-free mice. One-way ANOVA test, followed by Newman-Keuls test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Fig. 5. Photomicrographs of H&E stained spleen sections from Swiss mice. (A) Control CV mice and (C) control GF mice; (B) infected CV mice and (D) infected GF mice. Notice the decrease in follicles and red pulp cellularity in GF animals; infected CV have increased cellularity of germinal centers. Objective lens 4x. Scale represents 100 μm (n=4). (F) Surrogate assessment of neutrophil infiltration (MPO), (n=6). (G) Surrogate assessment of macrophage infiltration (NAG), (n=6). CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain;

CV: conventional mice; GF: germ-free mice. One-away ANOVA test, followed by Newman-Keuls test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Fig. 6. Photomicrographs of H&E stained lung sections from Swiss mice. (A) Control CV mice and (C) control GF mice; (B) infected CV mice and (D) infected GF mice. Arrows indicate enlarged alveolar septal areas and * indicates increased cellularity. Objective lens 10x. Scale represents 100 μm (n=4). (E) Morphometric analysis of pulmonary lesions – ratio of septal to total area – obtained from 10 fields with a 10x objective lens from H&E stained slides, n=4. (F) Surrogate assessment of neutrophil infiltration (MPO), n=6. (G) Surrogate assessment of macrophage infiltration (NAG), n=6. CTL: control; TgCTBr07: *Toxoplasma gondii* strain; CV: conventional mice; GF: germ-free mice. One-away ANOVA test, followed by Newman-Keuls test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Fig. 7. Photomicrographs of H&E stained brain sections from Swiss mice. (A) Control CV mice and (C) control GF mice; (B) infected CV mice and (D) infected GF mice. Arrow indicates edema and * indicates increased cellularity in the meninges of CV animals. 10x objective lens. Scale represents 100 μm (n=4).

References

- MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F.C.P.; SOUSA, LIRLÂNDIA P.; ARAÚJO, H.R.C.; PIMENTA, P.F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, p.270-279, 2013.
- SANDERS, M.E.; GUARNER, F., GUERRANT, R.; HOLT, P.R.; QUIGLEY, E.M.; SARTOR, R.B.; SHERMAN, P.M.; MAYER, E.A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**. v.62, p.787-796, 2013.
- SEKIROV, I.; FINLAY, B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. **J Physiol.**, v.587, p.4159–4167, 2009.
- VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 331-336, 1999.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, M.L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.**, v.30, p.1217-1258, 2000.
- REMYINGTON, J.S; DESMONTS, G.; MCLEOD, R. *Toxoplasmosis*. In: Remington JS, Klein JO. eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. **Philadelphia: WB Saunders**, p.140–243, 1995.

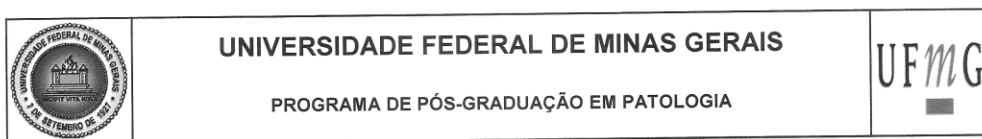
7. MENNECHET, F.J.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N.; MINNS, L.A.; LUANGSAY, S.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.34, p.1059–1067, 2004.
8. BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L.C.; KASPER, L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cell. Microbiol.**, v.8, p.535–544, 2006.
9. KIM, Y.S.; HO, S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol.**, v.12, p.319-30, 2010.
10. HILL, D.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res Rev.**, v.6, p.41-61, 2005.
11. CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; VITOR, R.W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v.51, p.901-7, 2013.
12. VIANA, M.; SANTOS, R.; GENEROSO, S.; et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**. v.26, p.218-233, 2010.
13. SOUZA, D.G.; et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol**, 2002,160:1755–1765.
14. AMARAL, F.A.; SACHS, D.; COSTA, V.V.; FAGUNDES, C.T.; CISALPINO, D.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; SILVA, T.A.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105 p.2193–2197, 2007.
15. CALVERT, R.J.; OTSUKA, M.; SATCHITHANANDAM, S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **J Nutr.**, v.119, p.1610-1616, 1989.
16. 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 p.61-69, 1997.
17. LIESENFELD, O. Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.S96–101, 2002.
18. LIESENFELD, O.; NGUYEN, T.A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **J Parasitol.**, v.87, p.1491-3, 2001.
19. HEIMESAAT, M.M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H.K.; DUNAY, I.R.; MOTER, A.; GESCHER, D.M.; SCHUMANN, R.R.; GÖBEL, U.B.; LIESENFELD, O. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunology**, v.177, p.8785-8795, 2006.
20. MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. **Br. Med. Bull.**, v.71, p.1-11, 2004.
21. GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.25, p.741-757, 2007.

22. YAN, Y.; KOLACHALA, V.; DALMASSO, G.; NGUYEN, H.; LAROUI, H.; SITARAMAN, S.V.; MERLIN, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS ONE**, v.29, p.4, 2009.
23. HILL, D.A., ARTIS, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. **Annu Rev Immunol.**, v.28, p.623–667, 2010.
24. CHUNG, H.; KASPER, D.L. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. **Curr Opin Immunol.**, v.22, p.455–460, 2010.
25. LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G.; KOROLIK, V.; MCGUCKIN, M.A.; Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunol.**, v.1, p.183–197, 2008.
26. MESTECKY, J.; RUSSELL, M.W.; ELSON, C.O. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. **Gut**, v.44, p.2–5, 1999.
27. HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med.**, v.11, p.S45–S53, 2005.
28. BRANDTZAEG, P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. **Curr Opin Gastroenterol.**, v.26 p.554–563, 2010.
29. PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p.821–32, 2012.
30. MOREAU, M.C.; DUCLUZEAU, R.; GUY-GRAND, D.; MULLER, M.C. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. **Infect Immun.**, v.21, p.532–9, 1978.
31. KELLY, D.; MULDER, I.E. Microbiome and immunological interactions. **Nutrition Reviews**, v.70, p.S18–30, 2012.
32. DUERKOP, B.A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L.V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. **Immunity**, v.31, p.368–76, 2009.
33. ALIBERTI, J. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.**, v.177, p.31–35, 2006.
34. REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R.N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.**, v.186, p.1819–1829, 1997.
35. KHAN, I.A.; THOMAS, S.Y.; MORETTO, M.M.; LEE, F.S.; ISLAM, S.A. et al. (2006) CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathog.**, v.2, p.e49, 2006.
36. LIESENFELD, O.; HOIL, K.; DANIEL, P.; THU, A.N.; CHANDAN, V.P.; HISAMI, W.; TORU, A.; ALAN, S.; JACK, S. R.; YASUHIRO, S. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.**, v.21, p.365–376, 1999.
37. LIESENFELD, O.; JAN, K.; JACK, S. R.; YASUHIRO, S. Association of CD4⁺ T Cell-dependent, Interferon- γ -mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.184, p.597–607, 1996.
38. RESCIGNO, M.; DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. **J Clin Invest.**, v.119, p.2441–2450, 2009.
39. SHAW, M.H., FREEMAN, G.J., SCOTT, M.F., FOX, B.A., BZIK, D.J., BELKAID, Y., YAP, G.S., Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10

- signaling and promoting IFN- γ dependent IL-10 reactivation. **J. Immunol.**, v.176, p.7263–7271, 2006.
40. BARNES, M.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. **Immunity**, v.31, p.401–411, 2009.
 41. GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHEEVER, A., KÜHN, R., MÜLLER, W., TRINCHIERI, G., SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **J. Immunol.**, v.157, p.798–805, 1996.
 42. FRENKEL, J.K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol Today** v.4, p.273-8, 1988.
 43. DUBEY, J.P.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; MCLEOD, R. Oral oocysts-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, v.139, p.1-13, 2012.
 44. BOYLE, J.P., SAEIJ, J.P., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: inconsistent dissemination patterns following oral infections in mice. **Exp Parasitol.**, v.116 p.302-5, 2007.
 45. SMILEY, S.T.; LANTHIER, P.A.; COUPER, K.N.; SZABA, F.M.; BOYSON, J.E.; CHEN, W.; JOHNSON, L.L. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. **J Immunol.** v.174, p.7904-11, 2005.
 46. DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; KLUN, I.; KHAN, A.; NIKOLIC, A.; KNEZEVIC-USAJ, S.; BOBIC, B.; SIBLEY, L.D. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. **Microbes Infect.**, v.8, p.2206-12, 2006.
 47. MORDUE, D.G.; MONROY, F.L.A.; REGINA, M.; DINARELLO, C.A.; SIBLEY, L.D. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J Immunol.**, v.167, p.4574-84, 2001.

“This manuscript was reviewed by a professional science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability”.

ANEXO D

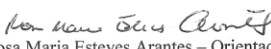
FOLHA DE APROVAÇÃO

PAPEL DA MICROBIOTA E EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE
PROBIÓTICO NA TOXOPLAMOSE EXPERIMENTAL MURINA

BRUNA BERNARDO NASCIMENTO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

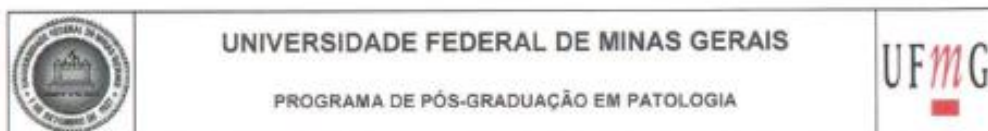
Aprovada em 20 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Rosa Maria Esteves Arantes – Orientador
UFMG


Prof(a). Elisabeth Neumann
UFMG


Prof(a). Liliâne Martins dos Santos
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

BRUNA BERNARDO NASCIMENTO

Realizou-se, no dia 20 de fevereiro de 2015, às 14:00 horas, ICB UFMG C3 241, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *PAPEL DA MICROBIOTA E EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROBIÓTICO NA TOXOPLAMOSE EXPERIMENTAL MURINA*, apresentada por BRUNA BERNARDO NASCIMENTO, número de registro 2013655813, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Rosa Maria Esteves Arantes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof Flaviano dos Santos Martins – Coorientador (UFMG), Prof(a). Elisabeth Neumann (UFMG), Prof(a). Liliane Martins dos Santos (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

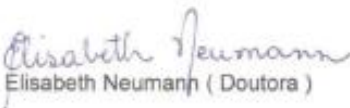
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.



Prof(a). Rosa Maria Esteves Arantes (Doutora)



Prof(a). Elisabeth Neumann (Doutora)



Prof(a). Liliane Martins dos Santos (Doutor)