

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Administração oral das bactérias probióticas *Lactobacillus* spp. controla a translocação bacteriana e reduz a ileíte experimental induzida por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6

Romulo Oliveira de Sousa

Uberlândia
Maio de 2013

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Administração oral das bactérias probióticas *Lactobacillus* spp. controla a
translocação bacteriana e reduz a ileíte experimental induzida por
Toxoplasma gondii em camundongos C57BL/6

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do
título de Mestre.

Mestrando: Romulo Oliveira de Sousa
Orientadora: Dr^a Neide Maria da Silva

Uberlândia
Maio de 2013

Dedicatória

Aos meus pais por todo apoio, amor e incentivo que deram a mim e aos meus irmãos. Por terem me ensinado os verdadeiros valores que me guiaram até aqui e me guiarão por toda a vida...

À minha amada (Lay) por me transformar numa pessoa melhor, por sua amizade, amor e companheirismo que aumentam a cada dia que passo ao seu lado...

Aos meus irmãos Fábio e Tiago por torcerem por mim sempre...

À dona Cida por ter adotado a mim e a Lay como filhos...

Agradecimentos

A **Deus** por ter me guiado pelos caminhos certos

À **Profª Neide** por me orientar e me ensinar o trabalho científico com seriedade e responsabilidade e por confiar em mim;

À **Profª Jane** por ter me aceitado como aluno de IC e por ter despertado a vontade de aprender a fazer pesquisa;

À minha família que sempre torce por mim e também faz parte desta conquista;

Ao **Paulo Víctor** por ter me ajudado desde o primeiro dia que cheguei aqui e ainda continua me ajudando, obrigado de coração;

Aos colegas de laboratório **Poliana, Loyane, Ester, Paulo Víctor, Lay, Luciana, Mário, Alexsandra, Karine, Nathália, Marisol e Thomas** por me ajudarem nos sacrifícios dos animais, muito obrigado;

À tia **Luzia, Jair, Loló, Vinicius e Sofia** por terem nos acolhido como parte da família

Aos técnicos da histologia **Fabrício, Juscélia, Mariani, Eliete, Rosiane, Ester** que me ajudaram muito desde o início;

Às “meninas da Eloísa” **Angélica, Mariana, Priscila, Mayara, Janice, Andressa, Pâmela** que sempre foram companheiras e tão dispostas a ajudar;

Às professoras **Letícia Filice** e **Bellisa** por terem sempre auxiliado quando precisei;

Às técnicas do Programa de Imunoparasitologia por serem sempre pacientes comigo;

À **CAPES, CNPq** e **FAPEMIG** pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIACÕES

16S rDNA - ácido desoxirribonucleico ribossomal 16 s

ABC – complexo avidina biotina

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BHI caldo infuso cérebro-coração

CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CD - doença de Crohn

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

Células NK – células “natural killer”

Células Treg – células T reguladoras

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CNS - Sistema Nervoso Central

Crp-1 - criptidina 1

Crp-2 – criptidina 2

Crp-3 – criptidina 3

Crp-5 – criptidina 5

Crp-6 – criptidina 6

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EPO - eosinófilo peroxidase

GAPDH – desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato

GI - gastrointestinal

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HBSS - solução salina balanceada de Hank

HE – hematoxilina-eosina

HIV - vírus da imunodeficiência humano

HTAB - Hexadeciltrimetilamônio bromido

IBD - doença inflamatória intestinal

IFN-γ – interferon-gama

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL17^{-/-} - gene *knockout* de interleucina 17

IL23 - interleucina 23

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IRF7 - fator regulatório de interferon 7

LAB - bactérias ácido lácticas

LP - lâmina própria

MPO - mieloperoxidase

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NAG - n-acetilglucosaminidase

NCDO2118 - coleção nacional de organismos lácteos cepa 2118

NO – óxido nítrico

OD - densidade óptica

OPD - orto-fenilenediamina dihidroclorido

PBS – salina tamponada com fosfato

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

TGF- β – fator transformador de crescimento β

Th17 - células T auxiliaadoras 17

TLR - receptor tipo Toll

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF – fator de necrose tumoral

UC - colite ulcerativa

UFC - unidades formadoras de colônia

WHO - Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados para quantificação de mRNA.....	16
Figura 1. Curva de sobrevivência, mudança de peso corporal, parasitismo intestinal e fotomicrografia representativa do parasitismo intestinal de camundongos C57BL/6 infectados via oral com 30 cistos de <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	18
Figura 2. Fotomicrografia e escore inflamatório do intestino delgado dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	20
Figura 3. Foto do intestino, comprimento médio e porcentagem de encurtamento do intestino delgado dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	22
Figura 4. Fotomicrografias representativas das células de Paneth e caliciformes coradas com H&E e azul Alcian, respectivamente e gráficos das quantidades de células encontradas no intestino delgado e segmentos dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com	24
Figura 5. Avaliação da atividade de MPO, NAG e EPO e número de leucócitos no sangue periférico dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	26
Figura 6. Fotomicrografia representativa e quantidade de células IgA ⁺ encontradas no intestino delgado dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	28
Tabela 2. Cultivo microbiológico e identificação bioquímica dos órgãos , sangue e fezes dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	30
Figura 7. Unidades formadoras de colônias por grama de fezes (UFC/g) coletados antes e depois dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	30
Figura 8. Expressão de mRNA de IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-10, DEFA3, Foxp3 e iNOS no intestino delgado dos animais infectados pó <i>T. gondii</i> e tratados com probióticos.....	32

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Microbiota intestinal	3
1.2 Imunologia da mucosa intestinal	4
1.3 Doenças inflamatórias intestinais	5
1.4 O organismo	6
1.5 Ciclo de vida	7
1.6 Resposta imune a <i>T. gondii</i>	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivos gerais	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Animais experimentais	11
4.2 Cepas de bactérias	11
4.3 Manutenção in vivo da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	12
4.4 Procedimento experimental e processamento das amostras	12
4.5 Análise microbiológica	13
4.6 Comprimento intestinal	14
4.7 Quantificação do parasitismo tecidual e células IgA positivas por imunohistoquímica ...	14
4.8 Quantificação de eosinófilo peroxisase (EPO) no intestino delgado	15
4.9 Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e β -N-Acetilglucosaminidase (NAG)	15
4.10 Análise estatística	17
5. RESULTADOS	17
5.1 O tratamento com probióticos diminui a carga parasitária e aumenta a sobrevivência de camundongos C57BL/6	17
5.2 O tratamento com <i>Lactobacillus acidophilus</i> melhora as lesões no intestino delgado causadas pela infecção por <i>T. gondii</i>	19
5.3 Probióticos reduzem o percentual de encurtamento do intestino delgado durante a infecção por <i>T. gondii</i>	21
5.4 O tratamento com probiótico reduz a perda de células de Paneth e células caliciformes no intestino delgado causada pela infecção por <i>T. gondii</i>	23

5.5 A migração de leucócitos para o intestino delgado é controlada pelo tratamento com probióticos.....	25
5.6 A infecção por <i>T. gondii</i> aumenta o número de células IgA ⁺ no intestino delgado independente do tratamento com probióticos.....	27
5.7 O tratamento com probióticos controla a mudança da flora intestinal dos animais após a infecção oral por <i>T. gondii</i>	28
5.8 Após a infecção por <i>T. gondii</i> , a expressão de mediadores da inflamação intestinal demonstra ser diferente entre os probióticos.....	31
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS *	41

RESUMO

A infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos susceptíveis C57BL/6 com 30 cistos da cepa ME-49 induz uma forte resposta do sistema imune do tipo Th1 causando uma intensa inflamação com lesão no íleo em resposta a antígenos da microbiota e se não for controlada causa a morte dos animais. Essa resposta é semelhante à encontrada em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (IBD) como a doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC). Portanto encontrar tratamentos alternativos que tenham efeito adjuvante aos tratamentos convencionais é de grande interesse. O uso de probióticos em produtos fermentados vem aumentando devido aos vários benefícios encontrados em pacientes com doenças inflamatórias que utilizam esses produtos. Com o objetivo de investigar o efeito da administração dos probióticos *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* NCDO 2118 no intestino delgado, tratamos camundongos C57BL/6 um dia antes e 7 dias depois da infecção oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. O tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus* diminuiu o parasitismo intestinal, reduziu a patologia associada ao intestino delgado e evitou a morte dos animais. Além disso, a cultura microbiológica dos órgãos revelou que *L. casei* e *L. acidophilus* foi capaz de impedir a translocação de bactérias do lúmen intestinal para órgãos como fígado, baço, pulmão e também para o sangue. O cultivo microbiológico das fezes mostrou que houve menos espécies de bactérias gram negativas encontradas nas fezes dos animais tratados com probióticos. A análise das enzimas NAG, MPO e EPO que são características de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente mostrou que houve diminuição na atividade das enzimas MPO e NAG e um pequeno aumento na atividade de EPO. Por último, a análise em qPCR revelou que o tratamento com *L. acidophilus* diminuiu a expressão de IFN- γ e TNF- α induzido pela infecção por *T. gondii* e o tratamento com *L. casei* aumentou a expressão de Foxp3 e IL-10. Esses resultados demonstram a capacidade dos probióticos em controlar a resposta inflamação e reduzir a mortalidade causada pela ileíte. Contudo, serão necessários mais estudos para descobrir quais os mecanismos precisos que os probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* utilizam para modular a resposta imune em favor do hospedeiro.

Palavras chave: probióticos, ileíte, *Toxoplasma gondii*, microbiota e translocação bacteriana.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infection in susceptible C57BL/6 mice induces a strong Th₁ immune response causing intense inflammation and lesions in ileum in response to microbial antigens and if controlled causes death of animals. The Th₁ immune response is similar to that in patients with inflammatory bowel disease (IBD) such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Therefore find alternative treatments that have adjuvant effect of conventional treatments are of great interest. The use of probiotics is increasing due to several benefits found in inflammatory diseases. To verify the effects of probiotics *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* NCDO 2118 in C57BL/6 mice, we treat one day before and 7 days after oral infection with 30 cysts of the ME-49 strain. We found that *L. casei*- and *L. acidophilus*-treatment mice decreased intestinal parasitism reducing the pathology in small intestine of C57BL/6 mice and prevent death. In addition, the microbiological culture of organs shows *L. casei*- and *L. acidophilus*-treatment mice prevent bacterial translocation from the intestinal lumen to organs such as liver, spleen, lung and blood, moreover the microbiological analysis of feces showed that there were fewer gram negative bacteria species in feces of probiotic treated mice.

The NAG, MPO and EPO assay that are characteristic of macrophages, and eosinophils neutrophils respectively showed that there was a decrease in the activity of enzymes MPO and NAG and a small increase in activity and EPO. Finally, the qPCR analysis revealed that treatment with *L. acidophilus* decreased IFN- γ and TNF- α mRNA induced by infection with *T. gondii* and *L. casei* treatment increased the expression of Foxp3 and IL-10. Our results demonstrate the ability of probiotics to control the inflammation response and reduce mortality caused by ileitis.

However, further studies are needed to find out what the precise mechanisms that probiotics *L. casei* and *L. acidophilus* modulate the host immune response.

Keywords: probiotics, ileitis, *Toxoplasma gondii*, microflora and bacterial translocation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal de mamíferos é densamente colonizado por uma ampla variedade de microorganismos e ultrapassa a ordem de 10^{12} bactérias por grama do conteúdo do lúmen intestinal (GARRETT; GORDON; GLIMCHER, 2010). Esta microbiota é necessária para manter a homeostase e função do intestino sendo úteis no processo de digestão e extração de energia de uma ampla variedade de alimentos que de outra forma estariam indisponíveis para o hospedeiro (MATHIAS; CORTHESEY, 2011). Até recentemente, a microbiota intestinal e sua diversidade eram incompletamente caracterizadas e pouco definidas devido a limitações metodológicas (NELL; SUERBAUM; JOSEPHANS, 2010). Com o desenvolvimento de técnicas independentes de cultura como a análise dos genes da subunidade 16s do DNA ribossomal (16s rDNA) (SALZMAN *et al.*, 2002) e também da metagenômica, (QIN *et al.*, 2010) a composição da microbiota pôde ser analisada mais detalhadamente. Estudos baseados em cultura sugeriam que todos os indivíduos adultos saudáveis compartilhavam os mesmos grupos de bactérias (LOZUPONE *et al.*, 2012), porém estudos de sequenciamento independentes de cultura tem demonstrado uma vasta diversidade que é altamente variável com o passar do tempo e entre populações. Cada um de nós é habitado por aproximadamente 15% das mais de 1000 espécies catalogadas no intestino humano, o que representa uma substancial variedade de espécies entre indivíduos (CLAESSON *et al.*, 2009). Existe, portanto, cerca de 10 vezes mais genes em nosso microbioma que em cada um de nós (MAYNARD *et al.*, 2012).

A microbiota humana começa a ser formada ao nascimento e os períodos mais críticos para essa colonização ocorrem até o período de desmame (STARK; LEE, 1982) e fatores como padrões de alimentação, idade gestacional, hospitalização infantil e tratamento com antibióticos influenciam no desenvolvimento da microbiota (PENDERS *et al.*, 2006). A população da microbiota é composta por bactérias, Archea, leveduras e fungos filamentosos. Enquanto Archea e Eukarya são representados por apenas um filo, a comunidade bacteriana no trato gastrointestinal humano é excepcionalmente diversa com membros de nove filos bacterianos sendo mais prevalentes Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (BACKHED *et al.*, 2005). Nesse ecossistema existe uma hierarquia de dominância ($>10^9$ UFC/g) de bactérias anaeróbias representadas pelos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*,

Ruminococcus, *Clostridium* e *Propionibacterium* e sub-dominância ($<10^9$ UFC/g) da família Enterobacteriaceae, especialmente *E. coli* e os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio* e *Methanobrevibacter* (HARMSEN *et al.*, 2002).

Atualmente os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são as bactérias ácido lácticas (LAB) mais usadas pela indústria. Além disso, são nativas do trato gastrointestinal humano (GI) e são consideradas probióticos (MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006). Em 2001 na cidade de Córdoba na Argentina, a Organização Mundial da Saúde definiu o termo probiótico como organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (WHO).

1.2 Imunologia da mucosa intestinal

O epitélio intestinal protege o hospedeiro contra infecções não só por formar uma barreira física, mas também por participação ativa na resposta imune inata via produção de citocinas, quimiocinas e peptídeos microbianos (MULLER; AUTENRIETH; PESCHEL, 2005). Defensinas (alfa ou beta) são peptídeos antimicrobianos que contêm três ligações dissulfeto que formam poros na membrana celular dos microorganismos (OUELLETTE; SELSTED, 1996). Em camundongos as α -defensinas são expressas exclusivamente nas células de Paneth que estão localizadas nas criptas de Lieberkhun no intestino delgado sendo mais abundantes no íleo que no duodeno (BRENNAN; MCCULLOUGH; CARR, 1999; PORTER *et al.*, 2002). As α -defensinas tem um amplo espectro de atividade microbicida contra bactérias gram positivas, gram negativas e também contra fungos, protozoários e vírus envelopados para proteger as células tronco multipotentes intestinais (SALZMAN; UNDERWOOD; BEVINS, 2007). A citotoxicidade mediada pelas criptidinas (Crp) parece ser patógeno específica de tal modo que Crp-2 e Crp-3 são citotóxicas para trofozoítos de *Giardia lamblia* enquanto que Crp-1 e Crp-6 não são (ALEY *et al.*, 1994).

Células de Paneth são estimuladas em resposta a uma ampla gama de patógenos intestinais principalmente procariotos, e então, os grânulos secretórios são liberados no lúmen e a expressão de mRNA de criptidinas é regulado positivamente (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* demonstram que a estimulação de TLR9 com agonistas leva a desgranulação de células de Paneth (RUMIO *et al.*, 2004) e estudos *in vitro* com

células dendríticas plasmocitóides demonstram que a ativação da via de sinalização de TLR9 induz a translocação para o núcleo do fator regulatório de interferon 7 (IRF7) e a transcrição de Interferon tipo I (IFN- α) (HONDA *et al.*, 2005; KAWAI *et al.*, 2004).

1.3 Doenças inflamatórias intestinais

Doenças inflamatórias intestinais (IBD) representam um grupo de desordens crônicas e recorrentes caracterizadas pela inflamação do trato gastrointestinal entre as quais se incluem a doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC) (SARTOR, 2006) com algumas diferenças entre as duas. A doença de Crohn pode envolver todo o trato gastrointestinal e é caracterizada por uma inflamação transmural irregular e a colite ulcerativa é restrita ao cólon e muitas vezes, à mucosa (GISBERT *et al.*, 2012). A etiologia das IBDs não é bem conhecida, mas várias linhas de evidências apontam o papel da microbiota intestinal na patogênese dessas doenças, pois em ambas as doenças, os pacientes têm ativadas as imunidades inata e adaptativa e perda da tolerância às bactérias intestinais (DUCHMANN *et al.*, 1995; MOW *et al.*, 2004).

Modelos animais de inflamação intestinal, em particular modelos murinos, tem se tornado indispensáveis para o entendimento de vários aspectos das IBDs. As aplicações de modelos animais incluem análises de mecanismos imunológicos envolvidos na indução e regulação da inflamação intestinal bem como contribuições dos microorganismos e seus fatores de virulência na inflamação aguda e crônica (NELL; SUERBAUM; JOSENHANS, 2010). A maioria dos modelos envolve a resposta Th₁/Th₁₇ relacionada à CD e um menor número de modelos utiliza a resposta Th₂ para estudar UC.

Camundongos C57BL/6 após infecção oral por *T. gondii* desenvolvem uma inflamação no íleo com resposta Th₁ semelhante à inflamação no íleo de pacientes com doença de Crohn ativa. (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012). Após a infecção oral, *T. gondii* se espalha sistematicamente no baço e localmente na lâmina própria do intestino delgado (HAND *et al.*, 2012) e camundongos C57BL/6 desenvolvem uma grave inflamação no íleo resultando na necrose das vilosidades da mucosa e destruição tecidual (LIESENFELD *et al.*, 1996). A ileíte é causada por uma imunopatologia do tipo Th₁ mediada por células T CD4 caracterizada por um aumento de mediadores inflamatórios incluindo IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO) (KHAN *et al.*, 1997). Em oito dias após a infecção, a quantidade de bactéria

comensal *E. coli* tem um aumento de 6 ordens de magnitude alcançando níveis acima de 10^{10} bactérias por grama de conteúdo do íleo (HAAG *et al.*, 2012). Portanto, a ileíte causada por *T. gondii* se assemelha em aspectos imunológicos e microbiológicos à IBD humana (LIESENFELD, 2002).

As IBDs apresentam uma desregulação das células T onde a eliminação de células autorreativas é alterada, além de um desequilíbrio na relação entre células T reguladoras (Tregs) e *T helper* 1, 2 e 17 (Th₁, Th₂ e Th₁₇). Portanto a ausência de uma regulação apropriada das células T influenciam no desenvolvimento e exacerbação da doença de Crohn e colite ulcerativa (LEON *et al.*, 2006). Outro fator relacionado ao desenvolvimento da CD é a superprodução de citocinas pois foi demonstrado que a liberação de TNF- α e interleucinas IL-12 e IL-23 por macrófagos ativados induz a diferenciação de células T *naive* para um perfil de resposta inflamatória Th₁ ao passo que a UC está relacionada à resposta Th₂ com liberação de IL-13 por células *Natural Killer* (NK) (MONTELEONE *et al.*, 2006).

Estudos recentes evidenciam que alguns probióticos como *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) ajudam no tratamento de imunopatologias humanas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (IBD). A administração de LcS concomitantemente com antibiótico ajudou a proteger camundongos infectados com *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* multi resistente a antibióticos (ASAHARA *et al.*, 2011; KOBAYASHI *et al.*, 2010; NAITO *et al.*, 2011; WAGNERBERGER *et al.*, 2013). Além disso, foi relatado que a administração de *L. casei* Shirota e *Bifidobacterium breve* não exarcebam a encefalomielite experimental autoimune (EAE) em modelo murino (KOBAYASHI *et al.*, 2010) e várias doenças são conhecidas ou são suspeitas de estarem relacionadas à microbiota do GI, incluindo câncer de estômago (PARSONNET *et al.*, 1991), linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (LECUIT *et al.*, 2004) e doenças inflamatórias intestinais (IBD) (SEKSIK *et al.*, 2003).

1.4 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, subclasse coccídea (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) que foi descoberto por Nicolle e Manceaux em roedores no ano de 1908 na Tunísia e simultaneamente por Splendore, no Brasil em tecido de coelhos usados em experimentos de laboratório. Esse parasito é capaz de infectar todos os animais de

sangue quente, sendo considerado um patógeno com importância zoonótica e veterinária (WEISS; DUBEY, 2009). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada por esse parasito variando conforme a idade e distribuição geográfica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) sendo que no Brasil, de 50-80% da população adulta apresenta anticorpos contra *T. gondii* (PENA *et al.*, 2008).

Toxoplasma gondii assim como outros parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa possuem como característica organelas secretoras localizadas no pólo apical da célula chamadas de micronemas, roptrias e grânulos densos que são especializadas na invasão e remodelamento da célula hospedeira (KIM; WEISS, 2008).

A transmissão ocorre pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos, ou pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos liberados nas fezes dos felinos. Pode ocorrer também a transmissão vertical durante a gestação onde a mãe, que não possui anticorpos protetores, se infecta e transmite via transplacentária para o feto, podendo levar a malformações e/ou ao aborto (KIM; WEISS, 2008). Uma forma menos comum de transmissão pode ocorrer através da doação de órgãos contaminados e transfusão sanguínea. Os portadores da infecção são em sua maioria assintomáticos, porém, em indivíduos imunocomprometidos como os portadores de AIDS, pode levar ao desenvolvimento de encefalite toxoplásmica. Estima-se que 30% dos portadores do HIV que não recebem o coquetel antiviral e não fazem profilaxia com o uso de antiparasitários, irão desenvolver a encefalite toxoplásmica (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

A estrutura populacional de *T. gondii* é tanto geneticamente quanto clonalmente diversificada, podendo ser subdividida em três linhagens encontradas na América do Norte e Europa denominadas de cepas tipo I, II e III: as cepas do tipo II são encontradas predominantemente em pacientes da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e causando toxoplasmose em humanos, já as cepas I e III são encontradas em doenças congênitas. As cepas do tipo I são geralmente letais para camundongos, porém as cepas dos tipos II e III são menos virulentas (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

1.5 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* é dividido em fase sexuada que ocorre em felinos e em fase não-sexuada, ocorrendo em outros hospedeiros. Nos membros da família dos felídeos, a replicação do parasito ocorre no intestino dos indivíduos

contaminados com uma das três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Ocorre então a penetração nas células epiteliais do intestino delgado pelos bradizoítos provenientes dos cistos que multiplicam-se assexuadamente por um processo denominado merogonia, originando merozoítos que por sua vez, dão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é então fecundado pelo masculino e após a fertilização, forma-se a parede do oocisto em volta do zigoto, ocorrendo então, a liberação dos mesmos no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON, 2002; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Os oocistos esporulados em condições ideais de temperatura e umidade no ambiente contêm oito esporozoítos.

A fase assexuada acontece quando hospedeiros intermediários ingerem alimentos ou água contaminados com oocistos contendo esporozoítos ou através do consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos com bradizoítos. Estas duas formas infectantes bradizoítos e esporozoítos após a ingestão, invadem o epitélio da mucosa intestinal e se diferenciam para taquizoítos invadindo células nucleadas onde se dividem, rompem a célula hospedeira e invadem novas células caracterizando assim a fase aguda da infecção. Uma subsequente resposta imune celular do hospedeiro dependente de IFN- γ , controla a infecção eliminando a maior parte do taquizoítos de *T. gondii*, entretanto, alguns parasitos resistem e se diferenciam em bradizoítos dentro de cistos, permanecendo em um estágio de dormência com multiplicação mais lenta nos tecidos principalmente nas células do Sistema Nervoso Central (SNC) e musculatura esquelética, caracterizando assim a fase crônica da infecção podendo novamente se diferenciar em taquizoítos em indivíduos imunocomprometidos como , por exemplo, os portadores de AIDS (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

1.6 Resposta imune a *T. gondii*

Devido à grande diversidade genética dos hospedeiros, a resposta imune contra a infecção por *Toxoplasma gondii* se torna complexa, compartimentalizada e individual. (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). A resposta local e sistêmica pode variar entre os indivíduos, sendo que essa resposta parece depender do *background* genético e estado imunológico do hospedeiro (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Embora os cistos sejam capazes de se formar em vários tecidos *in vitro*, em indivíduos

infectados eles são mais prevalentes no tecido nervoso e muscular, incluindo o Sistema Nervoso Central (CNS), os olhos e a musculatura esquelética e cardíaca. Embora possam ser encontrados no pulmão, fígado, rins e medula óssea (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Considerada como elemento chave dessa resposta imune do hospedeiro, a imunidade celular é constituída por células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e células *natural killer* (NK) juntamente com uma série de citocinas (FILISETTI; CANDOLFI, 2004). A produção contínua de IFN- γ é essencial para controlar a infecção aguda por *T. gondii* uma vez que essa citocina parece ser responsável pela rápida conversão de taquizoítos para bradizoítos durante essa fase da infecção e também por suprimir a conversão de bradizoítos para taquizoítos durante a fase crônica (MILLER *et al.*, 2009).

Durante a infecção, a produção de IL-12 é induzida por interações entre antígenos do parasito e receptores de quimiocinas 5 (CCR-5) ou receptores do tipo Toll (TLRs) iniciando uma cascata de sinalização via molécula adaptadora MyD88. Essa citocina é crucial para ativar a produção de IFN- γ por células NK bem como é responsável também por induzir a população de linfócitos T CD4⁺ tipo 1 e linfócitos T CD8⁺ (MILLER *et al.*, 2009).

As moléculas de óxido nítrico (NO), resultantes do metabolismo de L-argenina em citrulina pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) expressa em resposta a diversos estímulos incluindo IFN- γ , são produzidas por várias células da resposta imune inata, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK sendo importantes para a resistência inata do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii*. (MILLER *et al.*, 2009).

A ativação de células T CD4⁺ mediada por IL-12p40 e em menor extensão por IL-18 foi encontrada ser necessária para necrose iniciada pela infecção pelo parasito (VOSENKAMPER *et al.*, 2004). A cadeia p40 de IL-12 também é compartilhada por IL-23 e recentes estudos indicam que a imunopatologia intestinal é mediada por IL-23 na infecção por *T. gondii* bem como em outros modelos de IBD (MUNOZ *et al.*, 2009; YEN *et al.*, 2006). Em recente estudo foi encontrado que a produção de IL-22 por células T foi induzida por IL-23 contribuiu para colite durante a infecção por *T. gondii*, porém não encontraram evidências da participação de células Th-17. Entretanto, outros dois trabalhos relataram que animais IL-17R^{-/-} são resistentes ao desenvolvimento de

lesão intestinal causada pela infecção por *T. gondii* (GUITON *et al.*, 2010; KELLY *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Doenças inflamatórias intestinais tem se tornado cada vez mais prevalentes na população mundial, principalmente nos países desenvolvidos onde a dieta influencia o surgimento dessas doenças. Além disso, o uso de probióticos em produtos fermentados tem aumentado devido à procura por produtos comerciais que utilizam as bactérias probióticas que ofereçam benefícios à saúde humana. Por isso resolvemos avaliar os efeitos da administração oral de probióticos em camundongos susceptíveis à infecção oral por *T. gondii* e que desenvolvem grave ileíte semelhante àquela encontrada em portadores de doença de Crohn.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Verificar se o tratamento com probióticos um dia antes e durante 7 dias após a infecção oral por *T. gondii* é capaz de diminuir as alterações inflamatórias exacerbadas causadas pela infecção por esse parasito e se o mesmo interferiria na suscetibilidade do animal ao parasito e se o tratamento impediria a translocação bacteriana do lúmen intestinal causada após a infecção oral por *T. gondii*.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a sobrevivência de animais C57BL/6 tratados com probióticos e infectados com *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral com 30 cistos.
2. Avaliar as alterações histológicas e o comprimento do intestino delgado de animais C57BL/6 tratados com probióticos e infectados com *T. gondii*.
3. Avaliar e quantificar o parasitismo tecidual por imunohistoquímica no intestino delgado de animais C57BL/6 tratados com probióticos e infectados com *T. gondii*.
4. Avaliar e quantificar células positivas para IgA por imunohistoquímica no intestino delgado de animais C57BL/6 tratados com probióticos e infectados com *T. gondii*.

5. Quantificar por coloração por azul de Alcian e H&E células caliciformes de Paneth, respectivamente, no intestino de camundongos C57BL/6 tratados com probióticos e infectados com *T. gondii*.
6. Avaliar a ativação de enzimas de células inflamatórias após a infecção por *T. gondii*.
7. Avaliar o cultivo microbiológico de órgãos, sangue e fezes antes e após a infecção oral por *T. gondii*.
8. Avaliar a expressão de mRNA de citocinas e defensinas por PCR quantitativa (qPCR) no íleo de camundongos após a infecção por *T. gondii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Os animais usados nesse experimento foram fêmeas adultas de camundongos C57BL/6 com idade entre 8-12 semanas adquiridos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais com 3-4 animais por grupo divididos da seguinte forma:

- Grupo controle não infectado: 4 animais que não receberam tratamento com probióticos e nem foram infectados;
- Grupo controle infectado: 4 animais que não receberam tratamento com probióticos e foram infectados via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
- Grupo tratado com *L. lactis*: 4 animais que foram tratados um dia antes e 7 dias após a infecção com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
- Grupo tratado com *L. casei*: 3 animais que foram tratados um dia antes e 7 dias após a infecção com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
- Grupo tratado com *L. acidophilus*: 3 animais que foram tratados um dia antes e 7 dias após a infecção com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

4.2 Cepas de bactérias

As cepas utilizadas nesse trabalho foram *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult, Brasil) isoladas a partir do leite fermentado, *Lactobacillus acidophilus* (Leiba, União

Química, SP, Brasil) isolado do probióticos vendido comercialmente and *Lactococcus lactis* NCDO2118 (MIYOSHI *et al.*, 2004) que foi gentilmente cedido pelo Prof. Anderson Miyoshi da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as cepas cresceram a 37°C sob condições aeróbicas em caldo infusão cérebro coração (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, India).

4.3 Manutenção *in vivo* da cepa ME49 de *T. gondii*

Parsitos da cepa ME-49 de *T. gondii* foram mantidos em *Calomys callosus* os quais foram inoculados via oral com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. O homogeneizado cerebral foi novamente lavado por centrifugações a 2000 rpm por 10 minutos em PBS. Os 30 cistos cerebrais foram contados em microscópio de luz utilizando uma objetiva de 10 x de aumento e utilizados para a infecção dos animais (BARBOSA *et al.*, 2007).

4.4 Procedimento experimental e processamento das amostras

Camundongos C57BL/6 receberam suspensões de probióticos por gavagem durante 9 dias. Para isso, foram cultivadas diariamente as cepas das bactérias em caldo BHI até alcançarem a densidade óptica de 600 OD, depois foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* celular foi lavado três vezes em solução salina de NaCl 0.9% e ressuspensas em água filtrada até obter uma concentração final de 2×10^{10} UFC/mL. Cada animal recebeu 0.1 mL da suspensão de bactérias por gavagem (2×10^9 bacterias/camundongo/dia). No segundo dia do tratamento com probiótico, os camundongos foram infectados via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. O grupo controle (infectado com *T. gondii* sem receber tratamento com *Lactobacillus* ou *Lactococcus*) recebeu água via oral. Durante o período experimental os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração. Os animais foram observados e pesados diariamente para mudança do peso.

Aos 8 dias de infecção e 9 de tratamento com probióticos, grupos de 3 a 4 animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil), antes de serem levados para o fluxo laminar eram mergulhados rapidamente em álcool para diminuir a possibilidade

de contaminação das amostras e então o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital com capilar. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos periféricos (pulmão, fígado, baço e intestino delgado) e o conteúdo de um aproximadamente 1 cm do íleo foram coletados sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. Todos os materiais utilizados foram autoclavados. A translocação bacteriana foi determinada pela cultura do homogenato dos órgãos em meio BHI e ágar McConkey. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão, medido e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Essas foram lavadas com PBS e enroladas em finos palitos de madeira formando um “rolo suíço”. Os órgãos foram então fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina. Para cada segmento, cortes histológicos de 4 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação da patologia e contagem das células de Paneth e coradas com azul de Alcian para células caliciformes. Para contar as células de Paneth foram observadas 3 criptas por campo óptico e 16 campos por segmento do intestino delgado usando uma objetiva de 100 x de aumento. As células caliciformes foram contadas em 16 campos por segmento e a análise histológica foi feita como previamente descrito usando uma objetiva de 40 x de aumento. O escore inflamatório foi representado como unidades arbitrárias: 0-2, pouco inflamado; 2-4, inflamação moderada; 4-6, inflamação grave e acima de 6, inflamação muito grave (SILVA *et al.*, 2009). Alternativamente, lâminas com cortes histológicos foram processadas para análise por imunohistoquímica de parasitismo tecidual e detecção de células IgA positivas. O esfregaço sanguíneo foi feito em lâmina de vidro com 10µl do sangue no momento do sacrifício e coradas com corante de Wright. A contagem em câmara de Neubauer foi realizada com 10µl do sangue diluído na proporção 1:10 em solução de Turk para lisar hemácias e corar leucócitos.

4.5 Análise microbiológica

Tecidos coletados sob condições assépticas foram mantidos em PBS estéril e 20µl do sangue foi colocado em tubos de vidro com caldo BHI. Os órgãos foram homogeneizados em condições assépticas e 0,1 mL foi colocado em caldo BHI estéril e cresceu sob condições aeróbicas a 37° C por 48 h. O crescimento bacteriano foi monitorado por turbidez do caldo e alíquotas foram semeadas em ágar McConkey sob

condições aeróbicas e as espécies bacterianas foram identificadas por coloração de gram e bioquimicamente como previamente descrito (MacFaddin, 1976).

A quantidade de bactérias gram negativas nos órgãos, sangue e nas fezes foi determinada pela contagem de colônias distintas em placas de cultura com ágar McConkey.

4.6 Comprimento intestinal

O encurtamento relativo dos intestinos delgado foi calculado por dividir o comprimento médio dos intestinos não infectados (\bar{X}) menos o comprimento médio dos intestinos dos animais coletados aos 8 dias p.i. (L) divididos pelo comprimento médio dos intestinos dos animais não infectados multiplicados por 100. O resultado foi expresso como percentual de encurtamento (E) dado pela fórmula (HEIMESAAT *et al.*, 2006):

$$E = \frac{(\bar{X} - L) \times 100}{\bar{X}}$$

4.7 Quantificação do parasitismo tecidual e células IgA positivas por imunohistoquímica

Para determinar antígenos de parasito no intestino delgado, foi realizada reação como previamente descrito, resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6,0, em forno microondas durante 7 minutos e os sítios não específicos foram bloqueados pela incubação dos cortes com leite desnatado 3% por 30 minutos (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil). Feito isso, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de *Calomys callosus* anti-*T. gondii* diluído 1:100 em saponina 0,01% ou anticorpo cabra anti-IgA de camundongo na diluição 1:200 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra biotinilada anti-camundongo 1:300 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) e burro anti-cabra 1:1000 (Santa Cruz), respectivamente. A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina peroxidase 1:100 (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) 0,5mg/ml de PBS. Os cortes foram contracorados

com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos em 50 campos microscópicos por segmento do intestino (200 campos no total) e as células IgA⁺ foram avaliadas e células marcadas positivamente presentes e 16 campos microscópicos por segmento do intestino (64 no total). As análises foram feitas às cegas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em 2 secções teciduais por lâmina.

4.8 Quantificação de eosinófilo peroxisase (EPO) no intestino delgado

A atividade de eosinófilos no intestino foi avaliada a partir da detecção da atividade da enzima EPO. Para isso, pequenos pedaços do íleo foram cortados, pesados e triturados em 400 µl tampão fosfato (HBSS) seguido por uma centrifugação a 1950 x g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 1 ml de PBS e foi acrescentado água e salina 3,5% para realizar o choque hipotônico, em seguida as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 300 µl de HBSS-HTAB (Hexadeciltrimetilamônio bromido, Sigma) e colocado em 3 passagens de nitrogênio líquido e banho-maria a 37° C. As amostras foram centrifugadas a 855 x g por 10 min a 4°C. o sobrenadante foi plaqueado numa placa de 96 poços e acrescentado 50 µl de OPD e após 15 minutos a reação foi parada com 25 µl de H₂SO₄ 4M e o resultado foi lido espectrofotômetro a 490 nm.

4.9 Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e β-N-Acetilglucosaminidase (NAG)

A atividade de neutrófilos e macrófagos foi analisada a partir da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente. Para isso fragmentos do intestino delgado foram cortados e triturados em tampão fosfato pH 4,7 gelado, centrifugados a 855 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso novamente em tampão fosfato adicionado a 200 µl de NaCl 0,2% gelado para lisar hemácias. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 855 x g por 15 min a 4°C e o pellet ressuspenso em tampão fosfato pH 5,4, congelado e descongelado 3 vezes em nitrogênio líquido e banho-maria 37° C, centrifugadas a 27.400 x g por 15 min a 4°C. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50 µl das amostras e 50 µl de TMB

(tetramethylbenzidine). A reação foi parada adicionando 25 µl de H₂SO₄ 4M e o resultado foi lido espectrofotômetro a 450 nm.

4.10 Análise da expressão de citocinas por qPCR no íleo dos camundongos experimentais

Segmentos do intestino delgado (íleo) de camundongos C57BL/6 experimentais infectados com *T. gondii* foram submetidos a extração de RNA pelo método do Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram então congeladas a -80 °C até o momento do uso.

Para uma reação de confecção do cDNA, o RNA (50 ng) foi misturado com oligo (dT) primer (Promega, Fitchburg, EUA). A mistura foi aquecida a 70 °C durante 5 minutos em termociclador TC-3000 (Techne, Staffordshire, Reino Unido) e depois adicionada de 11,5 µl de uma solução contendo um tampão, MgCl₂, dNTPs, a enzima transcriptase reversa (Promega) e água de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a mistura final foi incubada a 42 °C por 1 hora no mesmo termociclador. Por fim, foi adicionado 17,5 µl de água e as amostras foram congeladas a -20 °C até o momento do uso.

Para a reação de qPCR, as amostras (2 µL) foram misturadas com SYBR (Life Technologies) e primers (0,15 pMol/µL, Tabela 1) até o volume final de 10 µL por reação. A reação foi realizada utilizando 40 ciclos com temperatura de anelamento a 60 °C por 1 minuto desenvolvida em aparelho de qPCR ABI7500 (Life Technologies). A análise dos resultados foi feita pelo método do delta-delta Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A sequência de *primers* utilizada na reação pode ser vista na tabela abaixo. O controle interno da reação foi feito a partir da expressão do gene constitutivo de GAPDH.

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados para quantificação de mRNA no íleo de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* tratados ou não com probióticos.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
GAPDH	GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG	CAGTGTAGCCCAAGATGCCC
FOXP3	AGAATGCCATCCGCCACA	CACACTGCTCCCTTCTCGCT
IL-10	TTTAAGGGTTACTTGGGTTGCC	CGCATCCTGAGGGTCTTCA
TNF	CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG	GATCTGAGTGTGAGGGTCTGGG
IFN-γ	GGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC	CATCCTTTTGCCAGTTCCTCC
iNOS	CGAAACGCTTCACTTCCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
DEFA3	CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG	TCAGCGACAGCAGAGTGTGTA
TGF-β	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GCTGATCCCGTTGATTTC

4.10 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O método Kaplan-Meier foi usado para comparar as taxas de sobrevivência dos animais experimentais e a curva de sobrevivência foi comparada usando Teste do Quiquadrado (χ^2) e long-rank teste. Diferenças entre grupos foram analisadas usando teste ANOVA Kruskal-Wallis, quando apropriado com o respectivo pós teste de comparação múltipla Bonferroni ou Dunn para examinar todas as possíveis comparações pareadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 O tratamento com probióticos diminui a carga parasitária e aumenta a sobrevivência de camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6 foram tratados com veículo (H_2O) ou com os probióticos *L.lactis*, *L.casei* ou *L.acidophilus* a uma concentração de 2×10^{10} bactérias/ml um dia antes e 7 dias depois da infecção com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Foi observado que os animais não tratados ou tratados com *L. lactis* foram altamente susceptíveis à infecção, ao passo que os animais tratados com *L. casei* ou *L.acidophilus* se tornaram resistentes e sobreviveram pelo menos até 40 dias p.i (Figura 1A) ($P < 0,05$) (Teste do Quiquadrado (χ^2) e long-rank teste). Entretanto todos os grupos apresentaram similar perda de peso após 7 dias p.i. (Figura 1B). Os animais foram pesados diariamente até o dia do sacrifício aos 8 dias p.i. E foi observado que os animais tratados com os probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* apresentaram menor carga parasitária no intestino delgado que os animais não tratados ou tratados com *L. lactis*. (Figura 1C e 1E) indicando que a maior resistência dos animais tratados com *L. casei* ou *L. acidophilus* está relacionada com a carga parasitária no intestino delgado. De maneira interessante, o tratamento com *L. casei* diminuiu a carga parasitária principalmente no duodeno e jejuno distal, mas não no jejuno proximal (Figura 1D).

Figura 1

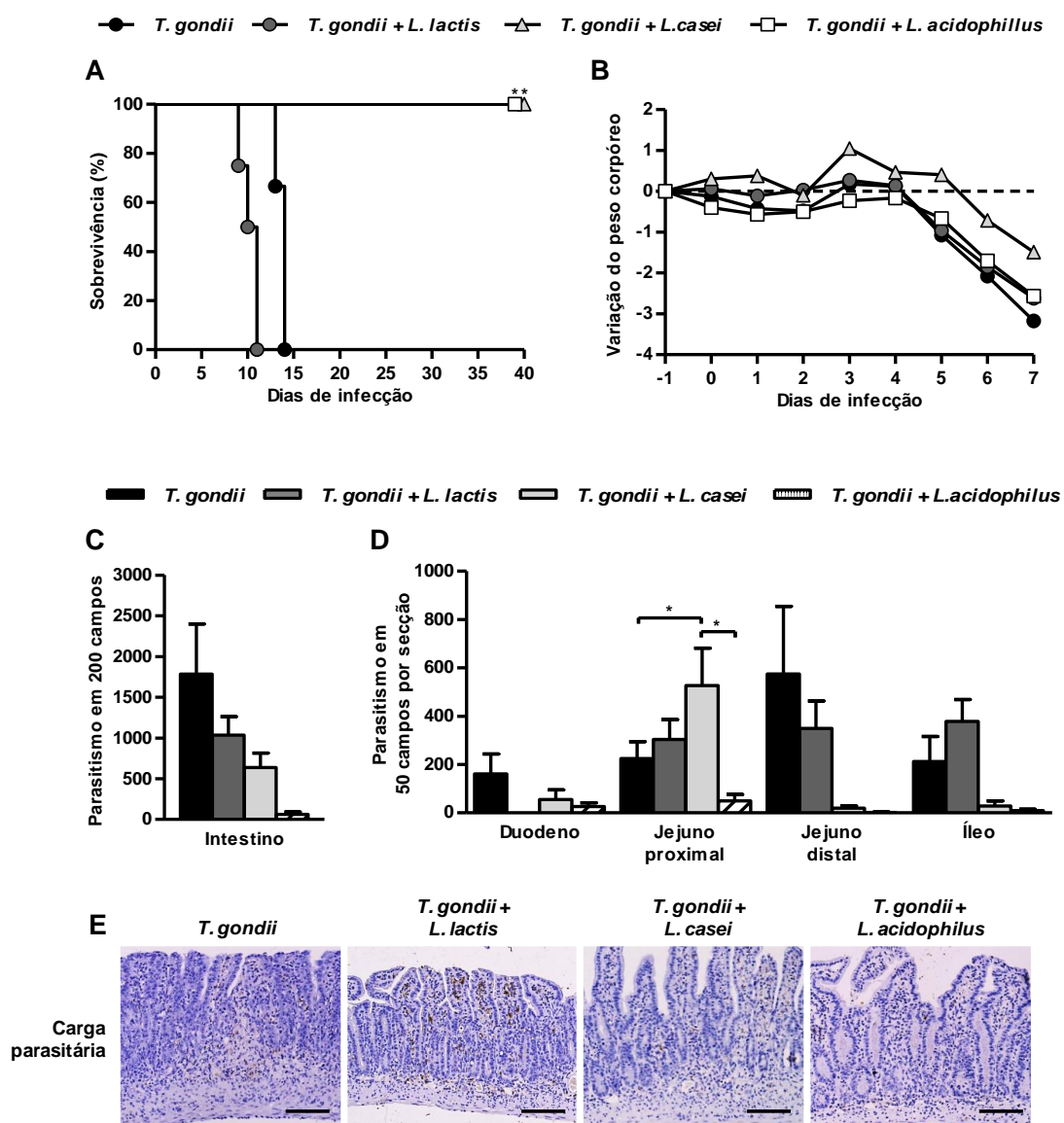


Figura 1. Curva de sobrevivência (A), mudança no peso corporal (B) e parasitismo tecidual no intestino delgado (C e D) de camundongos C57BL/6 fêmeas com idade entre 8-12 semanas tratados com probióticos *L. lactis*, *L. casei* ou *L. acidophilus* 24 h antes da infecção oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Fotomicrografia representativa do parasitismo intestinal (E). Os animais foram acompanhados diariamente para a análise de mortalidade e pesados para a mudança do peso corporal. O parasitismo foi detectado por imunohistoquímica e quantificado pela contagem do número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos em 50 campos microscópicos em cada segmento utilizando uma objetiva de 40 x. Fotomicrografia de cortes histológicos de marcações de parasitos por imunohistoquímica demonstrando que o tratamento com probióticos diminui o parasitismo. Dados são representativos de pelo menos 3 animais por grupo. * $P < 0,05$ (ANOVA com pós teste de comparação múltipla de Bonferroni) e as taxas e curva de sobrevivência foram comparados com método de Kaplan-Meier usando o teste do Quiquadrado (χ^2). Barra (100 μ m).

5.2 O tratamento com *Lactobacillus acidophilus* melhora as lesões no intestino delgado causadas pela infecção por *T. gondii*

Aos 8 dias p.i., o intestino dos camundongos C57BL/6 apresentou uma intensa infiltração de células mononucleares na lâmina própria (LP), epitélio e submucosa (Figura 2A). Em algumas áreas, aumento da espessura dos vilos intestinais também foi observado (dados não mostrados). Estas alterações foram observadas principalmente no íleo. O intestino delgado dos animais tratados com *L. lactis* apresentou inflamação tão alta quanto dos animais infectados e não tratados (dados não mostrados). O intestino delgado dos animais tratados com *L. casei* apresentaram inflamação levemente menor quando comparados ao intestino dos animais não tratados (Figura 2A). Ao contrário dos outros tratamentos, os camundongos tratados com *L. acidophilus* apresentaram alterações inflamatórias menores caracterizadas pela infiltração de células mononucleares na lâmina própria e submucosa ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis com múltipla comparação de Dunn) (Figura 2B). Além disso, o tratamento com *L. acidophilus* diminuiu significativamente a inflamação associada à infecção pelo parasito no jejuno distal e íleo em comparação aos animais não tratados e tratados com *L. casei*. Portanto, a maior resistência dos animais tratados com *L. casei* e principalmente com *L. acidophilus* parece estar associada à menor alteração inflamatória no intestino delgado causada pela menor carga parasitária nesses segmentos.

Figura 2

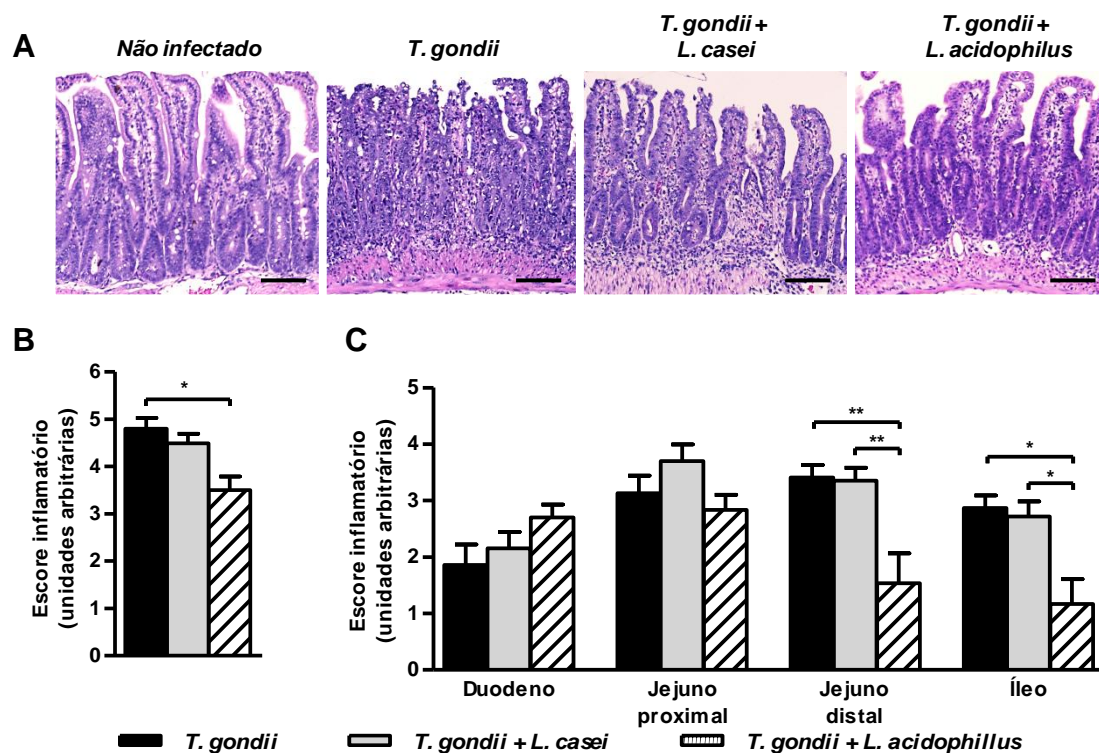


Figura 2. Fotomicrografia de cortes histológicos corados com H&E demonstrando intensa inflamação no intestino de camundongos C57BL/6 infectados e não tratados e uma diminuição na inflamação no grupo tratado com *L. acidophilus* (A), Escore inflamatório do intestino delgado (B), e segmentos (C). Camundongos C57BL/6 tratados com *L. casei* ou *L. acidophilus* um dia antes e 7 dias depois da infecção com 30 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. Os dados foram obtidos através da análise de 40 campos microscópicos por secção tecidual de cada órgão, de pelo menos 3 animais por grupo, usando a objetiva de 40x de aumento. Diferença estatística significativa entre camundongos tratados em condições diferentes (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0,05$). Barra 100 μ m).

5.3 Probióticos reduzem o percentual de encurtamento do intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*

Como a inflamação causa dano tecidual e no caso do intestino delgado, causa o encurtamento do órgão (BERESWILL *et al.*, 2010), o comprimento do intestino delgado foi mensurado com o objetivo de calcular o encurtamento do órgão quando comparado ao tamanho médio do intestino delgado dos animais não tratados e não infectados (NI). Quando comparamos o comprimento médio dos intestinos dos grupos tratados ou não, encontramos um comprimento médio menor dos animais infectados e tratados com *L. lactis* ou somente infectados quando comparados ao comprimento médio dos animais não tratados e não infectados. (Figuras 3A e 3B). Entretanto, o tratamento dos animais com *L. casei* ou *L. acidophilus* foi capaz de evitar o encurtamento do intestino delgado. Quando analisamos o percentual de encurtamento, nós observamos que o tratamento com *L. acidophilus* foi mais eficiente mostrando um percentual de encurtamento de aproximadamente 2% comparado ao grupo NI, seguido pelo tratamento com *L. casei* que teve um valor aproximado de 5% (Figuras 3C). O tratamento com *L. lactis* se mostrou ineficaz na proteção contra a inflamação e consequentemente, contra a redução no comprimento do intestino sendo que o comprimento médio foi semelhante ao do grupo infectado e não tratado (Figuras 3A, 3B e 3C). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Figura 3

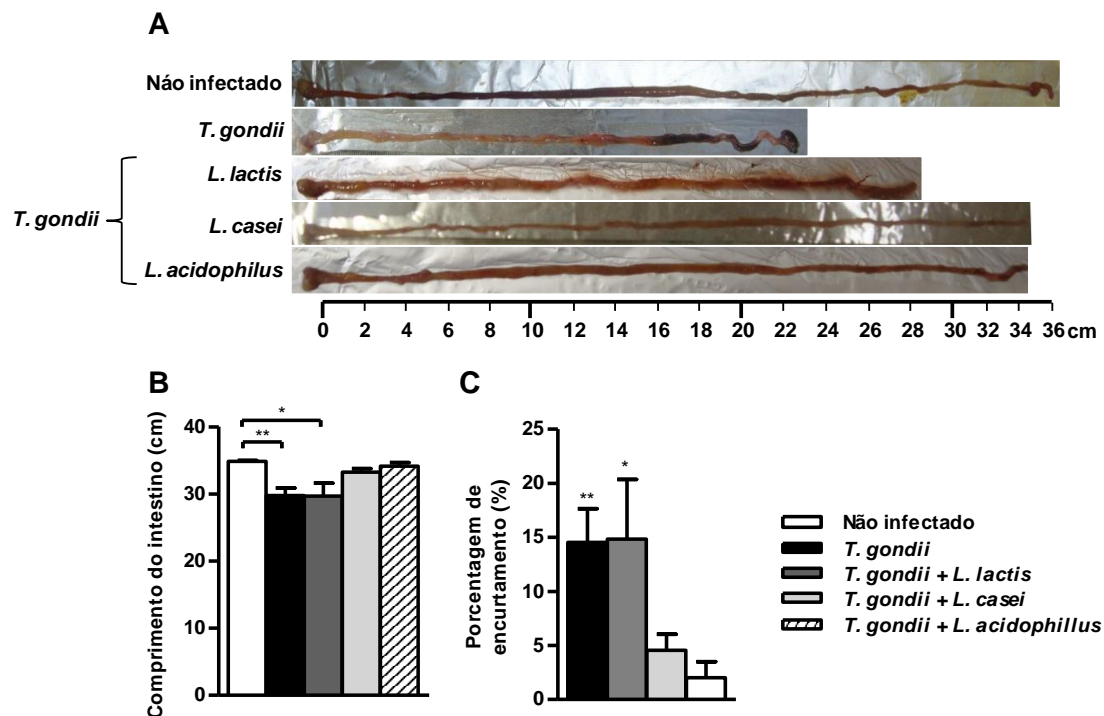


Figura 3. Fotos dos intestinos dos animais não infectados e não tratados (NI) e tratados com probióticos mostrando a redução no tamanho após a infecção por *T. gondii* (A). O comprimento médio dos intestinos delgados dos camundongos C57BL/6 é mostrado em (B) e o percentual de encurtamento em relação ao grupo NI mostra claramente que o tratamento com probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* reduz a inflamação e a atrofia do intestino (C). Os dados foram obtidos de pelo menos 3 animais por grupo, Diferença estatística significativa entre camundongos tratados em condições diferentes (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.4 O tratamento com probiótico reduz a perda de células de Paneth e células caliciformes no intestino delgado causada pela infecção por *T. gondii*

Baseados no fato do intestino delgado ser um importante sítio de infecção e consequentemente de translocação bacteriana, nós resolvemos analisar e quantificar as células caliciformes e células de Paneth que são importantes produtoras de muco e defensinas, respectivamente. Para isso, cortes histológicos com 4µm de espessura foram corados com azul Alcian para quantificar células caliciformes e H&E para as células de Paneth. A análise do intestino delgado mostrou que após a infecção por *T. gondii* houve diminuição no número de ambos os tipos de células (Figuras 4A, 4C, 4E e 4F). A diminuição na quantidade de células de Paneth ocorreu em todos os segmentos do intestino delgado, mas no íleo e principalmente no jejuno distal essa perda foi maior (Figura 4E, 4F). O tratamento com *L. casei* e *L. acidophilus* foi capaz de diminuir a perda de células de Paneth no duodeno e jejuno proximal quando comparadas ao grupo infectado e não tratado (Figura 4F). De forma interessante, a perda de células de Paneth foi menor no jejuno distal e íleo de animais tratados com *L. acidophilus* em comparação com animais tratados com *L. casei* (Figura 4F). Ao analisarmos as células caliciformes notamos que a infecção também reduziu o número de células comparado ao grupo NI (Figura 4B) e a análise dos segmentos mostrou que o tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus* reduziu a perda no duodeno e principalmente no íleo apresentando diferença significativa neste segmento em comparação ao grupo de animais infectados e não tratados (Figura 4C). Além disso, o tratamento com *L. acidophilus* se mostrou mais eficaz, pois em todos os segmentos o número de células caliciformes foi maior em relação ao grupo somente infectado (Figura 4C). (*P< 0,05, **P<0,01, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni).

Figura 4

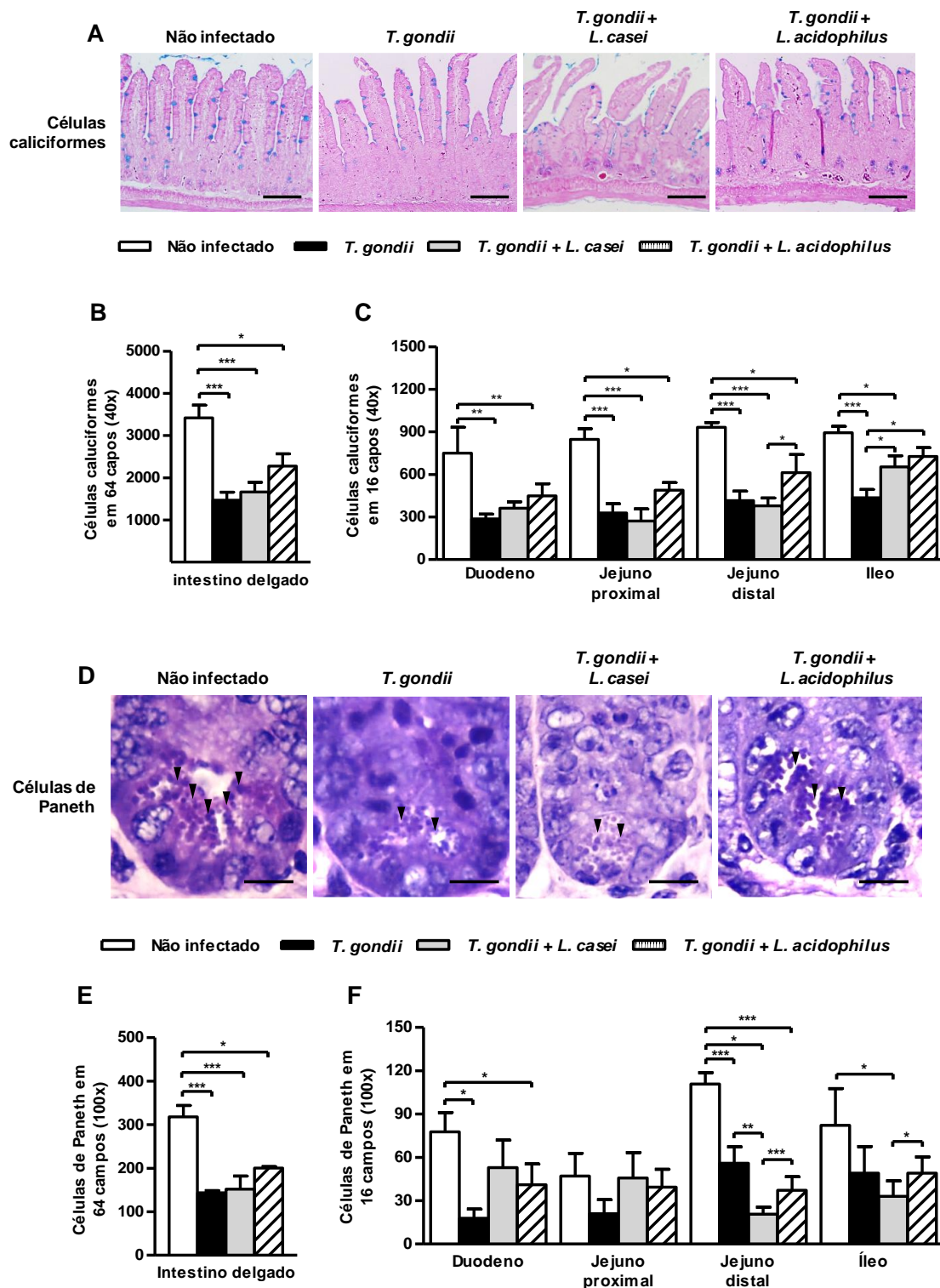


Figura 4. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de intestino delgado corado com azul de Alcian e H&E para células caliciformes e de Paneth, respectivamente (A, D). A infecção por *T. gondii* leva à perda dessas células e o tratamento com *L. acidophilus* protegeu os animais contra a perda das células caliciformes no jejuno distal e íleo e evitou a perda de células de Paneth no duodeno e jejuno

proximal (C, F). *L. casei* teve menor efeito protetor mas evitou em parte a perdas de ambas as células. Os dados foram obtidos de amostras de pelo menos 3 animais por grupo. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni). Barra (A) (100 μ m) e (B) (12 μ m). As cabeças das setas apontam as células de Paneth com os grânulos.

5.5 A migração de leucócitos para o intestino delgado é controlada pelo tratamento com probióticos

Baseados no fato que a infecção com *T. gondii* induz um processo inflamatório bastante intenso no intestino delgado de camundongos C57BL/6 (LIESENFELD *et al.*, 1996), nós avaliamos a ativação de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos através do ensaio das enzimas MPO, NAG e EPO, respectivamente. O grupo infectado e não tratado teve aumentado os níveis de MPO indicando aumento na atividade de neutrófilos e o tratamento com *L. lactis* e *L. casei* foi capaz de manter o nível de ativação de MPO no mesmo patamar dos animais não tratados e não infectados. (Figura 5A). Com relação a atividade de NAG, os animais não infectados e infectados e não tratados apresentaram o mesmo perfil de ativação, indicando que já haviam macrófagos ativados mesmo antes da infecção por *T. gondii* (Figura 5B), entretanto o tratamento com *L. casei* e *L. lactis* reduziu os níveis da enzima (ANOVA, $P < 0,05$), sugerindo uma menor atividade de macrófagos.

Como a infecção por *T. gondii* induz uma resposta do tipo Th₁, resolvemos avaliar a atividade de eosinófilos por mensurar EPO que é uma enzima característica de eosinófilos, portanto, resposta tipo Th₂. Após a infecção houve uma diminuição da atividade de EPO (Figura 5C) e o tratamento com *L. lactis* mostrou uma redução maior dos níveis de EPO. Ao contrário, o tratamento com *L. casei* foi capaz de manter o nível da enzima ao mesmo patamar do grupo não infectado e não tratado. (Figura 5C).

Em seguida resolvemos quantificar o número de leucócitos no sangue periférico dos animais coletados aos 8 dias p.i através da contagem de leucócitos em câmara de neubauer e contagem diferencial em esfregaço sanguíneo. O número de leucócitos não se alterou quando comparado os tratamentos com os três probióticos e o controle infectado e não tratado, porém houve um maior número total de leucócitos nos animais tratados com *L. lactis* (Figura 5D). A contagem de leucócitos no esfregaço sanguíneo mostrou um aumento de polimorfonucleares (PMN) no sangue dos animais tratados com *L. casei* e um aumento de eosinófilos nos animais tratados com *L. acidophilus* (Figura 5E).

Figura 5

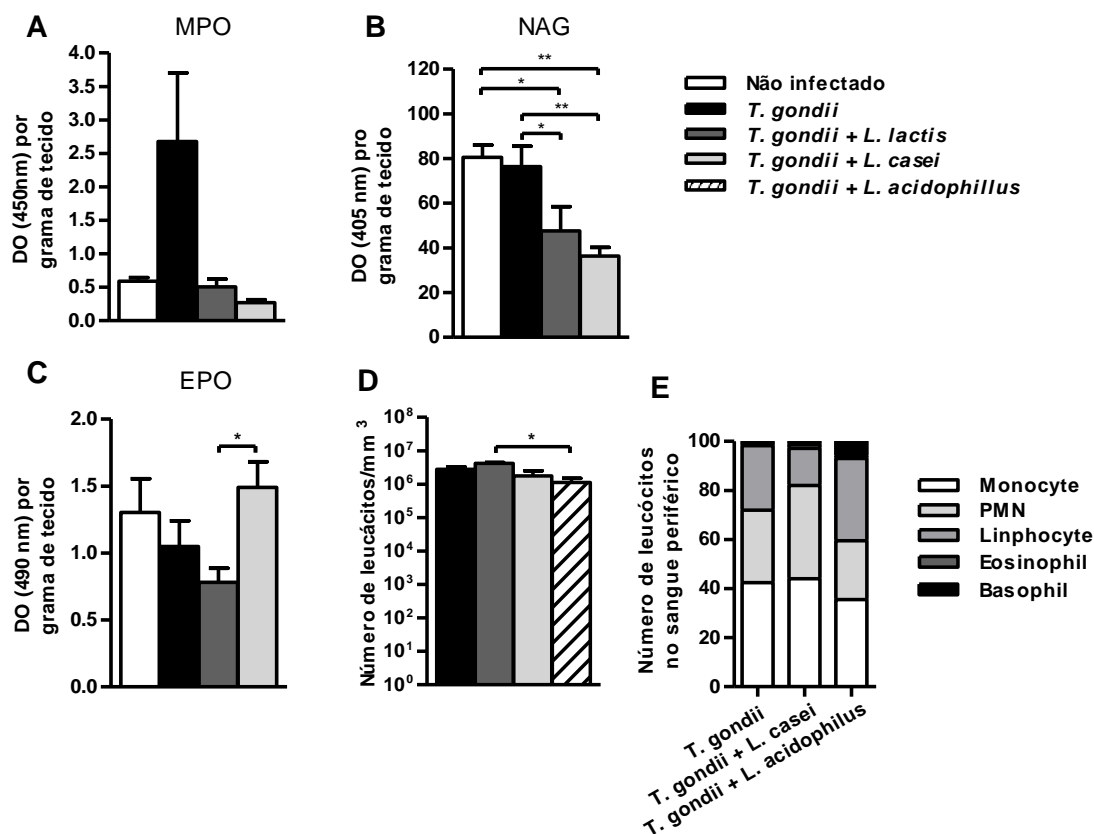


Figura 5. Avaliação da atividade de neutrófilos (A), macrófagos (B) e eosinófilos (C) no intestino de camundongos C57BL/6 tratados com probióticos 24 horas antes da infecção oral por *T. gondii* e até o dia 8 p.i. Houve um aumento de NAG após a infecção e o tratamento com *L. casei* e *L. lactis* foi capaz de reduzir a atividade da enzima (A) e diminuir a atividade de MPO em relação ao grupo não infectado e não tratado (NI) e infectado e não tratado (B) o tratamento com *L. casei* foi capaz de manter a atividade de EPO após a infecção já que o grupo NI apresenta níveis mais elevados da enzima (C). A leitura em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos é visto em (D) e (E) respectivamente. Dados obtidos de amostras coletadas de pelo menos três animais por grupo. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni).

5.6 A infecção por *T. gondii* aumenta o número de células IgA⁺ no intestino delgado independente do tratamento com probióticos

A imunoglobulina IgA é importante no controle de bactérias comensais e patogênicas no intestino, então nós resolvemos avaliar as células IgA⁺ no intestino delgado dos animais infectados com *T. gondii* e tratados com probióticos, dos animais infectados e não tratados e não infectados e não tratados. A avaliação foi feita através da técnica de imunohistoquímica em cortes histológicos aos 8 dias p.i. Nossos resultados mostram que a infecção por *T. gondii* induziu um aumento no número de células IgA⁺ quando comparadas aos animais não infectados (Figura 6A e 6B) ($p < 0,05$, $p < 0,01$, ANOVA). A análise dos segmentos mostrou que o perfil se manteve o mesmo, entretanto os tratamentos com *L. casei* e *L. acidophilus* apresentaram uma diminuição em relação ao grupo infectado e não tratado (Figura 6C) mesmo não apresentando diferença estatística, porém no duodeno e jejuno proximal houve uma maior diferença entre os animais não infectados e não tratados e os animais infectados (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, ANOVA). Além disso, pudemos observar que ambos os grupos de animais tratados com probióticos apresentaram quantidades menores de células marcadas em todos os segmentos quando comparados ao grupo infectado e não tratado.

Figura 6

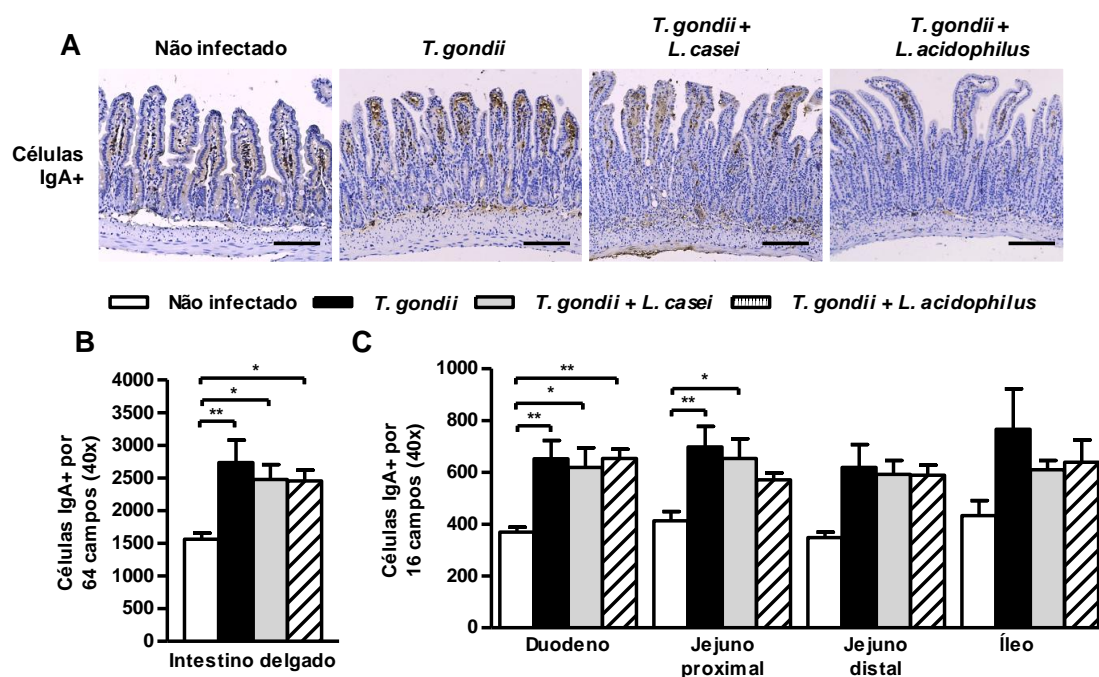


Figura 6. Fotomicrografia de cortes histológicos de intestino delgado de camundongos C57BL/6 marcado por reação de imunohistoquímica onde após a infecção oral por *T. gondii*, houve um aumento de células IgA⁺ (A, B) e o tratamento com probióticos reduziu levemente a quantidade de células IgA nos segmentos (C). Dados obtidos de pelo menos 3 animais por grupo. (*P< 0,05, **P<0,01, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni). Barra (100μm).

5.7 O tratamento com probióticos controla a mudança da flora intestinal dos animais após a infecção oral por *T. gondii*

Após a intensa inflamação induzida através da infecção por *T. gondii* ocorre a translocação de bactérias do lúmen intestinal para os órgãos (BERESWILL *et al.*, 2010), decidimos então avaliar se o tratamento com probióticos previne a translocação bacteriana. Para isso coletamos, sob condições assépticas, fragmentos do fígado, baço, pulmão e também o sangue e o conteúdo do íleo para cultivo microbiológico, descrito mais detalhadamente em materiais e métodos. Após 48 horas de incubação em caldo BHI, semeamos as amostras em ágar McConkey e cultivamos por mais 48 horas em condições de aerobiose a 37° C. A Tabela 2 mostra que o crescimento de bactérias ocorreu nos órgãos dos animais infectados e não tratados e dos animais tratados com *L.*

lactis. Surpreendentemente o tratamento com *L. casei* e *L. acidophilus* impediu que houvesse translocação de bactérias para os órgãos avaliados e também para o sangue por onde a translocação pode ocorrer.

Liesenfeld e colaboradores (LIESENFELD *et al.*, 1996) já haviam demonstrado que após a infecção por *T. gondii*, a inflamação intestinal, mais especificamente no íleo, de camundongos C57BL/6 se alterava predominantemente para bactérias gram negativas o que agrava mais inflamação. Por isso resolvemos cultivar as fezes dos animais em ágar McConkey, onde crescem preferencialmente bactérias gram negativas, antes e depois do tratamento e infecção. Houve um aumento significativo (ANOVA) na quantidade de unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC/g fezes) dos animais tratados com *L. casei* em relação ao grupo não infectado e não tratado, infectado e não tratado e tratado com *L. acidophilus* (Figura 7). Esse aumento na quantidade de bactérias nas fezes não refletiu no aumento de bactérias identificadas como mostra a Tabela 2. O grupo tratado com *L. acidophilus* mostrou uma tendência a diminuir a quantidade de bactérias gram negativas nas fezes (Figura 7). A Tabela 2 mostra que antes de qualquer tratamento e infecção, houve o crescimento de *E. coli* e *Proteus sp.* e após a infecção, houve uma mudança com crescimento de outras bactérias gram negativas como *Citrobacter sp.*, *Providencia sp.* e *Klebsiella sp.*

Tabela 2. Cultivo microbiológico e identificação bioquímica das bactérias encontradas nos órgãos, sangue e fezes de camundongos C57BL/6 infectados *T. gondii*.

	Não infectado e não tratado	Infectado	Tratado com <i>L. casei</i>	Tratado com <i>L. lactis</i>	Tratado com <i>L. acidophilus</i>
Fígado	-	<i>Citrobacter sp.</i>	-	-	-
Baço	-	<i>Citrobacter sp.</i>	-	<i>Proteus sp.</i>	-
Pulmão	-	<i>Citrobacter sp.</i>	-	-	-
Sangue	-	-	-	<i>E. coli</i>	-
				<i>Proteus sp.</i>	
Fezes	<i>E. coli</i> ; <i>Proteus sp.</i>	<i>Citrobacter sp.</i> ; <i>Klebsiella sp.</i> ; <i>Proteus sp.</i> ; <i>Providencia sp.</i>	<i>Citrobacter sp.</i> ; <i>E.coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Proteus sp.</i>	<i>Citrobacter sp.</i>

Cultivo microbiológico dos órgãos homogeneizados em PBS estéril e semeados em ágar McConkey cultivados a 37° C por 48 h em condições de aerobiose. Após o crescimento em placa, as colônias foram coradas pela técnica de gram e identificadas bioquimicamente.

Figura 7

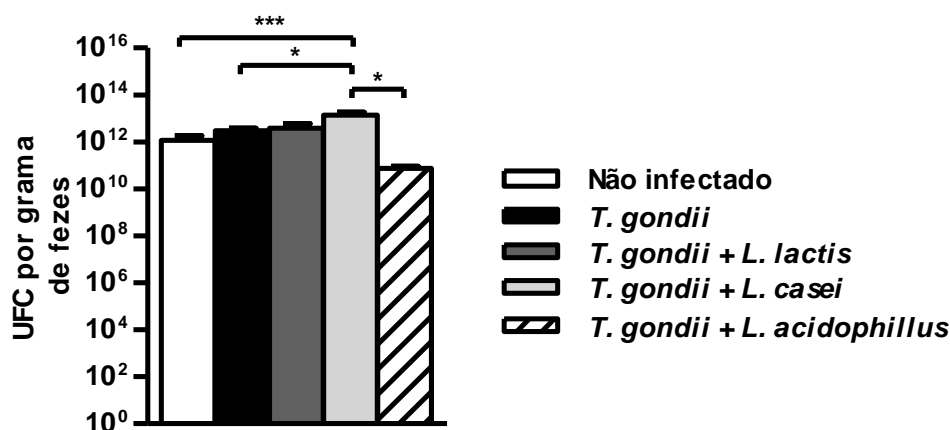


Figura 7. As fezes dos animais foram coletadas antes do início do tratamento com probióticos e da infecção por *T. gondii* e no dia do sacrifício que foi feito em condições assépticas em capela de fluxo laminar. As amostras foram incubadas em caldo BHI por 48 h a 37° C e semeadas em ágar McConkey por mais 48 h a 37° C em condições de aerobiose. As colônias foram coradas pela técnica de gram. Dados obtidos de pelo menos 3 animais por grupo. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni).

5.8 Após a infecção por *T. gondii*, a expressão de mediadores da inflamação intestinal demonstra ser diferente entre os probióticos

A análise de qPCR foi feita a partir da extração de RNA do íleo de camundongos C57BL/6 tratados com probióticos 24 horas antes de 7 dias após a infecção. Encontramos que a infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de IL-10, TNF e INF- γ bem como diminuem a expressão de iNOS, Defa3 e TGF- β em relação ao controle não infectado (NI). A expressão de Foxp3 foi maior em relação ao grupo NI. O tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus* mostrou uma tendência a reduzir a expressão de TNF, IFN- γ . A expressão de Foxp3, IL-10 foi maior no grupo tratado com *L. casei*, sendo que IL-10 foi menos expressa no grupo tratado com *L. aciophilus* que nos animais infectados e não tratados. A redução na expressão de iNOS foi maior no grupo tratado com *L. casei* em relação ao tratamento com *L. acidophilus* e ao grupo Infectado e não tratado. Resultado semelhante foi encontrado na expressão de TGF- β , onde a redução da expressão da citocina foi maior com o tratamento com *L. casei*, porém houve um pequeno aumento de TGF- β no intestino dos animais infectados e não tratados.

Figura 8

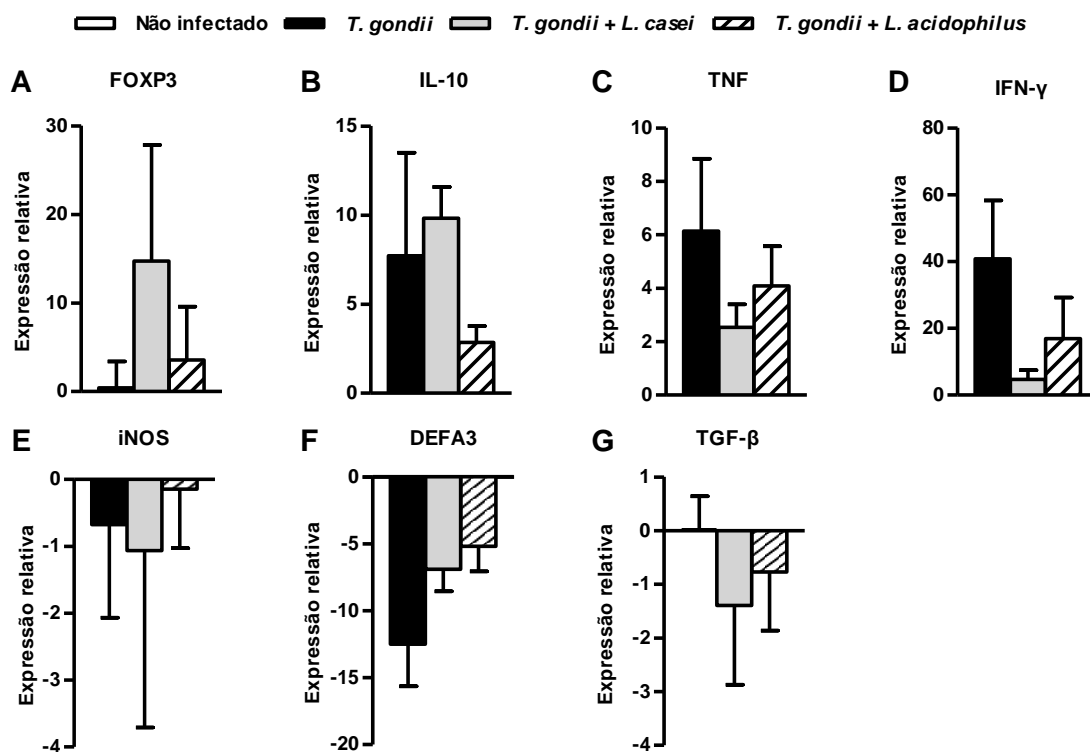


Figura 8. A expressão de mRNA foi analisada por qPCR em amostras de íleo de camundongos C57BL/6 tratados um dia antes e 7 dias depois da infecção oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. A expressão de Foxp3 e IL-10 foi maior após o tratamento dos animais com *L. casei* (A e B). Os animais infectados e não tratados tiveram a maior expressão de TNF e IFN-γ (C e D). A expressão de iNOS, DEFA3 e TGF-β foi reduzida com a infecção mesmo após o tratamento probiótico (A, B e C). Os gráficos mostram a expressão de mRNA em relação ao grupo não infectado (NI). Os dados foram obtidos de amostras de pelo menos 3 animais por grupo.

DISCUSSÃO

Vários estudos tem demonstrado o papel do uso de probióticos na redução e controle de várias doenças (ASAHARA *et al.*, 2011; KOBAYASHI *et al.*, 2010), assim resolvemos avaliar a ação de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* Shirota no modelo experimental de ileíte causada por *T. gondii* em camundongos C57BL/6. Essa infecção é caracterizada por uma fase aguda na qual o parasito atravessa o epitélio intestinal causando lesão e permitindo a translocação de bactérias (EGAN *et al.*, 2009; HAND *et al.*, 2012; HEIMESAAT *et al.*, 2006).

Primeiramente nós avaliamos se o tratamento com probióticos teria um efeito protetor e se haveria diminuição no parasitismo intestinal. Os animais tratados com *L. casei* ou *L. acidophilus* apresentaram um sobrevivência de 100% comparados aos animais infectados e não tratados ou tratados com *L. lactis*. Além disso, o tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus* foi capaz de reduzir o parasitismo no intestino delgado ao contrário do tratamento com *L. lactis* onde o parasitismo foi similar ao encontrado no intestino dos animais do grupo não tratado. Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram os efeitos benéficos de *Lactobacillus* sp. em outras doenças infecciosas onde houve diminuição do parasitismo por *Giardia lamblia* no intestino de camundongos (GOYAL; TIWARI; SHUKLA, 2011; HUMEN *et al.*, 2005) e apresenta efeitos protetores na infecção de animais com *Plasmodium chabaudi* (MARTINEZ-GOMEZ *et al.*, 2006). Além disso, o uso de probióticos associados ao tratamento com antibióticos apresenta melhores resultados na eliminação da amebíase em humanos (MANSOUR-GHANAIE *et al.*, 2003).

Quando analisamos os segmentos intestinais, verificou-se que houve uma evidente redução do parasitismo no jejuno distal e íleo e houve também uma redução na patologia associada à infecção oral por *T. gondii*. Além do mais os animais tratados com *L. acidophilus* apresentaram uma significativa redução nos sinais de inflamação na mucosa do intestino delgado comparados aos animais tratados com *L. lactis*, *L. casei* ou não tratados. De maneira interessante, um estudo anterior demonstrou que o tratamento com *L. acidophilus* estimula a resposta inflamatória Th₁ em humanos (VAN BAARLEN *et al.*, 2011). Esses resultados tornam evidentes que os efeitos anti-inflamatórios da resposta imune com o uso de probióticos dependem da espécie de

probiótico utilizada (MACHO FERNANDEZ *et al.*, 2011) e no caso do nosso experimento, também o patógeno utilizado para infectar animais.

A infecção por *T. gondii* resultou no menor percentual de encurtamento do intestino dos animais tratados com *L. casei* ou *L. acidophilus* em comparação aos animais tratados com *L. lactis* ou não tratados (2–5% vs. 15% respectivamente; $p < 0.05$). Foi previamente demonstrado que a ileíte causada pela infecção oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, resultou num percentual de encurtamento do intestino delgado de aproximadamente 15% nos animais tratados com Simvastatin, Resveratrol ou Curcumin quando comparados com os animais não tratados em que o percentual de encurtamento foi em torno de 22% (BERESWILL *et al.*, 2010). Essa diferença observada em nosso protocolo de infecção de 15% de encurtamento vs. 22% do outro estudo provavelmente foi pelo fato da infecção ter sido feita com 30 cistos no presente trabalho e com 100 cistos pelo outro grupo.

Foi demonstrado anteriormente que as células de Paneth de camundongos C57BL/6 após a infecção oral pela cepa 76K de *T. gondii*, aumentavam a liberação de grânulos e tiveram aumentada a expressão de mRNA de Crp-3 e Crp-5 (FOUREAU *et al.*, 2010) e também que a infecção de camundongos com *T. gondii* induz a perda de células de Paneth (SANTAOLALLA; ABREU, 2012). Desta forma resolvemos avaliar se tratamento com probióticos preservaria a quantidade dessas células no intestino delgado dos camundongos. Observou-se uma redução na quantidade de células de Paneth no intestino dos animais após a infecção por *T. gondii*. O tratamento com *L. acidophilus* ou *L. casei* induziu a uma menor perda dessas células no duodeno e jejuno proximal em comparação aos animais apenas infectados. Como as bactérias intestinais são controladas por peptídeos anti-microbianos produzidos pelas células de Paneth e enterócitos (BEVINS; SALZMAN, 2011; MCSORLEY; BEVINS, 2013) e considerando que as bactérias intestinais estão envolvidas na patologia na infecção por *T. gondii* (RAETZ *et al.*, 2013), uma maior quantidade dessas células pode ajudar a controlar a população bacteriana.

Células caliciformes são células epiteliais especializadas e responsáveis pela produção e liberação de muco que formam um “filme” protegendo e lubrificando o epitélio intestinal e estão envolvidas na proteção contra a translocação bacteriana (KIM;

HO, 2010). Recentemente foi relatado que a infecção por *T. gondii* causa uma alteração no equilíbrio da barreira intestinal devido a uma redução no número de células caliciformes (SANT'ANA *et al.*, 2012). Com o presente trabalho, verificou-se que após a infecção dos animais com *T. gondii* houve uma diminuição de células caliciformes no intestino e os animais tratados com *L. acidophilus* ou *L. casei* apresentaram uma quantidade mais elevada de células caliciformes comparados aos animais infectados e não tratados. O tratamento com *L. acidophilus* preservou mais células caliciformes no íleo, com uma quantidade mais próxima da quantidade de células do intestino dos animais não tratados e não infectados. Estudos têm evidenciado o papel de probióticos na manutenção da barreira intestinal através de vários mecanismos (AHRNE; HAGSLATT, 2011; PARASSOL *et al.*, 2005) e a preservação das células caliciformes, devido a sua importância na fisiologia do epitélio intestinal, pode ser mais uma forma de melhorar os danos causados pela inflamação causada por *T. gondii*.

Granulócitos são as primeiras células fagocíticas recrutadas para o sítio de infecção na fase inicial da infecção por *T. gondii* (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Estudos anteriores têm mostrado que em infecção oral por *T. gondii*, monócitos inflamatórios e células dendríticas são encontrados na lâmina própria do intestino delgado (DUNAY *et al.*, 2008). Baseados nesses estudos, avaliamos o acúmulo de macrófagos, neutrófilos e também eosinófilos através da avaliação da atividade das enzimas NAG, MPO e EPO, respectivamente. O ensaio mostrou que a infecção por *T. gondii* não altera a atividade de NAG, pois os animais infectados e não tratados ou não infectados e não tratados (NI) não apresentaram diferença em relação à ativação da enzima, contudo o tratamento com *L. casei* ou *L. lactis* foi capaz de reduzir a atividade da enzima. Com relação à MPO, observamos que não houve um aumento da atividade da enzima nos animais tratados com *L. lactis* ou *L. casei*, pois a atividade de MPO permaneceu no mesmo padrão do grupo não tratado e não infectado. Estudos já demonstraram a capacidade de redução da atividade de MPO após o uso de probióticos (JADHAV; SHANDILYA; KANSAL, 2013; WANG *et al.*, 2013). Nossos resultados estão de acordo com esses estudos demonstrando a capacidade de regulação de células da resposta imune inata, além disso, a diminuição no acúmulo de neutrófilos pode ajudar a explicar a diminuição no parasitismo e a patologia intestinal dos animais tratados com *L. acidophilus*, pois foi demonstrado recentemente que o parasito utiliza

da mobilidade de neutrófilos e se dissemina através do lúmen intestinal para outras células (COOMBES *et al.*, 2013). *Toxoplasma gondii* causa uma inflamação no intestino delgado que se assemelha à CD e é caracterizada por lesões induzidas por uma resposta Th₁ exacerbada (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012) e, portanto a análise de EPO, que é uma enzima característica de eosinófilos próprios de uma resposta Th₂, foi avaliada. Observou-se que o tratamento com *L. lactis* não foi capaz de evitar sua redução em relação aos animais não tratados e não infectados. O tratamento com *L. casei* elevou os níveis de EPO em relação aos animais do grupo não tratado e não infectado.

A contagem de leucócitos e a contagem diferencial em esfregaços sanguíneos no momento do sacrifício mostraram que houve um pequeno aumento na quantidade de leucócitos totais nos animais tratados com *L. lactis* e uma pequena redução dos leucócitos no grupo tratado com *L. acidophilus*. O esfregaço revelou ainda um pequeno aumento de eosinófilos no sangue dos animais tratados com *L. acidophilus*. Esses resultados são interessantes uma vez que já foi demonstrado que o uso de *L. acidophilus* altera a resposta imune para um perfil Th₁ em modelo de indução de alergia com ovalbumina (OVA) (KIM; CHOI; JI, 2008; VAN BAARLEN *et al.*, 2011) e quando administrados em humanos (VAN BAARLEN *et al.*, 2011).

A imunoglobulina A é responsável pela neutralização de toxinas e controle da microbiota intestinal, representando cerca de 70% da quantidade total de imunoglobulinas produzidas e sendo encontradas principalmente na mucosa intestinal (MACPHERSON *et al.*, 2008), por isso resolvemos analisar o perfil de células positivas para IgA no intestino delgado. Observamos que a infecção por *T. gondii* induziu um aumento de células IgA⁺ no intestino delgado e os tratamentos com *L. casei* ou *L. acidophilus* não alteraram a quantidade dessas células e a análise dos segmentos não mostrou uma mudança nesse perfil. Já foi demonstrado que a administração de probióticos induz ao aumento na produção de IgA em modelo de giardíase (GOYAL; TIWARI; SHUKLA, 2011) e em modelo de infecção por rotavírus em suínos gnotobióticos (ZHANG *et al.*, 2008). Entretanto, observamos que o uso de probióticos não induziu um aumento de detecção de células IgA⁺ no intestino delgado dos animais acima do número observado nos animais infectados e não tratados.

Estudos anteriores mostraram que a ileíte causada por *T. gondii* induz a disbiose com aumento da carga bacteriana no intestino delgado, com diminuição da diversidade de espécies e acúmulo de *Escherichia coli* e *Bacteroides/Prevotella* spp (HEIMESAAT *et al.*, 2006) e dominância de bactérias gram negativas *Escherichia* e *Shigella* da família *Enterobacteriaceae* (RAETZ *et al.*, 2013).

O cultivo microbiológico dos órgãos e sangue dos animais tratados ou não com probióticos, revelou que *L. casei* e *L. acidophilus* foram capazes de prevenir a translocação de bactérias gram negativas do lúmen intestinal para os órgãos analisados (fígado, pulmão, baço). Entretanto, o tratamento com *L. lactis* não alcançou o mesmo resultado sendo encontrado no sangue *E. coli* e no baço foi encontrado *Proteus* sp. A cultura microbiológica das fezes dos animais infectados com *T. gondii* mostrou que houve um aumento das espécies gram negativas e o tratamento com probióticos foi capaz de controlar o aumento da diversidade de espécies. Mesmo não cultivando as amostras para identificação de bactérias gram positivas, nossos resultados sugerem que houve uma disbiose e predominância de gram negativas como mostra a literatura, pois após a infecção houve um maior número de gênero de bactérias gram negativas identificadas nas amostras cultivadas, principalmente nas fezes onde a variedade foi maior.

Após a infecção oral por *T. gondii* de animais susceptíveis como a linhagem C57BL/6 utilizada em nossos experimentos, ocorre a indução da produção de IL-12 por células dendríticas (LIU *et al.*, 2006) que juntamente com TNF- α , induz a produção de IFN- γ por células NK na tentativa de eliminar o parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; GAZZINELLI *et al.*, 1993; GAZZINELLI *et al.*, 1994) e nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois a expressão relativa de mRNA de TNF- α e IFN- γ do grupo infectado e não tratado foi a mais alta encontrada em nossos experimentos. Contudo, o tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus* foi capaz de reduzir tanto a expressão de TNF- α quanto de IFN- γ induzida pela infecção. Estudos anteriores já demonstraram que *L. casei* Shirota reduz a expressão de TNF- α no intestino delgado de camundongos em modelo de inflamação intestinal (WATANABE *et al.*, 2009).

Além disso, foi demonstrado que *T. gondii* inicia a produção de IL-10 e TGF- β para inibir a produção de IFN- γ e impedir a ativação de macrófagos (GAZZINELLI *et*

al., 1996; KHAN; MATSUURA; KASPER, 1995; LANGERMANS *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a capacidade de *L. casei* em aumentar a expressão de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e Foxp3 e diminuir a expressão de mediadores pró-inflamatórios (PERAN *et al.*, 2007; YASUDA; SERATA; SAKO, 2008; ZAKOSTELSKA *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado previamente (van BAARLEN *et al.*) que *L. casei* não promove a expressão de mediadores de uma resposta Th₁ em intestino humano. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois detectamos expressão elevada de IL-10, aumentada de Foxp3 e em paralelo expressão diminuída de TNF e IFN- γ . Porém a administração de *L. acidophilus* está relacionada principalmente à diminuição da produção de IFN- γ (TORII *et al.*, 2007).

A expressão do mRNA da enzima sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), DEFA3 que é uma defensina produzida por células de Paneth e TGF- β foi reduzida em todos os grupos quando comparada aos animais não tratados e não infectados. Um estudo recente mostrou que os níveis de iNOS no fígado de ratos com esteatose hepática não alcoólica diminuiu após o tratamento com probiótico multi-cepas (ESPOSITO *et al.*, 2009) estando de acordo com nossos resultados que mostram a redução da expressão dessa enzima. A menor expressão de DEFA3 pode ser explicada pela menor quantidade de células de Paneth encontradas no intestino dos animais infectados com *T. gondii* tratados ou não com probióticos. A menor quantidade de células após a inflamação pode ter levado a uma menor quantidade de mRNA extraído do íleo dos animais e como consequência, uma menor expressão em relação aos animais não infectados e não tratados.

Nossos resultados mostram que o uso de probióticos vendidos comercialmente como é o caso de *L. casei* Shirota e *L. acidophilus* podem ser úteis na redução da inflamação do intestinal em infecção por *T. gondii*. Isso sugere que esse mecanismo possa também acontecer em humanos com inflamação intestinal provocada por um resposta imune tipo 1 exagerada, como por exemplo o que acontece em doença de Crohn. Os mecanismos pelo qual houve a proteção dos animais impedindo a translocação de bactérias intestinais para os órgãos precisam ser mais bem investigados, pois nossos resultados mostram que *L. casei* induz a expressão de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e Foxp3 e o tratamento com *L. acidophilus* induziu a redução de IFN- γ e TNF. Com relação ao tratamento com *L. lactis* que é utilizado pela indústria

de laticínios, não houve proteção com a administração desse probiótico talvez por sua pouca capacidade de regular a resposta imune como os outros probióticos usados nesse estudo.

CONCLUSÃO

- O tratamento com *L. casei* e principalmente com *L. acidophilus* diminui o parasitismo e a ileíte associada à infecção por *T. gondii*;
- A inflamação causada pela infecção por *T. gondii* reduz o tamanho médio dos intestinos delgado e o tratamento com probióticos *L. casei* ou *L. acidophilus* reduz esse encurtamento;
- A redução do número de células de Paneth e caliciformes esta associada à inflamação causada pela infecção por *T. gondii* e o tratamento com probióticos reduz parcialmente essa perda;
- A atividade das enzimas NAG e MPO, que estão associadas à macrófagos e neutrófilos respectivamente, foram reduzidas após o tratamento com *L. casei* ou *L. lactis*. A redução da atividade da enzima parece estar relacionada com a diminuição da inflamação já que o tratamento com *L. casei* apresentou uma maior redução de NAG e MPO e também de inflamação no intestino delgado dos animais. Além disso, o tratamento com *L. casei* manteve a atividade de EPO mais alta que no grupo infectado e não tratado, o que pode ter contribuído com a diminuição da inflamação;
- A infecção por *T. gondii* induz a um aumento de células IgA⁺ e os tratamentos com *L. casei* ou *L. acidophilus* reduziram levemente a quantidade de células, portanto o mecanismo que protegeu os animais da ileíte parece ser independente de IgA;
- A translocação bacteriana do lúmen intestinal para o fígado, baço, pulmão e sangue observada após a infecção por *T. gondii* ou nos animais tratados com *L. lactis* foi impedida com o tratamento com *L. casei* ou *L. acidophilus*. A análise

microbiológica das fezes demonstrou que houve menos gêneros bacterianos encontrados após o tratamento com *L. casei* e *L. acidophilus*, sugerindo um controle na mudança na flora bacteriana que ocorre após a infecção por *T. gondii*;

- A infecção por *T. gondii* induziu o aumento de TNF, IFN- γ e IL-10, contudo o tratamento dos animais com *L. casei* aumentou a expressão de Foxp3 e reduziu a expressão de TNF e IFN- γ , sugerindo o mecanismo que protegeu os animais parece ser dependente de células Foxp3⁺. Após o tratamento com *L. acidophilus* houve somente redução na expressão de TNF e IFN- γ e redução na expressão de IL-10 e uma ligeira redução na expressão de iNOS comparado ao grupo não infectado e não tratado. Portanto parece que o tratamento com *L. acidophilus* reduz os mediadores pró-inflamatórios e conserva a expressão de iNOS que é importante na eliminação do parasito. A expressão reduzida de DEFA parece estar relacionada com o menor número de células de Paneth no intestino delgado dos animais após a infecção. A redução na expressão de TGF- β parece ter sido compensado por outros mecanismos anti-inflamatórios como aumento da expressão de Foxp3 ou redução da expressão de INF- γ e TNF.

REFERÊNCIAS *

- AHRNE, S.; HAGSLATT, M. L. Effect of lactobacilli on paracellular permeability in the gut. **Nutrients**, 3, 104-117,2011.
- ALEY, S. B.; ZIMMERMAN, M.; HETSKO, M.; SELSTED, M. E.; GILLIN, F. D. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. **Infect Immun**, 62, 5397-5403,1994.
- ASAHARA, T.; SHIMIZU, K.; TAKADA, T.; KADO, S.; YUKI, N.; MOROTOMI, M.; TANAKA, R.; NOMOTO, K. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota against lethal infection with multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in mice. **J Appl Microbiol**, 110, 163-173,2011.
- BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, 307, 1915-1920,2005.
- BERESWILL, S.; MUNOZ, M.; FISCHER, A.; PLICKERT, R.; HAAG, L. M.; OTTO, B.; KUHL, A. A.; LODDENKEMPER, C.; GOBEL, U. B.; HEIMESAAT, M. M. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. **PLoS One**, 5, e15099,2010.
- BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. The potter's wheel: the host's role in sculpting its microbiota. **Cell Mol Life Sci**, 68, 3675-3685,2011.
- BRENNAN, P. C.; MCCULLOUGH, J. S.; CARR, K. E. Variations in cell and structure populations along the length of murine small intestine. **Cells Tissues Organs**, 164, 221-226,1999.
- CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILA, J.; MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. **PLoS One**, 4, e6669,2009.
- COOMBES, J. L.; CHARSAR, B. A.; HAN, S. J.; HALKIAS, J.; CHAN, S. W.; KOSHY, A. A.; STRIEPEN, B.; ROBEY, E. A. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2013.
- DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. **Clin Microbiol Rev**, 11, 569-588,1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, 11, 267-299,1998.

DUCHMANN, R.; KAISER, I.; HERMANN, E.; MAYET, W.; EWE, K.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). **Clin Exp Immunol**, 102, 448-455,1995.

DUNAY, I. R.; DAMATTA, R. A.; FUX, B.; PRESTI, R.; GRECO, S.; COLONNA, M.; SIBLEY, L. D. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, 29, 306-317,2008.

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunol Cell Biol**, 90, 668-675,2012.

EGAN, C. E.; SUKHUMAVASI, W.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. **Clin Exp Immunol**, 156, 17-24,2009.

ESPOSITO, E.; IACONO, A.; BIANCO, G.; AUTORE, G.; CUZZOCREA, S.; VAJRO, P.; CANANI, R. B.; CALIGNANO, A.; RASO, G. M.; MELI, R. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. **J Nutr**, 139, 905-911,2009.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends Parasitol**, 18, 355-359,2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, 40, 71-80,2004.

FOUREAU, D. M.; MIELCARZ, D. W.; MENARD, L. C.; SCHULTHESS, J.; WERTS, C.; VASSEUR, V.; RYFFEL, B.; KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, 184, 7022-7029,2010.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, 140, 859-870,2010.

GAZZINELLI, R. T.; AMICHAY, D.; SHARTON-KERSTEN, T.; GRUNWALD, E.; FARBER, J. M.; SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr Top Microbiol Immunol**, 219, 127-139,1996.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, 6115-6119,1993.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, 153, 2533-2543,1994.

GISBERT, J. P.; VILLAGRASA, J. R.; RODRIGUEZ-NOGUEIRAS, A.; CHAPARRO, M. Efficacy of hepatitis B vaccination and revaccination and factors impacting on response in patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, 107, 1460-1466,2012.

GOYAL, N.; TIWARI, R. P.; SHUKLA, G. Lactobacillus rhamnosus GG as an Effective Probiotic for Murine Giardiasis. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 2011, 795219,2011.

GUITON, R.; VASSEUR, V.; CHARRON, S.; ARIAS, M. T.; VAN LANGENDONCK, N.; BUZONI-GATEL, D.; RYFFEL, B.; DIMIER-POISSON, I. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. **J Infect Dis**, 202, 427-435,2010.

HAAG, L. M.; FISCHER, A.; OTTO, B.; PLICKERT, R.; KUHL, A. A.; GOBEL, U. B.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal *Escherichia coli* loads abrogate colonization resistance against *Campylobacter jejuni* in mice. **PLoS One**, 7, e35988,2012.

HAND, T. W.; DOS SANTOS, L. M.; BOULADOUX, N.; MOLLOY, M. J.; PAGAN, A. J.; PEPPER, M.; MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O., 3RD; BELKAID, Y. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science**, 337, 1553-1556,2012.

HARMSSEN, H. J.; RAANGS, G. C.; HE, T.; DEGENER, J. E.; WELLING, G. W. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. **Appl Environ Microbiol**, 68, 2982-2990,2002.

HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H. K.; DUNAY, I. R.; MOTER, A.; GESCHER, D. M.; SCHUMANN, R. R.; GOBEL, U. B.; LIESENFELD, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, 177, 8785-8795,2006.

HONDA, K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; ASAGIRI, M.; SATO, M.; MIZUTANI, T.; SHIMADA, N.; OHBA, Y.; TAKAOKA, A.; YOSHIDA, N.; TANIGUCHI, T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, 434, 772-777,2005.

HUMEN, M. A.; DE ANTONI, G. L.; BENYACOU, J.; COSTAS, M. E.; CARDOZO, M. I.; KOZUBSKY, L.; SAUDAN, K. Y.; BOENZLI-BRUAND, A.; BLUM, S.; SCHIFFRIN, E. J.; PEREZ, P. F. Lactobacillus johnsonii La1 antagonizes Giardia intestinalis in vivo. **Infect Immun**, 73, 1265-1269,2005.

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

KAWAI, T.; SATO, S.; ISHII, K. J.; COBAN, C.; HEMMI, H.; YAMAMOTO, M.; TERA, K.; MATSUDA, M.; INOUE, J.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nat Immunol**, 5, 1061-1068,2004.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection. **Infect Immun**, 73, 617-621,2005.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with Toxoplasma gondii in mice. **Parasite Immunol**, 17, 185-195,1995.

KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute Toxoplasma gondii infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, 13955-13960,1997.

KIM, J. Y.; CHOI, Y. O.; JI, G. E. Effect of oral probiotics (Bifidobacterium lactis AD011 and Lactobacillus acidophilus AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. **J Microbiol Biotechnol**, 18, 1393-1400,2008.

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100years. **Microbes Infect**, 10, 978-984,2008.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol Rep**, 12, 319-330,2010.

KOBAYASHI, K. S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y.; HENEGARIU, O.; INOHARA, N.; NUNEZ, G.; FLAVELL, R. A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science**, 307, 731-734,2005.

KOBAYASHI, T.; KATO, I.; NANNI, M.; SHIDA, K.; SHIBUYA, K.; MATSUOKA, Y.; ONOUE, M. Oral administration of probiotic bacteria, Lactobacillus casei and Bifidobacterium breve, does not exacerbate neurological symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 32, 116-124,2010.

LANGERMANS, J. A.; NIBBERING, P. H.; VAN VUREN-VAN DER HULST, M. E.; VAN FURTH, R. Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasma static activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production. **Parasite Immunol**, 23, 169-175,2001.

LECUIT, M.; ABACHIN, E.; MARTIN, A.; POYART, C.; POCHART, P.; SUAREZ, F.; BENGOUFA, D.; FEUILLARD, J.; LAVERGNE, A.; GORDON, J. I.; BERCHE, P.; GUILLEVIN, L.; LORTHOLARY, O. Immunoproliferative small intestinal disease associated with Campylobacter jejuni. **N Engl J Med**, 350, 239-248,2004.

LEON, F.; SMYTHIES, L. E.; SMITH, P. D.; KELSALL, B. L. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Adv Exp Med Biol**, 579, 117-132,2006.

LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with Toxoplasma gondii: a new model of inflammatory bowel disease? **J Infect Dis**, 185 Suppl 1, S96-101,2002.

LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii. **J Exp Med**, 184, 597-607,1996.

LIU, C. H.; FAN, Y. T.; DIAS, A.; ESPER, L.; CORN, R. A.; BAFICA, A.; MACHADO, F. S.; ALIBERTI, J. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against Toxoplasma gondii infection in mice. **J Immunol**, 177, 31-35,2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, 25, 402-408,2001.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, 489, 220-230,2012.

MACHO FERNANDEZ, E.; VALENTI, V.; ROCKEL, C.; HERMANN, C.; POT, B.; BONECA, I. G.; GRANGETTE, C. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. **Gut**, 60, 1050-1059,2011.

MACPHERSON, A. J.; MCCOY, K. D.; JOHANSEN, F. E.; BRANDTZAEG, P. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunol**, 1, 11-22,2008.

MANSOUR-GHANAIE, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. Efficacy of saccharomyces boulardii with antibiotics in acute amoebiasis. **World J Gastroenterol**, 9, 1832-1833,2003.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr Opin Biotechnol**, 17, 204-210,2006.

MARTINEZ-GOMEZ, F.; IXTA-RODRIGUEZ, O.; AGUILAR-FIGUEROA, B.; HERNANDEZ-CRUZ, R.; MONROY-OSTRIA, A. Lactobacillus casei ssp. rhamnosus enhances non specific protection against Plasmodium chabaudi AS in mice. **Salud Publica Mex**, 48, 498-503,2006.

MATHIAS, A.; CORTHESEY, B. N-Glycans on secretory component: mediators of the interaction between secretory IgA and gram-positive commensals sustaining intestinal homeostasis. **Gut Microbes**, 2, 287-293,2011.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, 489, 231-241,2012.

MCSORLEY, S. J.; BEVINS, C. L. Paneth cells: targets of friendly fire. **Nat Immunol**, 14, 114-116,2013.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii. **Int J Parasitol**, 39, 23-39,2009.

MIYOSHI, A.; JAMET, E.; COMMISSAIRE, J.; RENAULT, P.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. A xylose-inducible expression system for Lactococcus lactis. **FEMS Microbiol Lett**, 239, 205-212,2004.

MONTELEONE, G.; FINA, D.; CARUSO, R.; PALLONE, F. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol**, 22, 361-364,2006.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, 363, 1965-1976,2004.

MOW, W. S.; VASILIAUSKAS, E. A.; LIN, Y. C.; FLESHNER, P. R.; PAPADAKIS, K. A.; TAYLOR, K. D.; LANDERS, C. J.; ABREU-MARTIN, M. T.; ROTTER, J. I.; YANG, H.; TARGAN, S. R. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. **Gastroenterology**, 126, 414-424,2004.

MULLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. **Cell Mol Life Sci**, 62, 1297-1307,2005.

MUNOZ, M.; HEIMESAAT, M. M.; DANKER, K.; STRUCK, D.; LOHMANN, U.; PLICKERT, R.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; DUNAY, I. R.; WOLK, K.; LODDENKEMPER, C.; KRELL, H. W.; LIBERT, C.; LUND, L. R.; FREY, O.; HOLSCHEER, C.; IWAKURA, Y.; GHILARDI, N.; OUYANG, W.; KAMRADT, T.; SABAT, R.; LIESENFELD, O. Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced

immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. **J Exp Med**, 206, 3047-3059,2009.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev**, 240, 269-285,2011.

NAITO, E.; YOSHIDA, Y.; MAKINO, K.; KOUNOSHI, Y.; KUNIHRO, S.; TAKAHASHI, R.; MATSUZAKI, T.; MIYAZAKI, K.; ISHIKAWA, F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. **J Appl Microbiol**, 110, 650-657,2011.

NELL, S.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. **Nat Rev Microbiol**, 8, 564-577,2010.

OUELLETTE, A. J.; SELSTED, M. E. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. **FASEB J**, 10, 1280-1289,1996.

PARASSOL, N.; FREITAS, M.; THOREUX, K.; DALMASSO, G.; BOURDET-SICARD, R.; RAMPAL, P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Res Microbiol**, 156, 256-262,2005.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P.; CHANG, Y.; VOGELMAN, J. H.; ORENTREICH, N.; SIBLEY, R. K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, 325, 1127-1131,1991.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int J Parasitol**, 38, 561-569,2008.

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

PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; BAILON, E.; HENRIKSSON, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **J Appl Microbiol**, 103, 836-844,2007.

PORTER, E. M.; BEVINS, C. L.; GHOSH, D.; GANZ, T. The multifaceted Paneth cell. **Cell Mol Life Sci**, 59, 156-170,2002.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG,

H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBAACH, J.; META, H. I. T. C.; BORK, P.; EHRLICH, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, 464, 59-65,2010.

RAETZ, M.; HWANG, S. H.; WILHELM, C. L.; KIRKLAND, D.; BENSON, A.; STURGE, C. R.; MIRPURI, J.; VAISHNAVA, S.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; GILPIN, C. J.; HOOPER, L. V.; YAROVINSKY, F. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. **Nat Immunol**, 14, 136-142,2013.

RUMIO, C.; BESUSSO, D.; PALAZZO, M.; SELLERI, S.; SFONDRINI, L.; DUBINI, F.; MENARD, S.; BALSARI, A. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. **Am J Pathol**, 165, 373-381,2004.

SALZMAN, N. H.; DE JONG, H.; PATERSON, Y.; HARMSSEN, H. J.; WELLING, G. W.; BOS, N. A. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. **Microbiology**, 148, 3651-3660,2002.

SALZMAN, N. H.; UNDERWOOD, M. A.; BEVINS, C. L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Semin Immunol**, 19, 70-83,2007.

SANT'ANA, D. M.; GOIS, M. B.; ZANONI, J. N.; DA SILVA, A. V.; DA SILVA, C. J.; ARAUJO, E. J. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Int J Exp Pathol**, 93, 279-286,2012.

SANTAOLALLA, R.; ABREU, M. T. Innate immunity in the small intestine. **Curr Opin Gastroenterol**, 28, 124-129,2012.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, 3, 390-407,2006.

SEKSIK, P.; RIGOTTIER-GOIS, L.; GRAMET, G.; SUTREN, M.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; JIAN, R.; DORE, J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**, 52, 237-242,2003.

SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Exp Parasitol**, 123, 65-72,2009.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res**, 107, 253-260,2010.

STARK, P. L.; LEE, A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. **J Med Microbiol**, 15, 189-203,1982.

TORII, A.; TORII, S.; FUJIWARA, S.; TANAKA, H.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. *Lactobacillus Acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. **Allergol Int**, 56, 293-301,2007.

VAN BAARLEN, P.; TROOST, F.; VAN DER MEER, C.; HOOVELD, G.; BOEKSCHOTEN, M.; BRUMMER, R. J.; KLEEREBEZEM, M. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108 Suppl 1, 4562-4569,2011.

VOSENKAMPER, A.; STRUCK, D.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; WENT, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; PFEFFER, K.; ALBER, G.; LOCHNER, M.; FORSTER, I.; LIESENFELD, O. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. **Eur J Immunol**, 34, 3197-3207,2004.

WAGNERBERGER, S.; SPRUSS, A.; KANURI, G.; STAHL, C.; SCHRODER, M.; VETTER, W.; BISCHOFF, S. C.; BERGHEIM, I. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. **J Nutr Biochem**, 24, 531-538,2013.

WANG, Y.; LIU, Y.; KIRPICH, I.; MA, Z.; WANG, C.; ZHANG, M.; SUTTLES, J.; MCCLAIN, C.; FENG, W. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces hepatic TNF α production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. **J Nutr Biochem**, 2013.

WATANABE, T.; NISHIO, H.; TANIGAWA, T.; YAMAGAMI, H.; OKAZAKI, H.; WATANABE, K.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; OSHITANI, N.; ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, K.; ARAKAWA, T. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 297, G506-513,2009.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol**, 39, 895-901,2009.

YASUDA, E.; SERATA, M.; SAKO, T. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. **Appl Environ Microbiol**, 74, 4746-4755,2008.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHKE, M. A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.; BLUMENSCHIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A.; RENNICK, D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**, 116, 1310-1316,2006.

ZAKOSTELSKA, Z.; KVERKA, M.; KLIMESOVA, K.; ROSSMANN, P.; MRAZEK, J.; KOPECNY, J.; HORNOVA, M.; SRUTKOVA, D.; HUDCOVIC, T.; RIDL, J.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. **PLoS One**, 6, e27961,2011.

ZHANG, W.; AZEVEDO, M. S.; WEN, K.; GONZALEZ, A.; SAIF, L. J.; LI, G.; YOUSEF, A. E.; YUAN, L. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. **Vaccine**, 26, 3655-3661,2008.