

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Samir de Deus Elian Andrade

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DE
Bifidobacterium longum subsp. *infantis* CHCC2228
EM UM MODELO MURINO AGUDO DE
COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR
SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA (DSS)**

Belo Horizonte
2013

Samir de Deus Elian Andrade

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAGÁSTRICA DE
Bifidobacterium longum subsp. *infantis* CHCC2228
EM UM MODELO MURINO AGUDO DE
COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR
SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA (DSS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

Co-orientadores

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli - Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

Dra. Angélica Thomaz Vieira - Departamento de Genética, ICB, UFMG

**Belo Horizonte
2013**

043

Andrade, Samir de Deus Elian.

Efeitos da administração intragástrica de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 em um modelo murino agudo de colite ulcerativa induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS) [manuscrito] / Samir de Deus Elian Andrade. - 2013.

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

Orientador: Flaviano dos Santos Martins. Co-orientadores: Jacques Robert Nicoli, Angélica Thomaz Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Intestinos - Doenças inflamatórias - Teses. 2. Colite ulcerativa - Teses. 3. Probióticos - Teses. 4. *Bifidobacterium* - Teses. 5. Microbiologia - Teses. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Nicoli, Jacques Robert. III. Vieira, Angélica Thomaz. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU:576.8

*Ao meu avô João Alves de Deus Filho
(que foi acometido por colite ulcerativa)
e à minha avó Terezinha de Assis Alves
(ambos sempre presentes em minhas lembranças)*

Agradecimentos

Meus agradecimentos vão para:

O Prof. Dr. Flaviano Martins que, de colega de laboratório, passou a orientar minha iniciação científica durante seu pós-doutorado e foi, agora, meu orientador de mestrado.

O Prof. Dr. Jacques Nicoli, que me recebeu em seu laboratório desde o início da minha graduação em 2007. Foram seis anos de convívio com uma pessoa que julgo ser um exemplo pessoal e profissional.

A Profa. Dra. Angélica Vieira, por sua disponibilidade.

A Profa. Dra. Silvia Moura e ao Prof. Dr. Luciano Péret-Filho, por disporem de parte de seu tempo para poderem participar da banca examinadora da minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Jônatas Abrahão, por ter aceitado o encargo de relator e suplente na banca examinadora deste trabalho, e pela confiança em minha pessoa.

Aos colaboradores deste trabalho: profa. Dra. Rosa Arantes, Dra. Christiane Cartelle, Dra. Maria José Neves, Dra. Luciana Moreira, por nos fornecerem estrutura e essencial ajuda para o desenvolvimento, execução e análise dos experimentos que não tínhamos condições de desenvolver em nosso próprio laboratório.

A Chr. Hansen, na pessoa de Eric Johansen, PhD (*Associate Vice President, Science*), por fornecerem a bactéria utilizada neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG pelos ensinamentos.

A Éricka Souza, pelo companheirismo e amizade que se estreitaram nesses dois últimos anos. Obrigado por me escutar, me entender e compartilhar os momentos de alegria, tristeza, calma e tempestade das nossas pesquisas.

A Karine Rodrigues e ao Rafael Bastos que, mais do que colegas de laboratório, são amigos que me fizeram rever conceitos, e me ajudaram muito nesse momento de transição pessoal e profissional.

A Marliete Carvalho e a Vanessa Vieira, pelo apoio incondicional e a imensa capacidade de me fazer sorrir, quando a vontade era de chorar.

Os amigos do peito e longa data, Alice, Vinicius e Jéssica, que por mais difícil que fosse, compreenderam meus momentos de ausência quando tive que colocar minhas obrigações acadêmicas como prioridade. E Amanda, pela companhia e por me esperar para os almoços de sábado, mesmo quando eu saía tarde da UFMG.

Os amigos da graduação: Moara, Vanessa, Sarah, Marianna, Bruno e Fernando, com quem sei que posso sempre contar.

Os amigos do laboratório: Adriano Cloves, Ariane Martins, Bianca Seridan, Bárbara Porto, Camila, Bruna Nascimento, Fabiana Tiago (e Isaque), Igor Paiva, Karla Perez, Leonardo Acúrcio, Mário Abatemarco, Marcella, Quésia Damasceno, Rafaella Avelar, Sílvia Crispim, Silvia Pietra, Spencer Santos, Tássia Souza. Além desses que estão presentes mais próximos a mim, gostaria de agradecer a todos que já passaram por lá, seja como IC ou como pós-doutorando, e para não correr o risco de esquecer ninguém, vou representá-los todos no nome da Ilana Camargo, que me aceitou como seu IC e me ensinou muito com sua sabedoria e humildade – obrigado pelo seu carinho!

Os amigos do Departamento de Microbiologia: Maira Ribeiro, Anna Gabriela Guimarães, Patrícia Oliveira, Julliana Ribeiro, Rodrigo Holanda, Jacqueline, Jamil, Elisa Andrade, Renata Gomes, Luana Pirajá, Aline Júlio.

Os amigos de longe, que compartilham comigo os dramas da pós-graduação e que me deram força sempre que precisei: Márcia Neiva, Juvânie Lins, Priscila Azevedo, Luan Bezerra, Rodrigo Oliveira, Helder Freitas, Rodnei Rossoni e, especialmente, Anderson Arndt, que se disponibilizou a ler esse trabalho.

Os cidadãos brasileiros que com seus impostos nos fornecem, por meio das agências financiadoras (CAPES, FAPEMIG e CNPq), condições para realizarmos esse trabalho e ao CNPq pela bolsa.

A Clélia pelo carinho e pelo trabalho técnico no laboratório.

O meu irmão Samuel e o Henrique, pela companhia, pela força e por deixarem a casa sempre alegre!

Por último, e intencionalmente, quando na verdade deveriam ser os primeiros... Agradeço a meu pai Juarez e a minha mãe Eliana, obrigado por me apoiarem, sempre e incondicionalmente. Por me terem criado sob preceitos de decência e ética. Por festejarem meus momentos de alegria, e por compreenderem os momentos de desânimo e estarem sempre com um colo disponível, deixando de lado suas próprias preocupações para colocar as minhas em primeiro lugar.

Obrigado a todos vocês!.

“Não posso dar a nenhum cientista de qualquer idade melhor conselho do que este: a intensidade da convicção de que uma hipótese é verdadeira não tem nenhuma relação com se é ou não verdadeira”

(Peter Medawar, 1979, em seu livro *“Advice to a Young Scientist”*)

COLABORADORES E LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

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

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

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

- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

- Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

- Prof. Dra. Angélica Thomaz Vieira

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

- Profa. Dra. Rosa Maria Esteve Arantes

- Dra. Christiane Teixeira Cartelle

Laboratório de Radiobiologia, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/ Comissão Nacional de Energia Nuclear

- Dra. Maria José Neves

- Dra. Luciana Mara Costa Moreira

Apoio Financeiro:



RESUMO

Doenças inflamatórias intestinais (IBDs) são condições inflamatórias crônicas, marcadas por remissões e recidivas, de origem idiopática, mas que possuem mediação imunológica. A colite ulcerativa (UC), uma das principais formas de IBDs, tem como tratamento padrão o uso de anti-inflamatórios e corticosteróides. O uso de antibióticos também tem sido relatado, mas aqui devem ser considerados os efeitos colaterais associados. Nos últimos anos, a utilização de probióticos no tratamento de IBDs vem ganhando atenção na comunidade médica. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 no tratamento de UC em um modelo murino. Para a indução da colite em camundongos BALB/c fêmeas, a água foi suplementada com 3,5% de DSS (sulfato sódico de dextrana) a 3,5% por 7 dias. Durante este período os animais foram avaliados quanto à variação de peso, consistência fecal e presença de sangue nas fezes. No sétimo dia os animais foram eutanasiados para coleta dos órgãos para realização de análises histológica do fígado, do intestino delgado e do cólon. Foram, ainda, realizados: dosagem de imunoglobulina secretada (sIgA) no intestino delgado; avaliação da permeabilidade intestinal; avaliação indireta dos infiltrados de neutrófilos pela enzima mieloperoxidase (MPO), eosinófilos pela peroxidase eosinofílica (EPO) e macrófagos pela N-acetil-glicosaminidase (NAG); dosagem das citocinas KC e eotaxina-1; avaliação da permeabilidade e do estresse oxidativo no intestino. O tratamento com o probiótico melhorou o quadro clínico provocado pelo DSS nos animais. As análises histológicas e morfométricas mostraram que houve uma tendência à redução de áreas de lesão e edema nos animais, mas não houve aumento na produção de mucina. A dosagem de sIgA mostrou-se maior no grupo com colite e reduzido no grupo com colite e tratado com o probiótico. Houve, ainda, uma redução no quadro inflamatório do cólon, com redução das atividades enzimáticas de EPO e MPO, mas sem alteração na atividade de NAG. A permeabilidade intestinal, que está tipicamente aumentada durante o acometimento das IBD, mostrou-se reduzida após o tratamento com a bifidobactéria. Não foram observadas diferenças nas taxas de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Baseado nestes dados pode-se concluir que a bactéria *B. Longum* subsp. *infantis* CHCC2228 possui potencial probiótico no modelo estudado e é um bom candidato para o tratamento para o tratamento da colite ulcerativa.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal, Colite Ulcerativa, Probiótico, *Bifidobacterium*

ABSTRACT

IBDs are chronic inflammatory conditions, characterized by remissions and relapses, whose main manifestations are ulcerative colitis and Crohn's disease. Ulcerative colitis, one of the main forms of IBDS has as standard treatment the use of corticosteroids and anti-inflammatory drugs. The use of antibiotics has also been reported, but the possible adverse effects must be taken into consideration and thus the use of probiotics emerges as a real possibility. In this study, we evaluated the possibility of using *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 as treatment for ulcerative colitis in a murine model. For induction of colitis in female BALB/c mice, we replace the water by a 3.5% DSS (dextran sodium sulphate) solution for 7 days. During this period, the animals were evaluated for weight variation, fecal consistency and presence of bleeding in feces. On the seventh day, the animals were euthanized to collect the organs to the histological analysis of the liver, small intestine and colon. Other experiments were done, as: dosage of sIgA in the small intestine; evaluation of the intestinal permeability; indirect evaluation of the infiltration of eosinophils, neutrophils and macrophages by measuring their specific enzymes EPO (eosinophil peroxidase), MPO (myeloperoxidase) and NAG (N-acetyl-glucosaminidase); dosage of the cytokines KC and Eotaxin-1; evaluation of the permeability and oxidative stress in the intestine. Treatment with the probiotic resulted in clinical improvement of animals. The histological and morphometric analyzes showed a reduction of lesions and edema in the animals, but there was no increase in the production of mucin. The dosage of sIgA was significantly higher in the colitis group and reduced in the group treated with the probiotic. There was also a reduction in the inflammation of the colon, as indicated by the reduction of EPO and MPO activity, but no change in the activity of NAG. The intestinal permeability, which is typically increased during the onset of IBD, was reduced after treatment with bifidobacteria. There were no differences on rates of reactive oxygen species (ROS) generation. Based on these data it can be concluded that the bacterium *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 has probiotic potential for the treatment of ulcerative colitis, but further studies should be conducted in order to verify the mechanisms of action of the bacterium.

Key words: Inflammatory Bowel Disease, Ulcerative colitis, Probiotic, *Bifidobacterium*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

BAL – Bactérias do ácido láctico

CD (*Crohn's disease*) – Doença de Crohn

COX-2 – Cicloxigenase 2

NSAIDS (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) – Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais

DSS (*dextran sodium sulphate*) – Sulfato Sódico de Dextrana

EPO – Peroxidase eosinofílica

ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) – Cinase regulada por sinais extracelulares

F6PPK – Frutose-6-fosfato fosfoacetolase

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

IBD (*inflammatory bowel disease*) – Doença inflamatória intestinal

ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular 1

IFN – Interferon

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) – Cinase de amino-terminal de c-Jun

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos

MPO – Mieloperoxidase

NAG – N-acetil glicosaminidase

NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) – Fator nuclear kappa B

NK – Células T *natural killer*

PAMPS (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

sIgA – Imunoglobulina A secretora

SNP (*single-nucleotide polymorphism*) – Polimorfismo de nucleotídeo único

TLR (*toll-like receptor*) – Receptor semelhante ao *toll*

TNBS – Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

TNF (*tumor necrosis factor*) – Fator de necrose tumoral

UC (*ulcerative colitis*) – Colite ulcerativa

WHO (*World Health Organization*) – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

| | p. |
|--|-----------|
| Figura 1. As camadas de muco protegem o epitélio do cólon | 18 |
| Figura 2. Formação da mucina MUC2 no retículo endoplasmático, no aparato de Golgi e a forma secretada pelas células caliciformes | 19 |
| Figura 3. Interação entre vários fatores contribuem para a inflamação intestinal crônica em um hospedeiro susceptível | 20 |
| Figura 4. A microbiota e fatores genéticos e ambientais do hospedeiro contribuem para a patogênese das IBDs | 26 |
| Figura 5. Receptores TLR ligam-se, seletivamente, a vários componentes microbianos | 28 |
| Figura 6. Os principais efeitos da sinalização das MAPK no complexo de resposta imune do trato gastrointestinal de pacientes com IBD | 30 |
| Figura 7. Possíveis respostas a uma injúria intestinal transiente em um hospedeiro geneticamente susceptível ou geneticamente resistente | 32 |
| Figura 8. Patofisiologia da colite ulcerativa | 34 |
| Figura 9. AGCCs, produzidos pela microbiota intestinal como um bioproduto da fermentação de carboidratos complexos (fibras) da dieta, possuem diversos efeitos benéficos | 42 |
| Figura 10. Delineamento experimental com identificação dos grupos e seus respectivos tratamentos utilizados | 49 |
| Figura 11. Esquema do tratamento dos animais com salina ou probiótico e a posterior indução de colite pela solução de DSS a 3,5% | 50 |
| Figura 12 – Desenvolvimento ponderal | 60 |
| Figura 13 – Índice da atividade diária da doença (D.A.I.) | 61 |
| Figura 14 – Alterações macroscópicas do cólon: (A) avaliação do comprimento total (cm) e (B) relação entre o peso e o comprimento total do órgão (mg/cm) | 62 |
| Figura 15 – Fotomicrografias de fígado de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D) | 63 |
| Figura 16 – Fotomicrografias de cólon de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D) | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 17 – Fotomicrografias com detalhes do cólon de camundongos BALB/c tratados com a bifidobactéria (A) e com colite induzida por DSS (B) | 65 |
| Figura 18 – Fotomicrografias com detalhes do cólon de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D) | 66 |
| Figura 19 – Morfometria do cólon, em termos de percentual do perímetro do colón (A) com lesão, (B) com edema, (C) com presença de placas de Peyer e (D) com ausência de mucinas | 67 |
| Figura 20 – Avaliação da permeabilidade intestinal | 69 |
| Figura 21 – Avaliação da produção de imunoglobulina A secretada (sIgA) | 69 |
| Figura 22 – Avaliação qualitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no cólon, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG | 70 |
| Figura 23 – Quantificação de citocinas recrutadoras de (A) eosinófilos (Eotaxina/CCL-11) e (B) neutrófilos (KC/CXCL-1) no cólon | 71 |
| Figura 24 – Avaliação qualitativa da presença de ROS do soro | 72 |
| Figura 25 – Desenvolvimento ponderal com acompanhamento posterior ao período de indução da colite | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| | p. |
| Tabela 1. Alterações na microbiota intestinal em humanos com IBD e camundongos com colite induzida por DSS | 25 |
| Tabela 2. Citocinas associadas às doenças inflamatórias intestinais | 27 |

SUMÁRIO

| | p. |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 A manutenção do equilíbrio microbiota-sistema imune no intestino saudável | 17 |
| 1.2 Doenças inflamatórias intestinais | 19 |
| 1.2.1 Colite ulcerativa | 21 |
| 1.2.1.1 Microbiota intestinal indígena e seu papel na colite ulcerativa | 23 |
| 1.2.1.2 Aspectos imunológicos da colite ulcerativa | 26 |
| 1.2.1.3 Aspectos genéticos relacionados à colite ulcerativa | 30 |
| 1.2.1.4 Aspectos ambientais relacionados à colite ulcerativa | 31 |
| 1.2.1.5 Fisiopatologia da colite ulcerativa | 32 |
| 1.2.1.6 Opções para o tratamento da colite ulcerativa | 34 |
| 1.3 Probióticos: nova possibilidade de tratamento para a colite ulcerativa | 35 |
| 1.3.1 Origens, definições e utilização de probióticos | 35 |
| 1.3.2 Probióticos no tratamento da colite ulcerativa | 37 |
| 1.3.3 O gênero <i>Bifidobacterium</i> | 38 |
| 1.4 O modelo de colite ulcerativa induzida por DSS | 44 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 45 |
| 3. OBJETIVOS | 47 |
| 3.1 Objetivo geral | 47 |
| 3.2 Objetivos específicos | 47 |
| 4. METODOLOGIA | 48 |
| 4.1 Animais | 48 |
| 4.2 Micro-organismo | 48 |
| 4.3 Desenho experimental | 49 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.4 | Tratamento dos animais com solução salina ou <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> CHCC2228 | 50 |
| 4.5 | Indução química por DSS de colite aguda em camundongos | 51 |
| 4.6 | Avaliação clínica dos animais | 51 |
| 4.6.1 | Desenvolvimento ponderal e índice diário de atividade da doença (D.A.I.) | 51 |
| 4.6.2 | Avaliação da relação entre o peso e o comprimento do cólon | 52 |
| 4.7 | Análises histológicas do fígado, intestino delgado e cólon | 52 |
| 4.7.1 | Coloração HE | 53 |
| 4.7.2 | Técnica combinada de PAS/Alcian Blue | 53 |
| 4.7.3 | Análise das lâminas e fotodocumentação | 53 |
| 4.7.4 | Análises morfométricas do cólon | 54 |
| 4.8 | Medida da permeabilidade intestinal | 54 |
| 4.9 | Dosagem de imunoglobulina A secretada (sIgA) | 55 |
| 4.10 | Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG). | 56 |
| 4.10.1 | Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) | 56 |
| 4.10.2 | Atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) | 57 |
| 4.10.3 | Atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) | 57 |
| 4.11 | Dosagem de citocinas | 58 |
| 4.12 | Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no soro | 59 |
| 4.13 | Análises estatísticas | 59 |
| 5. | RESULTADOS | 60 |
| 5.1 | Avaliação clínica dos animais | 61 |
| 5.2 | Análises histopatológicas do fígado, intestino delgado e cólon | 62 |
| 5.2.1 | Fígado e intestino delgado | 63 |
| 5.2.2 | Cólon | 63 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 5.3 | Análises morfológicas do cólon | 67 |
| 5.4 | Avaliação da permeabilidade | 68 |
| 5.5 | Produção de IgA | 69 |
| 5.6 | Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG). | 70 |
| 5.7 | Dosagem de citocinas | 71 |
| 5.8 | Avaliação da geração de ROS no soro | 71 |
| 5.9 | Resumo dos resultados | 72 |
| 6. | DISCUSSÃO | 74 |
| 7 | CONCLUSÃO | 85 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 86 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |
| | ANEXO A – CERTIFICADO (CETEA) | 98 |
| | ANEXO B – ATIVIDADES CURSADAS DURANTE O MESTRADO | 99 |
| | ANEXO C – PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM PROJETOS E EVENTOS | 100 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 A manutenção do equilíbrio microbiota-sistema imune no intestino saudável

Os intestinos dos seres humanos possuem uma grande superfície, aproximadamente 100 m², devido às milhares de vilosidades e microvilosidades do intestino delgado (Maloy & Powrie 2011). Essa grande área, porém, é delimitada por uma camada única de enterócitos com cerca de 30 µm de espessura (MacDonald 2003). Essas células estão interconectadas umas às outras por meio de desmossomos e proteínas que compõem as zonas de oclusão e de adesão, formando uma barreira física que processa e absorve nutrientes provenientes da dieta (MacDonald 2003; Maloy & Powrie 2011). Mas essas células possuem outras funções importantes para a manutenção da homeostase, como a secreção de compostos que influenciam a colonização pela microbiota e a modulação da resposta imune (Maloy & Powrie 2011). Em um indivíduo saudável, a integridade dessa camada de células é mantida apesar da superfície ser eliminada e substituída a cada dois ou três dias (MacDonald 2003).

Desta forma, pode-se afirmar que a mucosa do sistema digestório possui uma área significativa de exposição a uma grande variedade de antígenos exógenos – principalmente bacterianos. Essa superfície está em contato com uma população grande e heterogênea de micro-organismos, a maioria dos quais se encontram nos intestinos delgado e grosso – locais onde as doenças inflamatórias intestinais ocorrem principalmente. Os intestinos são confrontados, portanto, com uma grande quantidade de estímulos antigênicos que devem ser diferenciados dos estímulos patogênicos. Conseqüentemente, o sistema imune de mucosa desenvolveu uma grande variedade de estruturas e mecanismos para responder a esses desafios – uma vez que, uma resposta que seja caracterizada por supressão ativa e pela capacidade de ignorar certos antígenos parece ser apropriada para o intestino, a fim de evitar uma resposta inflamatória não específica (Blumberg 2009).

O modo como essa regulação é realizada não é completamente compreendida, mas a presença de uma camada interna de muco firmemente aderida à mucosa e outra camada, mais externa, frouxa e com menor poder de adesão esclarece alguns pontos da manutenção da relação mutualística entre a microbiota e o hospedeiro (Figura 1).



Figura 1. As camadas de muco protegem o epitélio do cólon. A camada interna, firmemente aderida, é renovada constantemente pelas células caliciformes e, assim, transformada na camada mais externa e frouxa, como pode ser observada pela linha tracejada. As distâncias mostradas são para intestino de camundongos (Hansson & Johansson 2010 – modificado).

Essas camadas de muco são constituídas pela mucina MUC2, uma proteína altamente glicosilada, produzida e secretada pelas células caliciformes do intestino. A MUC2 humana é uma molécula de 5.200 aminoácidos. No retículo endoplasmático, duas moléculas de MUC2 unem-se por meio de pontes dissulfeto na região C-terminal. Após sofrerem a O-glicosilação e serem translocadas para o aparato de Golgi, os dímeros, que possuem massa de 5 MDa, associam-se em trímeros pelas regiões N-terminais, gerando, assim, grandes complexos em forma de rede (Figura 2). Após ser secretada, a rede de MUC2 é hidratada e expande seu volume, formando, junto a outras proteínas, a camada interna de muco. A camada interna é densa, firmemente aderida ao epitélio e é resistente a agentes caotrópicos. Em camundongos, a 50 μm da camada do epitélio intestinal, a camada interna de muco expande-se em até quatro vezes devido a clivagens proteolíticas. Dessa forma, as bactérias da microbiota normal residem apenas na camada externa do muco, sendo a camada interna impermeável a elas –

ou seja, atua como uma barreira protetora da camada de células epiteliais (Johansson et al. 2010).

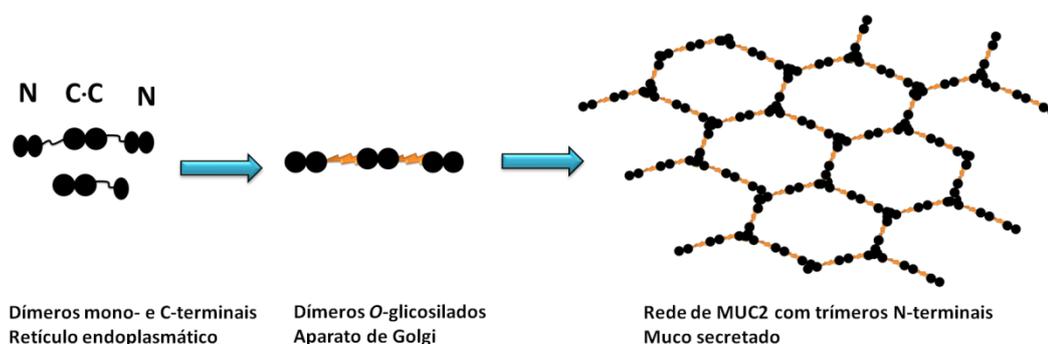


Figura 2. Formação da mucina MUC2 no retículo endoplasmático, no aparato de Golgi e a forma secretada pelas células caliciformes (Hansson & Johansson 2010 – modificado).

1.2 Doenças inflamatórias intestinais

Doenças inflamatórias intestinais (*inflammatory bowel diseases*, IBDs) são condições inflamatórias crônicas, marcadas por remissões e recidivas, cujas origens ainda permanecem incertas (idiopática), mas que possuem mediação imunológica (Blumberg 2009; Sartor 2006). A colite ulcerativa (*ulcerative colitis*, UC) e a doença de Crohn (*Crohn's disease*, CD) são as duas principais formas de IBDs e, embora existam muitas similaridades entre as duas doenças, a UC e a CD diferem em aspectos importantes de caráter clínico e genético (Blumberg 2009; Sartor 2006; Wirtz et al. 2007).

Pacientes com IBD sofrem de cólicas abdominais, diarreia, sangramento retal e perda de peso. Enquanto na UC a inflamação é restrita ao cólon (inflamação contínua), na CD pode ocorrer em qualquer porção do trato intestinal da boca ao reto (inflamação descontínua). Outras diferenças entre UC e CD podem ser observadas no nível histológico. Enquanto CD é caracterizada por uma inflamação transmural e às vezes granulomatosa, a UC afeta somente as camadas mucosa e submucosa. Por outro lado, algumas características histopatológicas são similares nas duas doenças como edema, depleção de células caliciformes, alterações na arquitetura das criptas e ulcerações. Complicações das IBDs incluem formação de fístula, desenvolvimento de abscesso, estenose e câncer. Além disso, muitos pacientes com IBD são

encaminhados para cirurgia devido a complicações da doença (Danese & Fiocchi 2011; Neurath 2012).

O início das IBDs ocorre, tipicamente, entre a segunda e a terceira décadas de vida e grande parte dos indivíduos acometidos pela doença desenvolve um quadro crônico e apresentam recidivas (Xavier & Podolsky 2007). Entretanto, mais de 25% dos pacientes com IBDs são diagnosticados antes dos 18 anos de idade, sendo cerca de 5% antes dos 5 anos de idade (Fell 2011). Essas doenças estão relacionadas, em grande frequência, a distúrbios nutricionais graves como desnutrição protéico-calórica e deficiência de vitaminas e de elementos traços (Oliveira et al. 2010).

Ainda que permaneçam lacunas acerca da etiologia dessas doenças, diversos estudos em modelos animais sugerem a combinação de fatores relacionados à predisposição genética, associados a disfunções imunológicas, com influência do meio ambiente e da microbiota do hospedeiro na contribuição para a cronificação das doenças (Figura 3) (Wirtz et al. 2007).

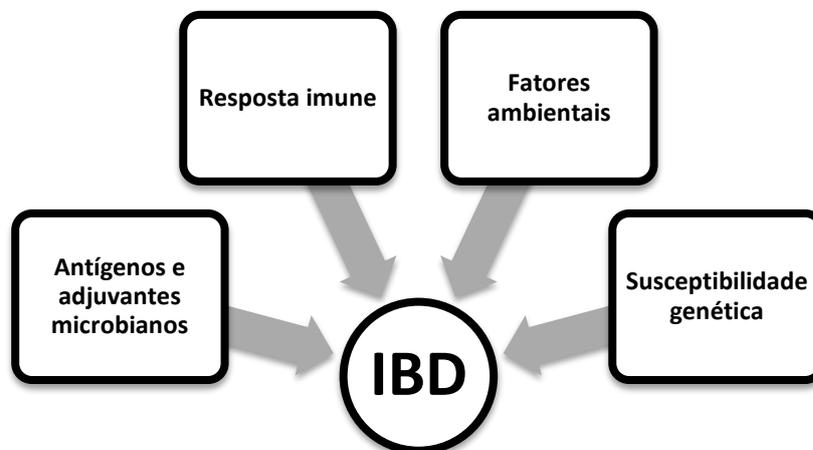


Figura 3. Interação entre vários fatores contribui para a inflamação intestinal crônica em um hospedeiro susceptível. A susceptibilidade genética é influenciada pela microbiota, que possui antígenos e adjuvantes que estimulam respostas imunes. Aspectos ambientais são necessários para iniciar ou reativar a expressão da doença (Sartor 2006 - modificado).

Os mecanismos envolvidos na patogênese inicial da UC e da CD ainda não estão desvendados, embora existam algumas propostas de mecanismos como: a) infecções específicas persistentes; b) disbiose intestinal; c) redução da função de barreira da mucosa

intestinal; d) redução da eficiência do *clearence* microbiano; e) imunorregulação aberrante (Sartor 2006).

A prevalência das IBDs aumentou rapidamente na Europa e América do Norte na segunda metade do século XX e tem se tornado mais presente no restante do planeta, à medida que diferentes países adotam uma dieta ocidental (Loftus 2004). Observa-se uma forte influência ambiental nas IBDs, confirmada pela taxa relativamente baixa de concordância entre gêmeos – de aproximadamente 50% nos casos de CD e de 10% em UC (Halfvarson et al. 2003). Essas taxas, porém, não são suficientemente baixas para que se exclua o fator genético como um dos determinantes das IBDs (Sartor 2006). A agregação familiar das doenças inflamatórias intestinais já é conhecida, uma vez que parentes de primeiro grau de indivíduos afetados possuem um risco relativo de cinco vezes ou mais de desenvolverem a doença. Esse componente herdável, porém, parece ser mais intenso para o desenvolvimento da DC do que da UC (Xavier & Podolsky 2007).

Dessa forma, pode-se dizer que as IBDs, apesar de terem sua etiologia precisa indefinida, derivam de uma resposta desregulada do sistema imune de mucosa contra componentes antigênicos da microbiota intestinal indígena em um indivíduo geneticamente susceptível (Ordás et al. 2012).

1.2.1 Colite ulcerativa

A UC foi descrita pela primeira vez por Sir. Samuel Wilks, em 1984, no artigo intitulado “*Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes*”. Hoje é considerada a mais comum das IBDs, tendo incidência de 1,2-20,3 casos por 100.000 indivíduos por ano, e prevalência de 7,6-246,0 casos por 100.000 indivíduos por ano (Danese & Fiocchi 2011). A UC possui um padrão bimodal de incidência, cujo pico principal localiza-se entre as idades de 15 e 30 anos, e um segundo pico, menor, entre os 50 e 70 anos. Os estudos não demonstram taxas diferentes entre os sexos, mas indicam diferenças entre etnias (Ordás et al. 2012).

A incidência de UC é maior em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento. Isso pode, em parte, ser explicado pelo maior acesso a cuidados médicos e, portanto, maior notificação dos casos da doença. Além disso, a maior sanitização dos países desenvolvidos pode reduzir a exposição de crianças às enterobactérias, o que pode alterar a

maturação do sistema imune de mucosa, resultando, assim, em uma resposta imune inapropriada em caso de exposição a micro-organismos infecciosos em uma fase tardia da vida - o que é chamado de hipótese da higiene (Ordás et al 2012).

Essa doença é caracterizada por uma inflamação difusa da mucosa, que se estende proximalmente a partir do reto e possui extensão e gravidade variáveis. Em conjunto com essa grave inflamação e produção de uma complexa variedade de mediadores inflamatórios, uma ulceração superficial da mucosa intestinal se desenvolve. Observa-se a presença de abscessos nas criptas intestinais e infiltrado de neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos na lâmina própria. O paciente acometido pela doença apresenta períodos de recidivas sintomáticas e remissões, apresentando como principal sinal clínico a diarreia sanguinolenta com ou sem a presença de muco. Pode-se, ainda, citar outros sinais como: tenesmo, náusea, vômito e dor abdominal hipogástrica. Em crianças, pode-se verificar atraso no crescimento e na aparição dos sintomas da puberdade. Dentre as complicações que podem surgir na fase aguda estão sangramento grave e megacólon tóxico, enquanto na fase crônica podem ocorrer displasia ou câncer epitelial. Além dos sintomas localizados, há relatos de manifestações extraintestinais, que podem ocorrer em 10-30% dos pacientes com UC. Podem envolver vários órgãos e sistemas, sendo os mais frequentes os mucocutâneos, oculares, articulares, ósseos e hepáticos. Já há relatos de envolvimento em eventos tromboembólicos, hematológicos e em manifestações neurológicas, cardíacas, tireóideas e nefrourológicas. Além disso, estas manifestações podem ocorrer anteriormente ou concomitantemente às manifestações intestinais (Danese & Fiocchi 2011; Fell 2011; Oliveira et al. 2010; Xavier & Podolsky 2007).

Em alguns casos, os pacientes podem apresentar, ainda, impactos psicológicos e fisiológicos como letargia, depressão, medo por causa da diarreia e, conseqüentemente, isolamento social e redução da atividade sexual (Oliveira et al. 2010). Apesar de muito dos sintomas e características da UC serem conhecidos, os mecanismos patológicos dessa doença ainda não estão totalmente esclarecidos (Johansson et al. 2010).

O diagnóstico da UC baseia-se nos sintomas clínicos e é confirmado por observações objetivas obtidas por endoscopia e análises histológicas. Causas infecciosas ou não infecciosas de diarreia devem ser descartadas antes do diagnóstico final. A inflamação geralmente é iniciada no reto e se estende proximalmente, em padrão ininterrupto, envolvendo parte ou todo o cólon. Apesar das graves manifestações da doença, os pacientes com UC não têm risco de mortalidade aumentado quando comparados à população em geral (Ordás et al 2012).

O Brasil ainda é considerado uma área de baixa prevalência de IBDs. Mas, apesar de haver um aumento significativo do registro dessas doenças na literatura nacional, elas não possuem notificação compulsória, o que, em muitos casos, pode implicar na ausência de diagnóstico dos quadros de IBDs (Souza et al. 2008). Além disso, os prontuários não são adequados e o registro é feito apenas pelas redes públicas hospitalares e conveniadas – e, majoritariamente, os portadores de doenças crônicas procuram a rede privada para o acompanhamento da enfermidade – o que também pode contribuir para a subnotificação dos quadros de IBDs (Oliveira et al. 2010).

Oliveira et al. (2010) publicaram um estudo epidemiológico que avaliou, entre os anos 1998 e 2005, casos de IBDs na macrorregião de saúde leste do estado de Minas Gerais. De acordo com os autores, os dados correspondem à situação de grande parte das demais macrorregiões. Os dados apresentados indicam que as IBDs representaram 0,6% das internações por doenças do aparelho digestivo, não se observando predominância de acordo com o gênero do paciente. Além disso, 70% dos casos estão concentrados na faixa etária entre 20 e 69 anos. Outro aspecto observado foi o tempo médio de internação hospitalar, aproximadamente 6,5 dias, o que caracteriza o alto grau de morbidade da doença, além de gerar alterações biopsicossociais no paciente e familiares, bem como gastos elevados com o sistema de saúde (Oliveira et al. 2010).

1.2.1.1 Microbiota intestinal indígena e seu papel na colite ulcerativa

A comunidade bacteriana (microbiota) dos intestinos humanos contém, predominantemente, representantes de 4 filos: Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes – sendo os dois últimos os filos dominantes numericamente. A microbiota intestinal é auto-regulada e isso permite que seja mantida uma estabilidade ao longo do tempo - essa estabilidade acontece principalmente nas proporções dos grupos filogenéticos e sob condições nas quais os indivíduos estão saudáveis (Tannock 2010).

A microbiota intestinal é, além disso, capaz de modular o sistema imune, atuando como adjuvante (ativando resposta imune inata, como células dendríticas e células apresentadoras de antígenos) ou como antígenos (estimulando a expansão clonal de células T). Os adjuvantes microbianos (lipopolissacarídeo, peptidoglicano, flagelina e DNA não-

metilado) ligam-se a receptores de células do sistema imune, mesenquimais, ou do epitélio intestinal e, assim, ativam vias de sinalização envolvidas na transcrição de genes regulatórios ou pró-inflamatórios (Sartor 2006).

Esse fato, associado a observações dos benefícios do tratamento com antibióticos em pacientes com IBDs e do uso de preparações probióticas como uma forma de melhorar o quadro clínico das IBDs, sugerem que o balanço entre a microbiota entérica e as respostas de defesa do hospedeiro na mucosa intestinal possui um papel essencial na iniciação e patogênese das doenças inflamatórias intestinais (Xavier & Podolsky 2007).

Com base em diferentes estudos, Tannock (2010) sugere três possíveis mecanismos que explicariam o envolvimento da microbiota na colite ulcerativa:

1. A microbiota como um todo atuaria como um patógeno substituto: observa-se que o perfil microbiano nas biopsias não é diferente entre as mucosas inflamada ou não inflamada (Bibiloni 2006; Vasquez et al. 2007). Assim, a predisposição genética de pacientes com permeabilidade anormal na mucosa intestinal permitiria a entrada de antígenos da microbiota comensal nos tecidos sub-epiteliais. Conseqüentemente, células do sistema imune seriam ativadas como se houvesse ocorrido uma infecção por um patógeno invasivo, resultando em um quadro de inflamação crônica (MacDonald et al. 2011).

2. Membros específicos da microbiota atuam como patógenos e desencadeiam a inflamação: alguns grupos bacterianos podem aumentar em casos de IBD. Em pacientes com DC, por exemplo, costuma-se encontrar níveis alterados de enterobactérias (Sokol et al. 2008), que podem ser, inclusive, *Escherichia coli* fenotipicamente diferentes das comensais (Chassaing & Darfeuille–Michaud 2011; Tannock 2010).

3. Alterações nas proporções dos grupos filogenéticos que compõem a microbiota poderiam iniciar a resposta inflamatória: a redução no número de filotipos (biodiversidade) foi relatada tanto em pacientes com UC quanto em pacientes com CD, o que sugere que alterações na composição da microbiota ocorrem devido às alterações provocadas pelo estado inflamado do intestino (Tannock 2010).

A participação da microbiota é tão significativa que animais geneticamente susceptíveis a desenvolverem quadros de IBD, quando em condições axênicas – ou seja, isentos de qualquer tipo de microbiota – não desenvolvem a doença; ao passo em que, quando a microbiota é reestabelecida, o quadro clínico aparece (Kaser et al. 2010).

Além disso, a própria inflamação, seja ela induzida por um patógeno (p.ex., o modelo de indução por *Citrobacter rodentium*), quimicamente (DSS) ou geneticamente (deleção de *il10*) leva a alterações significativas da estrutura da comunidade microbiana do cólon, como pode ser visto na tabela 1 (Kaser et al. 2010).

Tabela 1. Alterações na microbiota intestinal em humanos com IBD e camundongos com colite induzida por DSS

| Doença | Diminuição da abundância | Aumento da abundância | Total de bactérias | Origem da amostra |
|--------------------------------|---|--|---|------------------------------------|
| IBD | Bacteroidetes, incluindo <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> Classe Clostridia dos Firmicutes, como <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e espécies produtoras de butirato. Redução da diversidade | Proteobacteria, incluindo <i>Enterobacteriaceae</i> (aumento relativo, não absoluto) Classe Bacilli dos Firmicutes Aumento de bactérias aderentes de mucosa (particularmente em locais adjacentes e não inflamados). | Reduzida em estudos recentes de rRNA 16S Aumentada em estudos com DGGE ou FISH | Amostras de intestino |
| Colite induzida por DSS | Bacteroidetes (duas vezes) | Firmicutes (duas vezes, incluindo as famílias <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i>) | Reduzida (0,7 vezes) | Tecido do cólon e conteúdo luminal |

DGGE: (*denaturing gradient gel electrophoresis*) eletroforese em gel de gradiente denaturante; DSS: sulfato sódico de dextrana; FISH: (*fluorescence in situ hybridization*) hibridização *in situ* por fluorescência. (Kaser et al. 2010 - modificado)

Em indivíduos saudáveis, bactérias comensais e anti-inflamatórias interagem com a mucosa gastrointestinal para a manutenção da homeostase. Esse processo envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) derivados dos micro-organismos da microbiota pela mucosa intestinal e uma resposta fisiológica do hospedeiro, com a produção de IgA e IgG, bem como de α - e β -defensinas. A comunidade microbiana previne os efeitos pró-inflamatórios de bactérias (potencialmente) patogênicas que estão ali presentes e medeia a tolerância. Em pacientes com IBD, a interação anormal entre as células do hospedeiro e os micro-organismos perturba a homeostase, desencadeando a inflamação intestinal. A inflamação é decorrente de fatores genéticos do hospedeiro que afetam a função de barreira da mucosa, a imunidade inata e adaptativa e altera qualitativa e/ou quantitativamente a composição da microbiota

intestinal – com redução de membros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes em pacientes com IBDs (Figura 4) (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011).

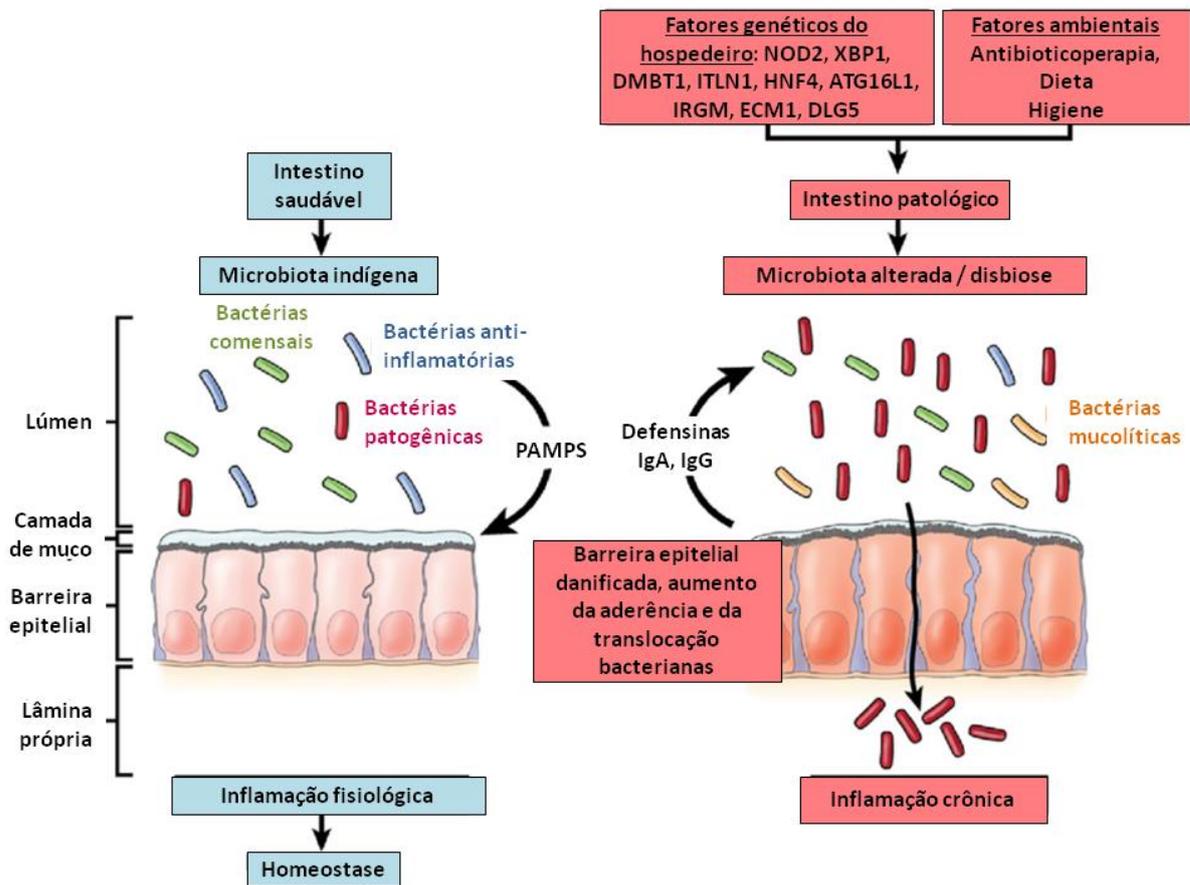


Figura 4. A microbiota e fatores genéticos e ambientais do hospedeiro contribuem para a patogênese das IBDs. Detalhes no texto (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011 - modificado).

1.2.1.2 Aspectos imunológicos da colite ulcerativa

Tanto na UC como na CD são observadas a ativação das respostas imunes inata (com envolvimento de macrófagos e neutrófilos) e adquirida (linfócitos B e T) e a perda de tolerância às bactérias comensais do intestino (Duchmann et al. 1995; Mow et al. 2004). A tolerância imunológica é regulada por linfócitos B e T, células *natural killer* (NK) e células dendríticas que secretam interleucina(IL)-10, interferon(IFN)- α/β e prostaglandina (Sartor 2006).

Macrófagos e células dendríticas apresentando fenótipos ativados são encontrados em elevados números na lâmina própria do intestino. É, ainda, detectado o aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (tabela 2) e na expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão (Sartor 2006).

Tabela 2. Citocinas associadas às doenças inflamatórias intestinais

| Citocina | Doença de Crohn | Colite Ulcerativa |
|------------------------------|-----------------|-------------------|
| Resposta imune inata | | |
| IL-1 β | ↑ | ↑ |
| TNF | ↑↑ | ↑ |
| IL-6 | ↑ | ↑ |
| IL-8 * | ↑ | ↑ |
| IL-12 | ↑ | N |
| IL-18 | ↑ | ↑ |
| IL-23 | ↑ | N |
| IL-27 | ↑ | N |
| Resposta de células T | | |
| IFN- γ | ↑ | N |
| IL-5 | N | ↑ |
| IL-13 | N | ↑ |
| IL-17 | ↑ | N |
| IL-21 | ↑ | N |

*Representante das quimiocinas. Abreviações: ↑, indica aumento; IL, interleucina; N, normal. (Sartor 2006)

Moléculas pró-inflamatórias são secretadas principalmente por monócitos e células polimorfonucleares que migram para o foco inflamatório. Isso ocorre uma vez que os macrófagos residentes possuem menor capacidade para responder aos adjuvantes microbianos, pois não expressam receptores, como os TLRs (*toll-like receptors*) (Smythies et al. 2005). As células do epitélio intestinal também possuem uma baixa densidade de TLRs, o que permite a convivência dessas células com a grande concentração de bactérias no lúmen intestinal (Iwasaki & Medzhitov 2004).

Apesar de cada tipo de TLR ligar-se a um adjuvante específico, esses sinais convergem para uma via única que levará à ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos

(*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) e do fator nuclear kappa B (*nuclear factor- κ B*, NF- κ B) (Figura 5) (Sartor 2006).

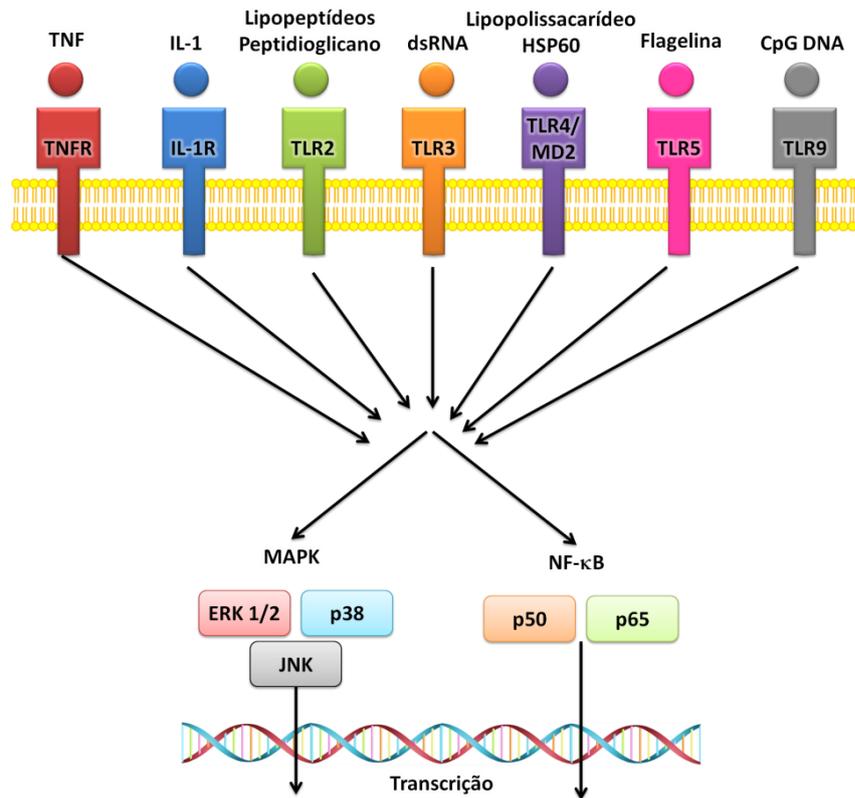


Figura 5. Receptores TLR ligam-se, seletivamente, a vários componentes microbianos. Essa ligação ativa vias conservadas de sinalização que, por sua vez, ativam MAPKs e NF- κ B. Esses fatores de transcrição estimulam a expressão de diversos genes pró- ou anti-inflamatórios (Sartor 2006 - modificado).

O NF- κ B é um fator de transcrição considerado um mediador intracelular crítico da resposta inflamatória. É constituído pelas proteínas p65/RelA, c-Rel, RelB, p50 e p52 que se combinam de diferentes formas a fim de formarem o dímero transcricionalmente ativo, induzindo, assim, a ativação de vários genes envolvidos nas respostas inflamatória e imune – muitos dos quais envolvidos na patogênese das IBDs. Dentre estes, os da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), cicloxigenase-2 (COX-2), citocinas: IL-1 β , fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) e IL-6, e quimiocinas (IL-8) (Sartor 2006; Ye 2001).

As MAPKs são membros da família de cinases intracelulares específicas de serina/treonina e são importantes na conversão de estímulos extracelulares em uma grande variedade de processos celulares como crescimento, proliferação, diferenciação, migração, inflamação e sobrevivência (figura 6) (Cuadrado & Nebreda 2010; Kyriakis & Avruch 2001; Rincón & Davis 2009; Roy et al. 2008; Weston & Davis 2007). Em mamíferos, a família das MAPKs é constituída de três grupos principais: cinases reguladas por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK) (ERK1/2 ou p42/p44), cinases de amino-terminal de c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK) (JNK 1/2/3) e a família das MAPKs p38, composta por quatro isoformas (α , β , γ e δ) (Chen et al. 2001). As cascatas de MAPKs são ativadas por diversos estímulos, nos quais se incluem fatores de crescimento, citocinas e hormônios. Consistentemente com seu papel em vários processos celulares, as vias de sinalização que envolvem as MAPKs estão envolvidas em diversas doenças humanas (Cuenda & Rousseau 2007; Johnson & Nakamura 2007; Kim & Choi 2010).

A UC tem sido considerada uma doença mediada por citocinas do tipo Th2 caracterizada por um aumento na produção de IL-5 e IL-13 e níveis normais de IFN- γ , como pode ser visto na tabela 2. A resposta do tipo Th1 é excluída uma vez que o aumento de IFN- γ , característica desse tipo de resposta, não é observado na UC. É importante ressaltar que a produção da citocina típica das respostas Th2, a IL-4, não se apresenta aumentada, o que leva a classificar a UC como uma doença de Th2 atípica (Strober & Fuss 2011).

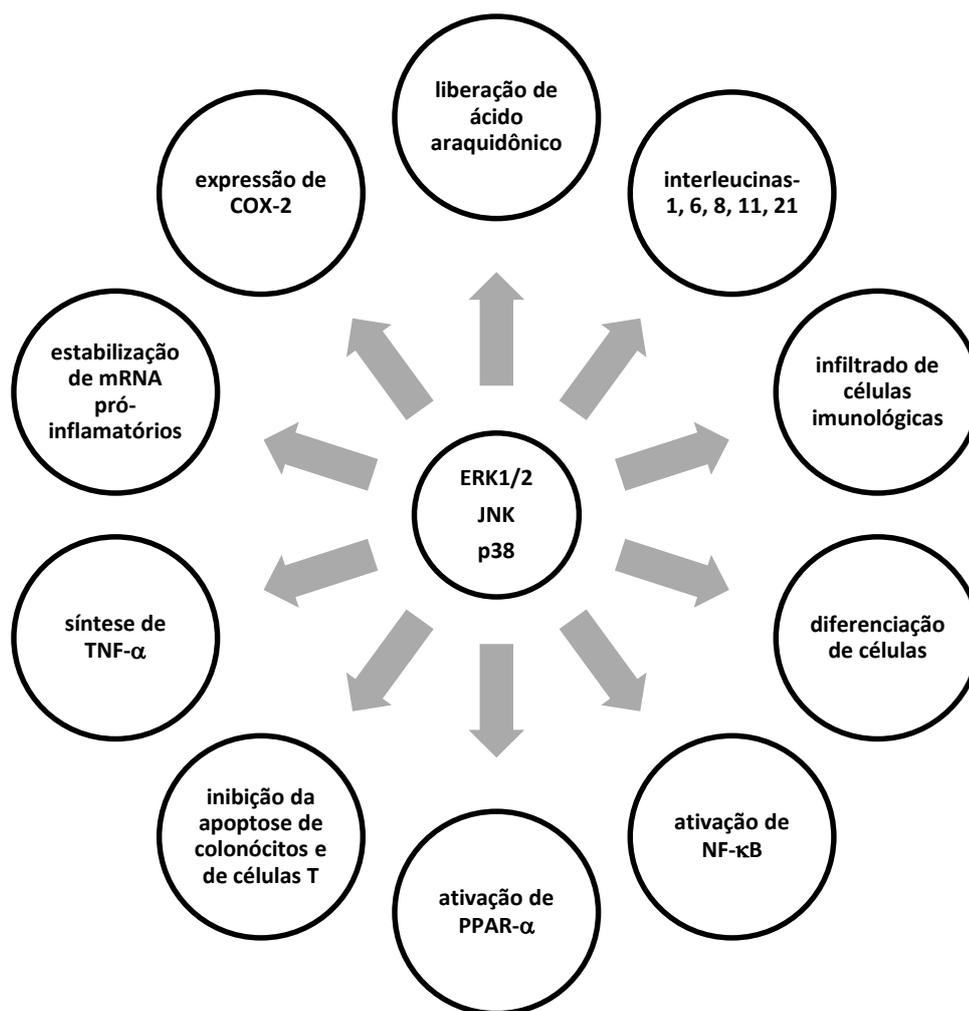


Figura 6. Os principais efeitos da sinalização das MAPK no complexo de resposta imune do trato gastrointestinal de pacientes com IBD (Broom et al. 2009 - modificado).

1.2.1.3 Aspectos genéticos relacionados à colite ulcerativa

A existência de fatores genéticos associados à UC é percebida, dentre outros fatores, pela agregação familiar da doença, bem como pela concordância fenotípica para UC em gêmeos. Gêmeos monozigóticos apresentam uma concordância de 10-20% para UC, esse valor é consideravelmente menor do que o valor encontrado para CD (50-75%) (Kaser et al. 2010); o que nos mostra que a UC possui uma menor associação com determinantes genéticos do que a CD.

Avanços na compreensão da genética das IBDs humanas são provenientes de estudos baseados na análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) e em estudos em modelos animais com a utilização de técnicas de transgenia

ou deleção (*knockout*) de genes. Os resultados mostram que os genes envolvidos nas IBDs atuam como reguladores de diversas funções biológicas importantes, incluindo imunorregulação, integridade da barreira mucosa, *clearance* microbiano e/ou homeostase (Sartor 2006).

Em uma revisão recente, Danese & Fiocchi (2011) citam uma meta-análise de seis estudos que confirmaram a presença de 47 loci associados à UC, dos quais 19 são específicos para UC e 28 são compartilhados com CD. Dentre os genes envolvidos pode-se citar: *ECM1*, *HNF4A*, *CDH1* e *LAMB1* envolvidos na disfunção na barreira epitelial; *DAP* que possui ligação com apoptose e autofagia; *PRDM1*, *IRF5* e *NKX2-3* relacionado a defeitos na regulação transcricional. Dentre os genes que são comuns à UC e à CD pode-se citar diversos genes na via de sinalização de IL-23 (*IL23R*, *JAK2*, *STAT3*, *IL12B* e *PTPN2*). É fundamental ainda ressaltar que existe a sobreposição de genes relacionados tanto à UC como a outras doenças imunológicas, dentre os quais *HLA-DR* e genes envolvidos na diferenciação de células T auxiliares (Th1 e Th17) como *IL10*, *IL7R*, *IL23R* e *IFN- γ* .

Dessa forma, considerando-se o grande número de genes implicados e o pequeno efeito aditivo de cada um, o *screening* genético não é correntemente indicado para avaliar a susceptibilidade individual em desenvolver UC (Danese & Fiocchi 2011).

1.2.1.4 Aspectos ambientais relacionados à colite ulcerativa

As taxas de concordância das IBDs em gêmeos monozigóticos, e o desenvolvimento dessas doenças em imigrantes que se deslocam para países com elevada prevalência de IBD e em países que estão sofrendo uma rápida ocidentalização mostram a importância do fator ambiental na patogênese dessas doenças (Kaser et al. 2010). Além disso, diversos estudos têm demonstrado a influência de fatores ambientais no desenvolvimento das doenças IBDs como, por exemplo, o hábito de fumar (que na UC tem um caráter protetor, contrário ao que ocorre na CD), a dieta, a utilização de antibióticos ou de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs), o estresse e a existência ou não de infecção patogênica. A participação desses fatores na patogênese das IBDs deve-se ao fato de eles serem capazes de alterar a integridade da função de barreira da mucosa intestinal, a resposta imune ou o microambiente luminal (Sartor 2006).

Sartor (2006) propõe que após uma injúria não específica desencadeada por um fator ambiental, como uma infecção ou a utilização de NSAIDs, um hospedeiro normal rapidamente repararia as alterações ocorridas na mucosa e nas respostas imunes inatas e de células T, sem que haja danos residuais ao tecido. Ao contrário, indivíduos nos quais a imunorregulação, a função de barreira da mucosa ou o *clearance* bacteriano são defectivos, podem desenvolver um quadro de inflamação crônica que é mediado por uma resposta agressiva de células T contra antígenos da microbiota intestinal. O quadro crônico é mantido pela contínua exposição de antígenos no intestino (Figura 7).

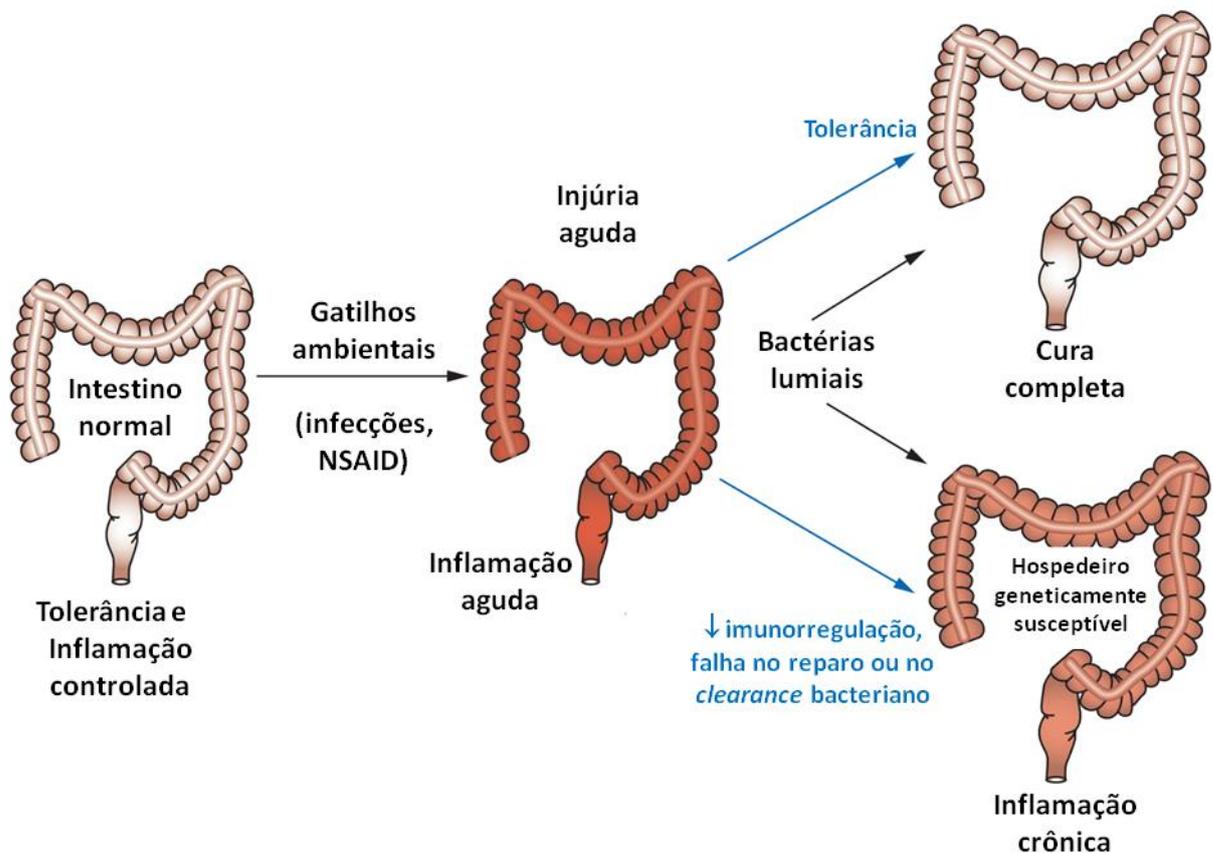


Figura 7. Possíveis respostas a uma injúria intestinal transitória em um hospedeiro geneticamente susceptível ou geneticamente resistente (Sartor 2006 - modificado).

1.2.1.5 Fisiopatologia da colite ulcerativa

A barreira epitelial e a camada de muco compõem a primeira linha de defesa intestinal, uma vez que ali há a separação entre a microbiota intestinal comensal e as células do sistema

imune, além da produção de peptídeos antimicrobianos. Nos pacientes com UC há uma redução tanto na produção de mucina quanto na expressão de proteínas de junção (ZO-1 e ocludina, por exemplo). Dessa forma, ocorre o rompimento das zônulas de oclusão (*tight junctions*) e do filme de muco que cobre a camada epitelial, levando ao aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, o que resulta no aumento da captura de antígenos do lúmen. Ao atingirem a lâmina própria, esses antígenos entram em contato com as células do sistema imune inato que residem naquele local – macrófagos e células dendríticas. Essas células passam, então, a reconhecer bactérias não-patogênicas da microbiota comensal por meio de seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares (como os TLRs), alteram seu estado funcional de tolerogênico para um fenótipo ativado. Esse processo culmina na ativação das vias de NF- κ B, que estimulam a transcrição de genes pró-inflamatórios, resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-12, IL-23, IL-6 e IL-1 β). Após o processamento, os antígenos capturados pelos macrófagos e células dendríticas são apresentados a células T CD4 *naive*, promovendo sua diferenciação em células Th2 efetoras, caracterizadas pela produção de IL-4. Células T NK (*natural killer*) são a principal fonte de IL-13, que está associada ao rompimento da barreira epitelial pela indução de apoptose e alterações nas zônulas de oclusão. A inflamação instalada no intestino leva a um aumento da expressão de MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin-cell adhesion molecule-1*) nas células endoteliais colônicas, permitindo com que células T circulantes que expressam a integrina α 4 β 7 liguem-se ao endotélio, levando ao aumento da infiltração de células T na lâmina própria. A maior expressão de quimiocinas pró-inflamatórias, como CXCL1, CXCL3 e CXCL8, também leva ao aumento do recrutamento de leucócitos circulantes, culminando com a perpetuação do ciclo inflamatório (Figura 8) (Ordás et al. 2012).

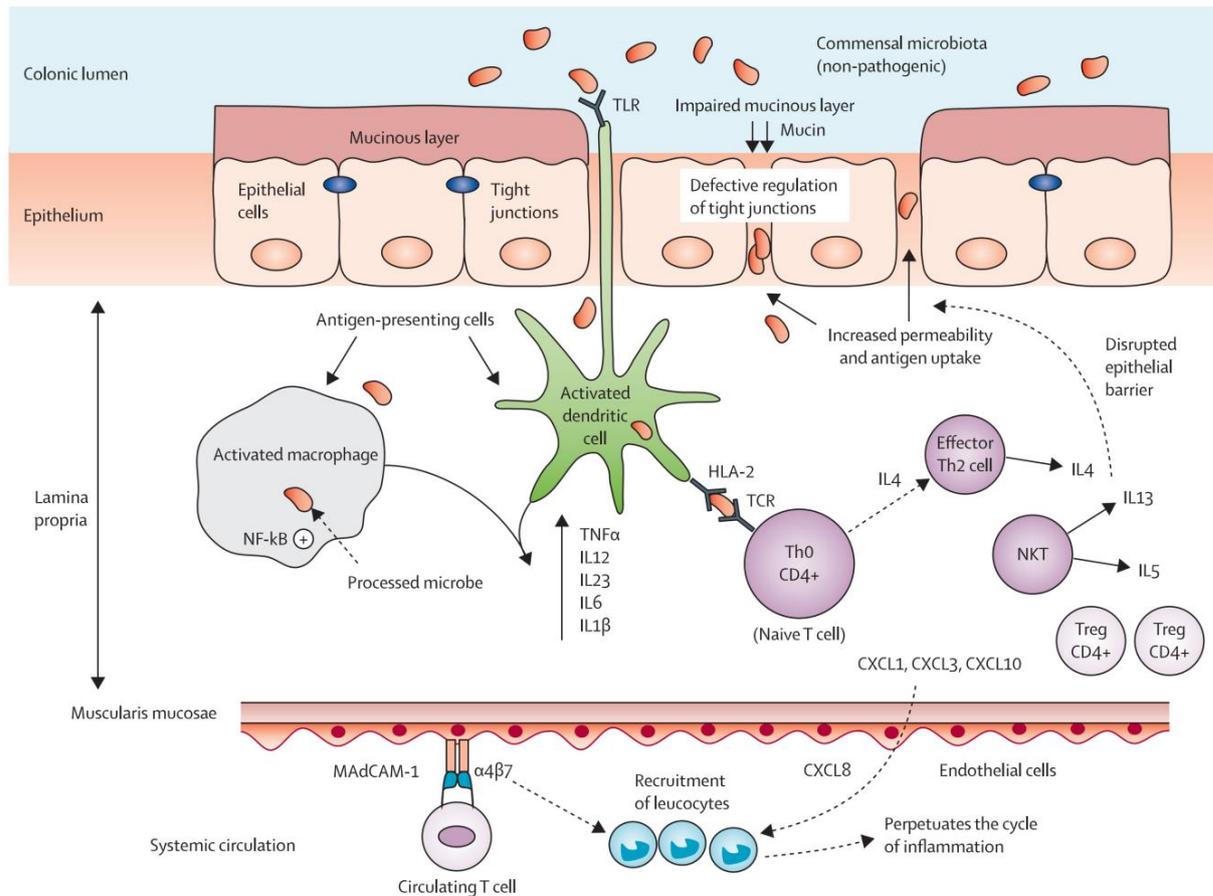


Figura 8. Patofisiologia da colite ulcerativa. Detalhes no texto. (Ordás et al 2012)

1.2.1.6 Opções para o tratamento da colite ulcerativa

O tratamento das IBDs consiste em medidas de conservação da saúde do paciente (Triantafillidis et al. 2011) e depende da extensão e da gravidade das lesões, bem como do segmento intestinal envolvido (Oliveira et al. 2010). As medidas tomadas objetivam, em um primeiro momento, induzir e manter a remissão; prever, prevenir e tratar complicações; restaurar o status nutricional do paciente; além de providenciar apoio psicossocial adequado ao paciente (Oliveira et al. 2010; Triantafillidis et al. 2011). A cirurgia pode ser empregada em casos mais complicados, como obstrução intestinal e abscessos, ou quando a doença não responde ao tratamento em tempo considerado razoável - entretanto, quando 50% do intestino delgado é removido, o paciente tende a desenvolver a Síndrome do Intestino Curto (Kaser & Tilg 2008; Oliveira et al. 2010; Triantafillidis et al. 2011).

Em revisão recente, Triantafillidis et al. (2011), classificam em cinco divisões os tratamentos farmacológicos utilizado no manejo das IBDs:

1. Drogas anti-inflamatórias: mesalazina, sulfasalazina e corticosteroides (prednisolona, metilprednisolona e butesonida)
2. Imunosupressores: azatioprina (AZ), 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato (MTX), ciclosporina, tacrolimo
3. Agentes biológicos: anticorpos monoclonais (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol)
4. Antibióticos: metronidazol, ciprofloxacina e rifaximina (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011)
5. Probióticos: *E. coli* Nissle 1917 e VSL#3

A principal abordagem terapêutica (e que se mostrou eficaz, tanto em casos de CD quanto em UC) envolve o uso de drogas anti-inflamatórias e de agentes biológicos como os anticorpos monoclonais anti-TNF, porém somente um terço, ou menos, dos pacientes mantêm remissão dos sintomas após um ano de tratamento. Além disso, muitos deles podem, com o passar do tempo, adquirirem resistência ao medicamento, que perde, assim, sua eficácia (Kaser & Tilg 2008, Danese 2012).

1.3 Probióticos: nova possibilidade de tratamento para a colite ulcerativa

1.3.1 Origens, definições e utilização de probióticos

Nos últimos anos tem se tornado cada vez mais evidente que a complexa microbiota que reside em nosso trato gastrointestinal perdeu grande parte de suas características patogênicas, ainda que tenham capacidade de penetrar a barreira epitelial e, assim, estimular respostas imunes de mucosa. Em alguns indivíduos como, por exemplo, aqueles com IBDs, esse equilíbrio é rompido e os micro-organismos da microbiota induzem respostas que levam a quadros de inflamação e doença. Uma tentativa de corrigir esse desequilíbrio tem sido a busca de micro-organismos que, quando introduzidos no sítio inflamado do intestino, sejam capazes de reduzir ou eliminar o quadro inflamatório (Boirivant & Strober 2007). Esses micro-

organismos que são utilizados com o objetivo de prevenir ou tratar doenças recebem o nome genérico de probióticos.

Relatos dos efeitos benéficos relacionados à utilização de bactérias na alimentação podem ser observados na versão persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), no qual se lê: “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. O historiador romano Plínio, em 76 a.C., recomendou a utilização de produtos de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (Teitelbaum & Walker 2002). No início do século XX, o cientista russo Ilya Metchnikoff (1845–1916), laureado com o Prêmio Nobel de Medicina de 1908, observou que os camponeses búlgaros possuíam uma vida média de 87 anos, excepcional para o início dos anos 1900. Ele atribuiu esse fato ao grande consumo de leite fermentado pela população. Além disso, ele sugeriu que a ingestão de iogurte contendo *Lactobacillus bulgaricus* diminuiria o número de bactérias produtoras de toxinas no intestino (Teitelbaum & Walker 2002; Vasiljevic & Shah 2008).

O primeiro uso do termo “probiótico” é atribuído a Kollath (1953), no qual a definição diz respeito a substâncias comuns em alimentos vegetais como vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas e outras substâncias ligadas a processos vitais. Nos anos seguintes, as definições propunham o termo em oposição ao termo antibiótico, considerando, inclusive, a capacidade de prevenir e restaurar o equilíbrio microbiano existente antes da terapia antibiótica (Kolb 1955; Vergin 1954). Posteriormente, outros autores ampliaram essa definição, para substâncias produzidas por micro-organismos que promovem o crescimento de outros micro-organismos, além de estimularem o sistema imunológico (Fujii & Cook 1973; Lilly & Stillwell 1965). Mais de 20 anos depois, Fuller (1989) definiu probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”. Atualmente, seguindo a recomendação da Junta de Avaliação de Probióticos em Alimentos da Organização Mundial de Saúde (OMS), a definição sugerida é aquela que diz que “probiótico é um micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2002).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de micro-organismos probióticos, usando diferentes fórmulas e com propósitos de prevenção ou tratamento de doenças. Dessa forma, há um acúmulo de evidências descrevendo a capacidade de linhagens probióticas em apresentar uma ou mais

das seguintes atividades protetoras: modulação da microbiota intestinal, imunomodulação, redução de sintomas alérgicos, alívio de gastroenterite aguda, redução da intolerância à lactose, redução da inflamação intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta e alívio da constipação (Goldin 1998; Ouwehand et al. 2002; Saxelin et al. 2005), além de contribuir para a nutrição do hospedeiro, atuar contra micro-organismos patogênicos e influenciar a proliferação de células intestinais e a maturação do sistema imune (Turroni et al. 2011).

Os probióticos são comercializados sob a forma de suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um único tipo de micro-organismo, ou mesmo uma combinação de diferentes espécies de micro-organismos. Entre os principais probióticos estão as bactérias do ácido láctico (BAL), que incluem os lactobacilos (*Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*), *Enterococcus faecium* SF68 e *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* e espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Além das BAL, temos também as bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Escherichia coli* EMO e *E. coli* Nissle, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi*, e as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (Martins 2008).

1.3.2 Probióticos no tratamento da colite ulcerativa

Desde a descoberta dos efeitos benéficos da sulfasalazina em casos de UC, o número de drogas usadas para o tratamento de IBD vem aumentando. Uma das últimas adições a esse arsenal terapêutico são os probióticos. A indicação de probióticos em casos de IBD é fundamentada em uma série de estudos em humanos e animais indicando que a microbiota intestinal possui um papel central na patogênese de CD e UC (Fiocchi 2003).

Como apresentado, probióticos atuam por meio de diferentes mecanismos. Primeiramente, eles atuam como barreira, pela colonização do epitélio intestinal e pela inibição competitiva, impedindo, assim, que outras bactérias do lúmen intestinal atinjam a lâmina própria. Eles promovem o aumento da produção e alteram a consistência da camada de muco – o que protege contra bactérias invasivas. Ainda levam a uma maior secreção, pelo hospedeiro, de defensinas e imunoglobulinas protetoras, como a imunoglobulina A secretora

(slgA) e eles mesmos (os probióticos) produzem substâncias que inibem o crescimento de patógenos (ácidos orgânicos, bacteriocinas). Finalmente, os probióticos atuam regulando as funções do sistema imune de mucosa, tornando-o mais anti-inflamatório e menos pró-inflamatório – especificamente, probióticos podem estimular as células dendríticas que sejam menos reativas e responsivas às bactérias luminais – o que é denominado como imunomodulação (Fedorak 2010).

Apesar de sua origem idiopática, sabe-se que a UC requer um *background* genético que permita, muitas vezes, que bactérias do lúmen intestinal desencadeiem uma resposta inflamatória intensa. Dessa forma, as bases para o uso de probióticos no tratamento desta doença se apóiam no fato de que alterar a população de bactérias existentes no local pode tornar a mucosa colônica menos inflamatória (Fedorak 2010).

A UC pode responder à terapia probiótica. Isso é observado por meio de estudos empíricos e clínicos que mostraram a eficácia de dois probióticos nesse tratamento. Por exemplo, *E. coli* linhagem Nissle 1917 (Mutaflor, Ardeypharm) (200 mg ao dia) pode ser tão efetivo quanto 5-aminosalicilato para a manutenção da remissão da doença, e o probiótico VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Inc.), é uma preparação que contém oito espécies probióticas (*B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. bulgaricus*) em conjunto com 5-aminosalicilato pode ajudar na remissão em UC leve ou moderada (Bibiloni et al. 2005; Danese & Fiocchi 2011; Fedorak 2010; Kokesoba et al. 2006; Nagalingam & Linch 2012).

Porém, novos estudos devem ser realizados na busca de novos tratamentos com probióticos como terapia alternativa para doenças inflamatórias intestinais. Linhagens bacterianas candidatas à qualidade de probióticos com potencial de intervenção em quadros de IBDs em sua maioria pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Philippe et al. 2010).

1.3.3 O gênero *Bifidobacterium*

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* estão classificadas como pertencentes ao filo Actinobacteria, à classe *Actinobacteria*, à ordem *Bifidobacteriales* e à família

Bifidobacteriaceae – sendo Actinobacteria uma das maiores unidades taxonômicas bacterianas (Turrone et al. 2011).

Actinobactérias são caracterizadas como bactérias Gram-positivo e que possuem elevado conteúdo G+C no DNA, variando de 51% para algumas espécies de *Corynebacterium* a 70% para algumas espécies de *Streptomyces* e *Frankia* (Ventura et al. 2007B). Esse filo inclui um grande número de espécies com uma ampla variedade de morfologias e diversas propriedades fisiológicas e metabólicas. Além disso, foram isoladas amostras de gêneros pertencentes a esse filo de uma grande variedade de nichos ecológicos como: comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), simbiontes fixadores de nitrogênio (*Frankia*) e habitantes do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.). Além do exposto, este filo engloba tanto micro-organismos patogênicos (e.g., *Mycobacterium* spp. *Nocardia* spp. *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionobacterium* spp.) como bactérias “promotoras de saúde” como as pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* (Turrone et al. 2011).

Henri Tissier, pediatra francês, em 1899, isolou, a partir de fezes de crianças alimentadas no seio, bactérias que apresentavam forma de Y, nomeando-as como *Bacillus bifidus* (Tissier 1900). Algum tempo depois, estudando diarreia infantil, observou a ausência dessa bactéria nas fezes das crianças acometidas pelo distúrbio. Assim, sugeriu que essa bactéria bífida poderia ser utilizada no tratamento de pacientes com diarreia, ajudando, portanto, na restauração da microbiota intestinal (Tissier 1906). Devido a suas características morfofisiológicas serem semelhantes às daquelas de lactobacilos, durante grande parte do século XX as bifidobactérias foram consideradas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Somente recentemente essas bactérias foram reconhecidas como pertencentes a um novo gênero: *Bifidobacterium* (Turrone et al. 2011). Atualmente, o gênero é composto por 37 espécies, todas exibindo mais de 93% de identidade nas sequências de rDNA 16S (Miayke et al. 1998).

O gênero *Bifidobacterium* é composto por bactérias Gram-positivo, não produtoras de gases, catalase-negativo e de elevado conteúdo G+C. Essas bactérias são bastonetes desprovidos de flagelos e incapazes de formar esporos. Sua morfologia é variável (pleomórfica), podendo apresentar-se como bastonetes curvos e, geralmente, são bifurcados em forma de V ou Y (forma bífida) (Arunachalam 1999, Gomes & Malcata 1999; Leahy et al. 2005; Tannock 1999). São descritas, ainda, como anaeróbios obrigatórios (Scardovi 1986) –

algumas linhagens podem ser bastante aerotolerantes (Simpson et al. 2004) –, possuindo pH ótimo para crescimento entre 6,5 e 7,0 (Matsumoto et al. 2004) e temperatura ótima de crescimento entre 37 °C e 41 °C, não crescendo em temperaturas inferiores a 25-28 °C ou superiores a 43-45 °C (Arunachalam 1999; Gomes & Malcata 1999; Laroia & Martin 1990; Scardovi 1986).

São, ainda, micro-organismos sacarolíticos e apresentam habilidade de fermentar glicose, galactose e frutose (Leahy et al. 2005). São considerados organismos heterofermentativos, ou seja, a partir de duas moléculas de glicose e cinco moléculas de ATP são formados acetato e lactato, na proporção molar de 3:2, sem produção de gás carbônico (Biavati et al. 2000; Gomes & Malcata 1999; Leahy et al. 2005; Mazo 2009). *Bifidobacterium* é o único gênero de bactérias da microbiota intestinal que possui essa via fermentativa, sendo, portanto, a presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoctolase (F6PPK) que degrada a frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato, um marcador taxonômico para o gênero bacteriano (Biavati et al. 2000; Gomes & Malcata 1999; Mazo 2009). Devido a suas características metabólicas, as bifidobactérias são muitas vezes consideradas bactérias acidoláticas (BAL), ainda que sejam filogeneticamente distintas dos demais membros do grupo (Mazo 2009).

As bifidobactérias são encontradas em nichos associados, direta ou indiretamente, ao ambiente intestinal de seres humanos ou outros animais (Turroni et al. 2011), como: intestino de animais (humanos, bovinos, coelhos, camundongos, galináceos e insetos), cavidade oral, sangue, alimentos e lixo (Ventura et al. 2004), sendo os três últimos possivelmente resultantes de contaminação a partir da fonte original (ou seja, o trato gastrointestinal) (Turroni et al. 2011). Turroni et al. (2011) ainda sugerem que a distribuição universal desses micro-organismos tenha surgido devido ao cuidado parental, ou seja, a distribuição das bifidobactérias seria uma consequência direta da transmissão das células bacterianas do carreador-parental para a prole.

As bifidobactérias dominam o intestino humano na fase inicial da colonização microbiana, sendo *B. Breve*, *B. infantis* e *B. longum* a espécies com maior representação. Porém, o perfil bacteriano sofre grandes alterações com a introdução de alimentos sólidos e o fim da amamentação, levando a um decréscimo na população de *Bifidobacterium* (Di Gioia et al. 2014; Favier et al. 2002; Magne et al. 2006).

A análise de bactérias totais em amostras fecais de crianças indica uma prevalência de bifidobactérias de até 90%; já na microbiota fecal de adultos existe uma redução para 3-5% (Leahy et al. 2005; Picard et al. 2005).

A distribuição inicial das espécies de *Bifidobacterium* nas fezes de recém nascidos foi inicialmente obtida por meio da técnica tradicional dependente de cultivo (Biavati et al. 1984) e, posteriormente, Biavati et al. (2000) refizeram o estudo utilizando, também, técnicas moleculares. As principais espécies encontradas nas crianças foram: *Bifidobacterium infantis* (atualmente classificada como *B. longum* subsp. *infantis*), *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* (atualmente classificada como *B. longum* subsp. *longum*) e *Bifidobacterium bifidum*. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* e *Bifidobacterium catenulatum* também foram encontradas em números reduzidos, e *B. dentium* foi encontrada apenas em crianças amamentadas no seio, não sendo encontradas em crianças que receberam fórmula.

Já em adultos, a biodiversidade da população de bifidobactérias foi investigada por técnicas dependentes e independentes de cultivo, a partir de amostras fecais e da mucosa intestinal. Verificou-se que diferentes indivíduos possuem diferentes populações de bifidobactérias. Porém, houve predominância de *B. pseudolongum* (50%), seguida por *B. longum* (17%) e *B. adolescentis* (8,5%). Notavelmente, 13% das sequências obtidas parecem estar relacionadas a novas espécies de *Bifidobacterium* (Eckburg et al. 2005; Palmer et al. 2007; Turroni et al. 2009; Turroni et al. 2011).

O sequenciamento do genoma de bifidobactérias sugere que todas elas seriam capazes de produzir um polissacarídeo extracelular que poderia tanto ajudar na adesão da bactéria às células do hospedeiro como, ainda, contribuir na resistência aos ácidos estomacais e aos sais biliares (Perez et al. 1998; Ruas-Madiedo et al 2009; Ventura et al. 2007A). Há, também, outras proteínas de superfície preditas, como estruturas semelhantes às fimbrias, identificadas pela presença de genes codificadores no genoma dessas bactérias (Ventura et al. 2007A) – apesar de que o papel exato dessas estruturas na interação micro-organismo–hospedeiro e micro-organismo–micro-organismo ainda não está bem determinado (Turroni et al. 2011).

Muitas bactérias comensais possuem propriedades anti-inflamatórias. Um dos mecanismos envolvidos nesse processo é a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato. Esses AGCC são produzidos a partir da fermentação de

carboidratos vegetais complexos (fibras). Os AGCC citados, são capazes de se ligar ao receptor associado à proteína G (em respectiva ordem de afinidade), o GPR43 – expresso por células do sistema imune inato, principalmente, neutrófilos, eosinófilos e monócitos (Kranich et al. 2011). O acetato leva a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da fagocitose, mas também pode induzir apoptose e modula o recrutamento de neutrófilos (figura 9) (Maslowski & Mackay 2011).

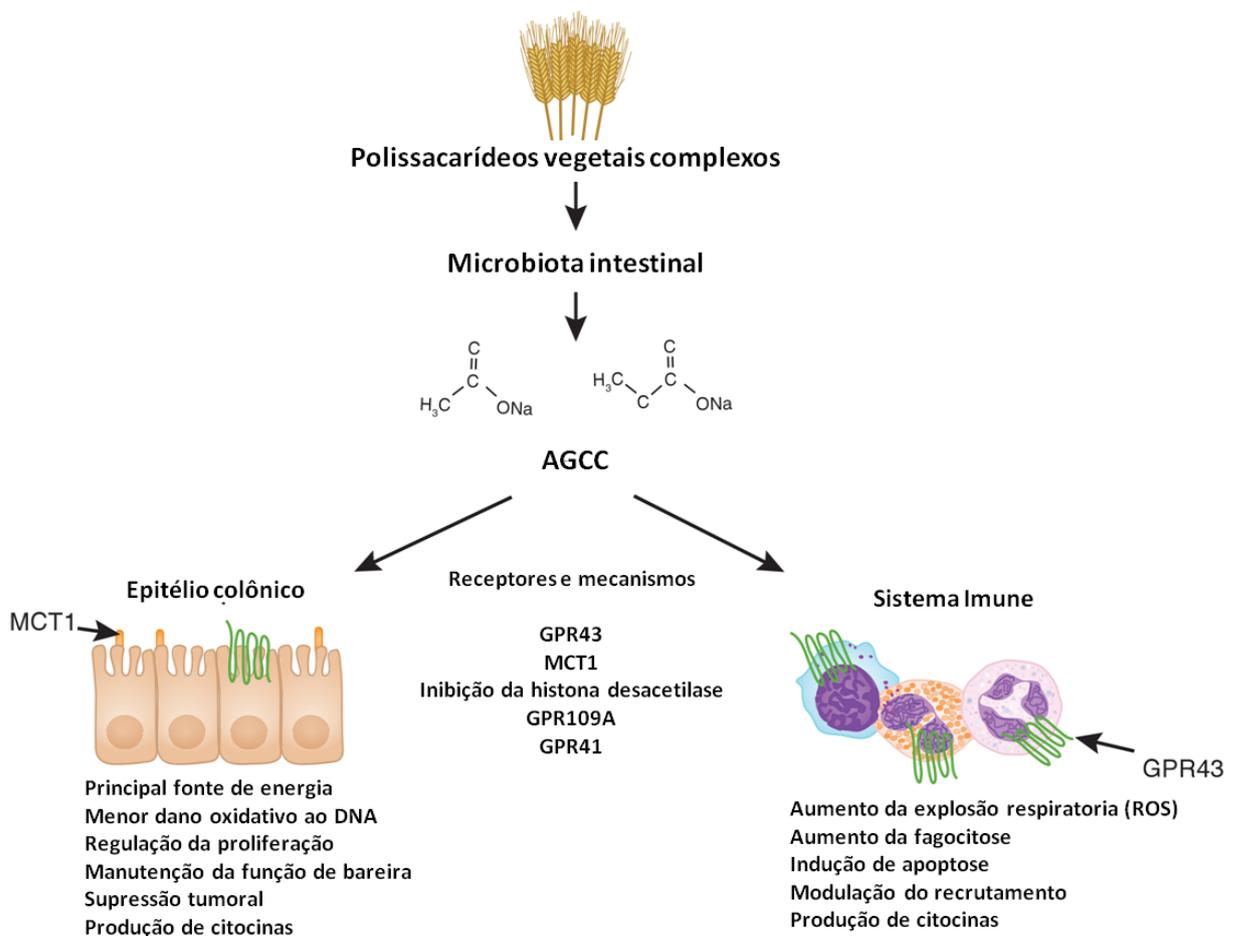


Figura 9. AGCCs, produzidos pela microbiota intestinal como um bioproduto da fermentação de carboidratos complexos (fibras) da dieta, possuem diversos efeitos benéficos. Como exemplo, esses AGCCs regulam a inflamação por meio do receptor GPR43. Enquanto o butirato é a principal fonte de energia para as células epiteliais do cólon, outros AGCCs são importantes para a manutenção da função de barreira epitelial, a regulação da proliferação e a supressão de tumor. AGCCs também diminuem o dano oxidativo ao DNA e regulam a produção de citocinas. Seus efeitos são devidos, principalmente, ao seu papel como fonte de energia e sua inibição das histona-desacetilases. AGCCs podem agir por meio de outros receptores como o GPR109A e o GPR41. No sistema imune, AGCCs possuem diversos efeitos anti-inflamatórios, mas também são importantes na estimulação da função imune, e seu papel parece ser importante para a regulação temporal das respostas imunes e na resolução da inflamação. O acetato aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e a fagocitose, mas também a apoptose e modula o recrutamento de neutrófilos (Maslowski & Mackay 2011 - modificado).

1.4 O modelo de colite ulcerativa induzida por DSS

Dada a enorme variedade de fatores etiológicos e a complexa heterogeneidade genética da IBD humana, muito do conhecimento da patogenia das IBDs veio de vários modelos animais (Strober et al. 2002). Embora existam algumas diferenças, esses modelos apresentam diversos aspectos histopatológicos e imunológicos da doença em humanos. Desse modo, os modelos murinos têm se tornado ferramentas indispensáveis para se investigar mecanismos patofisiológicos e processos imunológicos relativos à patogênese das IBDs. Dentre os modelos mais utilizados, estão a indução química de inflamação intestinal que envolve administração da oxazolona ou do DSS (sulfato sódico de dextrana) para simular a UC, e do TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico) para simular a CD (Johansson et al. 2010; Strober et al. 2002; Wirtz et al. 2007). Esses modelos murinos de indução química de inflamação intestinal são comumente usados e melhor caracterizados porque: (a) o início e duração da inflamação é imediata e controlável e, (b) não apresenta deleção genética artificial ou manipulações que normalmente não são encontradas em IBDs humanas (Strober et al. 2002; Wirtz et al. 2007). Além disso, esses dois modelos mostram-se muito semelhantes à IBD humana em múltiplos aspectos, incluindo a desregulação de citocinas (Mizoguchi & Mizoguchi 2008). Essa desregulação imunológica é representada por uma polarização das respostas Th1 (em CD) e Th2 (em UC).

O modelo de UC induzida por DSS foi proposto por Okayasu et al. (1990) e consiste em fornecer aos camundongos água suplementada com polímeros de DSS. O DSS é um polissacarídeo sulfatado, com peso molecular que varia de 5-1.400 kDa. O peso molecular do DSS é um fator importante na indução da colite, como pode ser observado nos resultados obtidos com camundongos BALB/c: DSS 5 kDa: colite moderada, com áreas de lesão no ceco e no cólon superior; 40 kDa: colite grave, com inflamação no meio e no terço distal do intestino; 500 kDa: não causa lesão (Kitajima et al 2000). A razão para esses resultados pode ser devido ao grande tamanho dessas moléculas, o que dificultaria a difusão do DSS na camada de muco. Dessa forma, o DSS mais utilizado na indução de colite possui massa molecular entre 40-50 kDa e é administrado por 5-7 dias em concentração de 3 a 5%, dependendo do modelo animal (Johansson et al. 2010). O DSS resiste à degradação pela microbiota, aos efeitos da exposição a diferentes valores de pH (4.0-7,5) e à incubação anaeróbica. O DSS atravessa a

mucosa intestinal, não é detectado em diversos órgãos (cérebro, pulmão, coração, timo, estômago e duodeno) e, além disso, é excretado nas fezes e na urina. Após 1 dia do início do tratamento, o DSS pode ser detectado em macrófagos do intestino grosso, nos linfonodos mesentéricos e nas células de Küpffer. No terceiro dia, o DSS pode ser detectado no baço e, a partir do 7º dia, nos rins e em macrófagos do intestino delgado (Kitajima et al 2002).

Apesar de muito utilizado, somente agora os mecanismos de indução da colite pelo DSS estão começando a ser desvendados. Verificou-se recentemente que o DSS afeta diretamente a camada interna de muco, permitindo que bactérias penetrem nessa camada (Johansson et al. 2010) e que não há participação de células B ou T na iniciação da doença (Claes et al. 2011). É importante ressaltar que a ação do DSS ocorre sobre o muco já formado, não alterando a biossíntese e formação de novo muco. Após a exposição dos camundongos ao DSS por 12 h, a camada interna não é mais livre de bactérias, assim, sugere-se que as bactérias penetrariam na camada interna de muco desestabilizada pelo DSS antes mesmo que sinais inflamatórios possam ser observados (Johansson et al. 2010).

O modelo agudo de colite é relevante para o estudo do efeito de micro-organismos probióticos e existe, ainda, a possibilidade de se induzir um quadro de colite crônica, por meio de múltiplos ciclos de administração de DSS (Claes et al. 2011).

A destruição da mucosa pelo DSS pode ocorrer sem a participação da microbiota. Isso foi demonstrado por Kitajima et al. (2001), em um experimento no qual camundongos IQI/Jic gnotobióticos desenvolveram colite após 14 dias de tratamento com DSS 1%. Nesse estudo, os animais desenvolveram um quadro mais grave do que o grupo de animais convencionais, sugerindo um papel protetor da microbiota.

2. JUSTIFICATIVA

As IBDs são processos inflamatórios crônicos que acometem o intestino de indivíduos susceptíveis. Tais manifestações clínicas apresentam períodos de remissões e recidivas, não existindo cura para as mesmas uma vez que a sua ocorrência é mediada por fatores genéticos, além dos fatores ambientais e imunológicos. O tratamento padrão baseia-se no uso de anti-inflamatórios ou anticorpos monoclonais que podem ter efeitos adversos sistêmicos quando utilizados de forma prolongada, além de muitos pacientes desenvolverem resistência ao tratamento.

Desde a descoberta dos efeitos benéficos da sulfasalazina em casos de UC, o número de drogas usadas para o tratamento de IBDs vem aumentando. Uma das últimas adições a esse arsenal terapêutico são os probióticos. O interesse no uso destes agentes microbianos vivos tem aumentado nesses últimos anos com o propósito de prevenção ou tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais, inclusive podem ser vistos como a grande promessa no tratamento das IBDs. Isso ocorre uma vez que estudos com probióticos têm demonstrado um grande potencial imunomodulador, a manutenção de períodos prolongados de remissão da doença e a ausência de resistência ao tratamento – uma vez que se trata da utilização de micro-organismos naturalmente encontrados na microbiota comensal, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos. Além disso, a própria Organização Mundial da Saúde tem sugerido o uso de terapias alternativas ao uso de antibióticos, tanto em humanos quanto em outras espécies animais. A indicação de probióticos em casos de IBD é fundamentada em uma série de estudos em humanos e animais indicando que a microbiota intestinal possui um papel central na patogênese de CD e UC. A interação hospedeiro-bactérias comensais é essencial para a saúde e homeostase do sistema imune. Dessa forma está claro que uma disrupção no balanço fisiológico entre sistema imune e bactérias pode levar a uma inflamação intestinal. Nos casos de IBD, a microbiota entérica poderia ser manipulada pelo uso de antibióticos e probióticos. Entretanto, o uso de antibióticos possui um valor limitado em casos de IBD, exceto em casos especiais como fístulas, abscessos, crescimento bacteriano exagerado e pouchitis (“bolsite”). Além do mais, o uso prolongado de antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas secundárias, decorrentes da perda da camada de muco protetora do epitélio intestinal, pode causar sérios efeitos colaterais e alterar drasticamente a microbiota com consequências indesejáveis, como diarreia associada

ao uso de antibióticos e colite pseudomembranosa e a seleção da resistência bacteriana a diversos agentes antimicrobianos. Nesses casos, o uso de probióticos seria o mais indicado. Entretanto, um dos principais motivos da falta de divulgação de probióticos no combate a diversos problemas intestinais é a falta de estudo dos mecanismos de ação destes microorganismos.

Dada a enorme variedade de fatores etiológicos e a complexa heterogeneidade genética da IBD em seres humanos, muito do conhecimento da patogenia das IBD veio de vários modelos animais. Embora existam algumas diferenças, esses modelos apresentam diversos aspectos histopatológicos e imunológicos da doença em humanos. Eles são comumente usados e melhor caracterizados porque: (a) o início e a duração da inflamação é imediata e controlável e, (b) não apresenta deleção genética artificial ou manipulações que normalmente não são encontradas nas IBD em seres humanos.

Com este trabalho, propusemos um estudo em modelo murino agudo de colite ulcerativa induzida quimicamente para avaliar o potencial efeito probiótico de uma linhagem de *Bifidobacterium*, bem como tentar desvendar alguns mecanismos responsáveis pelos resultados obtidos. A escolha da bifidobactéria deveu-se ao fato desse gênero ser membro dominante da microbiota humana e reconhecido por seu efeito benéfico em diversos distúrbios gastrointestinais. A linhagem utilizada foi escolhida pela empresa de origem (Christian Hansen, Dinamarca) devido ao interesse comercial em estudar o efeito probiótico dessa linhagem.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o efeito terapêutico da bactéria potencialmente probiótica *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 no modelo agudo de UC induzida por DSS em camundongos BALB/c, e tentar desvendar alguns dos mecanismos envolvidos nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

I. Avaliar os efeitos de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 como terapia preventiva no modelo murino agudo de UC induzida por DSS, usando como parâmetros clínicos a variação de peso, a consistência fecal e a presença de sangue nas fezes, além da histologia do intestino e do fígado, e da morfometria do cólon.

II. Avaliar os efeitos de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 na modulação do sistema imune em camundongos BALB/c com UC aguda induzida por DSS usando como parâmetros: a produção de sIgA no cólon, os níveis de citocinas recrutadoras de neutrófilos e eosinófilos (KC e Eotaxina) e a presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).

III. Avaliar os efeitos de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 no estresse oxidativo de camundongos BALB/c com UC aguda induzida por DSS considerando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no soro dos camundongos.

IV. Avaliar o efeito de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 sobre a permeabilidade e integridade intestinal em camundongos BALB/c com UC aguda induzida por DSS pelo método da quantificação de FITC-dextran no soro do animal.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foram conduzidos respeitando as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006). O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), e os experimentos somente foram iniciados após a aprovação pelo comitê (protocolo 047/2011) (Anexo A).

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ ICB/ UFMG, nível NB2.

Os animais receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água, esterilizados por calor úmido. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração e temperatura ambiente (23 °C) também foram controladas.

Os animais sofreram eutanásia por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina, 100 mg/mL; 0,4 mL de xilazina 20 mg/mL e 4 mL de solução salina NaCl 0,9%). Foi utilizada a proporção de 100 µL da solução anestésica para cada 8 g de peso corporal dos animais (Wirtz et al. 2007).

4.2 Micro-organismo

A linhagem bacteriana *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228, utilizada neste estudo, é originada da coleção de culturas da Christian Hansen S/A (Hørsholm, Denmark) e não possui genes de resistência ou de virulência em seu genoma (Bennedsen et al 2011). A bactéria foi repicada em caldo MRS (de Man, Rogosa e Shape) (Difco, Detroit, MI,

USA), e crescida em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, a 37 °C e sem agitação por 48h.

4.3 Desenho experimental

Os camundongos foram divididos, de forma aleatória, em 4 grupos (n=12), cuja identificação e tratamento estão indicados abaixo na figura 10.

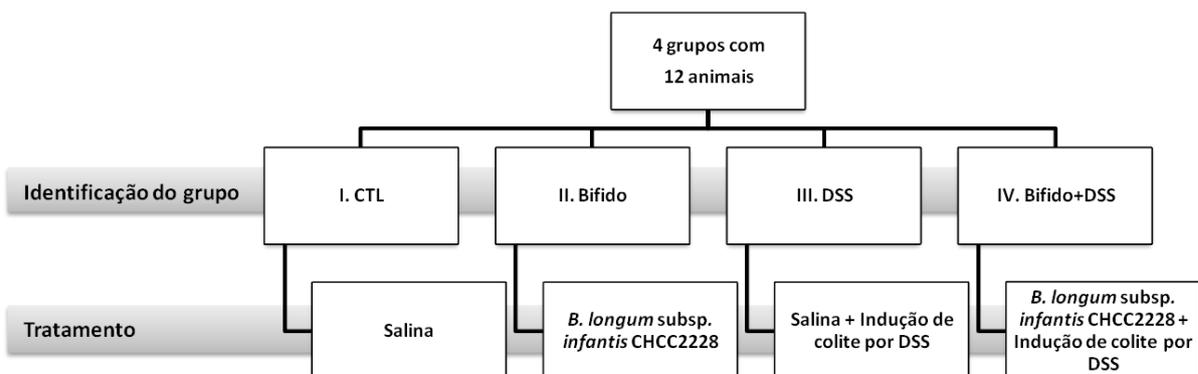


Figura 10. Delineamento experimental com identificação dos grupos e seus respectivos tratamentos utilizados. CTL, grupo controle.

O tratamento dos grupos (Figura 11 – faixa verde) iniciou-se nos 10 dias que antecederam a indução de colite e persistiu pelos sete dias seguintes ao início da indução da doença até a eutanásia. Nesse período, os animais receberam um inóculo diário de 0,1 mL de salina (grupos CTL e DSS) ou da bifidobactéria (grupos Bifido e Bifido+DSS). A colite foi induzida por sete dias (Figura 11 – faixa laranja), por meio da substituição da água por uma solução de DSS a 3,5% nos grupos DSS e Bifido+DSS. O experimento foi realizado simultaneamente para todos os grupos. Durante o período, os animais foram acompanhados para avaliação do peso, da consistência fecal e da presença de sangue nas fezes (Vieira et al 2009).

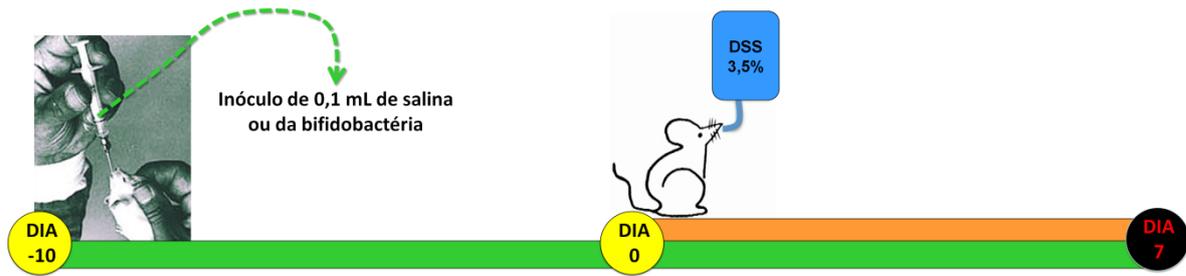


Figura 11. Esquema do tratamento dos animais com salina ou probiótico e a posterior indução de colite pela solução de DSS a 3,5%. Os círculos preenchidos em amarelos indicam a forma de contagem dos dias do experimento. O círculo preenchido de preto, dia 7, indica o dia da eutanásia dos animais. A faixa verde indica o período no qual o tratamento iniciado no dia -10 (inoculação de salina ou da bifidobactéria) ocorreu, respeitando-se o tratamento pré-determinado para cada grupo. A faixa laranja indica o período de indução de colite com a substituição da água pela solução de 3,5% de DSS apenas nos grupos DSS e Bifido+DSS. Os grupos CTL e Bifido não foram tratados com DSS, tendo sido tratados, durante todo o período, apenas com salina ou a Bactéria, respectivamente.

No sétimo dia, os animais foram sedados, eutanasiados e o soro e seus órgãos retirados para a realização das análises. O soro foi utilizado para a dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*); o fluido intestinal foi utilizado para dosagem dos níveis de sIgA; o intestino delgado e o cólon de 4 animais foram utilizados para análises histológicas e fragmentos do cólon de 6 animais foram utilizados na análise de citocinas (KC e eotaxina) e do infiltrado inflamatório por meio da medida das atividades enzimáticas de neutrófilos (MPO), eosinófilos (EPO) e macrófagos (NAG).

Foi, ainda, realizado um experimento (grupos com n=5) para medir a permeabilidade intestinal por meio da detecção de fluorescência do FITC-dextran no soro dos camundongos após inoculação intragástrica.

4.4 Tratamento dos animais com solução salina ou *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228

Quando tratados, de forma preventiva, com o probiótico (grupos Bifido e Bifido+DSS), os camundongos receberam um inóculo diário de 100 μ L, contendo 10^8 células, por inoculação intragástrica, com início no décimo dia anterior ao início da indução da colite e com término no último dia de indução de colite. Durante o mesmo período, os animais dos grupos CTL e

DSS receberam um inóculo diário de 100 µL de solução salina (NaCl 0,9%) de acordo com o esquema descrito para os respectivos grupos experimentais (Martins et al. 2009) (Figura 10).

4.5 Indução química por DSS de colite aguda em camundongos

Para a indução de colite, os camundongos dos grupos DSS e Bifido+DSS tiveram a água substituída por uma solução de DSS 3,5% (p/v) (36-50 kDa; MP Biomedicals, EUA) diluído em água filtrada e esterilizada por calor úmido. A indução foi feita durante sete dias, durante os quais a solução era trocada a cada dois dias e os animais tinham acesso livre à solução de DSS (Wirtz et al. 2007).

4.6 Avaliação clínica dos animais

4.6.1 Desenvolvimento ponderal e índice diário de atividade da doença (D.A.I.)

A avaliação ponderal dos animais objetivou verificar a variação do peso dos animais ao longo do período do estudo. Para isso, os animais foram pesados diariamente a partir do dia do início da indução da colite (dia 0) até o final do experimento. Para normalização dos resultados, o peso dos animais no dia zero foi considerado como 100%, e a perda ou ganho de peso foram contabilizados individualmente em função do peso inicial. Os resultados foram expressos em porcentagem. Os animais foram pesados diariamente, às 8:00 hs, a fim de evitar as variações que ocorrem ao longo do dia.

O índice diário de atividade da doença (D.A.I. – *disease activity index*) foi estabelecido conforme descrito por Albert et al. (2010), e é baseado em um score cumulativo, que varia de 0 a 10. Esse *score* foi obtido pela análise de 3 diferentes parâmetros: (A) peso dos animais (0 = nenhum perda de peso; 1 = 1 a 5% de perda de peso; 2 = 5 a 10% de perda de peso; 3 = 10 a 15% de perda de peso; 4 = mais de 15% de perda de peso); (B) consistência fecal (0 = normal, 1 = mole, porém ainda formada, 2 = muito mole, 3 = líquida) e; (C) sangramento (0 = negativo para presença de sangue oculto nas fezes, 1 = positivo para presença de sangue oculto nas fezes, 2 = sangue visível nas fezes, 3 = sangramento retal). A presença de sangue oculto nas

fezes foi avaliada em todos os animais, de forma não cega, pelo kit comercial FECA-CULT (InLab Diagnóstica, Diadema, SP, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.6.2 Avaliação da relação entre o peso e o comprimento do cólon

Após a eutanásia dos animais, o cólon dos mesmos foi cuidadosamente retirado, lavado, e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. Para a realização da medida utilizou-se o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo Digimatic Caliper). Em seguida o órgão foi pesado.

4.7 Análises histológicas do fígado, intestino delgado e cólon

O processamento do intestino delgado e do cólon foi realizado de acordo com o método descrito por Calvert et al (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997). Seguindo essa metodologia, os órgãos foram cortados separadamente e estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Estes foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação. Os órgãos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal (próxima ao ânus) em direção à proximal (próxima ao ceco). Os rolos amarrados com barbante foram fixados por imersão em solução de formol por 24 horas.

As amostras de intestino delgado, cólon e fígado, de 3 animais de cada um dos quatro grupos (controle, DSS, Bifido e Bifido+DSS), foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica de rotina.

Foram realizados, também, cortes adicionais das lâminas de cólon e estes foram corados pela técnica combinada de *Alcian Blue* e Ácido Periódico Combinado de Schiff (PAS/AB) com adaptações da técnica descrita por McManus & Mowry (1960). Esta técnica tem como objetivo

corar em azul as células produtoras de mucopolissacarídeos ácidos e na cor rósea as produtoras de mucopolissacarídeos neutros.

4.7.1 Coloração HE

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

4.7.2 Técnica combinada de PAS/*Alcian Blue*

As lâminas contendo cortes de cólon, já desparafinados, foram lavadas em água corrente por 5 min. Em seguida, os cortes foram mergulhados em solução de equilíbrio (ácido acético 3%) por 3 min. Posteriormente, os cortes foram imersos em solução de *Alcian Blue* 1% (pH: 2,5) e incubados por 30 min. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada por 3 min, escorridas e mergulhadas em solução aquosa de ácido periódico 0,5% por 5 min. As lâminas foram escorridas após esse período de incubação e incubadas em reagente de Schiff por 20 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 1 min, contracoradas com Hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 10 min. Após a coloração, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas em Etellan.

4.7.3 Análise das lâminas e fotodocumentação

Todas as lâminas foram codificadas e observadas sequencialmente por uma mesma patologista (Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Depto. de Patologia Geral/ ICB/ UFMG) que não teve acesso aos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

4.7.4 Análises morfométricas do cólon

Para as análises morfométricas do cólon, foram obtidas fotografias em aumento de 4x de modo a abranger a maior área possível do órgão. Para as medições foi utilizado o programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível *on line* no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Para as lâminas coradas em HE, foram considerados para análise o comprimento total das peças e o comprimento total das áreas com presença de edema e sinais de lesão (estes definidos pela perda da arquitetura do intestino, erosões superficiais e área de inflamação da camada epitelial). Foi também medido o diâmetro das placas de Peyer. Para as lâminas coradas por PAS/AB foram considerados os comprimentos total e com ausência de mucina. Os dados foram representados como comprimento percentual do cólon com lesão, com edema, com placa de Peyer e com ausência de mucina.

4.8 Medida da permeabilidade intestinal

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificar a função de barreira foi realizado utilizando-se o método do *FITC-labeled dextran*, como descrito por Yan et al. (2009). Alimento e água foram removidos e, após 4 h, os camundongos foram pesados e receberam

inoculação intragástrica de FITC-dextran (0,6 mg /g de peso corporal, PM 4000; Sigma-Aldrich). Quatro horas após a gavagem os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina, 0,4 mL de xilazina e 4 mL de salina) (Wirtz et al. 2007), tiveram seu sangue retirado por punção cardíaca e, posteriormente, foram eutanaziados. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 3 min à 4 °C e o soro foi coletado. 100 µL de soro foram pipetados em poços de placas de ELISA com 96 poços. Foi, então, realizada a medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA).

4.9 Dosagem de imunoglobulina A secretada (slgA)

A determinação do nível de slgA total foi realizada pelo método de ELISA, conforme previamente descrito (Martins et al. 2009). O intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, suplementada com inibidores de protease (1 µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 rpm (9.000 g), por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80 °C, para posterior dosagem da imunoglobulina. Para a determinação da slgA foram utilizados para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA). Para a detecção da slgA foram utilizados anticorpos conjugados a peroxidases anti-IgA de camundongo (A-4789, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA). A concentração de slgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). A leitura foi feita, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA) e a concentração de slgA foi dada em µg/mL de conteúdo intestinal.

4.10 Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).

4.10.1 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Utilizou-se um ensaio previamente desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia (ICB/UFMG) para dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados (Souza et al. 2000), com algumas modificações.

Inicialmente, fragmentos do cólon dos animais foram removidos e congelados a -80 °C. Após o descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1,9 ml de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4.7 (0,1 M NaCl; 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O; 0,015 M Na₂-EDTA), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos e o precipitado foi submetido à lise hipotônica hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação o precipitado foi ressuscitado em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). O sobrenadante foi descartado e a atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuscitado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando tetrametilbenzidine (TMB) (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados serão expressos como unidades relativas. Os experimentos de MPO foram complementados a dosagem da citocina KC

4.10.2 Atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima EPO como quantidade relativa de eosinófilos no tecido foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente por Strath et al. (1985). A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido é utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia tecidual.

Para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 ml de PBS 5X (pH 7.2). Em seguida o tecido foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido a lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuscitado em 1,9 mL de PBS (pH 7.4), contendo 0,5% de HTAB. Essa solução foi novamente homogeneizada e 1 mL do homogenato foi transferido para um microtubo de 1,5mL, seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A amostra foi, então, centrifugada a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos a 4 °C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos, e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 492 nm. Os experimentos de EPO foram complementados com a dosagem da citocina Eotaxina.

4.10.3 Atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima NAG, como medida indireta da atividade de macrófagos, foi avaliada por meio de testes enzimáticos utilizando como substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina. Homogenatos do cólon foram incubados juntamente com o substrato e o produto dessa reação, p-nitrofenol, foi quantificado por meio de um ensaio colorimétrico,

conforme descrito por Bailey (1988). Este protocolo também foi destinado à a obtenção de amostras para a dosagem de citocinas.

Fragments do cólon com aproximadamente 100 mg foram ressuspensos em 1mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases [0,1 mM PMSF, 0,1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinin A]) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80 °C para posterior dosagem das citocinas. O pellet (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias, sendo em seguida centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se 800 µL de solução salina 0,9% acrescida de Triton X-100 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e utilizadas para o ensaio enzimático. O mesmo consiste na adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante. A reação ocorreu a 37 °C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação deu-se pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) e a leitura foi realizada a 405 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em unidade relativa.

4.11 Dosagem de citocinas

Para avaliar a expressão de citocinas inflamatórias, fragmentos do cólon com aproximadamente 100 mg foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem das citocinas. A dosagem de citocinas foi realizada pelo método de ELISA. Os kits para as citocinas e

quimiocinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas (Martins et al 2011).

4.12 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no soro

A avaliação da geração de ROS foi realizada utilizando a sonda fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta molécula na presença de radicais livres é oxidada formando a diclorofluoresceína (DCF) que pode ser facilmente visualizada. Esta técnica é bastante utilizada como meio de determinação da produção de radicais livres em células. (Rhee et al., 2010).

Ao final do período de indução da colite, os animais foram anestesiados, eutanasiados e seu sangue coletado por meio de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 3 min à 4 °C e o soro foi coletado.

Neste ensaio 95µL de tampão fosfato/EDTA pH 7,4 e 10 µL de DCFH-DA foram adicionadas a 0,5mg de proteína da amostra de soro, homogeneizadas em vórtex e incubadas a 37 °C ao abrigo de luz por um período de 30 min. Ao final desse tempo foram feitas as leituras no leitor de ELISA (EnSpire® Multimode Plate Readers – Perkin Elmer) a 525 nm para excitação e 488 nm para emissão. Os resultados foram expressos pela intensidade da fluorescência (Wang & Joseph 1999).

4.13 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão e analisados usando teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey ou Bonferroni (indicados nas figuras). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças que apresentaram $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica dos animais

A avaliação ponderal dos animais para verificar a perda ou ganho de peso está mostrada na figura 12. As curvas dos grupos CTL e Bifido apresentaram um perfil semelhante. Os animais com colite começaram a perder peso a partir do 5º dia após a indução da doença. Além disso, os animais que sofreram indução de colite por DSS e foram tratados com a bifidobactéria (grupo Bifido+DSS) apresentaram uma menor perda de peso (6,55 %) quando comparados aos do grupo DSS (10,32 %) ($p < 0,01$). Durante o período, nenhum animal foi a óbito.

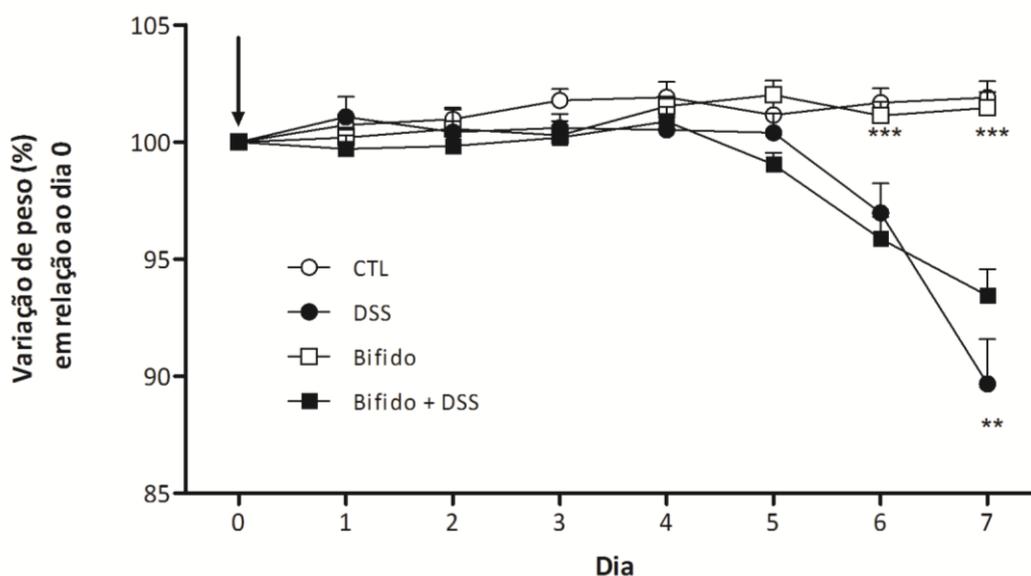


Figura 12 – Desenvolvimento ponderal. Variação do peso dos camundongos (em porcentagem) em relação ao peso no início do tratamento com DSS (dia 0). Os asteriscos na parte superior do gráfico mostram diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controles (CTL e Bifido) e os desafiados com DSS (DSS e Bifido + DSS). Os asteriscos na parte inferior do gráfico mostram diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos DSS e Bifido+DSS. Teste: ANOVA two-away, seguido por post-test de Bonferroni. N = 12.

Após a administração do DSS, observamos, tanto no grupo DSS como Bifido+DSS, alteração na consistência das fezes dos animais já nas primeiras 24 horas (mudança de escore

1 para 2), atingindo o escore 3 no terceiro dia de indução de colite. Os primeiros indícios da presença de sangue oculto nas fezes ocorreram no terceiro dia (para os dois grupos). Porém, o grupo Bifido+DSS apresentou de forma pontual animais com sangue visível nas fezes ou sangramento anal; e o grupo DSS desenvolveu uma doença mais agressiva, com presença constante de animais com sangramento retal.

O índice diário de atividade da doença (D.A.I. – *Disease Activity Index*) que estabelece o escore baseado nos sintomas clínicos de perda de peso, sangramento e alteração na consistência fecal ao longo dos 7 dias do experimento está apresentado na figura 13. Observou-se diferença entre os grupos controles (CTL e Bifido) e os grupos com colite (DSS e DSS+Bifido) já no primeiro dia após o desafio. A diferença entre os grupos DSS e Bifido+DSS somente foi estatisticamente significativa nos dois últimos dias do experimento (os valores do DAI foram de 4,846 e 3,846, respectivamente, para DSS e Bifido+DSS no dia 6; e de 7,154 e 3,769 no dia 7). Isso sugere que a administração de *B. longum infantis* CHCC2228 promoveu melhora na saúde dos animais, reduzindo de forma expressiva os sinais da doença.

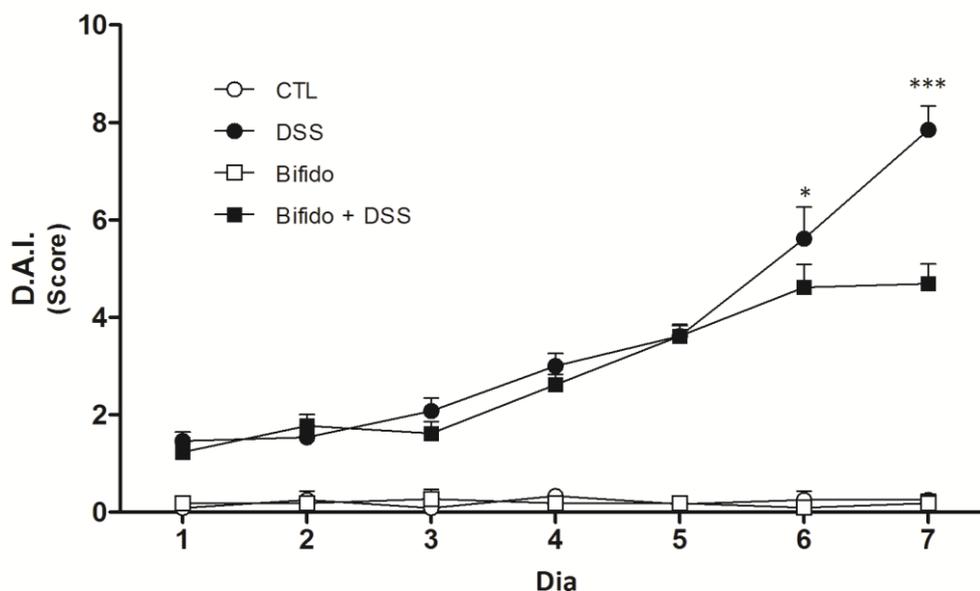


Figura 13 – Índice da atividade diária da doença (D.A.I.). Os asteriscos indicam diferença entre os grupos DSS e Bifido+DSS nos dias 6 ($p < 0,05$) e 7 ($p < 0,001$). N = 12. Teste: ANOVA two-way, seguido por post-test de Bonferroni.

Houve ainda um encurtamento no comprimento do cólon nos animais com colite ulcerativa (Figura 14A), que foi acompanhada de um aumento no peso dos mesmos (Figura 14B). O tratamento com o probiótico não foi capaz de gerar diferenças significativas nesse parâmetro.

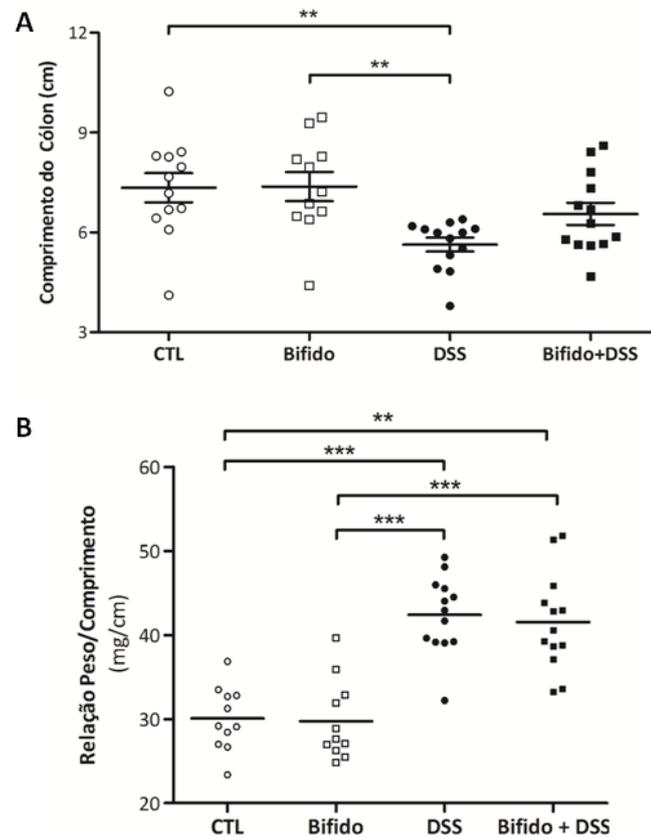


Figura 14 – Alterações macroscópicas do cólon: (A) avaliação do comprimento total (cm) e (B) relação entre o peso e o comprimento total do órgão (mg/cm). Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). N = 12.

5.2 Análises histopatológicas do fígado, intestino delgado e cólon

Para as análises histopatológicas foram analisadas lâminas dos seguintes órgãos: fígado, intestino delgado e cólon, de três animais de cada um dos quatro grupos (controle, DSS, Bifido e Bifido+DSS).

5.2.1 Fígado e intestino delgado

Como pode ser observado na figura 15, a indução da colite pelo DSS ou o tratamento com a bactéria potencialmente probiótica *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 não alteraram a estrutura histológica do fígado dos animais, havendo preservação do parênquima hepático e ausência de focos inflamatórios. Também não foi observada qualquer alteração histológica estrutural nas lâminas de intestino delgado (fotomicrografias não mostradas).

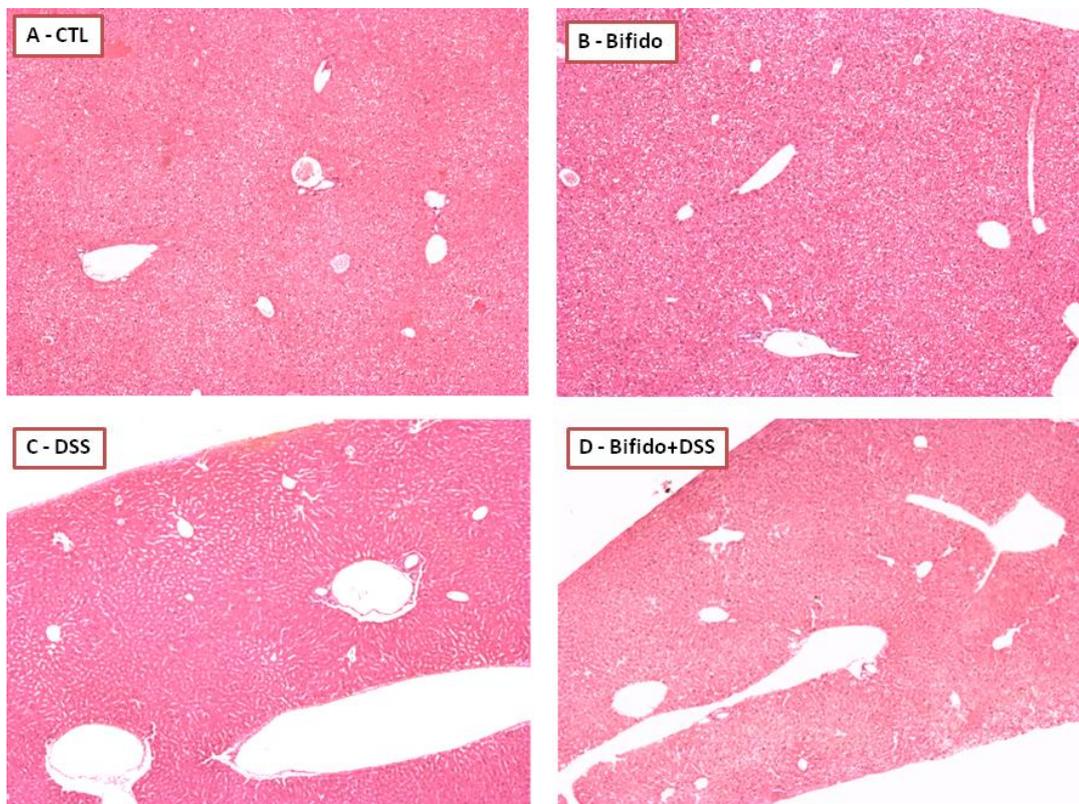


Figura 15 – Fotomicrografias de fígado de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D). Coloração HE. Aumento: objetiva 4x. N = 3

5.2.2 Cólon

As fotos representativas das lâminas de cólon de camundongos convencionais do grupo CTL ou com indução de colite por DSS e tratados ou não com a bifidobactéria podem ser observadas nas figuras 16 e 17.

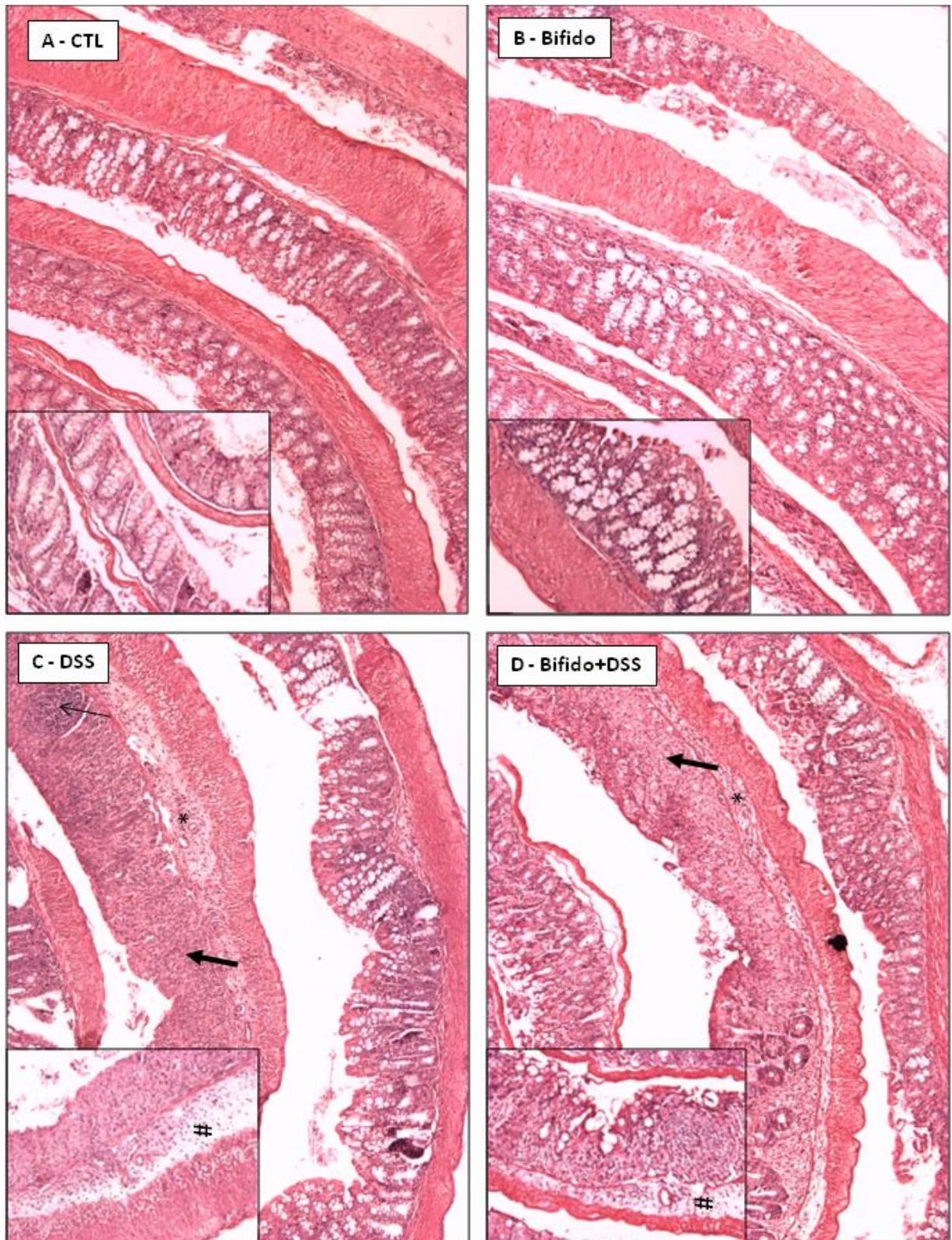


Figura 16 – Fotomicrografias de cólon de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D). Aumento: objetiva 4x, detalhes: objetiva 10x. Legenda: * infiltrado inflamatório; # edema; ► lesão epitelial; → nódulo linfóide de ativação. Coloração HE. N = 3

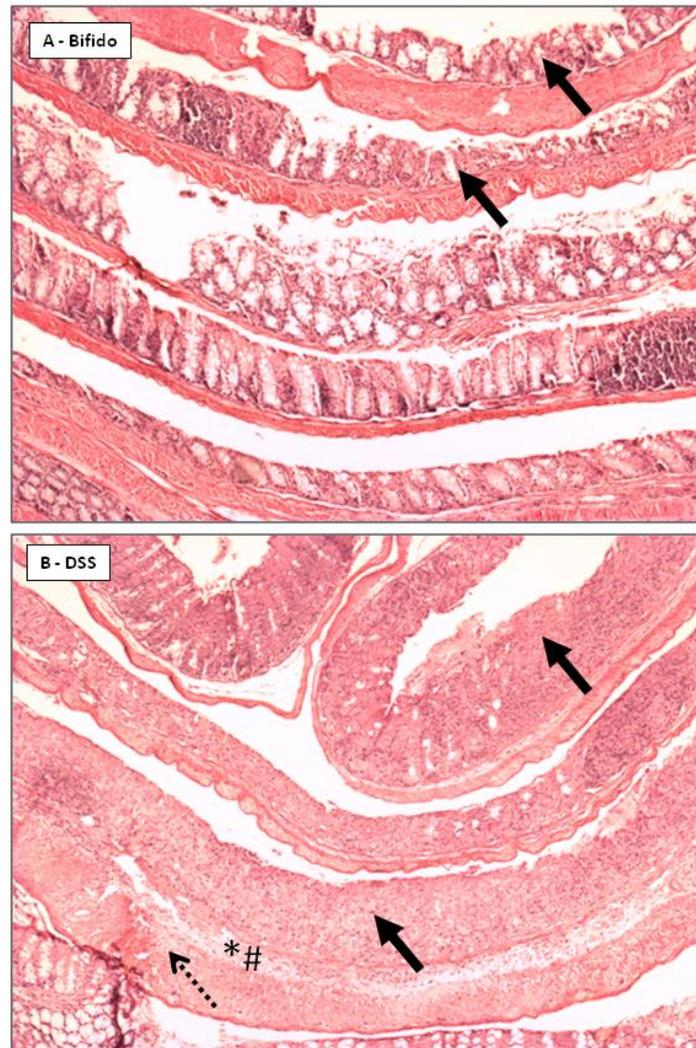


Figura 17 – Fotomicrografias com detalhes do cólon de camundongos BALB/c tratados com a bifidobactéria (A) e com colite induzida por DSS (B). Legenda: * infiltrado inflamatório; # edema; ➡ lesão epitelial; ⋯→ comprometimento da muscular da mucosa. Coloração HE. Aumento: objetiva 4x. N = 3

Após o tratamento dos camundongos com a bifidobactéria, os animais apresentaram relativa conservação da estrutura colônica (Figura 16B), apesar da presença de alguns focos de lesão (Figura 17A), atipia e hiperplasia de células epiteliais. Os animais dos grupos DSS (Figura 16C e 17B) e Bifido+DSS (Figura 16D) apresentaram grande alteração na mucosa colônica, principalmente na região distal do órgão.

A indução de colite acarretou em alterações importantes na morfologia do cólon, que apresentou áreas muito lesadas, intercaladas com áreas muito preservadas. As áreas exibiram desde edema da lâmina própria até completa perda da arquitetura das glândulas colônicas, com intensa infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares, alterações

degenerativas de células epiteliais, perda de diferenciação celular mucossecretora e atipias precursorais epiteliais. No grupo DSS houve presença de nódulos de células linfóides na camada epitelial (Figura 16C) e comprometimento da camada muscular pelo edema e alterações degenerativas (Figura 17B). As alterações não ocorreram de forma homogênea no perímetro do cólon, mas foram mais perceptíveis principalmente na região distal do órgão (região central do rocambole). Para a avaliação da diferença da intensidade dessas lesões entre os grupos foram realizadas as análises morfométricas.

As fotos representativas das lâminas de cólon coradas por PAS/AB podem ser observadas na figura 18.

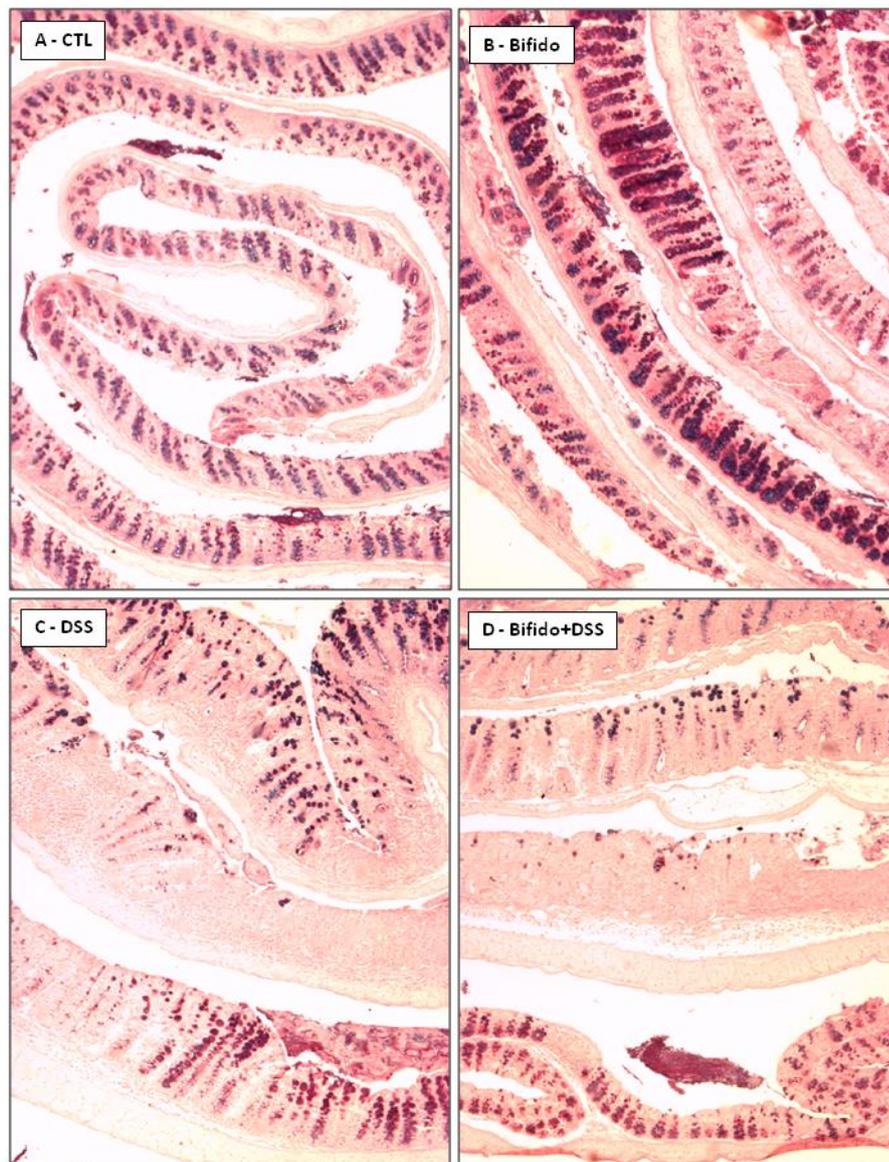


Figura 18 – Fotomicrografias com detalhes do cólon de camundongos BALB/c do grupo controle (A), tratados com a bifidobactéria (B), com indução de colite (C) e com indução de colite e tratados com a bifidobactéria (D). Coloração PAS/AB. Aumento: objetiva 4x. N = 3

A administração de *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 (Figura 18B) não provocou alterações perceptíveis no padrão de mucinas quando comparadas ao grupo controle (Figura 18A). Esse padrão difere-se dos grupos DSS e Bifido+DSS que apresentam grandes áreas com redução ou ausência de células produtora de mucina (Figuras 18C e 18D, respectivamente).

5.3 Análises morfométricas do cólon

Com a finalidade de se avaliar diferenças na extensão das lesões, do edema, das placas de Peyer e na produção de muco entre os grupos estudados foi realizada a análise morfométrica das amostras das lâminas histológicas do cólon (Figura 19).

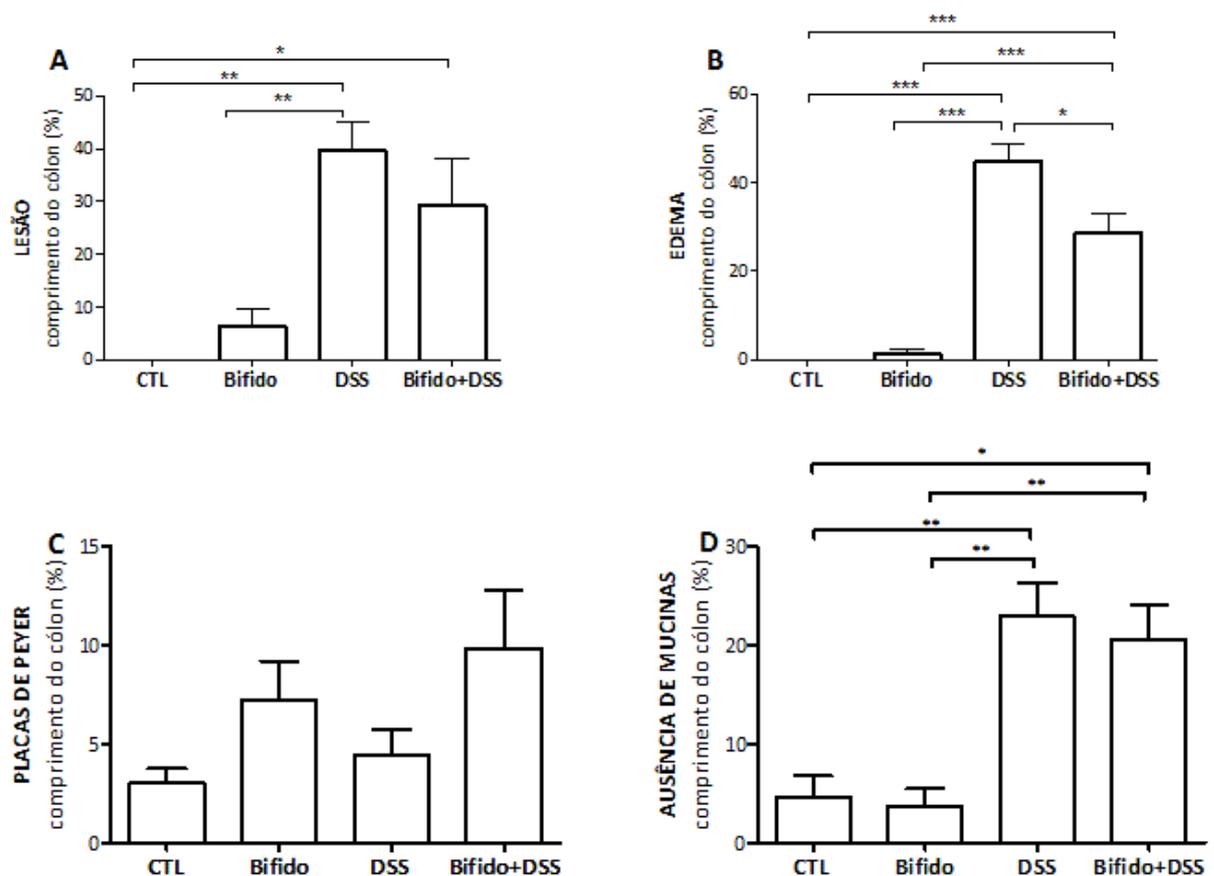


Figura 19 – Morfometria do cólon, em termos de percentual do comprimento do cólon (A) com lesão, (B) com edema, (C) com presença de placas de Peyer e (D) com ausência de mucinas. N = 3. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Apesar de se observar uma redução no perímetro lesionado no grupo Bifido+DSS quando comparado ao grupo DSS (Figura 19A), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Observa-se ainda que a bifidobactéria foi capaz de induzir lesões discretas no cólon dos animais. Aqui é importante ressaltar que nesta análise não foi considerada a intensidade das lesões, apenas sua extensão. A análise histológica indica que estas lesões são discretas e superficiais, e são acompanhadas de um discreto edema da lâmina própria (Figura 19B).

Os resultados da morfometria da extensão do perímetro com edema (Figura 19B) mostram uma redução significativa no grupo Bifido+DSS quando comparado ao grupo DSS.

Em 19C, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, no perímetro do cólon com a presença de placas de Peyer, observou-se uma tendência ao aumento do percentual do perímetro intestinal ocupado pelas placas de Peyer induzido pela presença da bactéria e, em maior proporção pelo DSS. Parece haver, ainda, uma sinergia quando a indução de colite é associada ao tratamento com o probiótico.

Em 19D observa-se uma perda na produção de mucina pelas células do cólon nos animais com indução de colite, não havendo, porém diferença estatística entre os grupos DSS e Bifido+DSS ou CTL e Bifido – nesta avaliação não foram considerados como distintos os perímetros com mucinas ácidas ou básicas.

5.4 Avaliação da permeabilidade

A avaliação da permeabilidade intestinal obtida pela medida da fluorescência do FITC-dextran translocado do intestino para o soro, mostrou que os animais do grupo DSS apresentaram grande taxa de permeabilidade e que o tratamento com a bifidobactéria reduziu de forma significativa essa permeabilidade (Figura 20).

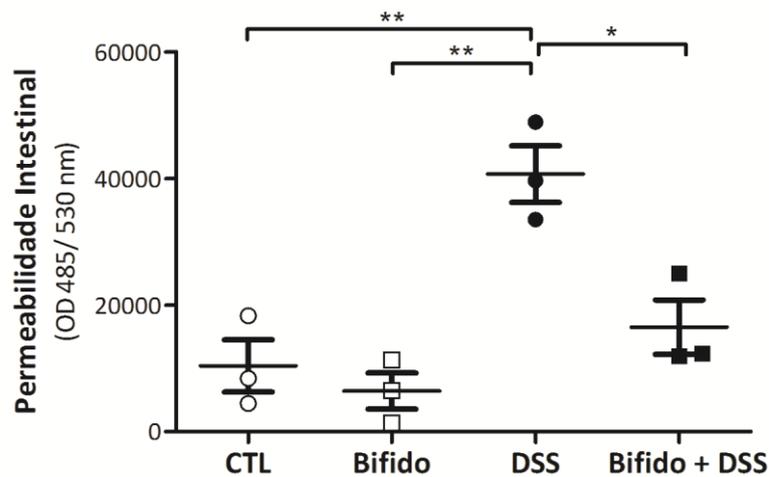


Figura 20 – Avaliação da permeabilidade intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). N = 3.

5.5 Produção de sIgA

Observou-se um aumento significativo na produção de sIgA nos animais do grupo DSS, enquanto o tratamento com a bifidobactéria nos animais dos grupo Bífido e Bifido+DSS manteve os níveis da imunoglobulina próximos ao nível basal (Figura 21). Foram observados os valores de 1445 para CTL, 1583 para Bifido, 1950 para DSS e 1084 para Bifido+DSS.

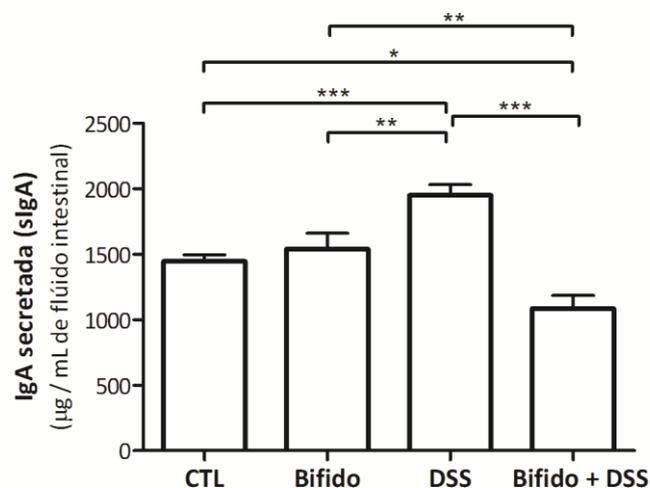


Figura 21 – Avaliação da produção de imunoglobulina A secretada (sIgA). Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). N = 12.

5.6 Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).

Observa-se que os animais do grupo DSS apresentaram infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de eosinófilos (0,7268) (Figura 22A). Houve uma tendência à redução do infiltrado eosinofílico com o tratamento com a bifidobactéria (0,4285, grupo Bifido+DSS).

O perfil do infiltrado de neutrófilos (Figura 22B) foi muito semelhante ao do infiltrado de eosinófilos. Houve um aumento significativo de neutrófilos nos animais do grupo DSS (0,4678) e uma redução significativa dessas células no grupo Bífido+DSS (0,2163).

A avaliação da presença de macrófagos no cólon (Figura 22C) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos.

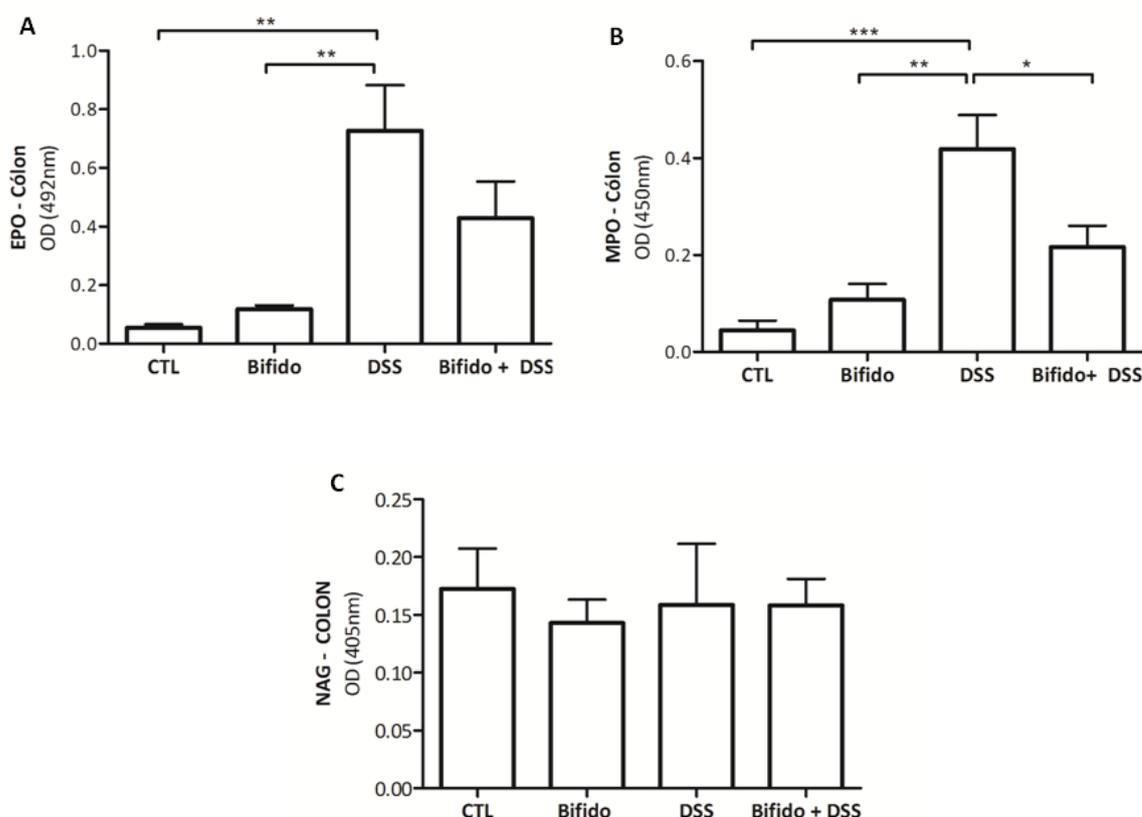


Figura 22 – Avaliação qualitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no cólon, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$). N = 6.**

5.7 Dosagem de citocinas

O DSS induziu o aumento de citocinas recrutadoras de eosinófilos (eotaxina/CCL-11) (Figura 23A) e de neutrófilos (KC/CXCL-1) (Figura 23B) no cólon. Porém a redução observada no grupo Bifido+DSS quando compara aos do grupo DSS foi significativa apenas para KC.

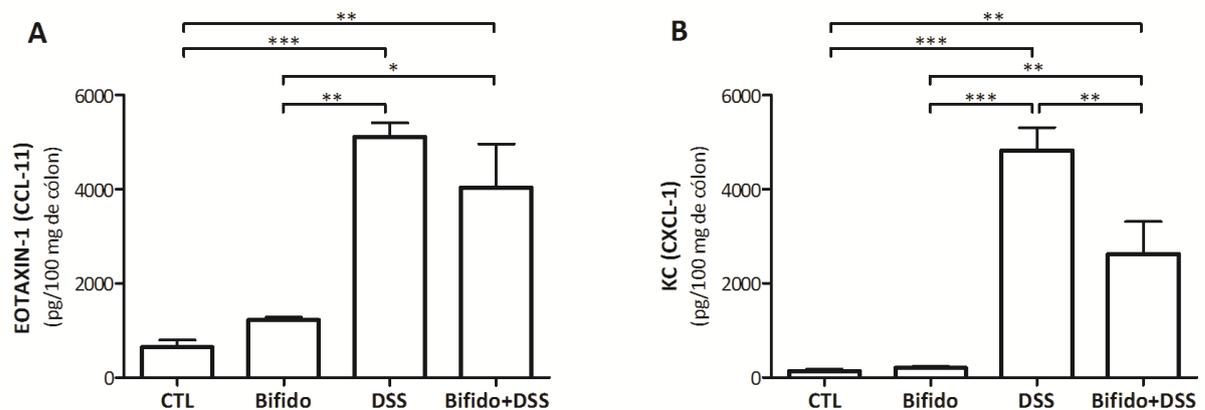


Figura 23 – Quantificação de citocinas recrutadoras de (A) eosinófilos (Eotaxina/CCL-11) e (B) neutrófilos (KC/CXCL-1) no cólon. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. N = 6. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.8 Avaliação da geração de ROS no soro

A avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no soro (Figura 24) mostrou que houve um aumento significativo de ROS no grupo DSS. Além disso, verificou-se que a bifidobactéria não induziu a geração de ROS e o grupo Bifido+DSS apresentou uma tendência à redução na geração de ROS, mas que não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo DSS ($p = 0.1229$).

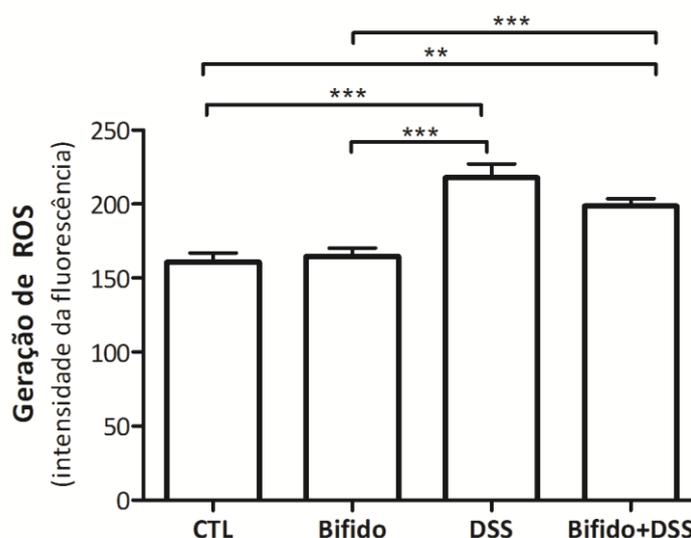


Figura 24 – Avaliação qualitativa da presença de ROS do soro. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. N = 8. (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5.9 Resumo dos resultados

Avaliação clínica: o tratamento com *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 foi capaz de reduzir os sinais clínicos da colite ulcerativa como a perda de peso, sangramento e consistência das fezes. Por outro lado, não foi eficiente na melhora do parâmetro que avaliou a relação entre o peso e o comprimento do cólon.

Histologia: Os animais não apresentaram danos no fígado ou no intestino delgado. No cólon, foram observadas lesões dispersas pelo órgão dos animais tratados com DSS, mas com maior concentração na região distal, além de descaracterização da mucosa intestinal. Verificou-se que o perímetro do cólon com edema foi reduzido no grupo tratado com o probiótico. Houve, ainda, uma tendência à redução da superfície lesionada do cólon quando a terapia foi realizada. O perfil de produção de mucinas não foi alterado pelo tratamento com a bifidobactéria. E houve uma tendência, ainda que não significativa, ao aumento do diâmetro das placas de Peyer, provavelmente induzido pelo DSS e pela bactéria, parecendo haver um aumento ainda maior no grupo Bifido+DSS, que associa o tratamento com a bactéria e a indução de colite.

Permeabilidade: o tratamento com a bifidobactéria reduziu de forma significativa a permeabilidade intestinal nos animais com colite ulcerativa.

Produção de sIgA: os animais com colite apresentaram um aumento na produção de sIgA, enquanto os animais que receberam a terapia probiótica, apresentaram os níveis desse anticorpo reduzidos em comparação ao controle.

Dosagem de EPO, MPO e NAG: Verificou-se a presença de infiltrado de neutrófilos e eosinófilos nos grupos com colite ulcerativa, havendo redução no grupo tratado com a bifidobactéria. Não houve alteração no perfil de macrófagos.

Dosagem de citocinas KC e eotaxina-1: As citocinas recrutadoras de eosinófilos (eotaxina-1) e de neutrófilos (KC) apresentaram-se aumentadas nos grupos com colite, porém reduzidas no grupo que utilizou o tratamento probiótico.

Stress oxidativo: a bifidobactéria não induziu a geração de ROS e o grupo Bífido+DSS apresentou uma tendência à redução na geração de ROS quando comparada ao grupo com colite induzida.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, objetivamos avaliar o potencial probiótico da bactéria *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 como tratamento bioterapêutico para UC, utilizando como modelo a indução da doença pelo DSS em camundongos BALB/c. A bifidobactéria utilizada nesse estudo pertence à coleção de culturas da Christian Hansen, Dinamarca, e nos foi enviada pela empresa.

Em uma revisão sobre bifidobactérias, Lee e O'Sullivan (2010) citam diversos estudos que mostram o potencial probiótico das bactérias do gênero *Bifidobacterium*. Dentre eles, destacamos aqui alguns estudos que correlacionam efeitos benéfico a administração da espécie probiótica *B. longum*:

- Qiao et al (2002) mostraram o efeito protetor de *B. longum* subsp. *infantis* contra diarreia rotaviral ($p < 0,001$).
- Jiang et al (1996) observaram redução da expiração de hidrogênio ($p < 0,05$) em pacientes com intolerância a lactose após a administração do probiótico.
- McCarthy et al (2003) detectaram a redução de citocinas pró-inflamatórias (IFN γ , TNF α e IL-12) por *B. longum* subsp. *infantis* em camundongos.
- *B. longum* foi capaz de aumentar a produção de IgA de mucosa em camundongos no estudo proposto por Takahasi et al (1998).
- Furrie et al (2005) observaram que após a administração de *B. longum* em pacientes com UC estes não apresentaram alterações significativas nos escores clínicos, mas foi detectada uma diminuição ($p < 0,05$) na expressão de genes humanos de citocinas pró-inflamatórias após a administração da bactéria associada a prebióticos (inulina e frutooligossacarídeos).
- Em pacientes com síndrome do intestino irritável, O'Mahony et al (2005) observaram redução nos escores clínicos e na proporção das citocinas IL-10 e IL-12, anti- e pró-inflamatórias, em concordância com os níveis de indivíduos saudáveis.
- Rowland et al (1998) perceberam uma redução discreta na indução carcinogênica de focos de cripta aberrantes quando suplementados com *B. longum* e significativa quando associaram inulina à administração da bactéria.

Os modelos animais possuem limitações e não apresentam a complexidade da doença humana, mas são ferramentas importantes e indispensáveis para o estudo do envolvimento dos diferentes fatores (genéticos, ambientais e imunológicos) na patogênese da UC e na avaliação de possíveis terapias, dentre as quais incluem-se os probióticos. A escolha do modelo de colite induzida pelo DSS ocorreu devido, principalmente, à sua semelhança com a doença humana e consequente possibilidade de inferência dos resultados para seres humanos (Perše & Cerar 2012). Além disso, esse modelo é utilizado para se estudar as contribuições dos mecanismos do sistema imune inato na colite. Comumente, a indução de colite em camundongos é realizada utilizando-se solução de DSS em concentrações variando entre 3% e 5%, dependendo do modelo animal utilizado (Claes et al. 2011; Johansson et al. 2010, Wirtz et al. 2007). Nesse trabalho optamos pela concentração de 3,5% por ser uma concentração que observamos causar doença nos animais, sem levá-los ao óbito no período do experimento.

Esse modelo de colite é caracterizado por diarreia sanguinolenta iniciada após 4-7 dias do início do tratamento, ulcerações e infiltrados com células granulosas que podem ser observados após 120 h (Claes et al. 2011; Johansson et al. 2010; Wirtz et al. 2007). Dessa forma, leva ao aparecimento de sinais clínicos típicos da doença como perda de peso, sangramento e alteração na consistência fecal (Perše & Cerar 2012).

A avaliação ponderal (Figura 12), na qual consideramos a perda de peso dos animais, mostrou que, como é esperado de uma bactéria probiótica, a administração sozinha de *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 não causou perda de peso nos camundongos, e houve redução na perda de peso quando administrada aos animais com colite. Quando consideramos, além do peso, os outros sinais citados, foi possível estabelecer um *score* denominado índice diário de atividade da doença (DAI – *Disease Activity Index*) (Figura 13) que varia de 0 a 10. Os parâmetros clínicos para estabelecimento do DAI são medidas compreensivas e consistem na avaliação de sinais semelhantes aos observados em humanos com UC. Um significativo decréscimo no valor do final do DAI é considerado como sucesso na utilização de uma referida terapia (Osman et al. 2004). Osman et al. (2004) demonstraram tanto o efeito de diferentes linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em reduzir o DAI num modelo de colite induzida por DSS, como o fato de que essa melhora difere entre as diferentes linhagens. No nosso trabalho, os valores finais do DAI mostram que a administração de *B. longum* *infantis* CHCC2228 promoveu melhora na saúde dos animais, reduzindo de

forma expressiva os sinais da doença. A análise dos resultados de peso e comprimento do cólon (figura 14) mostra que houve um encurtamento do cólon associados ao aumento do peso. Isso sugere a ocorrência de um espessamento da parede colônica devido à presença de infiltrado inflamatório e/ou edema – índices avaliados na análise histológica (Figuras 16 e 17).

Nossos resultados são corroborados pelo estudo de Jadhav et al. (2013) no qual os animais tratados com Dahi (leite de búfala fermentado contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum*) apresentaram uma melhora significativa nos escores clínicos. Os autores sugerem uma extrapolação para um quadro clínico humano: menor detecção de sangue nas fezes significa menos perda de sangue que, por sua vez, implica em um quadro menor de hemorragia e dano ao epitélio colônico, menor permeabilidade intestinal e susceptibilidade a infecções, levando, finalmente, a um quadro reduzido de desconforto e de melhora das condições para o paciente. Esse aspecto de redução de perda de peso e do sangramento retal observado no grupo Bifido+DSS pode ter importância clínica.

A colite ulcerativa consiste em uma inflamação difusa da mucosa que se estende proximalmente a partir do reto, variando de intensidade. Em conjunto com essa grave inflamação e produção de uma complexa variedade de mediadores inflamatórios, uma ulceração superficial da mucosa intestinal se desenvolve (Xavier & Podolski 2007). Por sua vez, o DSS age distalmente no intestino, sendo diretamente tóxico às células colônicas epiteliais das criptas basais e, assim, afetando a integridade da barreira de mucosa do intestino grosso aumentando a permeabilidade e a translocação de bactérias do lúmen e de antígenos (Claes et al. 2011; Neurath 2012; Johansson et al. 2010; Wirtz et al. 2007).

Dentre as características histopatológicas normalmente observadas no cólon de pacientes com UC cita-se: depleção de células caliciformes e na produção de mucinas, degeneração epitelial e necrose, levando à descaracterização do tecido epitelial. Observa-se ainda infiltrados de linfócitos, plasmócitos e granulócitos na lâmina própria e submucosa e a localização retal das lesões (Danese & Fiocchi 2011, Perše & Cerar 2012, Xavier & Podolski 2007).

Os resultados histológicos (Figuras 16 e 17) foram condizentes com as características já descritas na literatura, onde os danos teciduais foram restritos ao cólon, não havendo lesão no intestino delgado. O mecanismo pelo qual o DSS induz uma forte inflamação na mucosa do cólon distal quando comparado ao cólon proximal ainda não é compreendida (Yan et al. 2009).

Além da análise histológica de rotina, realizamos a análise morfométrica do cólon (Figura 19) para quantificar as alterações observadas. Observamos que o tratamento com o probiótico reduziu a superfície com edema (Figura 19B) e apresentou tendência a diminuição das áreas lesionadas (Figura 19A).

O DSS é tóxico para as células epiteliais do cólon e causa alterações na integridade da barreira epitelial, o que aumenta a permeabilidade da mucosa colônica, que, por sua vez, permite a passagem de moléculas grandes como o DSS. As alterações incluem a perda de componentes das junções celulares como a ZO-1 (Perše & Cerar 2012, Yan et al. 2009). A importância das barreiras epitelial e de muco é demonstrada em diferentes modelos de colite nos quais os camundongos apresentam alterações na produção de muco ou na interação, homeostase ou reparo das células epiteliais. Isso fica evidente nos modelos de UC que baseiam-se na depleção dessas barreiras, como, por exemplo a colite induzida por DSS, bem como camundongos deficientes para *Muc2*, *XBP-2*, *Mdr1a*, e com deleção de componentes específicos do NF- κ B das células epiteliais (Uhlir & Powrie 2009).

O epitélio colônico é coberto por uma camada de muco que protege as células contra estresse mecânico, substâncias do lúmen e patógenos. Por serem componentes estruturais da camada de muco, alterações na quantidade, secreção e estrutura da mucina podem resultar na queda da proteção do epitélio do cólon. Em humanos com UC, são reportadas alterações no número de células caliciformes, aderência do muco e síntese, secreção e sulfatação da mucina. Além disso, as células caliciformes possuem menos mucina, estão em menor número e possuem atividade reduzida na UC ativa, resultando em uma camada mais frouxa quando comparada aos grupos controle. Defeitos na camada de muco podem, ainda, influenciar no padrão de colonização microbiana e na manutenção da estrutura e da função da comunidade microbiana (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011; Matricon et al. 2010; Renes et al. 2002).

Houve uma redução visível no número de células caliciformes nos grupos com colite induzida pelo DSS (figura 18), havendo, inclusive, grandes áreas com ausência de muco, mas não houve aumento na produção de mucina quando os animais foram tratados com o probiótico (Figura 19D).

Acredita-se que a perda da função de barreira do epitélio é o evento inicial que incita a injúria e a inflamação em várias desordens intestinais, incluindo as IBDs. Esses defeitos de barreira resultam na migração de antígenos luminiais para a submucosa, expondo as células

imunes da lâmina própria a esses antígenos, desencadeando a resposta inflamatória e o dano ao epitélio, que são característicos dessas doenças (Yan et al. 2009).

Estudamos possíveis alterações na função de barreira do epitélio intestinal utilizando o método do FITC-dextran. A análise *in vivo* da permeabilidade intestinal, consistiu na inoculação intragástrica de dextrano marcado com fluoresceína que, em caso de aumento na permeabilidade intestinal, atravessa o epitélio, atingindo a corrente sanguínea, podendo ser dosado posteriormente pela fluorescência do soro. O tratamento com o probiótico foi capaz de melhorar a integridade da barreira intestinal, por meio da redução da permeabilidade intestinal (figura 20).

Para avaliarmos se essa redução resultou em possíveis efeitos sistêmicos, analisamos histologicamente o fígado (Figura 15) dos animais, porém não observamos danos no órgão.

Para avaliar a constituição dos infiltrados inflamatórios, que são descritos na literatura como sendo caracterizados principalmente pela presença de eosinófilos e neutrófilos, realizamos experimentos que dosaram enzimas específicas desses dois tipos celulares (EPO e MPO, respectivamente – figura 22) e de suas quimiocinas recrutadoras (Eotaxina-1 e KC, respectivamente – figura 23).

Uma característica comum observada em biópsias de pacientes com IBDs são os infiltrados de eosinófilos, particularmente na UC (Barrie et al. 2012, Hogan et al. 2012, Stasikowska-Kanicka et al. 2012). Eosinófilos são leucócitos granulócitos com papel na defesa inata da mucosa do hospedeiro, principalmente contra helmintos. Essas células promovem a inflamação pela liberação de proteínas granulares tóxicas e radicais livres, bem como pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas. Elas também estimulam o sistema imune adaptativo pela apresentação de antígenos e recrutamento de células T (Barrie et al. 2012). Apesar de geralmente estarem em baixas quantidades nos infiltrados leucocitários, os eosinófilos parecem estar relacionadas às alterações morfológicas observadas, bem como à gravidade da doença e as disfunções gastrointestinais. Acredita-se que eles desempenhem papel combatendo a microbiota intestinal na UC (Hogan et al. 2012) e que tenham participação modulando tanto vias de danos quanto de reparo tecidual. Eosinófilos originam-se na medula óssea e migram para o trato gastrointestinal sob influência, principalmente, das quimiocinas IL-5 e eotaxina-1, superexpressas nas IBDs (Barrie et al. 2012).

Eosinófilos expressam receptores de reconhecimento de padrão (como os TLRs), produzem citocinas pró-inflamatórias e proteínas catiônicas (como a peroxidase eosinofílica, EPO) que possuem atividade antibacteriana, além de serem capazes de produzir NETs (redes de DNA mitocondrial lançadas no meio extracelular para capturar bactérias) (Hogan et al. 2012). Em resposta aos estímulos (imunoglobulinas e citocinas), os eosinófilos podem secretar uma gama de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-13, IL-16, IL-18, TGF- α e TGF- β), quimiocinas (RANTES e eotaxina-1) e mediadores lipídicos (PAF e leucotrieno C4). Essas moléculas possuem importantes efeitos inflamatórios, que incluem o aumento da expressão de sistemas de adesão, modulação do tráfego intracelular e alterações no estado celular de ativação, além de afetar a permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição de músculos lisos. Além disso, as proteínas granulares (MBP, ECP e EPO e EDN) podem causar graves danos teciduais, inclusive efeitos sistêmicos no coração, cérebro e epitélio brônquico (Hogan et al. 2002).

Considerando-se os resultados obtidos (figuras 22A e 23A), observamos uma tendência à diminuição de eosinófilos e da citocina eotaxina no cólon dos camundongos do grupo Bifido+DSS, quando comparados ao grupo DSS. Porém, não sendo a eotaxina a única citocina envolvida no recrutamento desse tipo celular, outras dosagens de citocinas, como a IL-5 e a IL-13 – que são, tipicamente, produzidas em excesso em pacientes com UC ativa – seriam necessárias.

Outro tipo celular encontrando em grande quantidade nos infiltrados inflamatórios na mucosa inflamada da UC é o neutrófilo. A atividade da doença, portanto, não está ligada somente à presença de eosinófilos, mas também ao influxo de neutrófilos que migram para a mucosa e, posteriormente, para o lúmen intestinal, resultando na formação dos abscessos de criptas. Além disso, a circulação de neutrófilos ativados, que são uma grande fonte de citocinas inflamatórias e possuem uma maior sobrevivência, está elevada na UC ativa. Medimos a atividade da MPO colônica como um indicador da extensão do infiltrado neutrofílico na mucosa. A enzima MPO está presente nos grânulos de neutrófilos e tem função bactericida ao gerar ROS (Naito et al. 2007). Dentre as diversas fontes de formação de ROS, a MPO se destaca pelo seu papel no tecido intestinal inflamado. A enzima MPO é primariamente derivada do infiltrado de neutrófilos e está envolvido na geração de ácido hipocloroso, um potente oxidante capaz de induzir danos teciduais (Zhu & Li 2012).

Em humanos, além da acumulação de neutrófilos observada em biopsias retais, há um aumento na produção da proteína recrutadora desse tipo celular, a IL-8. Em modelos murinos essa migração celular é induzida pela quimiocina CXCL-1 (KC) (Vieira et al. 2009).

Nesse trabalho observamos redução significativa nos níveis da atividade da MPO (figura 22B) e na produção da quimiocina KC (figura 23B) no grupo Bifido+DSS.

Juntos, os resultados das figuras 22 e 23 sugerem uma participação do probiótico na regulação da produção de citocinas próinflamatórias e recrutadoras de leucócitos, reduzindo sua produção e, dessa forma, contribuindo para a melhora do quadro inflamatório.

Existem evidências que sugerem que a inflamação intestinal crônica está associada com o aumento na produção de ROS. Assim, uma maior produção de ROS e consequentemente o estresse oxidativo e a modulação redox parecem ter um papel importante na patofisiologia das IBDs tanto em modelos animais como em pacientes humanos (Zhu & Li 2012).

As ROS são bioprodutos naturais formados a partir do metabolismo do oxigênio, e são moléculas altamente reativas por possuírem elétrons desemparelhados. Para regular o efeito destrutivo das ROS, as células estão equipadas com sistemas de defesa antioxidante intrínsecos. Observamos o estresse oxidativo quando há um desbalanço entre a produção de ROS e sua remoção pelos agentes antioxidantes (Rezaie et al. 2007).

O aumento na produção de ROS (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peroxinitrito) na mucosa colônica de animais e pacientes com IBD já foi demonstrado. De forma contrária, as defesas antioxidantes (glutathione, cobre-zinco superóxido dismutase [Cu-ZnSOD]) estão reduzidas. Apesar desses dados não necessariamente estarem estabelecidas como causa das IBDs, podem influenciar a patofisiologia das doenças (Zhu & Li 2012).

Quando as ROS são geradas próximas à membrana celular, possivelmente pelas células epiteliais, pode ocorrer, em cadeia, a peroxidação dos fosfolipídios de membrana (Naito et al. 2007). O estresse oxidativo induz tanto o dano tecidual direto, quanto leva à desregulação da sinalização redox, que leva à ativação de NF- κ B e o subsequente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (Zhu & Li 2012).

Houve um aumento na geração de ROS nos grupos com UC induzida por DSS (DDS e Bifido+DSS) quando comparados aos grupos CTL e Bifido(figura 24); havendo uma discreta redução no grupo Bifido+DSS. Como a geração do estresse oxidativo depende da relação

entre a geração de ROS e de defesas antioxidantes, não podemos afirmar a forma como o probiótico está atuando. A avaliação da produção de agentes antioxidantes será avaliada posteriormente.

A sIgA é um anticorpo com papel crítico na imunidade de mucosa, atuando como barreira contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal. Essa imunoglobulina liga-se a moléculas da superfície bacteriana prendendo o micro-organismo no muco e prevenindo a translocação através do epitélio (Martins et al. 2009). Anticorpos secretados, como a IgA, são produzidos pelas células B da lâmina própria do intestino e secretadas no muco pelas células epiteliais, onde agem como importantes componentes da barreira mucosa. Esses anticorpos influenciam a microbiota comensal e contribuem substancialmente na capacidade do muco a reter e eliminar potenciais patógenos. Esses anticorpos exercem melhor sua função ao serem retidos no muco do que se fossem simplesmente dispersos no lúmen intestinal (McGuckin et al. 2011).

A resposta de sIgA estabelece e mantém a relação não inflamatória entre as células do hospedeiro e a microbiota e é requerida para a homeostase imunológica local e sistêmica. Nem todos os membros da microbiota são igualmente eficazes na indução da secreção de sIgA – bactérias Gram-negativo são mais eficientes do que as Gram-positivo, por exemplo. A ausência de IgA intestinal pode resultar no crescimento exacerbado de alguns membros da microbiota comensal. Indução de IgA pode, assim, afetar a competição entre vários membros da microbiota – modificações na secreção induzida de IgA pode selecionar micro-organismos específicos da microbiota comensal e promover um quadro inflamatório induzido por essa microbiota (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011).

A avaliação da produção de sIgA (figura 21) mostrou que houve um aumento na produção dessa imunoglobulina nos animais do grupo DSS. Como houve uma redução na produção de muco (dados da histologia) associados à ação mucolítica do DSS (Wirtz et al. 2007), sugerimos ter havido uma maior liberação do anticorpo no fluido intestinal, devido a uma redução da sua retenção na camada de muco.

Probióticos podem atuar como uma barreira contra patógenos por meio de mecanismos como a produção de lactato e acetato, a competição por nutrientes e sítios de ligação no intestino, imunomodulação e a indução ou produção de agentes microbianos específicos (Osman et al. 2004). Probióticos como as bifidobactérias e os lactobacilos, inibem o crescimento de patógenos pela liberação de fatores antimicrobianos e por competirem com

patógenos pelos limitados receptores das células epiteliais (Kruis 2004; Sartor 2004). Diversos estudos demonstram os efeitos de probióticos no tratamento das IBDS (Campieri & Gionchetti 1999; Collins & Gibson 1999).

Diferentes linhagens de *Bifidobacterium*, mesmo pertencendo a uma mesma espécie, e, portanto, compartilhando uma série de características, podem desempenhar papéis funcionais diferentes, até mesmo opostos (López et al. 2010). Várias linhagens de *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* e *B. infantis*) resultam na melhora da inflamação intestinal induzida por DSS, tanto quando administradas diretamente quando sob a forma de leite fermentado (Osman et al. 2006; Matsumoto et al. 2001; Setoyama et al. 2003), reduzindo *scores* histopatológicos, atividade da MPO, TNF e aumentando níveis de IL-10 (Damaskos & Kolios 2008).

Em ensaios clínicos, por outro lado, existem relatos de leites fermentados com bifidobactéria com sucesso (Ishikawa et al. 2003; Kato et al. 2004) ou sem sucesso (Laake et al. 2003) (Damaskos & Kolios 2008). Um ensaio clínico mostrou que um leite fermentado com adição de *Bifidobacterium* foi eficaz na manutenção da remissão e possui possíveis efeitos preventivos na recidiva da UC (Ishikawa et al. 2003).

Os dados apresentados neste trabalho, contudo, não nos permitem concluir qual o mecanismo responsável pela melhora observada nos animais. Os resultados citados dos ensaios clínicos com leites fermentados podem sugerir um possível efeito de metabólitos produzidos pela bifidobactéria e que seriam liberados no sobrenadante do meio de cultivo. Nesse ponto podemos questionar se, com a substituição do caldo MRS por salina para a gavagem dos animais, acabamos perdendo alguma substância ativa importante no processo.

Outro ponto a ser levantado seria a possibilidade de haver um efeito sinérgico caso essa bactéria fosse administrada em conjunto com outras espécies ou linhagens probióticas, como é o caso do produto VSL#3, que, juntamente com a *E. coli* Nissle 1917, é utilizada com sucesso no tratamento de UC.

Sabemos que a fermentação de fibras pela microbiota intestinal leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como acetato, butirato e propionato. Esses AGCCs são frequentemente produzidos no cólon e, sua aplicação sob a forma de enema, já foi demonstrada como um possível tratamento para IBDS, o que permite associar uma dieta rica em fibras alimentares a benefícios à saúde do paciente no contexto das IBDS (Marsland 2012). Quando observamos alterações na microbiota comensal de pacientes com UC, verifica-se uma

redução em *Bacteroides* e *Bifidobacterium* e, conseqüentemente, nos níveis de produção de AGCCs. Observa-se, ainda, que a ingestão de fibras alimentares fermentáveis, ou de AGCCs, parece ser benéfica para pacientes com UC. Esses AGCCs ligam-se ao GPR43 e possui diversos efeitos anti-inflamatórios (Maslowski et al. 2009).

Em modelo de colite em camundongos C57Bl/6 *Gpr43*^{-/-} *germ-free* o tratamento com acetato melhorou significativamente os sinais da doença como: tamanho do cólon, DAI e níveis de MPO. Além de estar presente em neutrófilos e eosinófilos, o GPR43 é expresso em colonócitos, e induzem, dentre diversas funções, a proliferação (Maslowski et al. 2009).

Considerado o exposto, um possível mecanismo de ação para explicar os resultados encontrados poderia ser a produção de AGCC, como o acetato, pela *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228.

Durante o processo de padronização dos modelos para este projeto, realizamos um experimento de indução de colite crônica utilizando-se uma dose de DSS a 3% e camundongos de ambos os sexos. Porém, após o período de sete dias de indução da colite, os animais não foram sacrificados, e tiveram seu peso avaliado por 10 dias. O resultado desse experimento pode ser observado na figura 25.

Os resultados sugerem que a *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 teria capacidade de atuar não só reduzindo os sintomas da UC, mas acelerando a recuperação dos animais. Para uma visão mais próxima de um quadro clínico real, seria interessante que fosse realizado um experimento de indução crônica de colite, no qual os animais têm três ciclos alternados de indução de colite pelo DSS e de recuperação, quando recebem novamente água (Wirtz et al. 2007).

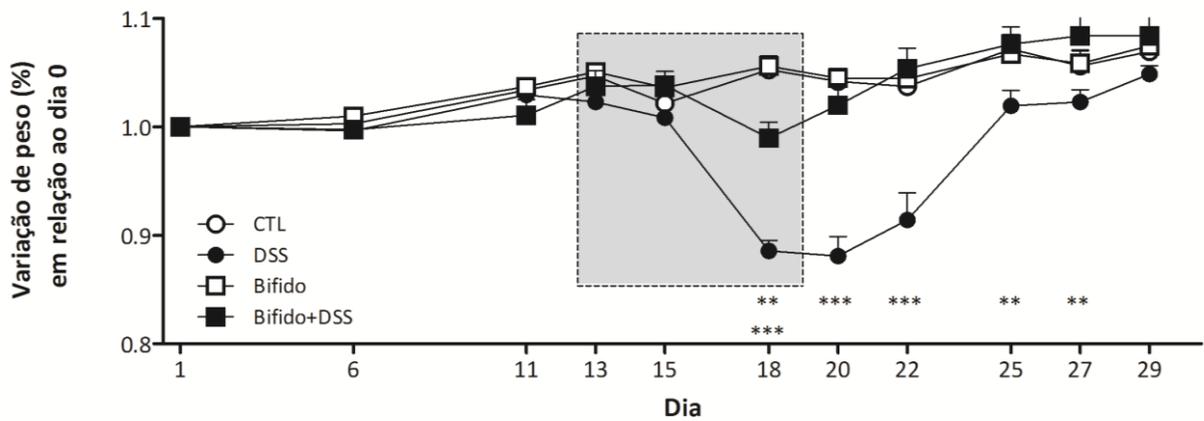


Figura 25 – Desenvolvimento ponderal com acompanhamento posterior ao período de indução da colite. O quadro sombreado no fundo do gráfico indica o período no qual os animais estavam recebendo o DSS para a indução da colite. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o grupo DSS e os demais, apenas no dia 18, os asteriscos superiores indicam diferença entre o grupo Bifido+DSS e os grupos CTL e Bifido. O grupo Teste: ANOVA two-way, seguido por post-teste de Bonferroni. N = 12.

7. CONCLUSÃO

A partir análise dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a bactéria *B. longum* subsp. *infantis* CHCC2228 possui potencial probiótico, tendo apresentado efeito protetor no modelo murino agudo de UC induzida por DSS. Apesar de não ter apresentado sucesso em todos os aspectos avaliados, a bactéria promoveu melhora dos sinais clínicos e redução do infiltrado inflamatório e da permeabilidade intestinal – aspectos importantes e que devem ser levados em consideração para um tratamento bioterapêutico para a UC. Outros estudos ainda devem ser realizados para avaliar os mecanismos de ação pelos quais os efeitos observados são desencadeados.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para uma possível continuidade deste trabalho, e maior esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em todos os processos citados, estão:

- avaliação da produção de substâncias antioxidantes, para uma avaliação mais precisa do estado de estresse oxidativo instalado nos animais com UC.
- a avaliação da translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos (por PCR em tempo real).
- a avaliação de possíveis alterações no microbioma intestinal dos camundongos por método independente de cultivo, para observar se há um reestabelecimento do equilíbrio ou uma redução da disbiose observada pelo quadro de colite.
- avaliação, por *Western blotting*, da ativação ou inibição de proteínas das vias de regulação de genes pró-inflamatórios: NF- κ B (subunidade p65/RelA fosforilada), e as MAPK (p38, JNK e ERK1/2).
- avaliação da função de barreira da mucosa, por expressão de mucina (PCR em tempo real) e de proteínas de junção como ZO-1 e ocludina (por PCR em tempo real ou por *Western blotting*).
- avaliação da produção de acetato da bifidobactéria.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert E, Walker J, Thiesen A, Churchill T, Madsen K. (2010). Cis-urocanic acid attenuates acute dextran sodiumsulphate-induced intestinal inflammation. *PLoS One*, 5:e13676.
- Arantes RME, Nogueira AMMF. (1997). Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell and Tissue Research*, 290:61-69.
- Arunachalam KD. (1999). Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, 19:1559-1597.
- Bailey PJ. (1988). Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*, 162: 327-334.
- Barrie A, Mourabet ME, Weyant K, Clarke K, Gajendran M, Rivers C, Park SY, Hartman D, Saul M, Regueiro M, Yadav D, Binion DG. (2012). Recurrent blood eosinophilia in ulcerative colitis is associated with severe disease and primary sclerosing cholangitis. *Digestive Diseases and Science*, 58:222-228
- Bennedsen M, Stuer-Lauridsen B, Danielsen M, Johansen E. (2011). Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2785-2787.
- Biavati B, Castagnoli P, Crociani F, Trovatelli LD. (1984). Species of the *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiologica*, 7:341-345.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50:117-131.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117-131.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. (2005). VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*, 100: 1539–1546.
- Bibiloni R. (2006). The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8):1141-1149.
- Blumberg RS. (2009). Inflammatory bowel disease: immunologic considerations. In: NJ Greenberger, RS Blumberg, R Burakoff (Eds.), *Current Diagnosis & Treatment in Gastroenterology, Hepatology, & Endoscopy* (1 ed., pp. 11-21). New York: McGraw-Hill.
- Boirivant M, Strober W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23:679-92.

- Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. (2009). Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clinical and Experimental Immunology*, 158:272-80.
- Calvert RJ, Otsuka M, Satchithanandam S. (1989). Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. *The Journal of Nutrition*, 119:1610-1616.
- Campieri M, Gionchetti P. (1999). Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative. *Gastroenterology*, 116:1246–1260.
- Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. (2011). The comensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140:1720-1728.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. (2001). MAP Kinases. *Chemical Reviews*, 101:2449-2476.
- Claes IJJ, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, Lebeer S. (2011). Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis. *Molecular & Nutrition Food Research*, 55:1441-1453.
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. (2006). *Legislação e Ética*. <http://www.cobea.org.br/>. Acessado em 30/06/2011.
- Collins MP, Gibson GR. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:s1052–s1057.
- Cuadrado A, Nebreda AR. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal*, 429:403-417.
- Cuenda A, Rousseau S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773:1358-75.
- Damaskos D, Kolios G. 2008. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microfora ‘on the scope’. *British journal of Clinical Pharmacology*, 65(4):453-467.
- Danese S, Fiocchi C. (2011). Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine*, 365:1713-1725.
- Danese S. (2012). New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut*, 61:918-932
- Di Gioia D, Aloisio I, Mazzola G, Biavati B. (2014). Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9:563-577
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology*, 102:448-455.

- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308:1635-1638.
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* (pp. 1-11). London, Ontario, Canada.
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied Environmental Microbiology*, 68:219-226.
- Fedorak RN. (2010). Probiotics in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterology & Hepatology*, 6:688-690.
- Fell JME. (2011). Update of the management of inflammatory bowel disease. *Archives of Disease in Childhood*, 97:78-83.
- Fiocchi C. (2003). Microbial factor in the pathogenesis of IBD. *Bioscience Microflora*, 22:5-14.
- Fujii A, Cook ES. (1973). Probiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidino acids and omega-guanidinoacyl-L-histidines. *Journal of Medical Chemistry*, 16:1409-1411.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. (2005). Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54:242-249.
- Goldin BR. (1998). Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80:S203-S207.
- Gomes AMP, Malcata FX. (1999). Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Biotechnologia Alimentar*, 64:12-22.
- Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 124:1767-1773.
- Hansson GC, Johansson ME. (2010). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes*, 1:51-54.
- Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. (2012). Eosinophil in infection and intestinal immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29:7-14.
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. (2003). Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *Journal of the American College of Nutrition*, 22:205-214.

- Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5:987-995.
- Jadhav SR, Shandilya UK, Kansal VK. (2013). Exploring the ameliorative potential of probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on dextran sodium sulphate induced colitis in mice. *The Journal of Dairy Research*, 80:21-27
- Jiang TA, Mustapha A, Savaiano DA. (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79:750–757.
- Johansson ME, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, Hansson GC. (2010). Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One*, 5:e12238.
- Johnson GL, Nakamura K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773:1341-8.
- Kaser A, Tilg H. (2008). Novel therapeutic targets in the treatment of IBD. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12:553-63.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology*, 28:573-621.
- Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20:1133–1141.
- Kim EK, Choi EJ. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802:396-405.
- Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. (2001). Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Experimental Animals*, 50:387–395.
- Kitajima S, Morimoto M, Sagara E. (2002) A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents. *Experimental Animals*, 51:203-6.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. (2000). Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Experimental Animals*, 49:9-15.
- Kokesova A, Frolova L, Kverka M, Sokol D, Rossmann P, Bartova J, Tlaskalova-Hogenova H. (2006). Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Folia Microbiologica (Praha)*, 51:478–484.

- Kolb H. (1955). Die Behandlung akuter Infekte unter dem Gesichtswinkel der Prophylaxe chronischer Leiden. Über die Behandlung mit physiologischen Bakterien. *Microecology and Therapy*, 1:15-19.
- Kollath W. (1953). Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, 8:Suppl 7-16.
- Kranich J, Maslowski KM, Mackay CR. (2011). Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Seminars in Immunology*, 23, 139-45.
- Kruis W. (2004). Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20(Suppl. 4):75–78
- Kyriakis JM, Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81:807-69.
- Laake KO, Line PD, Aabakken L, Lotveit T, Bakka A, Eide J, Roseth A, Grzyb K, Bjorneklett A, Vatn MH. (2003). Assessment of mucosal inflammation and circulation in response to probiotics in patients operated with ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38:409–414.
- Laroia S, Martin JH. (1991). Methods for enumeration and propagating bifidobacteria. *Cultured Dairy Products Journal*, 26:32-33.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98:1303-1315.
- Lee JH, O’Sullivan DJ. (2010). Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74:378-416.
- Lilly DM, Stillwell RH. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147:747-748.
- Loftus, EV (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126:1504-1517.
- López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. (2010). Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, 138:157-165.
- MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. (2011). Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology*, 140:1768-1775.
- MacDonald TT. (2003). The mucosal immune system. *Parasite Immunology*, 25:235-46.
- Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Mangin I, Touhami M, Bouziane-Nedjadi K, Pochart P. (2006). A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, 58:563-571.

- Maloy KJ, Powrie F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474:298-306.
- Marsland BJ. (2012). Regulation of inflammatory responses by the commensal microbiota. *Thorax*, 67:93-94.
- Martins FS, Elian SDA, Vieira AT, Tiago FCP, Martins AKS, Silva FCP, Souza ELS, Sousa LP, Araújo HRC, Pimenta PF, Bonjardim CA, Arantes RME, Teixeira MM, Nicoli JR. (2011). Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4): 359-364.
- Martins FS, Silva AA, Vieira AT, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, Nicoli JR. (2009). Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives in Microbiology*, 191(8):623-630.
- Martins FS. (2008). *Efeito de dois probióticos, Saccharomyces boulardii e Saccharomyces cerevisiae linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por Salmonella enterica subsp. enterica sorovar. Typhimurium*. Belo Horizonte: UFMG. 222 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Maslowski KM, Mackay CR. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology*, 12:5-9.
- Matricon J, Barnich N, Ardid D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonsense*, 1:299-309.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93:109-113.
- Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. (2001). Preventive effects of *Bifidobacterium*- and *Lactobacillus*-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion*, 64:92-99.
- Mazo JZ. (2009). *Isolamento, caracterização e viabilidade tecnológica de bifidobactérias de origem humana com atividade potencialmente probiótica*. Florianópolis: UFSC. 129 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.
- McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. (2003). Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, 52:975-980
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9:265-278.

- McManus JFA, Mowry RW. (1960). *Staining Methods, Histologic and Histochemical*. New York: Hober.
- Miyake T, Watanabe K, Watanabe T, Oyaizu H. (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology*, 42:661-667.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E. (2008). Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *Journal of gastroenterology*, 43:1-17.
- Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H, Targan SR. (2004). Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology*, 126:414-24.
- Nagalingam NA, Lynch SV. (2012). Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*, 18:968-84.
- Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. (2007). neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Biochemical Nutrition*, 41:18-26.
- Neurath MF. (2012), Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. *Digestive Diseases*, 30(suppl 1):91-94.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98:694-702
- Oliveira FM, Emerick AP, Soares EG. (2010). Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. *Ciência e Saúde Coletiva*, 15 (Supl.1):1031-1037.
- O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F, Quigley EM. (2005). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128:541-551.
- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. (2012). Ulcerative Colitis. *The Lancet*, 380:1606-1619.
- Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. (2004). Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotics strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Digestive Diseases and Sciences*, 49:320-327.
- Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. (2006). *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterology*, 6:1-10.

- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82:279-89.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5:e177.
- Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:21-26.
- Perše M, Cerar A.(2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012:718617
- Philippe D, Heupel E, Blum-Sperisen S, Riedel CU. (2011). Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *International Journal of Food Microbiology*, 149:45-9.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22:495-512.
- Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, Rich G, Riepenhoff-Talty M, Locniskar M. (2002). Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatric Research*, 51:750–755.
- Renes IB, Boshuizen JA, Van Nispen DJPM, Bulsing NP, Büller HA, Dekker J, Einerhand AWC. (2002). Alterations in Muc2 biosynthesis and secretion during dextran0sulfate sodium-induced colitis. *American Journal of Phisiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282:G382-G389.
- Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, 52:2015-2021.
- Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells*, 29:539-549.
- Rincón M, Davis RJ. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological Reviews*, 228:212-224.
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. (1998). Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19:281-285.
- Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. (2008). Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14:200-202
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:1936-1940

- Sartor RB. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology*, 126:1620–1633.
- Sartor RB. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3:390-407.
- Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:204-211.
- Scardovi V. (1986). Genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. P. 1418-1434.
- Setoyama H, Imaoka A, Ishikawa H, Umesaki Y. (2003). Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes and Infection*, 5:115–122.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. (2004). *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 2):401-406.
- Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 115:66-75.
- Sokol H, Lay C, Seksik P, Tannock GW. (2008). Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflammatory Bowel Diseases*, 14:858-67.
- Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. (2000). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 131:1800-1808.
- Souza MM, Belasco AGS, Aguilar-Nascimento JE. (2008). Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, 28:324-328.
- Stasikowska-Kanicka O, Danilewicz M, Glowacka A, Wagrowska-Danilewicz M. (2012). Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. *Advances in Medical Sciences*, 2:1-7.
- Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. (1985). Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods*, 83:209-215.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology*, 20:495-549.

- Strober W, Fuss IJ. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*,140:1756-67.
- Takahashi T1, Nakagawa E, Nara T, Yajima T, Kuwata T. (1998). Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Biosci Biochem*, 62:10-15.
- Tannock GW. (1999). *Probiotics: a Critical Review*. Wymondham: Horizon Scientific Press.
- Tannock GW. (2010). The bowel microbiota and inflammatory bowel diseases. *International Journal of Inflammation*, 2010:954051.
- Teitelbaum JE, Walker WA. (2002). Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, 22:107-138.
- Tissier H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique)*. Thèse de médecine de l'Université de Paris. 253 p.
- Tissier H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology*, 60:359-361.
- Triantadilidis JK, Merikas E, Georgopoulos F. (2011). Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drugs Design, Development and Therapy*, 5:185-210
- Turroni F, Marchesi JR, Feroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. (2009). Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *The ISME journal*, 3:745-751.
- Turroni F, van Sinderen D, Ventura M. (2011). Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 149:37-44.
- Uhlig HH, Powrie F. (2009). Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunology*, 39:2021-2026.
- Vasiljevic T, Shah N. (2008). Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18:714-728.
- Vasquez N, Mangin I, Lepage P, Seksik P, Duong JP, Blum S, Schiffrin E, Suau A, Allez M, Vernier G, Tréton X, Doré J, Marteau P, Pochart P. (2007). Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13:684-692.
- Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. (2007A). Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91:351-372.

- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. (2007B). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71:495-548.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:205-23.
- Vergin F. (1954). Anti- und probiotika. *Hippokrates*, 25:116-119.
- Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM. (2009). Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *The American Journal of Pathology*, 175:2383-2391.
- Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM. (2009). Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *The American Journal of Pathology*, 175(6):2382-2391.
- Wang IH, Joseph JA. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by a dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:612-616
- Weston CR, Davis RJ. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:142-149.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 2:541-546.
- Xavier RJ, Podolsky DK. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448:427-34.
- Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE*, 4:e6073.
- Ye RD. (2001). Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 70:839-48.
- Zhu H, Li YR. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Experimental Biology and Medicine*, 237:474-480.

ANEXO A – CERTIFICADO (CETEA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 47/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do probiótico *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CHCC2228 em modelos experimentais de inflamação intestinal**", que tem como responsável(is) **Flaviano dos Santos Martins**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 05/2011**.

Este certificado expira-se em **25/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 47/2011**, related to the project entitled "**Effects of probiotic *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CHCC2228 in experimental models of inflammatory bowel disease**", under the supervisors of **Flaviano dos Santos Martins**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 25, 2011**.

This certificate expires in **May 25, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Maio de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

ANEXO B – ATIVIDADES CURSADAS DURANTE O MESTRADO

| Período | Turma | Nome Atividade | Nota | Conc | Créd |
|----------------|--------------|--|-------------|-------------|-------------|
| 2011/1 | MIC824 | BACTERIOLOGIA DE ANAEROBIOS | 98 | A | 4 |
| 2011/1 | MIC842 | BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS | 93 | A | 3 |
| 2011/1 | MIC843 | CITOLOGIA E FISILOGIA DE MICROORGANISMOS | 90 | A | 5 |
| 2011/1 | MIC848 | BACTERIOLOGIA DE AEROBIOS | 100 | A | 4 |
| 2011/1 | MIC855 | BIOSSEGURANCA E BIOETICA | 97 | A | 2 |
| 2011/2 | MIC835 | TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA | 98 | A | 2 |
| 2011/2 | MIC849 | ECOLOGIA MICROBIANA DO TRATO DIGESTIVO | 100 | A | 2 |
| 2011/2 | MIC853 | MICROORGANISMOS PATOGENICOS | 100 | A | 3 |
| 2012/1 | MIC808 | SEMINARIOS EM MICROBIOLOGIA | 100 | A | 2 |
| 2012/1 | MIC827 | TOP.ESPECIAIS EM MICROBIOLOGIA | 99 | A | 1 |
| 2012/1 | MIC856 | TREINAMENTO DIDATICO EM MICROBIOLOGIA I | 100 | A | 2 |

ANEXO C – PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM PROJETOS E EVENTOS

1. PUBLICAÇÕES

- Martins FS, Elian SDA, Vieira AT, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, Souza EL, Sousa LP, Araújo HR, Pimenta PF, Bonjardim CA, Arantes RM, Teixeira MM, Nicoli JR. (2011). Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4):359-64
- Martins FS, Vieira AT, Elian SDA, Arantes RME, Tiago FCP, Sousa LP, Araújo HRC, Pimenta PF, Bonjardim CA, Nicoli JR, Teixeira MM. (2013). Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.

2. PARTICIPAÇÕES EM PROJETOS DE PESQUISA

- Efeitos da administração intragástrica de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228 em um modelo murino agudo de colite ulcerativa induzida por DSS.
- Efeito probiótico da bactéria *Escherichia coli* linhagem Nissle 1917 em modelo murino de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS).

3. PARTICIPAÇÕES EM CURSOS E EVENTOS

- “Imunologia básica e avançada 2011”, curso de extensão universitária – modalidade curso à distância, promovido pelo Departamento de Medicina Interna, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 14 de abril a 30 de junho de 2011.
- “VII Fórum de Microbiologia Prof. Edmar Chartone de Souza”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, no dia 01 de junho de 2011.
- “Aspectos microbiológicos, tecnológicos e funcionais de probióticos – Atualizações”, ministrado pelo Dr. Celso Gabriel Vinderola, da Universidade Del Litoral, Santa Fé, Argentina, nos dias 17 e 18 de maio de 2011, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

- “26º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2011)”, realizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, de 2 a 6 de outubro de 2011, no Rafain Palace Hotel e Convention Center, em Foz do Iguaçu, Paraná
 - Pôster: *Saccharomyces boulardii* prevents *Salmonella* infection via inhibition of bacterial translocation and tissue inflammation. Autores: Martins FS, Elían SDA, Vieira AT, Paula LMR, Arantes RME, Tiago FCP, Sousa LP, Bonjardim CA, Nicoli JR, Teixeira MM.
 - Pôster: Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. Autores: Martins FS, Souza ELS, Elían SDA, Vieira AT, Tiago FCP, Sousa LP, Bonjardim CA, Arantes RME, Nicoli JR, Teixeira MM.
 - Pôster: influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and goldfish (*Carassius auratus*). Autores: Silva FCP, Nicoli JR, Martins FS, Elían SDA, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ.
- “International Society for Microbial Ecology – Latin America ISME Symposium 2011”, realizado durante o 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2011), de 2 a 6 de outubro de 2011, no Rafain Palace Hotel e Convention Center, em Foz do Iguaçu, Paraná
- “Simpósio Internacional de Bactérias Láticas”, realizado durante o 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM 2011), de 2 a 6 de outubro de 2011, no Rafain Palace Hotel e Convention Center, em Foz do Iguaçu, Paraná
- “VIII Fórum de Microbiologia Professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho”, promovido pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 23 e 24 de maio de 2012.
- “XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM)”, realizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, de 28 de outubro a 1 de novembro de 2012, no Mendes Convention Center, em Santos/SP.
 - Pôster: Efeito probiótico da bactéria *Escherichia coli* Nissle 1917 em modelo murino de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextran (DSS). Autores: Souza ELS, Elían SDA, Paula LM, Vieira AT, Teixeira MM, Arantes RME, Nicoli JR, Martins FS.
 - Pôster: Efeitos da indução de colite ulcerativa por DSS em camundongos BALB/c tratados ou não com *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CHCC2228. Autores: Elían SDA, Souza ELS, Paula LM, Vieira AT, Teixeira MM, Arantes RME, Nicoli JR, Martins FS.