

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Efeitos protetores de *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 na
infecção experimental por *Listeria monocytogenes*
em camundongos gnotobióticos**

Aluna: **Liliane Martins dos Santos**

Orientador(a): Dr. Leda Quercia Vieira

BELO HORIZONTE, 31 DE JULHO DE 2011

Liliane Martins dos Santos

**Efeitos protetores de *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 na
infecção experimental por *Listeria monocytogenes*
em camundongos gnotobióticos**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador(a): Leda Quercia Vieira

Belo Horizonte, 31 de Julho de 2011

Agradecimentos

A Profa Leda Quercia Vieira, por acreditar em minha capacidade e me receber em seu laboratório. Seus ensinamentos valiosos e o grande incentivo foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Jacques Robert Nicoli, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, por suas excelentes sugestões e por sua disponibilidade.

A Denise, primeira professora nos caminhos da pesquisa, pela paciência quando eu era apenas uma estudante de iniciação, pelas sugestões e apoio com os experimentos e principalmente pelas lições que valerão para toda a vida.

A Mônica, por seu interesse e incansável auxílio com o manuseio dos animais e com os experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, pelas discussões enriquecedoras nas reuniões, pelos bons momentos de distração, pelo companheirismo e disponibilidade para ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos por me receberem tão bem e pela grande ajuda e paciência com essa novata nos caminhos da Microbiologia.

A Profa Rosa Arantes pela análise dos cortes histológicos, por suas sugestões e principalmente por sua disponibilidade e amabilidade.

Ao Antônio Vaz, pela eficiência no apoio técnico com os animais.

As agências de fomento, CNPq, CAPES E FAPEMIG, por fornecerem os recursos para a realização deste trabalho.

A Viviane, por seu apoio, amizade e ótimas conversas nos corredores que sempre ajudaram a descontrair.

Ao meu pai, Poliane e Tatiane pelo apoio incondicional.

A minha mãe, que mesmo ausente, continua me guiando pelo caminho certo.

Lista de figuras

Figura 1. Cinética de colonização de <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 nas fezes de camundongos gnotobióticos durante a monoassociação.....	25
Figura 2. Curva de sobrevivência de animais sem germes e animais monoassociados ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	26
Figura 3. Quantificação de <i>L. monocytogenes</i> no baço e fígado de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 4. Peso do baço e fígado de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	29
Figura 5. Quantificação de <i>L. monocytogenes</i> na cavidade peritoneal de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	31
Figura 6. Análise histológica do fígado de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> após 1 dia de infecção com <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 7. Análise histológica do fígado de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> após 3 dias de infecção com <i>L. monocytogenes</i>	33
Figura 8. Análise histológica do fígado de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> após 5 dias de infecção com <i>L. monocytogenes</i>	34

Figura 9. Análise histológica do baço de animais sem germes e animais monoassociados com <i>L. delbrueckii</i> após 5 dias de infecção com <i>L. monocytogenes</i>	35
Figura 10. Produção de IFN- γ por células de baço de animais sem germes e animais monoassociados ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	37
Figura 11. Produção de TNF- α no soro de animais sem germes e animais monoassociados infectados com <i>L. monocytogenes</i>	38
Figura 12. Produção de TNF- α por células peritoneais de animais sem germes e animais monoassociados ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	40
Figura 13. Produção de óxido nítrico no soro de animais sem germes e animais monoassociados ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	41
Figura 14. Produção de óxido nítrico por células peritoneais de animais sem germes e animais monoassociados ambos infectados com <i>L. monocytogenes</i>	42
Figura 15. Produção de TNF- α no tubo digestivo de animais sem germes e animais monoassociados infectados com <i>L. monocytogenes</i>	44
Figura 16. Produção de IL-10 por células esplênicas de animais sem germes e animais monoassociados infectados com <i>L. monocytogenes</i>	45

Figura 17. Produção de IL-10 no tubo digestivo de animais sem germes e animais monoassociados infectados com *L. monocytogenes*.....46

Abstract

Probiotics are formulations containing viable microorganisms that have some beneficial influence on the maintenance of a balanced intestinal microbiota and on the resistance to infections. It has been reported that *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, a probiotic candidate, is able to protect against infections by stimulating the host's immune responses. In the present study we investigated the protective effects of *L. delbrueckii* on the resistance to *Listeria monocytogenes* infection in gnotobiotic mice. SWISS germfree mice received a single dose containing 10^9 viable *L. delbrueckii*. Control mice received saline instead. Both groups were infected intraperitoneally ten days later with 10^4 live *L. monocytogenes*. We showed that *L. delbrueckii* colonized the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice and the number of viable cells ranged 10^8 to 10^9 cfu/g of feces 10 days after monoassociation. Survival data indicated a protective effect of *L. delbrueckii* against *L. monocytogenes* infection. Monoassociation induced a faster clearance of *L. monocytogenes* in the spleen, liver and peritoneal cavity 1, 3 and 5 days after infection. Also, production of TNF- α in the serum, peritoneal cavity and digestive tract was augmented in monoassociated mice. Levels of IFN- γ found on supernatants of spleen cells cultures were higher after monoassociation. In addition, increased production of nitric oxide in supernatants of peritoneal cells cultures and in serum was observed in mice that received *L. delbrueckii*. We also showed that *L. delbrueckii* was capable of inducing the production of IL-10 in the mucosal immune system, but not at the systemic immune system. In conclusion, it was shown that *L. delbrueckii* is able to colonize the gastrointestinal tract and enhance host resistance against *L. monocytogenes* infection through stimulation of inflammatory and regulatory mediators of immune responses.

Resumo

Probióticos são formulações contendo microrganismos viáveis que exercem algum tipo de efeito benéfico sobre a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal e na resistência à infecções. Já foi demonstrado que *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, um candidato a probiótico, é capaz de estimular as defesas imunes do hospedeiro. No presente trabalho, nós investigamos os efeitos protetores de *L. delbrueckii* na resistência contra a infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos gnotobióticos. Camundongos SWISS isentos de germes receberam uma única dose de 10^9 *L. delbrueckii* viáveis. Animais controle receberam salina em lugar do probiótico. Ambos os grupos foram infectados intraperitonealmente dez dias depois com 10^4 *L. monocytogenes* vivas. Demonstramos que *L. delbrueckii* colonizou o trato intestinal dos animais e o número de células viáveis atingiu 10^8 a 10^9 ufc/g de fezes dez dias após a monoassociação. A monoassociação foi capaz de proteger os animais contra a morte causada por *L. monocytogenes* e induziu o clareamento mais eficiente da bactéria no baço, fígado e cavidade peritoneal após 1, 3 e 5 dias de infecção. Além disso, houve maior produção de TNF- α no soro, cavidade peritoneal e trato intestinal dos animais monoassociados. Os níveis de IFN- γ encontrados no sobrenadante de cultura de células esplênicas foram mais altos após a monoassociação. Também houve aumento na produção de óxido nítrico no soro e sobrenadante de cultura de células da cavidade peritoneal dos animais que receberam *L. delbrueckii*. Nós também mostramos que *L. delbrueckii* foi capaz de induzir a produção de IL-10 ao nível da mucosa intestinal, mas não a nível sistêmico. Em resumo, nós demonstramos que *L. delbrueckii* é capaz de colonizar o trato intestinal e aumentar a resistência contra a infecção por *L. monocytogenes* através da estimulação da produção de mediadores pró e antiinflamatórios da resposta imune.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal humano (TGI) é colonizado por um grande número de microrganismos que habitam o trato intestinal e desempenham uma variedade de funções fisiológicas. Esta microbiota fornece não só uma importante barreira entre o hospedeiro e o ambiente, mas também sítios de contato entre os micróbios e o sistema imune em desenvolvimento (Salminen e Isolauri, 2006). O TGI comporta uma flora complexa de mais de 500 espécies bacterianas diferentes. Uma estimativa mostra que existem 10 vezes mais células bacterianas que células eucarióticas no corpo. O trato gastrointestinal é estéril ao nascimento, mas é colonizado por microrganismos presentes no meio ambiente imediatamente após o parto. Inicialmente, quando o espaço e a disponibilidade de alimentos são abundantes, as bactérias com altas taxas de multiplicação começam a dominar. A partir do momento que o número bacteriano aumenta, a disponibilidade de alimento e espaço diminui e os habitats ficam ocupados por microrganismos mais especializados e a complexidade da biota aumenta (Falk et al, 1998).

Uma vez estabelecida, a microbiota intestinal permanece relativamente estável por toda a vida, mas varia quantitativamente e qualitativamente dependendo da espécie animal a qual está associada, bem como de sua localização na mesma. No homem, a cavidade oral comporta mais de 200 espécies de microrganismos. O estômago e os dois terços do intestino delgado proximal (duodeno e jejuno) contêm um número pequeno de microrganismos (10^3 - 10^4 bactérias/ml de conteúdo gástrico ou intestinal). Isto se deve ao baixo pH do estômago e ao constante mobilidade (peristaltismo) nessas áreas. Em ratos, por exemplo, onde o pH estomacal é relativamente alto, a densidade microbiana aumenta (10^5 - 10^6 bactérias/ml de

conteúdo gástrico). Os principais tipos de microrganismos encontrados são lactobacilos e estreptococos, que ao contrário da maioria dos microrganismos encontrados nos alimentos, sobrevivem à passagem pelo estômago. A parte distal do intestino delgado é considerada “zona de transição” entre o baixo nível populacional do intestino delgado proximal e o enorme número de bactérias encontrados no intestino grosso. Tanto em roedores como em humanos constata-se um aumento progressivo dos níveis populacionais ao longo do intestino delgado. O intestino grosso (cólon) é a região mais densamente colonizada em animais e nos humanos, provavelmente devido à sua baixa motilidade e baixo potencial redox. Logo, o cólon comporta um grande número de microrganismos, dentre 400 e 500 espécies (Berg, 1996). Anaeróbios estritos como *Bacteroides* e *Bifidobacteria* constituem o tipo microbiano predominante (99,9%) presente no intestino grosso (Savage, 1977).

Os microrganismos da flora intestinal estão em constante movimento, ainda que em número pequeno, entre o TGI e os linfonodos mesentéricos. Este processo de passagem da microbiota através da mucosa é chamado de translocação. Em indivíduos saudáveis, essas poucas bactérias translocadas são mortas nos linfonodos e não se espalham para outros locais como baço, fígado e corrente sanguínea. Na verdade, a presença destes poucos microrganismos na lâmina própria e linfonodos pode ser benéfico para o sistema imune do hospedeiro que passa a ser capaz de responder mais rapidamente a patógenos exógenos (Berg, 1996).

De maneira geral a microbiota intestinal de humanos e animais representa um ecossistema complexo e em equilíbrio. Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal podem ter papéis distintos na manutenção deste equilíbrio. Algumas bactérias intestinais podem ser potencialmente patogênicas para o hospedeiro, estarem envolvidas na putrefação intestinal e na produção de substâncias tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Outros componentes da microbiota, como lactobacilos e bifidobactérias podem conferir benefícios ao hospedeiro através da diminuição de triglicérides, da estimulação imune não invasiva e da

capacidade de inibição de microrganismos prejudiciais. Em indivíduos saudáveis existe um balanço entre as populações bacterianas benéficas e as potencialmente patogênicas. Fatores como terapias antibióticas ou com radiação, estresse e infecções podem levar a distúrbios neste equilíbrio, aumentando a predisposição a um risco maior de doenças (Isolauri *et al.*, 2004).

1.2. O MODELO GNOTOBIÓTICO ANIMAL

O modelo que mais tem fornecido valiosas informações a respeito do papel da microbiota intestinal no desenvolvimento do hospedeiro é o modelo isento de germe (McCracken e Lorenz, 2001). O animal isento de germes ou gnotobiótico, livre de qualquer microrganismo ou associado somente com espécies conhecidas, é o que se aproxima do ideal quando da simulação das relações microecológicas no trato intestinal humano (Trexler, 1978). Os estudos *in vitro*, apesar de fornecerem indicações do comportamento de algumas estirpes no trato digestivo, raramente reproduzem a complexidade das interações ecológicas existentes *in situ*, que podem ser ativamente influenciadas pelo hospedeiro (Fuller, 1991). Animais isentos de germes têm sido ferramentas importantes no estudo das relações entre hospedeiro e sua microbiota, já que permitem o estudo das interações entre um patógeno e o hospedeiro sem a interferência de outros organismos associados (Vieira, *et al* 1998).

Estudos com animais isentos de germes têm demonstrado alterações nas funções imunes devido à ausência da microbiota. O número de linfócitos na lâmina própria se mostra reduzido, assim como o tamanho dos agregados linfóides como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, conseqüência da ausência de centros germinativos. Além disso, a quimiotaxia de macrófagos e a atividade fagocítica e lítica estão inibidas em animais isentos de germes e os precursores de macrófagos derivados do baço apresentam-se em menor número. O número de linfócitos intraepiteliais TCR $\alpha\beta+$ é reduzido e estes apresentam-se com menor atividade citolítica (Johnson e Balish, 1980; Shroff e Cebra, 1995).

Propriedades imunoestimulatórias de bactérias comensais são mais bem estudadas em modelos animais gnotobióticos os quais demonstram essencialmente que alguns aspectos do sistema imune intestinal estão subdesenvolvidos nos animais isentos de germes, mas são

rapidamente restaurados com a introdução de uma única espécie bacteriana (Corthésy *et al*, 2007).

1.3. LACTOBACILOS

Lactobacillus é o nome dado ao grupo de bastonetes gram positivos, não esporulantes, imóveis, anaeróbios estritos, facultativos ou microaerófilos que obtém energia através da conversão da glicose em outro açúcar, a lactose. Não possuem catalase e apresentam capacidade de síntese extremamente limitada, tendo, portanto, um requerimento nutricional complexo. Outra característica marcante do grupo é a sua tolerância a ácidos, o que permite a essas bactérias sobreviverem à passagem pelo estômago e chegar às porções mais distais do trato gastrointestinal.. Estas bactérias utilizam carboidratos como fonte de energia e produzem principalmente ácido lático ao final do processo fermentativo.

Numerosas espécies de lactobacilos podem ser encontradas no trato digestivo, mas sua prevalência e distribuição variam com a espécie animal a qual estão associados. Os lactobacilos estão presentes em grande número em toda a extensão do trato intestinal de suínos e roedores, provavelmente devido à habilidade de certas estirpes aderirem e colonizarem a superfície epitelial em regiões proximais do trato digestivo desses animais. Em humanos os lactobacilos habitam o trato intestinal e cavidade oral além do trato urogenital feminino.

Os lactobacilos são importantes na produção de alimentos que requerem fermentação do ácido lático, os produtos lácteos como iogurtes e queijos, vegetais fermentados e carnes fermentadas. O uso de lactobacilos na indústria tem uma longa história e sua função nesses alimentos tem sido bem estudada e comprovada. Ao contrário, as espécies habitantes normais dos animais e do homem são bem menos conhecidas, apesar do contínuo interesse dos cientistas (Tannock, 2004).

1.4. PROBIÓTICOS

Em 1908, o ganhador do prêmio Nobel por sua observação pioneira do processo de fagocitose, Ellie Metchnikoff (1845-1916), estava interessado no processo de envelhecimento. Metchnikoff observou que os habitantes da Bulgária apresentavam elevada expectativa de vida. Metchnikoff associou este fenômeno ao alto consumo de alimentos contendo bactérias lácticas e sugeriu que a ingestão dessas bactérias era capaz de diminuir a quantidade de bactérias produtoras de toxinas no intestino, contribuindo assim para a longevidade dos habitantes daquele país. Desde então o consumo de leites fermentados contendo lactobacilos viáveis é recomendado devido aos efeitos terapêuticos e nutricionais que estes microrganismos proporcionam no trato intestinal de humanos e animais. (Teitelbaum e Walker, 2002).

É a partir do estudo de Metchnikoff que surge o conceito de probióticos (Tannock, 2004). O termo probiótico é definido como “microrganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). De acordo com Reid (1999) um microrganismo deve possuir certos requisitos básicos para ser considerado um probiótico. São eles: ser capaz de resistir ao estresse do ambiente gastrointestinal e se estabelecer; permanecer viável no ambiente intestinal; ser seguro, não invasivo e não patogênico e exercer algum tipo de benefício através dos seguintes mecanismos de ação:

a) Antagonismo direto contra microrganismos patogênicos através da produção de substâncias inibidoras do crescimento ou microbicidas. Vignolo *et al.* (1993) identificaram uma substância (bacteriocina) produzida por uma bactéria láctica (*Lactobacillus casei*) que era capaz de inibir o crescimento de microrganismos como *L. monocytogenes* e *Staphylococcus*

aureus. Annuk *et al.* (2003) caracterizaram diversas estirpes de lactobacilos como possíveis candidatos a probióticos por sua capacidade de produzir substâncias microbicidas.

b) Competição por nutrientes e sítios de adesão e na mucosa com bactérias patogênicas. Por exemplo, bactérias probióticas são capazes de proteger células epiteliais contra a invasão por *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e outros enteropatógenos (Resta-Lennet e Barret, 2003; Servin e Coconnier, 2003).

c) Proteção contra infecções através da estimulação do sistema imune. *Lactobacillus casei* protege contra *Streptococcus pneumoniae* através do aumento da capacidade fagocítica e da produção de citocinas (Racedo *et al.*, 2006). Além disso, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifido bacterium lactis* aumentam os níveis de anticorpos produzidos no soro e mucosa e a atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos, protegendo contra infecção por *Salmonella tiphymurium* (Gill *et al.*, 2001; Shu *et al.*, 2000).

1.5. PROBIÓTICOS E O SISTEMA IMUNE

Um grande número de evidências sugere que respostas imunes Th1 geradas por lactobacilos probióticos na mucosa intestinal podem estimular imunidade celular sistêmica necessária para imunoterapia de câncer, para o controle de microrganismos intracelulares patogênicos e para o combate do envelhecimento do sistema imune em indivíduos idosos (Cross, 2002).

Respostas imunes do tipo 1 envolvem estimulação de respostas efectoras da imunidade celular como aumento da citotoxicidade e respostas microbidas em macrófagos, células natural killer (NK) e linfócitos T citotóxicos. As citocinas geradas pelas células Th1 incluem IL-2, fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e interferon gama (IFN- γ), sendo a última capaz de regular negativamente a expansão de subtipos Th2 durante os estágios iniciais da diferenciação de células T ativadas (Cross, 2002). Estudos *in vitro* recentes envolvendo culturas de linfócitos humanos do sangue periférico com lactobacilos obtidos de iogurtes indicam uma regulação positiva da capacidade de produção de IFN- γ , resposta que pensava-se inicialmente ser dependente de citocinas derivadas de linfócitos T CD4+ e CD8+, mas estudos recentes têm demonstrado o importante papel de células NK humanas (Haller *et al.*, 2000). Outros estudos envolvendo o consumo de suplementos da dieta contendo estirpes definidas de lactobacilos probióticos indicaram um aumento do nível de IFN- γ no sangue de doadores voluntários e o aumento da capacidade de produção *ex vivo* de IFN- α e IFN- γ por células mononucleares do sangue (Halpern *et al.*, 1991; Kishi *et al.*, 1996).

As células que monitoram os sítios de entrada de microrganismos patogênicos e que coordenam a defesa inicial do sistema imune gastrointestinal inato incluem os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células NK, células epiteliais e células M (Dugas *et al.*, 1999). As células epiteliais intestinais protegem o hospedeiro provendo forte barreira física e produzindo

uma variedade de defesas inatas antimicrobicas. As defesas inatas incluem a produção de mucinas e outros compostos como lisozimas e defensinas. Estas moléculas inibem diretamente o crescimento bacteriano. Além disso, células epiteliais secretam várias citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e TGF- β (McCracken e Lorenz, 1999). A barreira epitelial não é totalmente eficiente e algumas vezes antígenos do lúmen podem ganhar acesso aos tecidos. Isto acontece através das células M, tipo especializado de célula epitelial, que transporta antígenos até as placas de Peyer onde ocorre a apresentação de antígeno (Owen, 1999). Linfócitos antígenos-específicos ativados entram na circulação e migram para os sítios efetores no intestino (Perdue, 1999). Os principais sítios efetores no intestino são a lâmina própria e os espaços intraepiteliais. A lâmina própria contém células imunes residentes incluindo células B secretoras de anticorpos, células T e macrófagos. Outro caminho que os antígenos luminiais podem tomar para chegar aos tecidos é através das células apresentadoras de antígeno na lâmina própria que fazem a apresentação às células T da lâmina própria (McCracken e Lorenz, 1999). Devido à diversidade de resposta imunes ou inflamatórias que podem ser produzidas no epitélio intestinal, a associação de probióticos com as células epiteliais deve ser suficiente para desencadear cascatas de sinalização que ativarão as células imunes na lâmina própria. Além disso, os probióticos podem secretar fatores solúveis que ativariam as cascatas de sinalização ao nível do epitélio ou do sistema imune associado.

Apesar de ser um evento limitado, a translocação de bactérias para a lâmina própria pode afetar a imunidade inata e a imunidade adaptativa através da produção de citocinas por monócitos/macrófagos. As células M das placas de peyer capturam os antígenos microbianos que são engolfados pelas células dendríticas do sistema imune inato que apresentam os antígenos às células T naive nas placas de peyer e nos linfonodos mesentéricos (Corthésy *et al*, 2007).

Entender os mecanismos pelos quais os microrganismos presentes na microbiota intestinal, incluindo aqueles com potencial probiótico, modulam o sistema imune pode facilitar a implementação de suplementos probióticos terapêuticos que tenham propriedades imunoregulatórias individuais (Christensen *et al.*, 2002).

1.6. *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20:

O microrganismo selecionado para este estudo, *L. delbrueckii* UFV-H2b20, é um potente candidato ao uso como probiótico, pois preenche os requisitos básicos que uma estirpe microbiana necessita para ser classificada como tal, a saber: a) habitar normalmente o trato intestinal do hospedeiro; b) ser capaz de resistir a condições de estresse no trato intestinal e se estabelecer. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é um habitante normal do trato intestinal já que foi isolado de fezes de uma criança recém-nascida na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Sabioni *et al.*, 1998). Agostinho (1988) demonstrou que *L. delbrueckii* é capaz de resistir e se manter viável sob o efeito de condições adversas do trato gastrointestinal como pH ácido, sais biliares, lisozima e antibióticos. Neumann *et al.*, 1998 demonstrou que esta estirpe bacteriana é capaz de sobreviver às condições do trato intestinal de camundongos gnotobióticos e se manter em número elevado em todas porções do mesmo. Neste mesmo trabalho, também foi demonstrada a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de estimular as defesas imunes do hospedeiro. No presente trabalho procuramos confirmar esta capacidade, mostrando que o probiótico é capaz de conferir proteção ao hospedeiro infectado por uma bactéria patogênica, em nosso caso a *L. monocytogenes*.

1.7. *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* é um bacilo gram positivo intracelular facultativo adquirido por via oral que sobrevive dentro de fagócitos mononucleares e hepatócitos causando a listeriose. A listeriose é uma doença rara, mas séria, com taxas de mortalidade (20-30%), maiores do que as da maioria das doenças causadas por patógenos presentes em alimentos contaminados como a *Salmonella*. No Brasil e em outros países em desenvolvimento não há estatísticas oficiais de casos de listeriose, pois sua notificação não é obrigatória. Entretanto, um estudo clínico realizado por Hofer e Reis (2006) acusou a presença de *Listeria* em vários estados brasileiros como São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

A *Listeria* é um patógeno oportunista que acomete principalmente indivíduos em condições de supressão da resposta imune (tratamentos imunossupressivos, HIV/AIDS, cirroses, etc), mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos (WHO/FAO 2004).

As manifestações clínicas incluem meningite, meningoencefalite, septicemia, abortos, infecções perinatais e gastroenterites. A gravidade da doença depende igualmente da virulência bacteriana e da eficiência da imunidade celular do hospedeiro. Muitos adultos sem nenhuma história de listeriose possuem linfócitos T primados especificamente para antígenos de *Listeria*. Se, entretanto, o sistema imune está comprometido, uma doença sistêmica pode se desenvolver (Baron, 1996).

A imunidade inata do hospedeiro é fase crítica para a resistência contra a infecção por *Listeria*. Os macrófagos infectados com *Listeria* produzem TNF- α e IL-12 que juntas estimulam as células NK a produzirem IFN- γ . Em conjunto com TNF- α , IFN- γ leva à ativação dos macrófagos. Os macrófagos ativados tornam-se listericidas através da produção de radicais livres (Unanue, 1997). Os epitópos derivados de proteínas de *Listeria* processados nos fagossomos e no citosol das APCs são apresentados por moléculas de MHC de classe I e de classe II aos linfócitos T CD4 + e CD8 +, que são primados resultando no clareamento

completo da bactéria no hospedeiro e em um pool de células T de memória capazes de uma resposta imune secundária mais rápida contra a bactéria (Unanue, 2000).

Existem controvérsias quanto ao papel da citocina IL-10 na infecção por *Listeria*. Entretanto, Dai *et al.* (1997) reportou que camundongos deficientes em IL-10 são altamente resistentes à infecção porque produzem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias durante as respostas primária e secundária. Deckert *et al.* (2001) mostraram que a IL-10 endógena é necessária para prevenir a imunopatologia caracterizada pela hiper-inflamação e destruição do tecido cerebral murino durante a infecção por *Listeria*.

Os macrófagos ingerem *Listeria* através da fagocitose enquanto que o microrganismo é capaz de invadir células epiteliais humanas através da interação de proteínas chamadas internalinas com as proteínas caderinas epiteliais. Entretanto, no camundongo, estas caderinas apresentam-se distintas das proteínas humanas impedindo a interação destas com as proteínas de internalização da bactéria. Por este motivo, modelos de infecções orais com *Listeria* não são adequados. Infecções sistêmicas com *L. monocytogenes* têm sido usadas como modelos ótimos para o estudo da resistência do hospedeiro a infecções bacterianas (Lecuit *et al.*, 1999).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de atividade antimicrobiana de microrganismos considerados probióticos em relação a *L. monocytogenes*. Leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus casei* exibe atividade microbicida contra *L. monocytogenes* (Milette *et al.*, 2007). *Lactobacillus plantarum* produz uma bacteriocina capaz de inibir o crescimento de *Listeria* (Zou *et al.*, 2007). Corr *et al.* (2007) demonstraram que algumas estirpes de lactobacilos são capazes de estimular o sistema imune da mucosa *in vitro* e proteger contra infecção por *Listeria*. Sato *et al.* (1988) e de Waard *et al.* (1999) demonstraram que uma bactéria probiótica pode conferir proteção contra a listeriose em modelos animais. A capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 proteger contra a infecção por

L. monocytogenes em modelo animal isento de germes ainda não havia sido avaliado, o que justifica a realização do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos protetores do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em infecções experimentais com *Listeria monocytogenes* analisando os possíveis mecanismos de ação do probiótico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Determinar os efeitos da monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 sobre a mortalidade de animais isentos de germes infectados por *L. monocytogenes*.
- B) Avaliar a influência de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 sobre o clareamento de *L. monocytogenes* no baço, fígado e cavidade peritoneal.
- c) Estudar os possíveis mecanismos de ação do probiótico através da detecção de citocinas pró e antiinflamatórias e óxido nítrico a nível local e sistêmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados camundongos isentos de germes SWISS/NIH de 21 a 23 dias, de ambos os sexos, obtidos de nossa colônia. Os animais foram mantidos em isoladores do tipo Trexler (Class Biologically Clean, Madison, WI) no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia de acordo com procedimentos descritos (Pleasants,1974). Durante o período dos experimentos, os animais permaneceram em micro-isoladores (UNO Roestvastaal BV, Zevenaar, Holanda) recebendo água e ração devidamente esterilizadas.

3.2. MICRORGANISMOS

O microrganismo *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 foi isolado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) de fezes de crianças recém-nascidas e trazido para a UFMG em meio LDR 12% (leite desnatado reconstituído). Este material foi expandido em 1 L de LDR 12% e cultivado 18 horas a 37°C. Esta cultura foi alíquotada e estas alíquotas foram usadas como cultura estoque em nossos experimentos. Para a associação dos animais, 100µL desta preparação eram inoculados em 10 ml de caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe, Merck, São Paulo) e cultivados por 24 horas a 37°C. Após este período, a densidade óptica da suspensão era ajustada em espectrofotômetro a 550 nm a partir de uma amostra de 100 µl. A cultura era centrifugada a 2000 x g a 4°C, lavada duas vezes em salina tamponada estéril e ressuspendida em 1 ml de salina.

A *Listeria monocytogenes* 104035 (fornecida pelo Dr. Daniel Portnoy, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, EUA) é mantida em meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories) contendo 10% de glicerol a temperatura de -70°C antes do uso. Para as infecções, uma alíquota de 100 µL desta suspensão era inoculada em meio BHI e mantida por 18 horas a 37°C. O inóculo era obtido através de diluições sucessivas desta cultura em salina tamponada estéril. A densidade óptica da suspensão era ajustada em espectrofotômetro a 550 nm. Para confirmação, a suspensão era plaqueada em ágar BHI e incubada por 48 horas a 37°C para a contagem do número de unidades formadoras de colônia por ml de cultura.

3.3. MONOASSOCIAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a monoassociação, uma única dose de uma cultura ativada de *L. delbrueckii* ressuspensa em salina na concentração de 10^9 UFC/ml era administrada aos animais por via oral. A fim de checar o sucesso da monoassociação e a ausência de contaminação, as fezes desses animais foram coletadas por dez dias consecutivos, logo após receberem o microrganismo. As fezes eram pesadas e diluições seriadas das amostras em salina tamponada estéril eram plaqueadas em ágar MRS para a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) após 48 horas de incubação a 37°C. O resultado foi expresso como logaritmo do número de unidades formadoras de colônias (Log UFC) de *L. delbrueckii* por grama de fezes.

3.4. AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

Para a avaliação da mortalidade, os animais foram infectados via intraperitoneal com *L. monocytogenes* na concentração de 10^4 UFC/100 µl dez dias após a monoassociação. Como

controle de nosso experimento, um grupo de animais recebeu salina em lugar do probiótico e também foi infectado ao mesmo tempo em que o grupo monoassociado. A mortalidade dos animais foi observada até o 25º dia de infecção.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE *L. monocytogenes* NO BAÇO E FÍGADO

Grupos de cinco animais monoassociados ou não foram infectados com *L. monocytogenes* e sacrificados em diferentes tempos de infecção (1, 3 e 5 dias) para a contagem do número de unidades formadoras de colônia por grama de órgão. O baço e o fígado dos animais foram coletados, pesados e macerados sob condições estéreis. Diluições seriadas das amostras em salina tamponada estéril foram plaqueadas em ágar BHI e mantidas a 37°C. A contagem do número de UFC era realizada após 48 horas de incubação. O resultado foi expresso como logaritmo do número de unidades formadoras de colônias (Log UFC) de *Listeria* por grama de órgão.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DE *L. monocytogenes* NA CAVIDADE PERITONEAL

Grupos de cinco animais monoassociados ou não foram infectados com *L. monocytogenes* e sacrificados em diferentes tempos de infecção (1, 3 e 5 dias). O peritônio dos animais foi lavado com 10 ml de salina tamponada estéril. O material coletado era centrifugado a 2000 x g a 4°C. Diluições seriadas do material coletado foram então plaqueadas em ágar BHI e incubadas a 37°C. A contagem do número de UFC era realizada após 48 horas. O resultado foi expresso como logaritmo do número de unidades formadoras de colônias (Log UFC) de *Listeria* por ml de material coletado.

3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE BAÇO E FÍGADO

Porções do baço e fígado dos animais foram recolhidas, fixados em formalina 4%, embebidos em parafina, cortados em secções de 5 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (H&E). A medida da área de infiltrado inflamatório no fígado foi realizada utilizando-se do programa de análise de imagens KS 300-Zeiss. Foram analisados dez campos (356.207 $\mu\text{m}^2/\text{campo}$) por animal em cada grupo nos diferentes tempos de infecção (1, 3 e 5 dias) na objetiva de 10x. Os gráficos representam a razão da área de inflamação sobre a área total analisada.

3.8. CULTURA DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL E DO BAÇO

As células peritoneais foram coletadas por lavagens do peritônio com 10 ml de meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, EUA). As células do baço foram obtidas após maceração do órgão em meio RPMI 1640. As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell), 50 mM de β -mercaptoetanol, 10.000 U/ml de penicilina/estreptomicina e 200 mM de glutamina. As células foram ajustadas para concentração final de 2×10^6 células/ml para células peritoneais e 5×10^6 células/ml para células esplênicas.

As células da cavidade peritoneal receberam os seguintes estímulos: *L. monocytogenes* morta pelo calor na proporção de 1:10 (células: bactéria), IFN- γ (75 UI/ml), ambos os estímulos ou nenhum deles. Após 18 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, uma amostra do sobrenadante foi coletada para a dosagem de TNF- α e após 48 horas o restante do

sobrenadante foi coletado para detecção de óxido nítrico. As amostras foram mantidas a – 70°C até o momento da dosagem.

As culturas de células esplênicas receberam os seguintes estímulos: *L. monocytogenes* morta pelo calor na proporção de 1:10 (células: bactéria) ou nenhum estímulo. Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de IFN- γ . As amostras foram mantidas a – 20°C até o momento da dosagem.

3.9. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Amostras de sangue dos animais foram coletadas no momento do sacrifício e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. O soro obtido foi armazenado a – 70°C. As amostras obtidas foram submetidas a ensaio enzimático com a enzima nitrato-redutase (Sigma-Aldrich Inc.). Brevemente, 25 μ l de uma solução contendo 1 U de nitrato-redutase e 2,5 mg/ml de NADPH (CALBIOCHEM, San Diego, CA, EUA) foram adicionados a 25 μ l de amostra ou padrão nitrito de sódio 1mMolar (Sigma-Aldrich Inc.) e incubados durante a noite 37°C. Após este período foram adicionados 50 μ l de Reagente de Griess (0,1% de dihidroclorato de naftiletlenodiamina, 1% de sulfanilamida, 3% de ácido fosfórico) e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente antes da leitura da absorbância em leitor de ELISA (BIO-RAD, 2550) a 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada com base na curva padrão obtida.

A concentração de nitrito no sobrenadante de cultura de células peritoneais foi determinada utilizando-se do ensaio descrito por Padgett e Pruett (1992).

3.10. DETECÇÃO DE CITOCINAS NO TUBO DIGESTIVO

O terço distal do intestino delgado e o intestino grosso foram coletados e 100 mg de cada órgão foram homogeneizados em 1 ml de PBS (4 M cloreto de sódio e 10 mM fosfato de sódio) contendo inibidores de proteases (0.1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA, e 20 Unidades Inibidoras de Calicreína-UIC de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g e o sobrenadante imediatamente utilizado para a detecção das citocinas.

3.11. DETECÇÃO DE TNF- α

Para a detecção de TNF- α , as amostras de soro e de intestino foram submetidas a ELISA utilizando-se do Kit DuoSet para TNF- α murino de acordo com procedimentos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). O limite de detecção foi de 7,8 pg/ml.

A dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de células peritoneais foi realizada por bioensaio utilizando a linhagem de células WEHI (doada pela Dra. Claude Pirmez da Fundação Oswaldo Cruz, RJ), segundo Lattime *et al.*, 1988. O limite de detecção foi de 146 pg/ml.

3.12. DETECÇÃO DE IFN- γ

A detecção de IFN- γ em amostras de soro, de intestino e de sobrenadante de cultura de células esplênicas foi feita por ELISA de captura (Afonso e Scott, 1993). Foi utilizado um anticorpo monoclonal (R46A2) para cobertura, soro policlonal de coelho (obtido em nosso laboratório) como segundo anticorpo, conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, PA, USA) para detecção e ABTS (Sigma-Aldrich Co.) para revelação. O limite de detecção para sobrenadante de cultura de células esplênicas foi de 16,3 pg/ml. Os níveis desta citocina presentes em amostras de soro e intestino não puderam ser detectados pela técnica utilizada.

3.13. DETECÇÃO DE IL-10

A dosagem de dos níveis de IL-10 produzidos no tubo digestivo e em sobrenadante de cultura de células esplênicas foi realizada por ELISA utilizando-se do Kit DuoSet para IL-10 murino de acordo com procedimentos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems Inc.). O limite de detecção para esta citocina foi de 20 pg/ml.

3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para comparação de médias entre os grupos foi utilizado o Teste *t* de Student. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Uma das principais características de um microrganismo probiótico é a capacidade de resistir a condições de estresse e assim estabelecer-se no trato intestinal (Saarela *et al.*, 2000). Portanto o primeiro objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de colonizar o trato gastrointestinal de animais isentos de germes. Nossos resultados mostram que, após a administração de uma única dose, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 atinge níveis populacionais altos (10^9 UFC/g) nas fezes dos animais nas primeiras 24 horas após a monoassociação (figura 1). Estes níveis permanecem altos durante os próximos nove dias, indicando que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de resistir ao ambiente gastrointestinal e se estabelecer.

Diversos estudos mostram a capacidade de alguns microrganismos probióticos de proteger contra infecções. Para avaliar esta mesma capacidade de nosso candidato a probiótico, monoassociamos animais isentos de germes com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e avaliamos seu efeito frente a um desafio sistêmico por *L. monocytogenes*. Animais isentos de germes são modelos ideais, já que permitem o estudo do comportamento de uma estirpe microbiana isoladamente, sem a interferência de outros componentes da microbiota normal. Os animais receberam *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e 10 dias mais tarde foram infectados. Um grupo de animais recebeu salina em lugar do probiótico e foi utilizado como grupo controle. A figura 2 mostra que a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 foi capaz de proteger os camundongos contra a morte causada por *L. monocytogenes*. A taxa de sobrevivência dos animais monoassociados (>80%) foi significativamente maior que a do grupo que recebeu salina (10%).

O aumento da capacidade de clareamento de *L. monocytogenes* pelos animais pode ser um indicativo da proteção conferida pelo probiótico. Então coletamos baço e fígado dos animais em diferentes tempos de infecção para avaliar a carga bacteriana presente. Os tempos

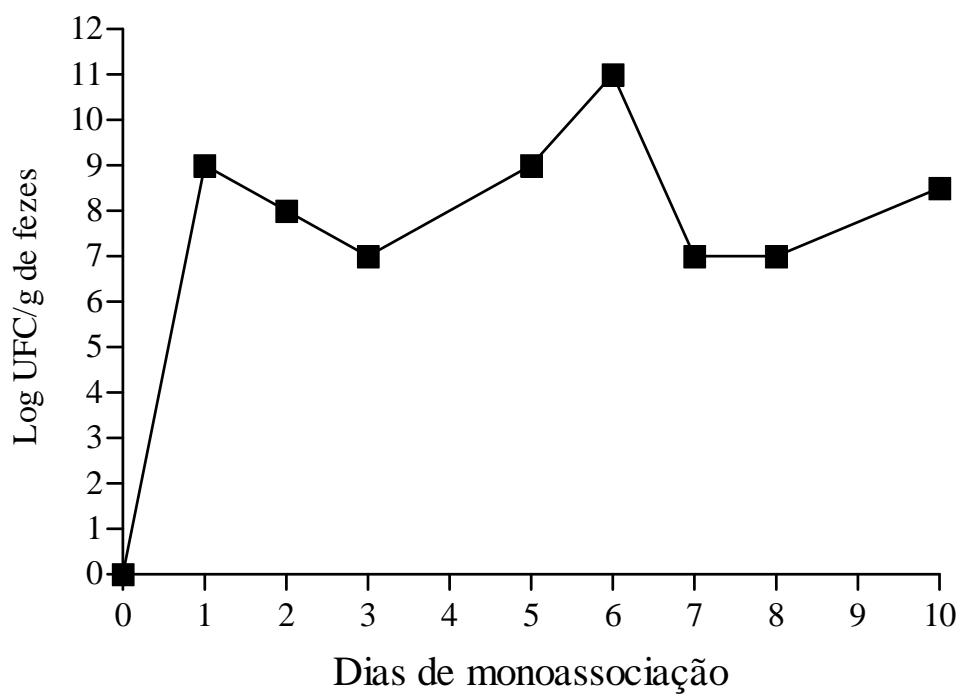


Figura 1: Cinética de colonização do microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 nas fezes de camundongos gnotobióticos durante a monoassociação. Os animais foram monoassociados com uma dose única de *L. delbrueckii* na concentração de 10^9 ufc/ml. As fezes dos animais foram coletadas durante 10 dias consecutivos após a monoassociação. Diluições sucessivas foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas por 48 horas a 37°C para a contagem do nº de UFC. Cada ponto da curva é média de cinco animais.

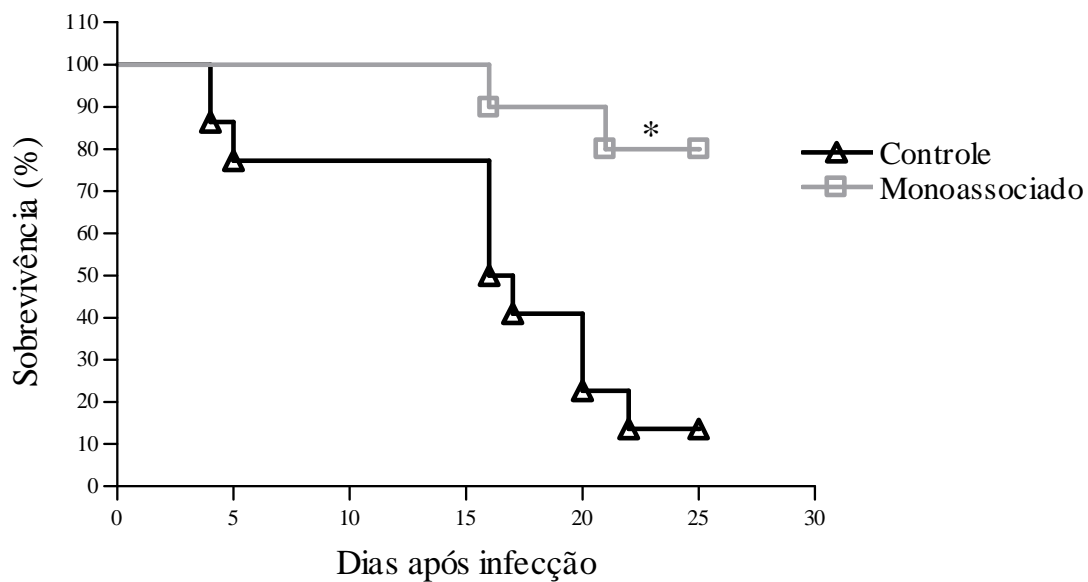


Figura 2: Curva de sobrevivência de animais sem germes (□) e animais monoassociados (Δ) ambos infectados com *L. monocytogenes* (LM). Os animais monoassociados receberam uma única dose de *L. delbrueckii* na concentração de 10^9 ufc/ml. Os animais do grupo controle receberam salina. Dez dias depois, os animais de ambos os grupos foram infectados com 10^4 ufc/100 μl de LM. O resultado foi expresso como porcentagem de animais sobreviventes até 25 dias após a infecção. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0.001$).

escolhidos foram 1, 3 e 5 dias de infecção. Intervalos maiores que 5 dias não puderam ser avaliados pois os animais do grupo controle sucumbem à infecção em torno do 6º dia. Após 1 dia de infecção, camundongos monoassociados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 apresentaram níveis estatisticamente menores de *L. monocytogenes* no baço e no fígado, comparados com os animais do grupo controle (figura 3-A). Os níveis bacterianos de ambos os grupos diminuem após 3 dias de infecção, porém o grupo monoassociado continuou apresentando menores quantidades de *L. monocytogenes* em ambos os órgãos avaliados (figura 3-B). Não foi possível detectar a presença de *L. monocytogenes* nos animais monoassociados após 5 dias de infecção. Nos animais do grupo controle ainda foi possível encontrar bactéria (figura 3-C). Em resumo, os resultados sugerem que a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 promove o clareamento mais eficiente de *L. monocytogenes* no baço e fígado dos animais.

Uma hipótese que poderia ser levantada é a de que a diferença entre os grupos no número de *L. monocytogenes* encontrada no baço e fígado seria devido à diferença de tamanho dos órgãos. Esta hipótese não se confirmou já que não houve diferença significativa no peso dos órgãos entre o grupo controle e o monoassociado. O peso do baço (figura 4-A) e do fígado (figura 4-B) dos animais do grupo controle mostrou-se semelhante ao peso dos órgãos dos animais monoassociados ao longo do curso de infecção.

Já que o inóculo utilizado neste trabalho é intraperitoneal, decidimos investigar também a quantidade de *L. monocytogenes* presente na cavidade peritoneal após a infecção. Após 1 dia de infecção o nível de *L. monocytogenes* encontrado na cavidade peritoneal dos animais monoassociados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 foi estatisticamente menor comparado com os animais do grupo controle (figura 5-A). Assim como também foi menor a quantidade de bactéria encontrada na cavidade peritoneal dos animais monoassociados após 3 dias de infecção (figura 5-B). Não foi possível detectar a presença de *L. monocytogenes* em nenhum dos grupos após 5 dias de infecção. Os resultados mostram que a monoassociação

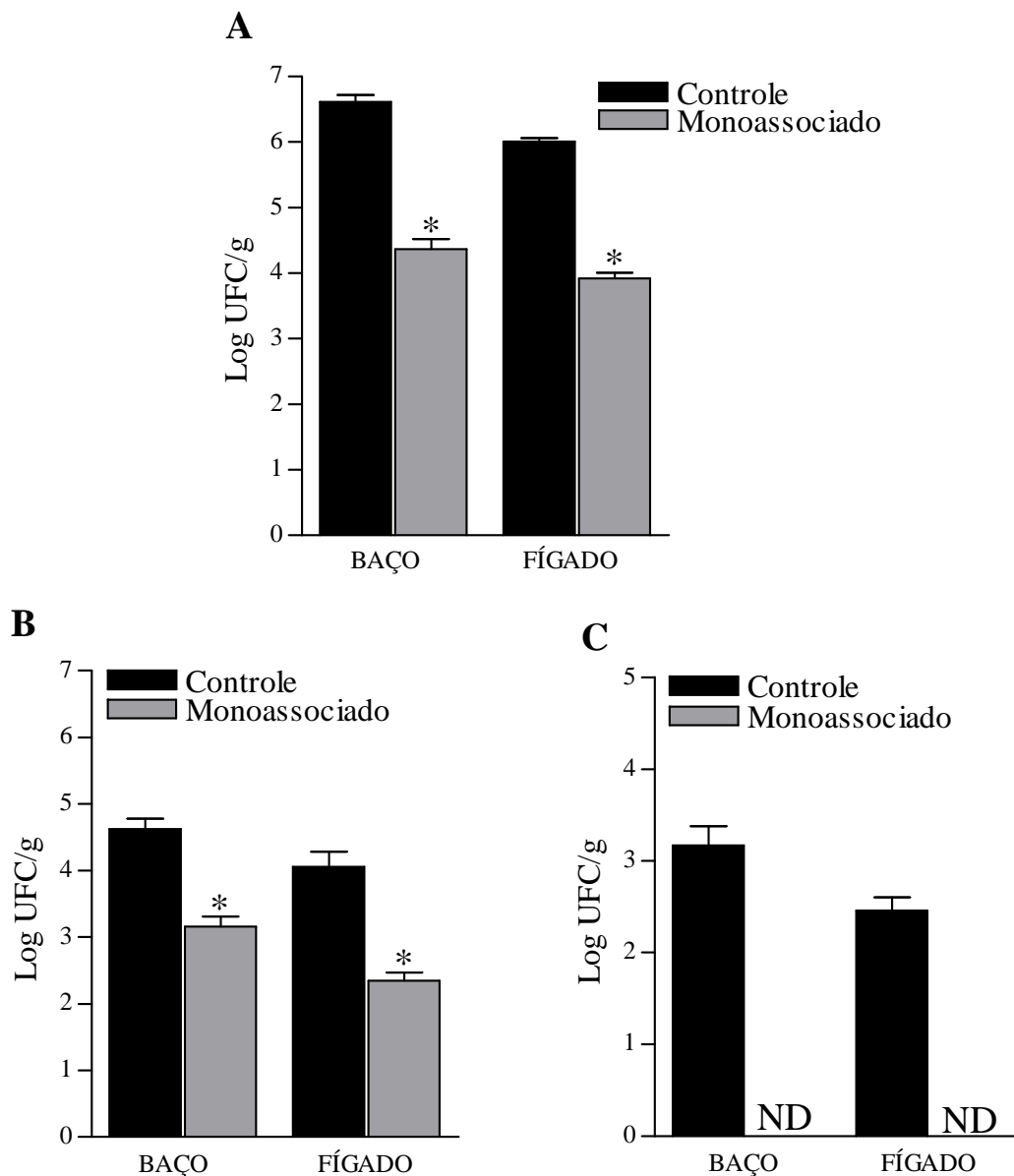


Figura 3: Quantificação de *L. monocytogenes* no baço e fígado de animais sem germes (preto) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes* (LM). **A**: 1 dia de infecção; **B**: 3 dias de infecção e **C**: 5 dias de infecção. Os órgãos foram removidos, pesados, macerados e diluições sucessivas foram plaqueadas em ágar BHI seguindo-se incubação a 37°C/ 48 horas. O dado mostrado é a média de 15 camundongos (foram realizados três experimentos contendo cinco animais em cada grupo). O limite de detecção foi de 100 UFC/g. **ND**: não determinado. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * (Teste *t* de Student, $P < 0,05$).

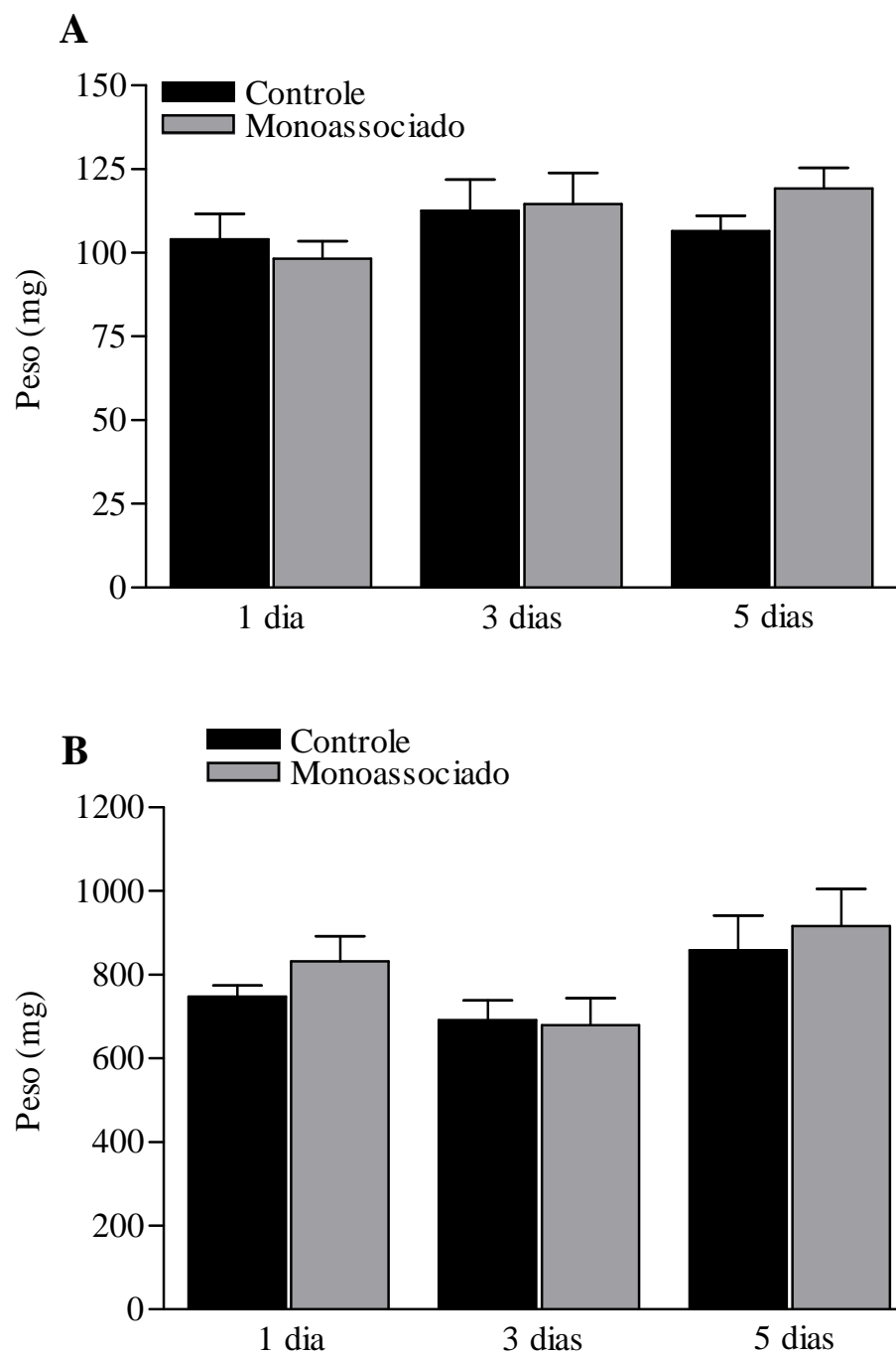


Figura 4: Peso do baço e fígado de animais sem germes (preto) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes* (LM). **A**: baço e **B**: fígado. O dado mostrado é a média de nove camundongos (foram realizados três experimentos contendo três animais em cada grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos.

com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também melhora o clareamento de *L. monocytogenes* na cavidade peritoneal.

As análises histopatológicas do fígado acusaram a presença de processo inflamatório mais acentuado no grupo controle comparado com o grupo monoassociado. Após 1 dia de infecção, os animais do grupo controle apresentaram maior área de inflamação comparados com os animais do grupo monoassociado, resultado representado pelo gráfico (figura 6). Ao analisar as imagens dos cortes histológicos, podemos observar a presença de infiltrado inflamatório, com degeneração vacuolar e necrose hepatocitária em ambos os grupos. Após 3 dias de infecção, podemos observar a presença de infiltrado inflamatório contendo raros eosinófilos em ambos os grupos. A necrose hepatocitária no grupo controle está bem evidente (figura 7). O tamanho da área de infiltrado inflamatório também se mostra estatisticamente maior no grupo controle, apesar desta diferença ser menos acentuada em relação a 1 dia de infecção. Após 5 dias de infecção, nota-se que as lesões diminuem em número e tamanho nos animais monoassociados e tendem a se resolver (figura 8). Nos animais sem germes persistem alterações degenerativas do parênquima hepático. O gráfico ilustra bem a proteção conferida pela monoassociação. Os animais monoassociados menor área de infiltrado inflamatório correspondente quando comparado com os animais do grupo controle. A análise histopatológica do baço não acusou nenhuma diferença entre os grupos (figura 9). Os resultados acima descritos confirmam a capacidade de proteção de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 contra a infecção por *L. monocytogenes*.

Estudos recentes mostram que a proteção conferida por alguns probióticos contra patógenos é devido à capacidade destes microrganismos de estimularem o sistema imune do hospedeiro. Neumann *et al*, 1998 já havia demonstrado a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 estimular mecanismos de defesa imune. Diante destas informações, decidimos avaliar se a proteção conferida pela monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 aos animais

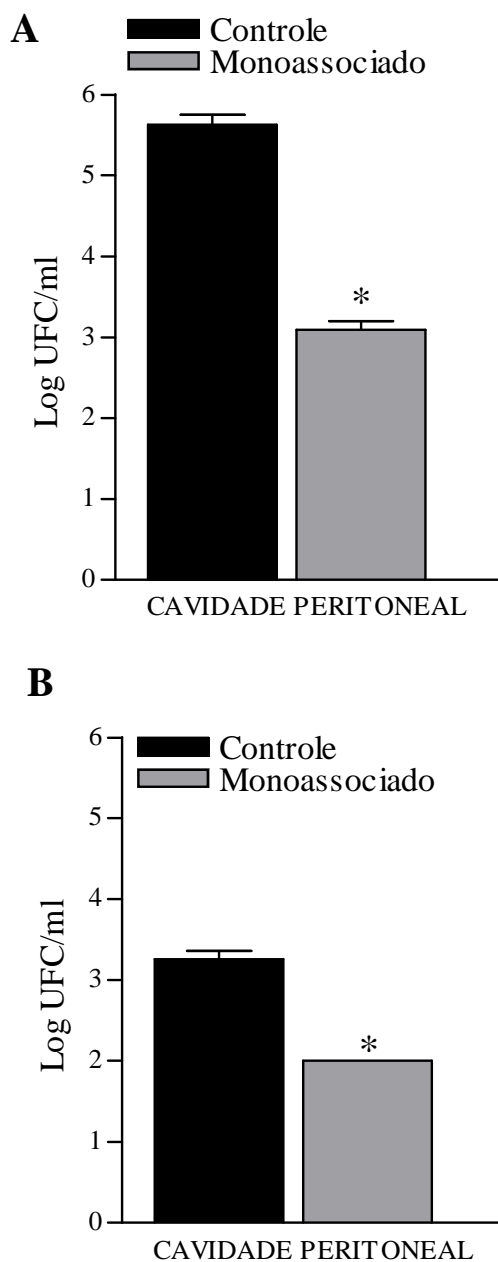


Figura 5: Quantificação de *L. monocytogenes* na cavidade peritoneal de animais sem germes (preto) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes*. Foram realizadas diluições sucessivas em placas de ágar BHI do material coletado a partir da lavagem do peritônio dos animais. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. **A**: 1 dia de infecção; **B**: 3 dias de infecção. O dado mostrado é a média de 15 camundongos (foram realizados três experimentos contendo cinco animais em cada grupos). Limite de detecção: 100 UFC/g. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * (Teste *t* de Student, $P < 0,05$).

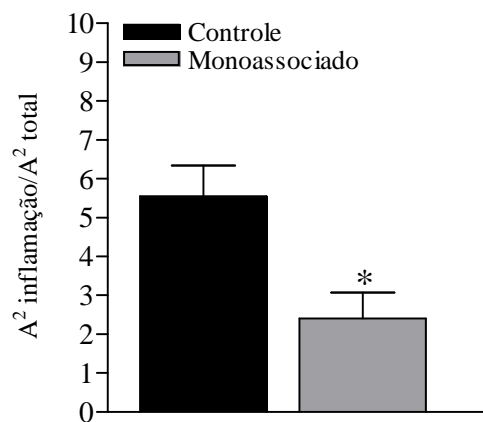
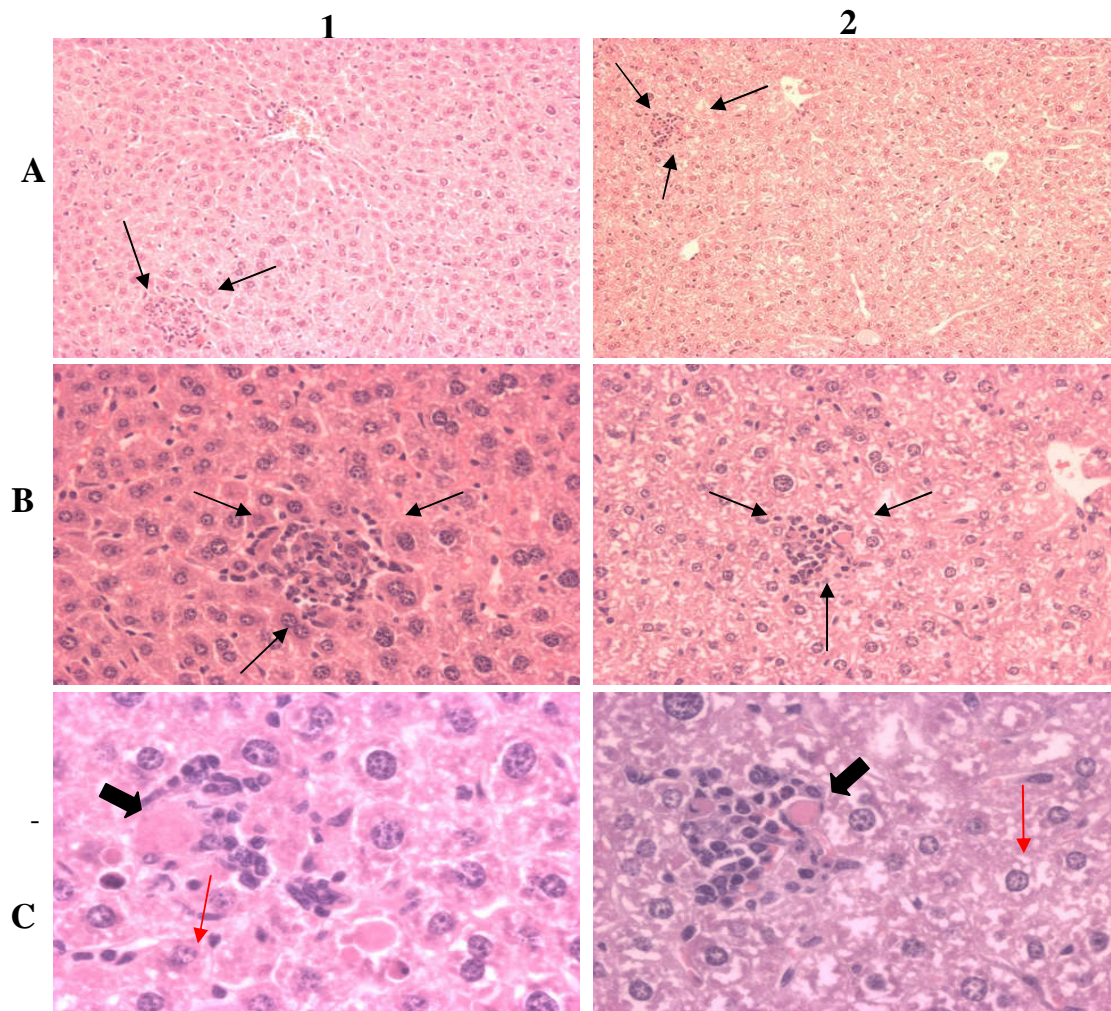


Figura 6: Análise histológica do fígado de animais sem germes (1) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (2) após 1 dia de infecção com *L. monocytogenes*. Setas finas pretas: infiltrado inflamatório; setas finas vermelhas: degeneração vacuolar dos hepatócitos e setas largas: necrose hepatocitária. A: objetiva 10x; B: objetiva 20x, C: objetiva 40x. Coloração: H&E. O gráfico representa a razão da área (A^2) de inflamação sobre a área total analisada. Cada barra é a média de três animais. Foram analisados 10 campos/animal no aumento de 10x. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

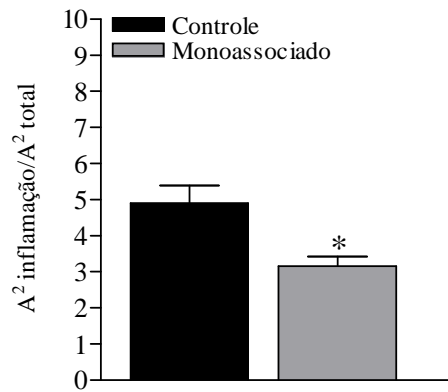
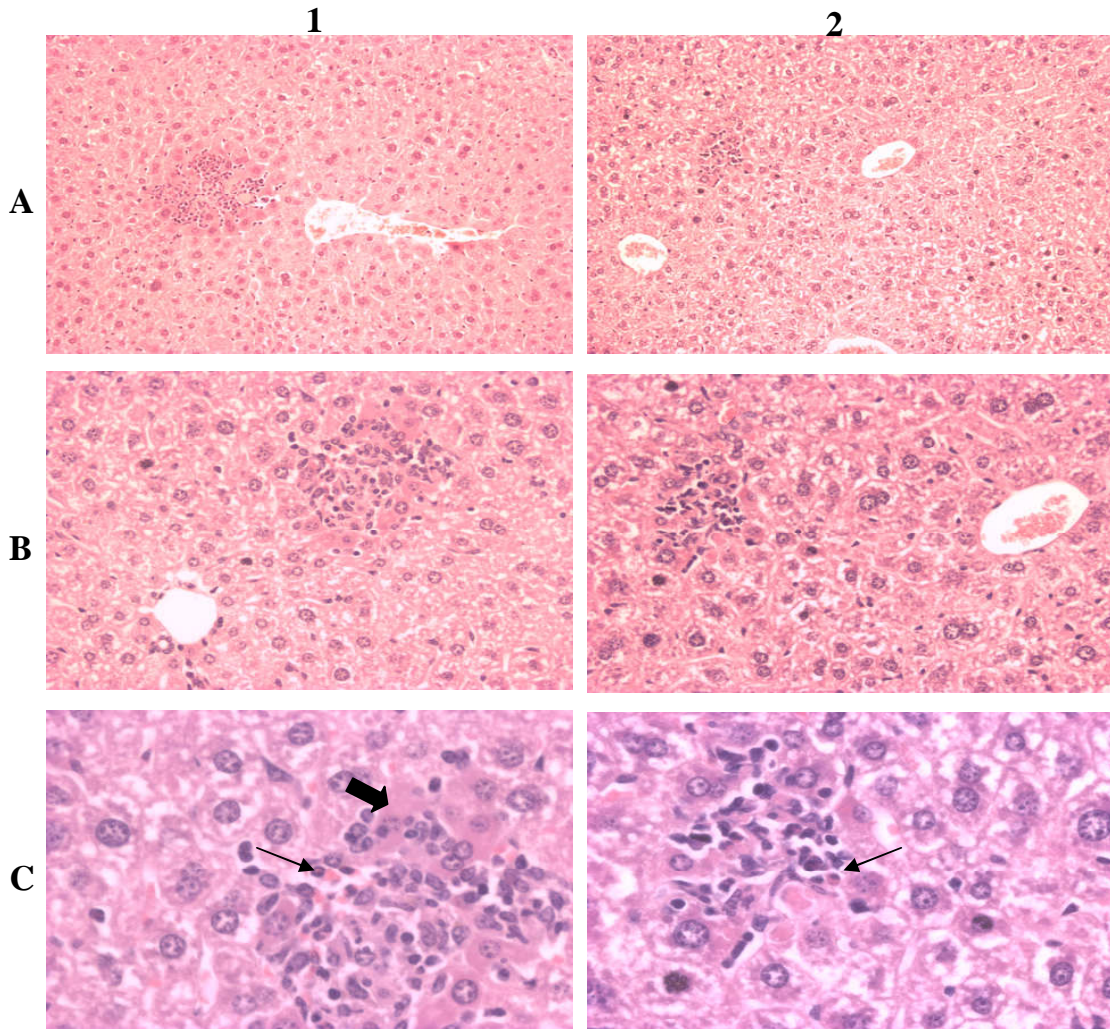


Figura 7: Análise histológica do fígado de animais sem germes (1) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (2) após 3 dias de infecção com *L. monocytogenes*. Setas finas: eosinófilo; setas largas: necrose hepatocitária **A**: objetiva 10x; **B**: objetiva 20x, **C**: objetiva 40x. Coloração: hematoxilina-eosina. O gráfico representa a razão da área (A^2) de inflamação sobre a área total analisada. Cada barra é a média de três animais. Foram analisados 10 campos/animal no aumento de 10x. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

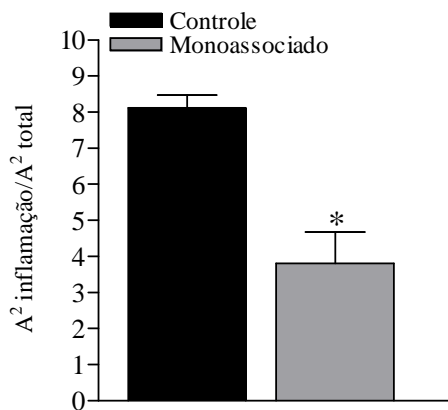
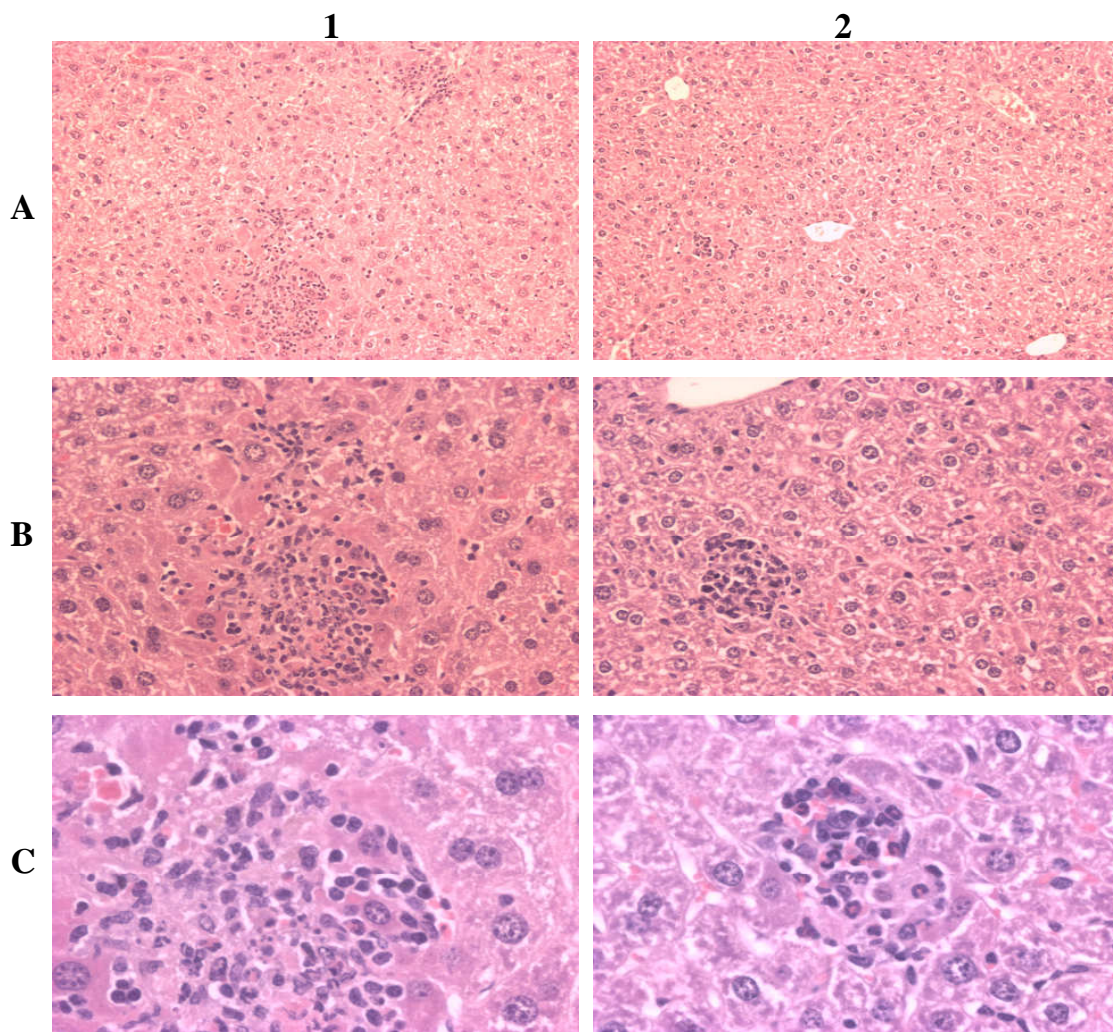


Figura 8: Análise histológica do fígado de animais sem germes (1) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (2) após 5 dias de infecção com *L. monocytogenes*. **A:** objetiva 10x; **B:** objetiva 20x, **C:** objetiva 40x. Coloração: hematoxilina-eosina. O gráfico representa a razão da área (A^2) de inflamação sobre a área total analisada. Cada barra é a média de três animais. Foram analisados 10 campos/animal no aumento de 10x. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

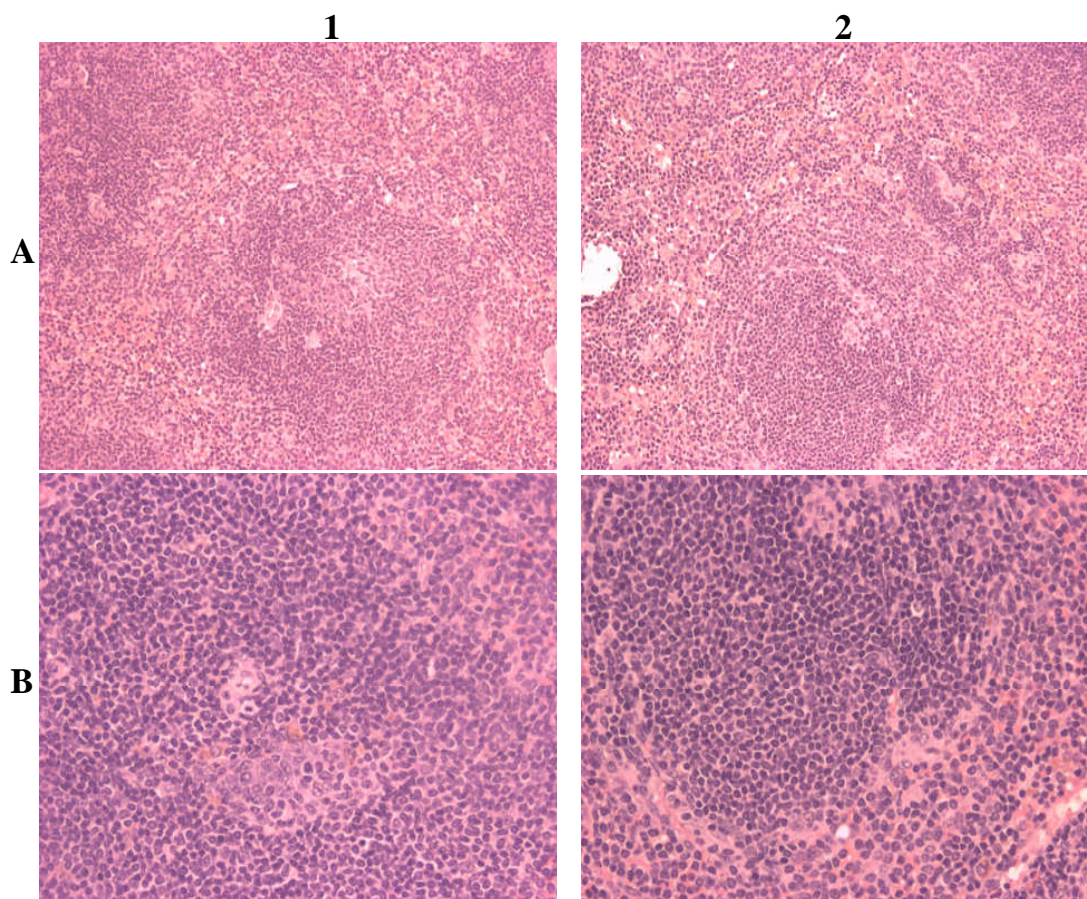


Figura 9: Análise histológica do baço de animais sem germes (1) e animais monoassociados com *L. delbrueckii* (2) após 5 dias de infecção com *L. monocytogenes*. **A:** objetiva 10x; **B:** objetiva 40x. Coloração: hematoxilina-eosina.

infectados com *L. monocytogenes* tem relação com a modulação da resposta imune. Para isso avaliamos o perfil de resposta imune sistêmica e local nestes animais. A produção de TNF- α e IFN- γ nas primeiras 48 horas de infecção é crítica para o controle da listeriose (Beckerman, 1993). Por esse motivo avaliamos a influência da monoassociação com *L. delbrueckii* sobre a produção destas citocinas.

A produção de IFN- γ no soro dos animais não atingiu níveis detectáveis. Em relação a produção de IFN- γ por células esplênicas, observamos maior produção desta citocina nos animais do grupo monoassociado com *L. delbrueckii* (figura 10). Após 1 dia de infecção os níveis produzidos por células sem estímulo de animais monoassociados foram maiores em relação ao grupo controle (figura 10-A). Após 3 dias de infecção houve um aumento da produção em ambos os grupo em relação a 1 dia de infecção, sendo que o grupo monoassociado continuou produzindo mais que o grupo controle (figura 10-B). Os níveis de IFN- γ após 5 dias de infecção foram menores em relação a três dias. Os animais monoassociados também produziram mais desta citocina neste tempo de infecção avaliado (figura 10-C). Os níveis de IFN- γ produzidos pelas células esplênicas dos animais não infectados de ambos os grupos não puderam ser detectados. Esses resultados indicam que a monoassociação com *L. delbrueckii* leva a um aumento da produção de IFN- γ no baço dos animais.

A figura 11 mostra a produção de TNF- α no soro dos camundongos ao longo da infecção. Os níveis de TNF- α detectados no grupo monoassociado foram estatisticamente maiores comparados com os níveis do grupo controle após 1, 3 e 5 dias de infecção. Não foi possível detectar produção de TNF- α antes da infecção em ambos os grupos.

Avaliamos também a produção de TNF- α por células da cavidade peritoneal dos animais. Não houve diferença entre grupos nos níveis basais produzidos pelas células não

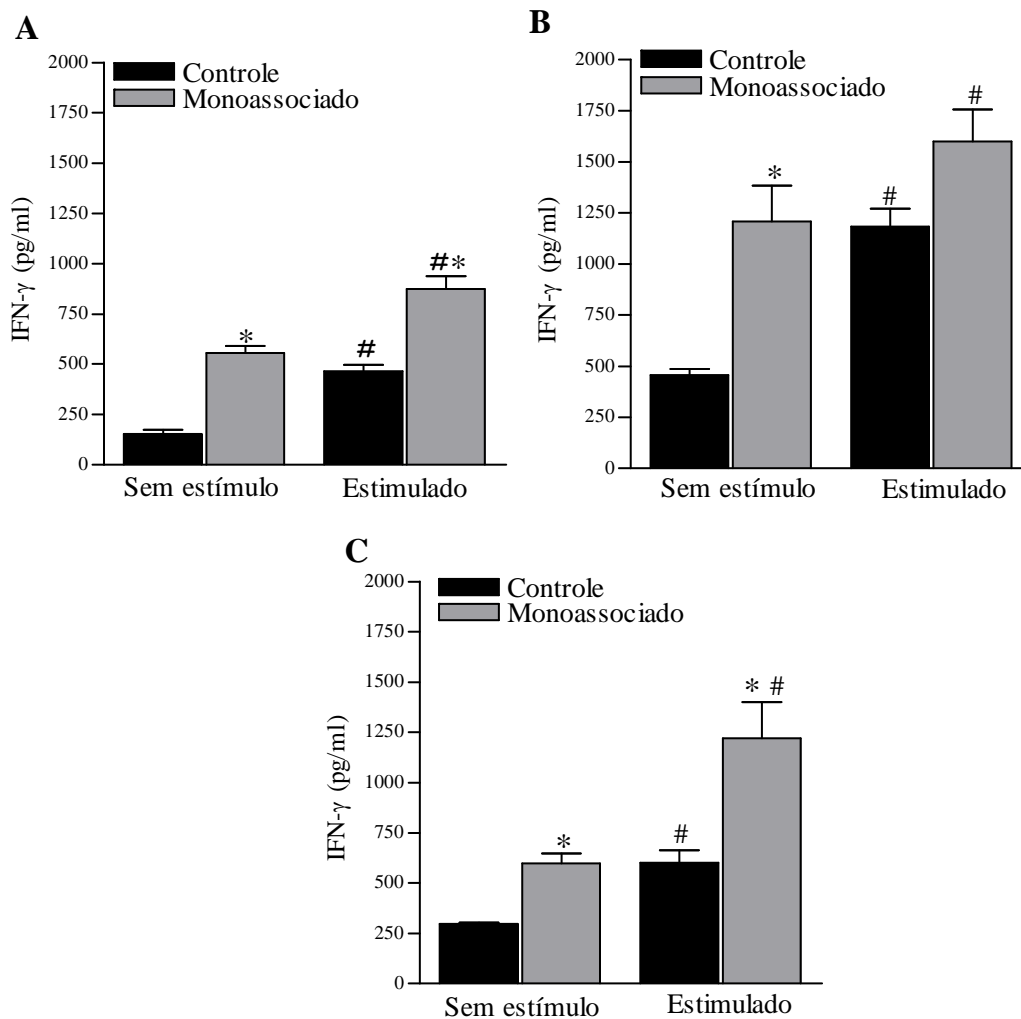


Figura 10: Produção de IFN- γ por células de baço de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes*. **A**: 1 dia de infecção; **B**: 3 dias de infecção; **C**: 5 dias de infecção. As células foram estimuladas ou não com *Listeria* morta pelo calor na proporção de 1:10 (célula: bactéria). O sobrenadante coletado após 48 horas de incubação foi mantido a -20°C até o momento da dosagem por ELISA. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo cinco animais em cada grupo). Limite de detecção: 30,7 pg/ml. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$). Diferença significativa em relação às células sem estímulo: # ($P < 0,05$).

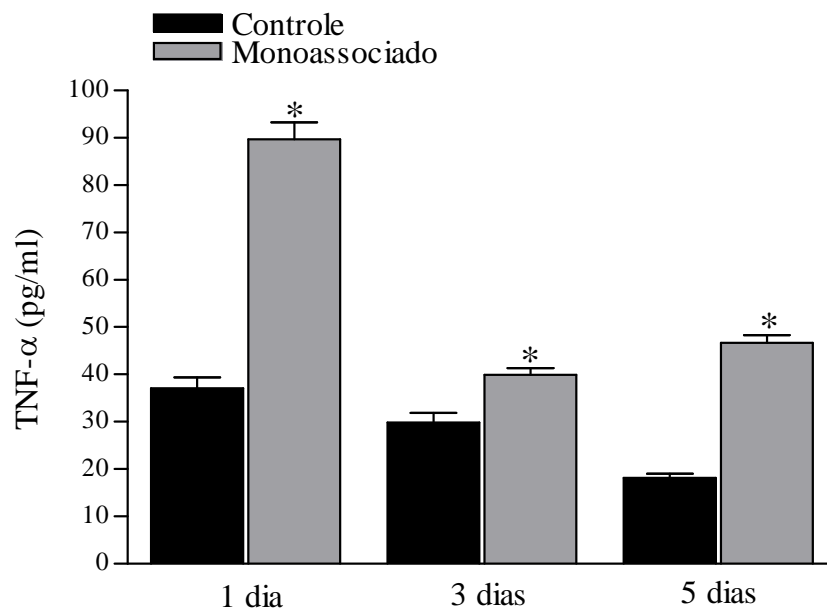


Figura 11: Produção de TNF- α no soro de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes*. O sangue foi coletado de animais com 1, 3 e 5 dias de infecção. O soro obtido foi mantido a -70°C até o momento da dosagem por ELISA. O dado mostrado é a média de 20 camundongos (foram realizados quatro experimentos contendo cinco animais em cada grupo). Limite de detecção: 7,8 pg/ml. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

estimuladas. Entretanto após o acréscimo dos estímulos *Listeria* morta pelo calor (L) ou IFN- γ (G) ou ambos (L+G) detectamos maior produção nos animais monoassociados em comparação ao grupo controle (figura 12-A). Após 1 dia de infecção observamos maior produção de TNF- α por células de animais monoassociados não estimuladas em comparação ao grupo controle também sem estímulo. Os níveis produzidos pelos animais monoassociados também foram maiores em comparação ao grupo controle após o acréscimo de *Listeria* morta pelo calor ou IFN- γ (figura 12-B). Após 3 dias de infecção as células não estimuladas de animais monoassociados continuaram produzindo níveis maiores de TNF- α comparadas com os animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos após o acréscimo dos estímulos (figura 12-C). Após 5 dias de infecção houve maior produção da citocina por células de animais monoassociados comparados ao grupo controle na ausência de estímulo e quando estimuladas por IFN- γ ou pelos dois estímulos (figura 12-D). Os resultados de dosagem de TNF- α acima descritos indicam que *L. delbrueckii* é capaz de estimular o sistema imune dos camundongos isentos de germes.

Um dos principais mecanismos microbicidas de macrófagos é a produção de óxido nítrico. Verificamos então a produção deste mediador da resposta imune no soro dos animais (figura 13). A produção basal (antes da infecção) de óxido nítrico só pôde ser detectada no grupo que recebeu *L. delbrueckii*. Após 1 dia de infecção os níveis aumentaram em ambos os grupos, sendo estatisticamente maiores no grupo monoassociado em relação ao grupo controle. Os animais monoassociados continuaram a exibir um perfil de maior produção de óxido nítrico após 3 e 5 dias de infecção.

Os animais monoassociados também apresentaram maior perfil de produção de óxido nítrico de células da cavidade peritoneal (figura 14). Antes da infecção, a produção de óxido nítrico por células peritoneais de animais monoassociados mostrou ser estatisticamente maior quando comparada à do grupo controle. Esta diferença pôde ser detectada mesmo na ausência

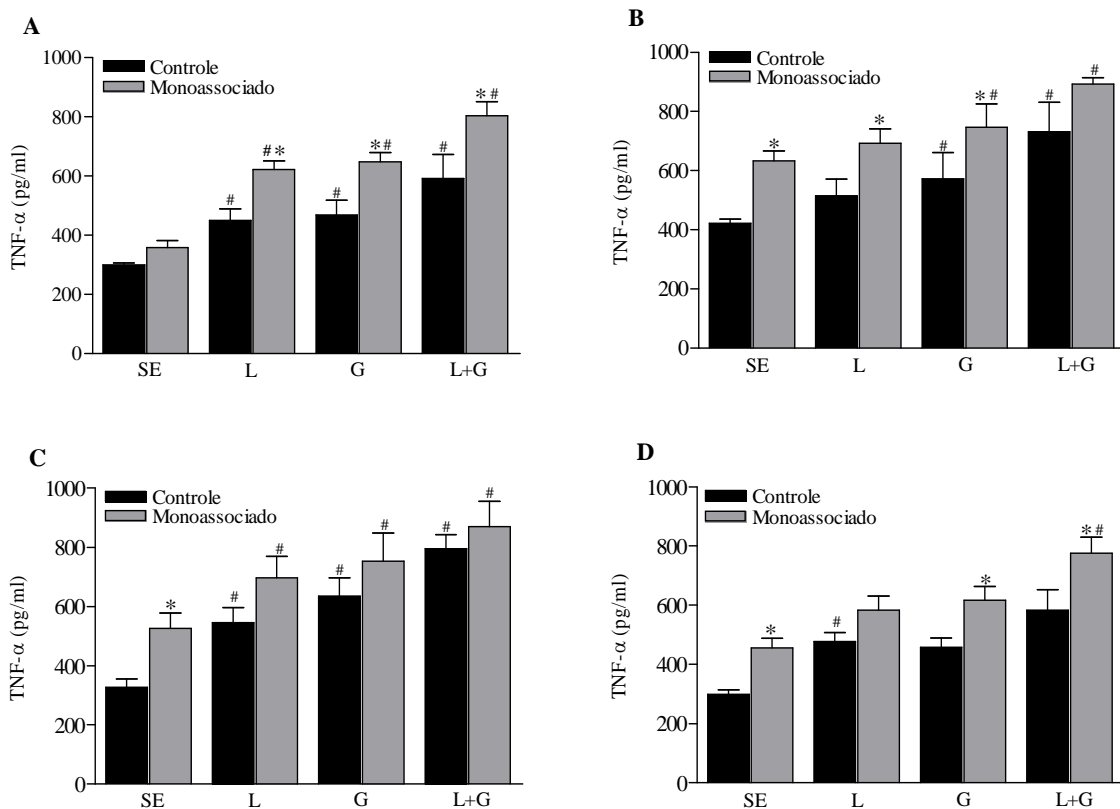


Figura 12: Produção de TNF- α por células peritoneais de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes*. As células foram coletadas de animais não infectados (**A**) e animais com 1 (**B**), 3 (**C**) e 5 (**D**) dias de infecção através de lavagens peritoneais. As células incubadas foram estimuladas com *Listeria* morta pelo calor na proporção de 1 célula:10 bactérias (**L**) ou com 75 UI/ml de IFN- γ (**G**) ou por ambos os estímulos (**L+G**). Foi usado um controle não estimulado (**SE**). O sobrenadante coletado após 48 horas de incubação foi mantido a -20°C até o momento da dosagem. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo 5 animais em cada grupo). Limite de detecção: 29,9 pg/ml. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P<0,05$). Diferença significativa em relação às células sem estímulo: # ($P<0,05$).

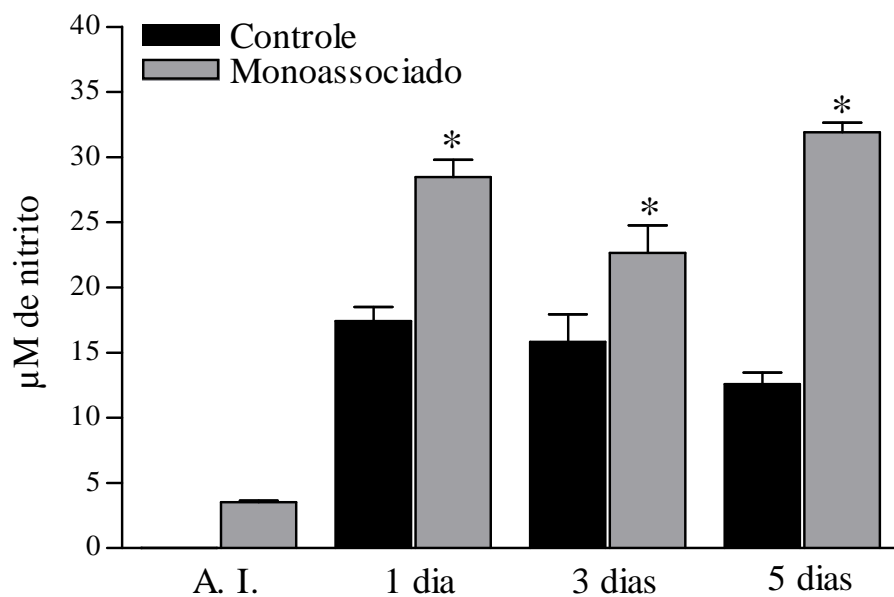


Figura 13: Produção de óxido nítrico no soro de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) infectados com *L. monocytogenes*. As amostras de sangue foram coletadas de animais não infectados e de animais com 1, 3 e 5 dias de infecção. O soro obtido foi mantido a -70°C até o momento da dosagem por ensaio enzimático. O dado mostrado é a média de 20 camundongos (foram realizados quatro experimentos contendo cinco animais em cada grupo). Os níveis de óxido nítrico dos animais sem germes antes da infecção ficaram abaixo do limite de detecção ($3,2\ \mu\text{M}$). Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

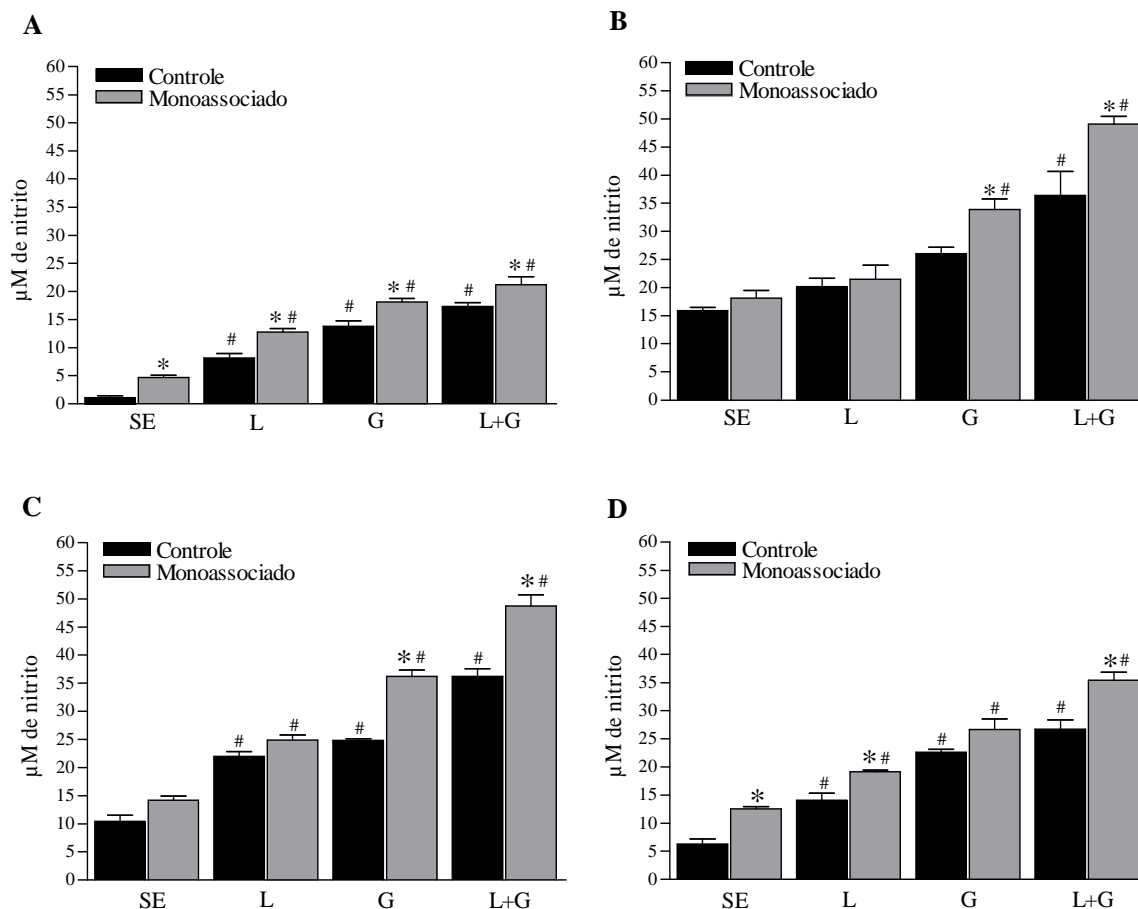


Figura 14: Produção de óxido nítrico por células peritoneais de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) ambos infectados com *L. monocytogenes*. As células foram coletadas de animais não infectados (A) e animais com 1 (B), 3 (C) e 5 (D) dias de infecção através de lavagens peritoneais. As células incubadas foram estimuladas com *Listeria* morta pelo calor na proporção de 1 célula:10 bactérias (L) ou com 75 UI/ml de IFN- γ (G) ou por ambos os estímulos (L+G). Foi usado um controle não estimulado (SE). O sobrenadante coletado após 48 horas de incubação foi mantido a -20°C até o momento da dosagem. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo 5 animais em cada grupo). Limite de detecção: 1,35 μM . Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$). Diferença significativa em relação às células sem estímulo: # ($P < 0,05$).

de qualquer estímulo. O acréscimo de estímulo bacteriano (*Listeria* morta pelo calor) ou IFN- γ ou ambos foi capaz de aumentar significativamente esses níveis (figura 14-A). Após 1 e 3 dias de infecção, a diferença só foi observada após presença de IFN- γ e dos dois estímulos (figura 14-B e figura 14-C). A diferença voltou a ser detectada na ausência de estímulo após 5 dias de infecção, além de também ser estatisticamente diferente na presença do estímulo bacteriano e dos dois estímulos (figura 14-D).

Como *L. delbrueckii* coloniza e se estabelece no trato gastrointestinal dos animais, decidimos avaliar a capacidade de estimulação do sistema imune intestinal. Para isso estudamos o perfil de produção de IFN- γ e TNF- α no intestino delgado e intestino grosso dos animais. A figura 16 ilustra a produção de TNF- α no intestino delgado (A) e intestino grosso (B). A produção de TNF- α no intestino delgado dos animais monoassociados foi muito maior em comparação com o grupo controle. Os níveis detectados foram estatisticamente diferentes em todos os tempos avaliados. No intestino grosso, também se pode observar maior produção de TNF- α pelos animais monoassociados, apesar da diferença não ser tão acentuada como no caso do intestino delgado. No intestino grosso, apesar da maior produção de TNF- α no grupo monoassociado observada após 3 dias de infecção não foi possível observar diferença estatística entre os grupos. A produção de IFN- γ não pôde ser detectada. Todos esses resultados confirmam a capacidade de *L. delbrueckii* estimular o sistema imune a produzir citocinas pró-inflamatória conferindo proteção contra a infecção por *Listeria*.

Alguns estudos têm demonstrado a capacidade de alguns microrganismos probióticos de estimularem a produção de citocinas antiinflamatórias. Esta característica tem sido empregada no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais. Esta capacidade ainda não havia sido avaliada para *L. delbrueckii*, motivo pelo qual decidimos estudá-la. A figura 16 mostra a produção de IL-10 por células esplênicas. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos

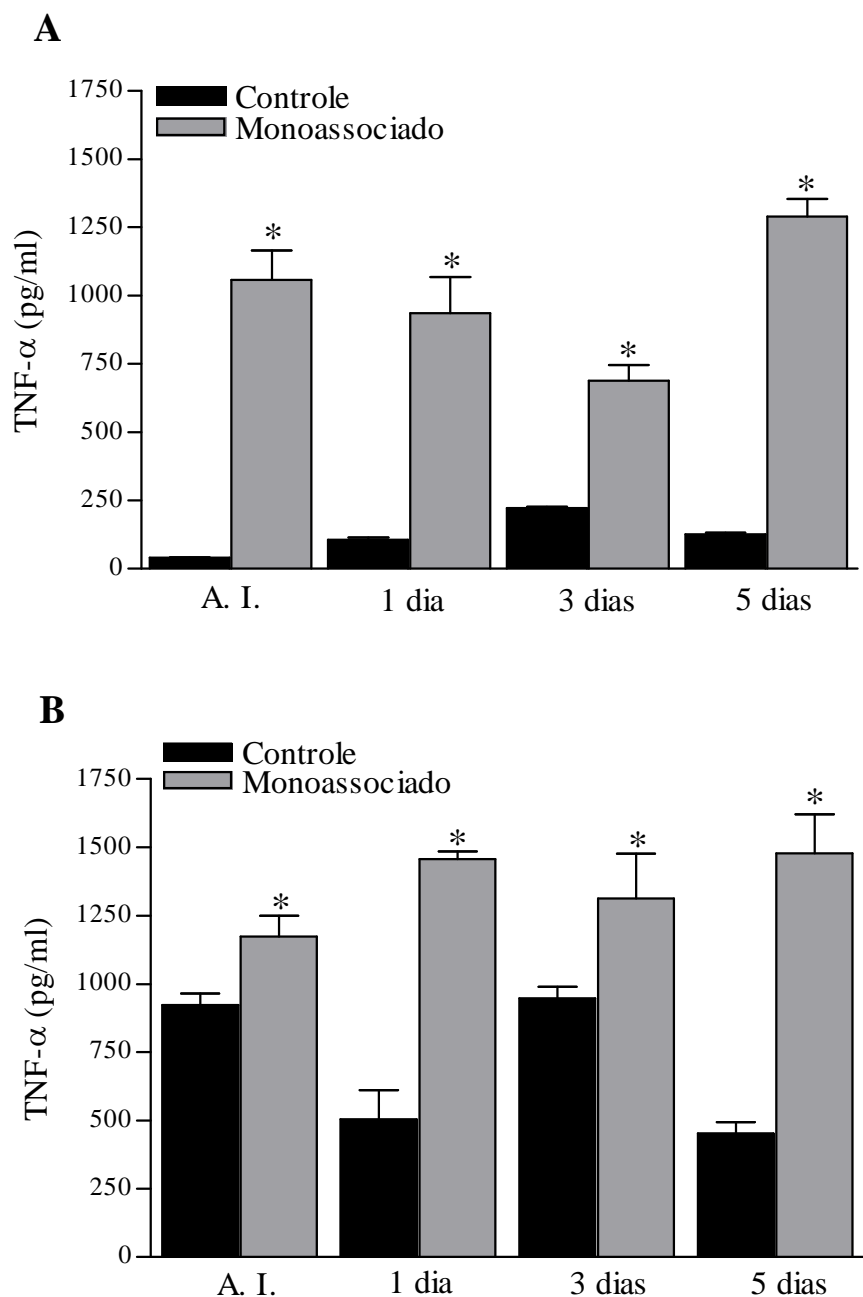


Figura 15: Produção de TNF- α no tubo digestivo de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) infectados com *L. monocytogenes*. Porções do intestino delgado (A) e intestino grosso (B) foram coletadas de animais não infectados (A.I.) e de animais com 1, 3 e 5 dias de infecção, homogeneizadas em solução contendo anti-proteases e mantidas a -70°C até o momento da dosagem por ELISA. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo cinco animais em cada grupo). O limite de detecção foi de 21 pg/ml de. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P < 0,05$).

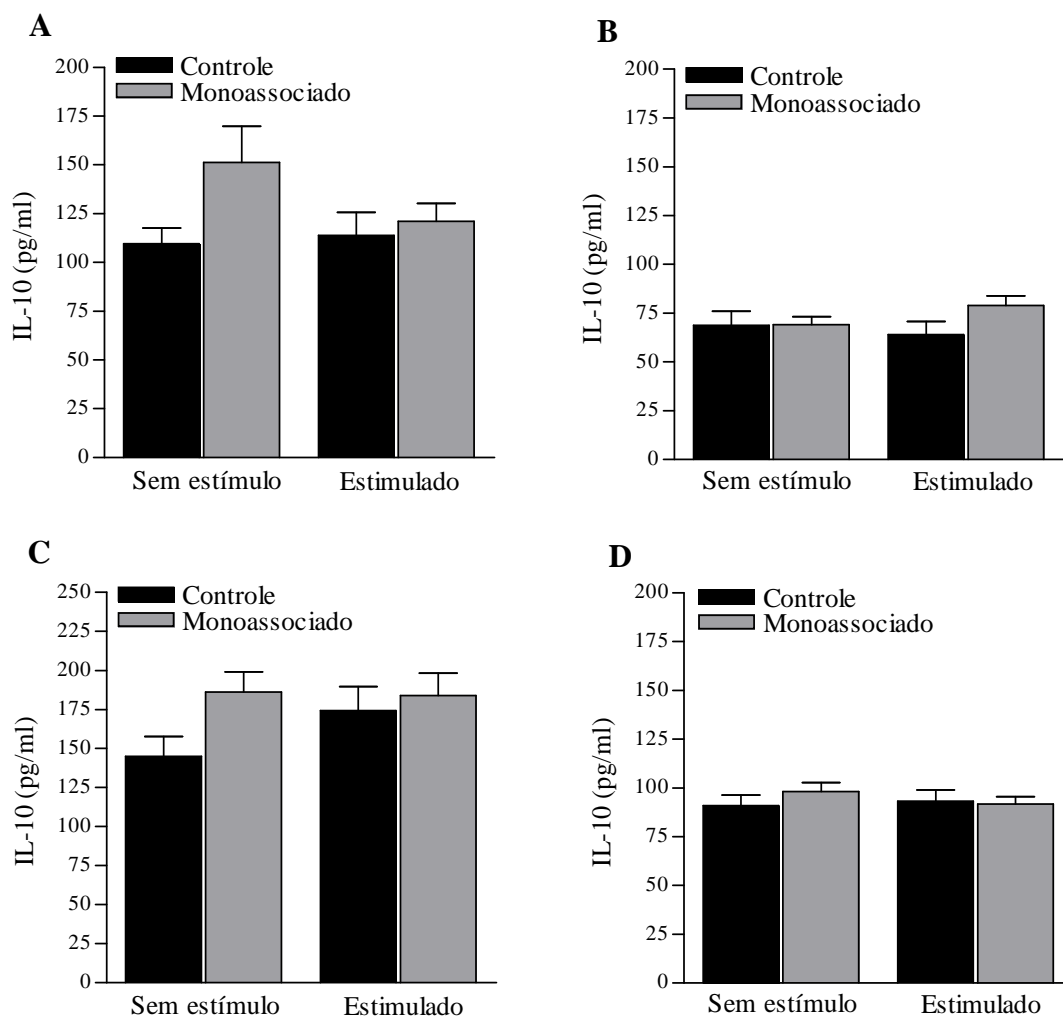


Figura 16: Produção de IL-10 por células esplênicas de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) infectados com *L. monocytogenes*. As células do baço foram coletadas de animais não infectados (A) e com 1 (B), 3 (C) e 5 (D) dias de infecção e incubadas na presença ou não de *Listeria* na proporção de 1:10 (células: bactérias). O sobrenadante foi coletado após 48 horas de incubação e mantido a -20°C até o momento da dosagem por ELISA. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo cinco animais em cada grupo). O limite de detecção foi 21 pg/ml. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

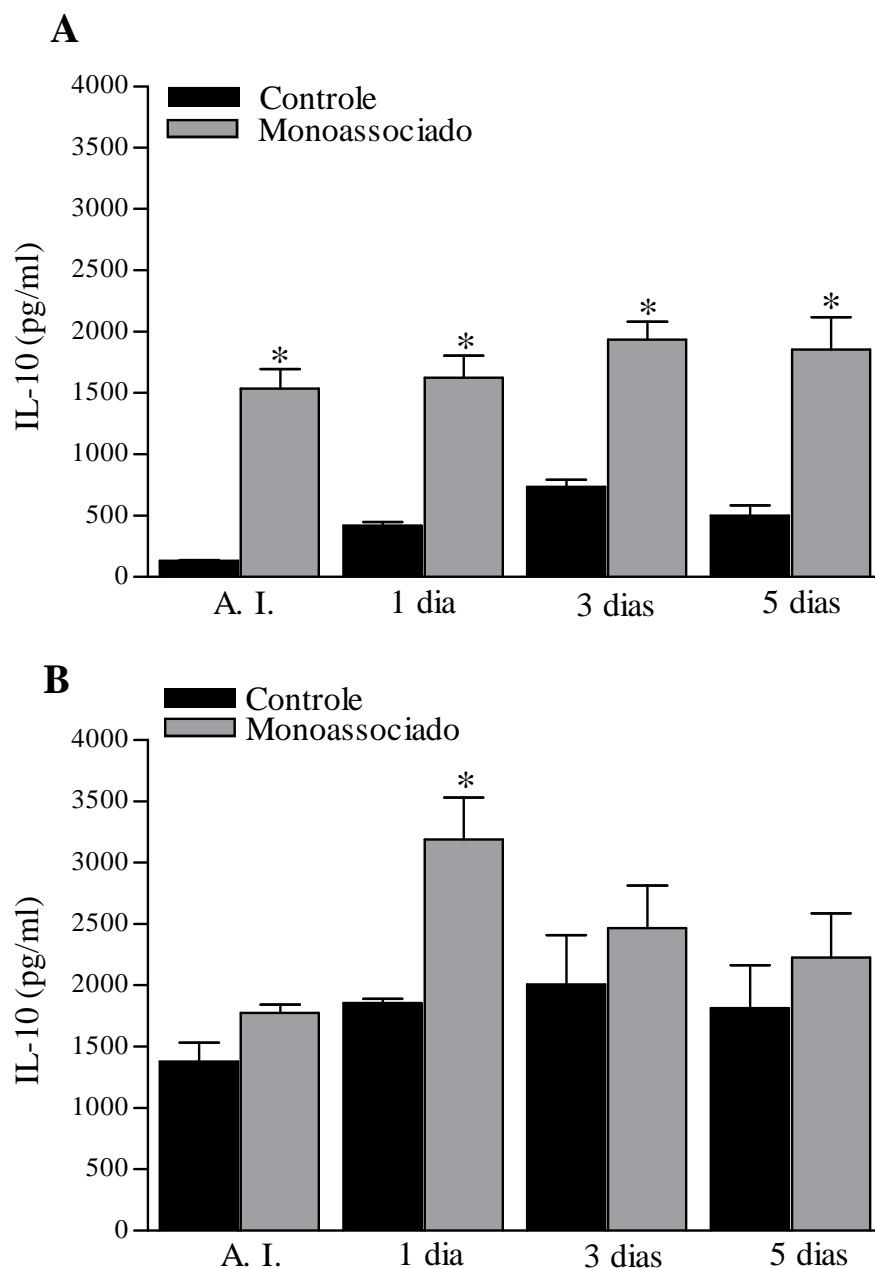


Figura 17: Produção de IL-10 no tubo digestivo de animais sem germes (preto) e animais monoassociados (cinza) infectados com *L. monocytogenes*. Porções do intestino delgado (A) e intestino grosso (B) foram coletadas de animais não infectados e de animais com 1, 3 e 5 dias de infecção, homogeneizados em solução contendo anti-proteases e mantidas a -70°C até o momento da dosagem por ELISA. O dado mostrado é a média de 10 camundongos (foram realizados dois experimentos contendo 5 animais em cada grupo). O limite de detecção foi de 68 pg/ml. Diferença significativa em relação ao grupo controle: * ($P<0,05$). Diferença significativa em relação aos animais não infectados: # ($P<0,05$).

tempos avaliados. Além disso, o acréscimo de *Listeria* morta pelo calor não levou ao aumento da produção de IL-10 assim como foi observado para IFN- γ . Entretanto, ao avaliar a produção de IL-10 no tubo digestivo, foi possível detectar maior produção desta citocina no intestino delgado dos animais monoassociados (figura 17-A). Os níveis detectados parecem não sofrer influência da infecção já que permaneceram os mesmos em todos os tempos avaliados. No intestino grosso, a diferença entre grupos só pôde ser observada após 1 dia de infecção onde os níveis de IL-10 no grupo monoassociado sofreram um aumento em relação aos animais monoassociados não infectados (figura 17-B). Após 3 e 5 dias a produção de IL-10 voltou a ser a mesma quando comparada com o controle não estimulado e continuou não sendo diferente entre os dois grupos. Esses resultados mostram que *L. delbrueckii* é capaz de estimular a produção de IL-10 a nível local e não a nível sistêmico.

5. DISCUSSÃO

Desde o início do século XX vários efeitos benéficos têm sido atribuídos ao consumo de produtos contendo bactérias probióticas (Santosa *et al.*, 2006). Algumas espécies de lactobacilos têm sido largamente utilizadas como probióticos já que possuem características essenciais para serem consideradas como tal. Um desses requisitos básicos é a capacidade de resistir ao ambiente gastrointestinal e se estabelecer. Neumann *et al.* (1998) havia demonstrado a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 colonizar o trato intestinal de animais isentos de germes após uma única dose recebida. Em nosso estudo, os animais isentos de germes também são colonizados após receberem apenas uma única dose de *L. delbrueckii* comprovando esta capacidade (figura 1). A colonização só é possível devido à ausência da microbiota intestinal. Em camundongos convencionais, por exemplo, a colonização não acontece porque *L. delbrueckii* UFV-H2b20, assim como outros probióticos, não é capaz de competir com a microbiota intestinal normal e se adaptar ao novo ambiente (De La Cochetière, *et al.*, 2005). As doses devem ser reforçadas para que os níveis bacterianos permaneçam altos no trato intestinal.

Estudos recentes mostram a capacidade de alguns probióticos de conferirem resistência contra infecções em modelo animal isento de germe. Camundongos BALB/c isentos de germes monoassociados com uma bactéria láctica foram capazes de um clareamento mais eficiente da bactéria *Helicobacter pilory* (Kabir *et al.* 1997). A monoassociação com *Lactobacillus acidophilus* protegeu camundongos C3H/He/Oujco isentos de germes contra a infecção por *Salmonella enterica* var. Typhymurium (Bernet-Camard *et al.* 1997). *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também é capaz de proteger contra *S. enterica*. Tanto a mortalidade dos animais como a capacidade de clareamento de *Salmonella* são afetadas beneficemente pela monoassociação (Moura *et al.*, 2001; Silva *et al.* 2004). Quanto à proteção contra *L.*

monocytogenes conferida por microrganismos probióticos, um estudo realizado por de Waard *et al.* (2002) mostrou a capacidade de antagonismo do probiótico *Lactobacillus casei* contra a listeriose em ratos livres de patógenos específicos (SPF). O envolvimento de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 na proteção contra *L. monocytogenes* em modelo murino isento de germe ainda não havia sido avaliado. Os modelos animais isentos de germes são ideais para entender o impacto de um microrganismo sobre seu hospedeiro isoladamente, sem a interferência de outros componentes da microbiota normal (Vieira *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de proteger animais isentos de germes da morte causada por *Listeria* (figura 2). Além disso, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 induziu o clareamento mais eficiente do patógeno, refletido nos níveis reduzidos de *Listeria* encontrados no baço, fígado e cavidade peritoneal dos animais monoassociados e na reduzida área de injúria no fígado quando comparado com o grupo controle (figuras 3-8). Johnson e Balish (1980) reportaram que os macrófagos de animais isentos de germes respondem mais lentamente aos sinais quimiotáticos. A explicação para isto poderia ser que a apresentação eventual de antígenos provenientes da microbiota intestinal serve para a manutenção de um estado de prontidão, seja inflamatório ou regulatório dependendo da natureza do microrganismo e de seus produtos metabólicos, levando a respostas imunes mais rápidas (Schiffirin e Blum, 2002). A resposta mais lenta dos animais isentos de germes pode explicar a capacidade de clareamento reduzida observada em nossos resultados. Além disso, Neumann *et al.*, (1998) observou o aumento do número de células de Kupfer, responsáveis pelo clareamento da bactéria circulante, após a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20. O papel destas células fagocíticas no controle de *L. monocytogenes* no fígado já está bem definido (Mitsuyama *et al.*, 1978) e seu aumento poderia explicar a maior resistência dos animais monoassociados na infecção. A maior produção de quimiocinas como a proteína quimiotática para macrófagos 1 (MCP-1), por exemplo, pelos animais monoassociados

atrairia maior número de células para órgãos infectados e também poderia explicar o clareamento mais eficiente. Seria necessária a realização de experimentos para verificarmos esta hipótese.

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de imunomodulação dos microrganismos probióticos tanto a nível local (trato intestinal) como sistêmico (Perdigón *et al.*, 1988; Cross, 2002; Ibnou-Zekri *et al.*, 2003). A estimulação do sistema imune é um dos principais mecanismos de ação postulados para explicar a proteção contra infecções atribuída a microrganismos probióticos (Lin *et al.*, 2007). De acordo com nossos resultados, *L. delbrueckii* estimula o sistema imune dos animais isentos de germes e assim confere proteção contra a infecção por *L. monocytogenes*. Sato *et al.* (1984) avaliou o aumento da resistência contra a infecção por *L. monocytogenes* conferida por *Lactobacillus casei*. Neste trabalho a administração do probiótico suprime o crescimento de *Listeria* no fígado dos camundongos. Além disso, a injeção intraperitoneal de *Listeria* morta por radiação UV leva ao aumento da acumulação de macrófagos peritoneais nesses animais, indicando que a proteção é mediada por macrófagos que migram da corrente sanguínea para o fígado e cavidade peritoneal. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também é capaz de estimular as defesas imunes do hospedeiro, aumentando a atividade fagocítica de células mononucleares e assim promovendo a eliminação eficiente de uma bactéria Gram-negativa inoculada intravenosamente (Neumann *et al.*, 1998).

O papel de TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico no controle da listeriose já está bem descrito (Rothe *et al.*, 1993; Leenen *et al.*, 1994). Alguns estudos mostram que os microrganismos probióticos possuem a capacidade de induzir a produção desses três mediadores da resposta imune. Ishida-Fujii *et al.* (2007) mostraram que macrófagos peritoneais de ratos alimentados com *L. casei* e infectados intraperitonealmente com *Escherichia coli* apresentavam maior produção de TNF- α e tiveram sua atividade fagocítica aumentada conferindo proteção aos

animais. Em outro estudo, macrófagos peritoneais murinos produziram quantidades substanciais de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em resposta à estimulação por diferentes estirpes de lactobacilos (Marcinkiewicz *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que células de *L. delbrueckii* viáveis, mortas pelo calor ou inativadas estimulam *in vitro* a produção de TNF- α por células peritoneais e de IFN- γ por células esplênicas de camundongos isentos de germes. Em nosso estudo, *L. delbrueckii* estimulou *in vivo* a maior produção de TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico, o que contribuiu para o aumento da resistência contra a infecção (figura 10 a 14). A produção de TNF- α e IFN- γ está de acordo com o reportado por vários autores (Bancroft *et al.*, 1991; Dunn e North, 1991; Kauffman, 1993). É provável que a maior produção IFN- γ pelos animais monoassociados esteja relacionada com a maior produção de citocinas pró-interferon como IL-12 e IL-18 (Cross, 2002a). Neumann (1998) mostrou que *L. delbrueckii* é capaz de induzir *in vitro* a produção de IL-12 por células de animais isentos de germes.

Macpherson *et al.* (2005) ao revisarem as respostas imunes que adaptam a mucosa intestinal à microbiota reportaram que apesar das células dendríticas das placas de Peyer reconhecerem bactérias comensais vivas, estas células ficam geralmente restritas ao sistema imune da mucosa. Então, respostas imunes sistêmicas estimuladas por microrganismos vivos da microbiota são relativamente raras. Entretanto, produtos solúveis da degradação destas bactérias alcançam a circulação sistêmica e são responsáveis pelas diferenças na organização e estrutura de tecidos linfóides e na diversidade e concentração de mediadores da resposta imune entre animais isentos de germes e animais SPF. Esses dados explicam a capacidade de *L. delbrueckii* estimular o sistema imune sistêmico dos camundongos demonstrado aqui em nosso trabalho. Estudos futuros deverão focar-se na identificação dos antígenos provenientes da degradação deste microrganismo que são capazes de ativar respostas imunes nos animais isentos de germes. Além disso, estudos têm demonstrado a importância dos receptores do tipo

Toll (TLR) no reconhecimento destas bactérias (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Seria interessante estudar também as vias de sinalização envolvidas na imunomodulação exibida por *L. delbrueckii* UFV-H2b20.

O transporte transepitelial de antígenos por células M no epitélio associado com folículos linfóides no intestino leva imunógenos diretamente para os tecidos linfóides organizados da mucosa que constituem os sítios de indução para respostas imunes (Neutra e Kraehenbuhl, 1993). Perdígón *et al.*, 2002 já haviam avaliado a influência de diversas estirpes de lactobacilos sobre o sistema imune intestinal de camundongos. Neste estudo, os animais que receberam os probióticos apresentaram maior número de células produzindo citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-10 na lâmina própria do intestino. Este estudo também mostrou que as principais células responsáveis pela secreção dessas citocinas foram macrófagos e células dendríticas. Outro estudo mostrou que algumas espécies de lactobacilos modulam diferentemente a expressão de citocinas e marcadores de ativação em células dendríticas (Christensen *et al.*, 2002). A translocação de bactérias comensais para o linfonodo mesentérico tem sido largamente demonstrada e parece ser um evento central para o desenvolvimento e ativação do sistema imune intestinal (Berg, 1999). A translocação de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 para os linfonodos mesentéricos de camundongos após 7 dias de monoassociação já foi demonstrada por Neumann (1998). Esses dados da literatura e a comprovada capacidade de translocação de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 para sítios de indução de respostas imunes fornecem suporte para explicar a maior produção de TNF- α observada em nosso estudo no tubo digestivo dos animais monoassociados (figura 15).

Wagner *et al.* (1994) reportaram que a citocina regulatória IL-10 pode ter um papel benéfico ou um papel prejudicial na listeriose. Alguns estudos têm demonstrado que bactérias probióticas são capazes de exercer efeitos antiinflamatórios em regiões distantes do local de administração, sugerindo o envolvimento e migração de células T regulatórias (Sheil *et al.*,

2004). Nossos resultados mostram que *L. delbrueckii* não interfere com a produção de IL-10 por células esplênicas (figura 16). A produção desta citocina ao longo do curso de infecção está de acordo com o descrito na literatura. Flesch e Kaufmann (1994) mostraram que a produção de IL-10 no baço é detectada no 1º dia de infecção por *L. monocytogenes*, tem um pico em torno do 4º dia e daí em diante declina. Esta produção de IL-10 no início da infecção se deve às células da resposta inata, em especial, os macrófagos. Suffia *et al.* (2006) reportaram que, em infecções por *Leishmania major*, as células T regulatórias (Treg) específicas para o parasito ficam restritas ao sítio de infecção e sua sobrevivência é dependente da persistência do parasito. Esta observação poderia explicar porque a estimulação das células esplênicas com *Listeria* morta pelo calor não levou ao aumento da produção de IL-10, como foi observado nas dosagens de IFN- γ .

Mostramos, ainda, nesse estudo que *L. delbrueckii* é capaz de estimular a produção de IL-10 na mucosa intestinal (figura 17). Estudos mostram que as células dendríticas da mucosa intestinal têm papel chave no processo de estimulação da mucosa (Suvas e Rouse, 2006). Essas células migram da corrente sanguínea para a mucosa intestinal atraídas por sinais quimiotáticos. As células dendríticas imaturas, após capturarem o antígeno, migram para o linfonodo mesentérico e placas de Peyer, onde fazem a apresentação antigênica. As principais células produtoras de IL-10 na mucosa são as células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺, que se encontram em maior quantidade na mucosa em comparação com outros tecidos, e os linfócitos T CD8⁺ intra-epiteliais (Schenk e Mueller, 2007). Esta característica exibida por *L. delbrueckii* de ser um bom indutor da produção de IL-10 no intestino poderia ser útil para o tratamento de doenças inflamatórias. Vários trabalhos mostram que a microbiota e a produção de IL-10 em conjunto são essenciais para a regulação das respostas imunes da mucosa intestinal e prevenção das colites (Kuhn *et al.*, 1993; Asseman *et al.*, 1999; Foligne *et al.*,

2007). Entretanto a também capacidade de indução de citocinas pró-inflamatórias por este candidato a probiótico poderia tornar esta possibilidade inviável.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados mostram que a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 protege animais isentos de germes contra a infecção por *L. monocytogenes* através da estimulação do sistema imune, induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios importantes para o controle da infecção. O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também é capaz de induzir a produção de IL-10, citocina importante para a regulação das respostas imunes. Os dados apresentados aqui sugerem fortemente que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 pode ser utilizado como probiótico. Entretanto ainda são necessários muitos estudos para o melhor entendimento dos mecanismos de ação utilizados por este microrganismo para conferir resistência a infecções. Identificar e avaliar os componentes de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 responsáveis pela sua capacidade de imunomodulação, além de estudar os mecanismos pelos quais estes componentes ativam o sistema imune, deverão ser os próximos passos para a continuação deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 403-412, 2003.

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. Exo. Med.*, v. 190, p. 995-1004, 1999.

BANCROFT, G. J.; SCHREIBER, D. R.; UNANUE, E. R. Natural Immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the SCID mouse. *Immun. Rev.*, v. 124, p. 5-11, 1991.

CAMPBELL, N.; YIO, X. Y.; SO, L. P., LI, Y.; MAYER, L. The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunology Reviews*, v. 172, p. 315-324, 1999.

CHRISTENSEN, H. R.; FROKIAER, H.; PESTKA, J. J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*, v. 168, p. 171-178, 2002.

[CORR, S. C.](#); [GAHAN, C. G.](#); [HILL, C.](#) Impact of selected Lactobacillus and Bifidobacterium species on Listeria monocytogenes infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007.

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

CROSS, M. L. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health. *Clin. and Appl. Immun.*, v. 3, p. 115-125, 2002.

DAI, W. J.; KÖHLER, G.; BROMBACHER, F. Both innate and acquired immunity to Listeria monocytogenes infection are increased in IL-10-deficient mice. *Journal of Immunology*, v. 158, p. 2259-2267, 1997.

DECKERT, M.; SOLTEK, S.; GEGINAT, G.; LÜTJEN, S.; MONTESINOS-RONGEN, M.; HOR, H.; SCHLÜTER, D. Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in Listeria monocytogenes infection. *Infection and Immunity*, v. 69, n.7, p. 4561-4571, 2001.

DE LA COCHETIERE, M. F.; DURAND, T.; LEPAGE, P.; BOURREILLE, A.; GALMICHE, J. P.; DORE, J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol.*, v. 43, n. 11, p. 5588-5592, 2005.

DE WAARD R, GARSSSEN J, BOKKEN GC, VOS JG. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 73, n. 1, p. 93-100, 2002.

DUNN, P. L.; NORTH, R. J. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 2892-2899, 1991.

FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FLESCH, I. E.; KAUFMANN, S. H. Role of macrophages and alpha beta T lymphocytes in early interleukin 10 production during *Listeria monocytogenes* infection. *Int. Immunol.*, v. 6, n. 3, p. 463-468, 1994.

FOLIGNE, B.; ZOUMPOPOULOU, G.; DEWULF, J.; YOUNES, A. B.; CHAREYRE, F.; SIRARD, J.; POT, B.; GRANGETTE, C. Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS ONE*, v. 2. n. 3, 2007.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; GOPAL, P. K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J. Nutr.*, v. 83, p. 167-176, 2000.

GILL, H. S.; SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFORD, K. J.; CROSS, M. L.; Protection against translocating *Salmonella tiphymurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain Hn001. *Med. Microbiol. Immunol*, v. 190, p. 97-104, 2001.

GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*, V. 97, P. 673-681, 2004.

HOFER, E.; REIS, C. M. F. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, n.2, p.79-83, 2005.

ISHIDA-FUJII, K.; SATO, R.; GOTO, S.; YAHG,X.; KUBOKI, H.; HIRANO, S.; SATO, M. Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 71, p. 1-8, 2007.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.*, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JOHNSON, W. J.; BALISH, E. Macrophage function in germ-free, athymic (nu/nu), and conventional-flora (nu/+) mice. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 28, n. 1, p. 55-66, 1980.

KAUFFMAN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. *Ann. Rev, Immunol.*, v. 11, p. 129, 1993.

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

LEENEN, P. J. M.; CANONO, B. P.; DREVETS, D. A.; VOERMAN, J. S. A.; CAMPBELL, P. A. TNF- α e IFN- γ stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide-independent manner. *The Journal of Immunology*, v. 153, p. 5141-5148, 1994.

LIN, W-H.; YU, B.; LIN, C-K.; HWANG, W-Z.; TSEN, H-Y. Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion to mice. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 22-31, 2007.

MACPHERSON, A. J.; GEUKING, M. B.; McCOY, K. D. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*, v. 115, p. 153-162, 2005.

MARCINKIEWICZ, J.; CISZEK, M.; BOBEK, M.; STRUS, M.; HECZKO, P. B.; KURNYTA, M.; BIÉDRON, R.; CHMIELARCZYK, A. Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Path.*, v. 88, p. 155-164, 2007.

Medical Microbiology, edited by Samuel Baron, 4. ed Galveston (TX): University of Texas Medical Branch. Section 1. Bacteriology, cap. 16, 1996.

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

MCGHEE, J.R.; LAMM, M.E.; STROBER, W. Mucosal immune responses: an overview. *Mucosal Immunology*, p. 485-506, 1999.

MITSUYAMA, M.; TAKEYA, K.; NOMOTO, K.; SHIMOTORI, S. Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, v.106, p.165-171, 1978.

NEUMANN, E. Efeitos da ingestão de *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 sobre os mecanismos de defesa imunológica contra enteropatógenos em camundongos gnotoxênicos e convencionais. Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 141 p. (Tese).

NEUTRA, M. R.; KRAEHENBUHL, J. P. The role of transepithelial transport by M cells in microbial invasion and host defense. [J Cell Sci Suppl.](#), v. 17, p. 209-215, 1993.

OWEN, R.L. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches – a personal and historical perspective. *Semin Immunol*, v. 11, p. 157-163, 1999.

PERDIGÓN, G.; DE MACIAS, M. E. N.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A. O. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, v. 63, p. 17-23, 1988.

PERDIGÓN, G.; MEDINA, M.; VINTIÑI, E.; VALDEZ, J. C. Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, v. 13, n. 3, p. 141-150, 2000.

PERDIGÓN, G.; GALDEANO, M.; VALDEZ, J. C.; MEDICI, M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur. Journal of Clin. Nutr.*, v. 56, s. 4, p. 21-26, 2002.

PERDUE, M.H. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol*, v. 277, p.1-5, 1999.

RACEDO, S.; VILLENA, J.; MEDINA, M.; AGÜERO, G.; RODRÍGUEZ, V.; ALVAREZ, S. *Lactobacillus casei* administration reduces lung injuries in a *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 2359-2366, 2006.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.*,v. 118, p. 229-241, 2004.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 3763-3766, 1999.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, v. 52, p. 988-997, 2003.

ROLFE R. D. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal health. *American Society for Nutritional Sciences - Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health*, p. 396-401, 2000.

ROTHE, J.; LESSLAUER, W.; LOTSCHER, H.; LANG, Y.; KOEBEL, P.; KONTGEN, F.; ALTHAGE, A.; ZINKERNAGEL, R.; STEINMETZ, M.; BLUETHMANN, H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, v. 364, p. 798-802, 1993.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉNS, R.; MATTO, J.; SANDHOLM-MATTILA, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SANTOSA, S.; FARNWORTH, E.; JONES, P. J. H. Probiotics and their potential health claims. *Nutrition Reviews*, v. 64, n. 6, p. 265-274, 2006.

SATO, K.; SAITO, H.; TOMIOKA, H. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: activation of liver macrophages and peritoneal macrophages by *Lactobacillus casei*. *Microbiol. Immunol.*, v. 32, n. 7, p. 689-698, 1988.

SCHENK, M.; MUELLER, C. Adaptations of intestinal macrophages to an antigen-rich environment. *Seminars in Immunology*, v. 19, p. 84-93, 2007.

- SCHIFFRIN, E. J.; BLUM, S. *Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa.* Eur. Jour. Clin. Nutr., v. 56, p. 60-64.
- SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 17, p. 741-754, 2003.
- SHEIL, B.; MCCARTHY, J. O.; MAHONY, L.; BENNETT, M. W.; RYAN, P. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut.*, v. 53, p.694–700, 2004.
- SHROFF, K. E.; CEBRA, J. J. *Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice.* Adv Exp Med Biol., v. 371, p. 441-446, 1995.
- SHU, Q.; RUTHERFORD, K. J.; FENWICK, S. G.; PRASAD, J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, v. 44, p. 213-222, 2000.
- SUFFIA, I. J.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; GOLDSZMID, R. S.; BELKAID, Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 3, p. 777-788, 2006.
- SUVAS, S.; ROUSE, B. T. Treg control of antimicrobial T cell responses. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 344-348, 2006.
- WAGNER, R. D.; MAROUSHEK, N. M.; BROWN, J. F.; CZUPRYNSKI, C. J. Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 2345-2353, 1994.

