



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS**

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NAS  
PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DE UMA VACINA  
RECOMBINANTE**

**ANTÓNIO RIBEIRO CHISSULULO CHISSOCA**

**Florianópolis  
2016**



**ANTÔNIO RIBEIRO CHISSULULO CHISSOCA**

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NAS  
PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DE UMA VACINA  
RECOMBINANTE.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Oscar Bruna Romero

**Florianópolis  
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chissoca , António Ribeiro Chissululo  
Influência da microbiota intestinal nas propriedades  
imunológicas de uma vacina recombinante / António Ribeiro  
Chissululo Chissoca ; orientador, Prof. Dr. Oscar Bruna  
Romero - Florianópolis, SC, 2016.  
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Microbiota  
Intestinal. 3. Vacinas Recombinantes. I. Romero, Prof. Dr.  
Oscar Bruna . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.  
III. Título.

**“Influência da microbiota intestinal nas propriedades imunológicas de uma vacina recombinante”**

Por

**Antônio Ribeiro Chissululo Chissoca**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (17/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



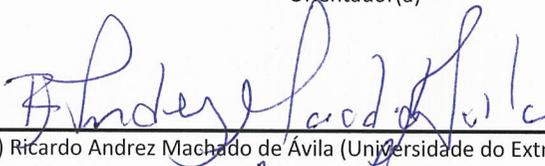
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

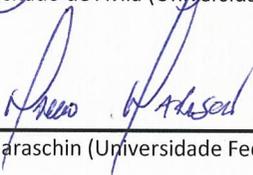
Banca examinadora:



Dr(a) Oscar Bruna Romero (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de Junho de 2016.



*Dedico este trabalho aos meus Pais,  
meus filhos, meus irmãos, minha  
esposa pois sem eles eu não seria  
ninguém neste mundo.*

*O amor em si*

*O amor em si já diz tudo, faz a vida  
acontecer.*

*Enquanto saudade é a essência do  
sentimento*

*Faz da arte de amar uma grande  
virtude.*

*Constrói o perdão, através da janela  
da alma revela bons pensamentos.*

*Comanda os passos da vida, que de  
tão envolventes deixam o nosso  
caminho mais prazeroso e confiável.*

*É a satisfação de estarmos felizes e  
assim podemos agradecer a Deus por  
tudo.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Instituto Superior Politécnico do Huambo pelo convenio com a Universidade Federal de Santa Catarina – Brasil, nas pessoas de *Professores doutores, Bonifácio Vissetaca e Hélder Lucas Chipindo*, do Instituto Superior Politécnico da Universidade José Eduardo dos Santos em Angola.

Aos Coordenadores do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, *Professores Doutores Marcelo Maraschim, Oscar Bruna Romero e o Professor Doutor Mario Steindel*, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação científica.

*Ao Professor Doutor Oscar Bruna Romero*, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoios incondicionais que fizeram crescer os meus conhecimentos acadêmicos e científicos e, sem dúvida, veio a estimular o meu desejo de querer, sempre, saber mais e ganhar a vontade de querer fazer melhor. Agradeço profundamente a oportunidade que me deu em me integrar no seu grupo de investigação, e reconheço este momento com imensa gratidão, não só pela confiança depositada em mim, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do Projeto.

*Ao MsC Abadio de Oliveira da Costa Junior*, um muito obrigado pela amizade que me manifestou. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição durante a realização de todos os experimentos no laboratório e no biotério.

*Ao Professor Doutor, Carlos Zanetti* pelo estágio decência, a *Professora Doutora Célia Regina Monte Barardi* pelo apoio durante o curso das disciplinas. Os meus agradecimentos são extensivos a todos os professores que retiraram um pouco de seu precioso tempo para poderem dar aulas durante o período do mestrado, muito obrigado.

Aos meus colegas do laboratório, *Abadio, Carlos, Wellington, Vinicius, e as colegas Stephany, Jessica, Aline, e Ana Clara*, um muito obrigado pela nossa amizade, companheirismo e ajuda, pois são fatores muito importantes para a realização desta dissertação e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Agradeço-lhes a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo.

Aos meus colegas de casa, *Domingos Samanjata, Marino Leopoldo, Alexandrino Martinho, Silvano da Silva* e em especial *Adriana Costa Cardoso* pela nossa convivência durante os dois anos de mestrado. Pela amizade, companhia e afeto, Muito obrigado.

Ao meu amigo Jefferson Virgílio, pela ajuda na correção da língua portuguesa, o meu muito obrigado.

*Aos meus filhos: Maria Carolina Chissoca, Alberta Rosa Chissoca, Debora Chissoca, Daniel Monteiro Chissoca e Adolfo Sumbelelo Chissoca, a minha esposa Adelaide Bulaio Sumbelelo, muito obrigada por cuidar de nossos filhos.*

## RESUMO

A microbiota humana é o conjunto de microrganismos que habitam as superfícies externas e internas do nosso corpo, tais como, pele, mucosa oral e respiratória, ou o trato gastrointestinal (TGI) e geniturinário (TGU). Este conjunto de microrganismos é adquirido pelos recém-nascidos inicialmente no momento do parto. Entre os 18 e 24 meses se torna já semelhante à microbiota de um adulto. Uma das principais funções dessa microbiota é a estimulação do sistema imune, tornando-o apto a desenvolver suas funções de homeostase e defesa, através do amplo leque de células e moléculas que o compõe. Existem evidências de que variações na microbiota intestinal podem causar alterações no sistema imunológico, podendo constituir um ambiente que modula de forma negativa ou positiva a indução de uma resposta imune eficaz. O desequilíbrio dessa microbiota (disbiose) pode provocar não só dano tecidual, mas também anergia imune, tolerização ou inflamação intestinal crônica que, caso persistam, podem comprometer a resposta do hospedeiro aos antígenos, e dentre eles àqueles que formam parte das vacinas. O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o impacto das alterações provocadas experimentalmente na microbiota intestinal sobre a resposta imune de camundongos imunizados. Os animais foram vacinados por via subcutânea com  $10^8$  ufp/animal ( $10^9$  ufp/mL) de vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante. Para avaliar a ação de variações significativas da microbiota intestinal e correlacioná-la com a imunogenicidade das vacinas foram traçados dois desenhos experimentais baseados na depleção da microbiota com antibióticos. No primeiro desenho experimental (A), camundongos BALB/c foram tratados com 250 mg de axetilcefuroxima e 25 mg de enramicina diluídos em 250 ml de água estéril administrado por via oral durante 14 dias. Para o segundo desenho experimental (B) utilizaram-se diferentes combinações de antibióticos não absorvíveis: Gentamicina (G), Metronidazol (M), Neomicina (N) e Vancomicina (V), administrada via oral (1 g/L) durante 14 dias. Durante o tratamento, os animais foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento mediante a mensuração do seu peso corporal, e foram também realizadas coletas de fezes para realização de culturas bacterianas e quantificação da microbiota intestinal por PCR quantitativa (qPCR).

Os resultados mostraram que o desenho experimental B conseguiu ter uma eficácia maior quanto à depleção da microbiota, apesar de que também foram observadas com ele as maiores taxas de diminuição do peso corporal dos animais. Os grupos de animais tratados

com M apresentaram maior redução do peso corporal médio e não tiveram sua microbiota totalmente depletada. Já, uma significativa redução da microbiota foi observada no início do tratamento com NGV ainda sem observar uma redução proporcional do seu peso médio corporal. O resultado mais relevante do nosso trabalho é o que diz a respeito do fato de que a depleção/seleção da microbiota intestinal utilizando NGV e MGV teve impacto significativo na imunogenicidade das vacinas recombinantes adenovirais atenuadas, já que os níveis de anticorpos anti-adenovirais resultantes foram menores, apresentando valores de significância estatística (p) de 0.0154 e 0.0293, respectivamente, em relação ao grupo controle.

**Palavras-chave:** Microbiota Intestinal, Vacinas Recombinantes.

## ABSTRACT

Human microbiota is formed by a group of microorganisms that inhabit our body surfaces, such as skin, respiratory or oral mucosa as well as the gastrointestinal (GIT) or genital-urinary (GUT) tracts. Between 18 and 24 months, this microbiota becomes similar to that of an adult human being. One major function of these microorganisms is to stimulate a diversity of immune functions, making our immune system able to perform their homeostasis and defense functions, mainly through the use of a wide arrange of cells and humoral factors that make part of it. Evidences suggest that variations in gut microbiota contents may cause positive or negative alterations in immune responses, thus representing an immune-modulative microenvironment. Disbiosis (lost of equilibrium) may be responsible not only for intestinal tissue damage but also for immune anergy, tolerization or chronic intestinal inflammation, which, if maintained for long periods, may compromise host's response to antigens, including those that form the vaccines. Our current study had the aim of elucidating the impact that experimental alterations in gut microbiota of mice might have on the immune responses induced in those animals by vaccination. Mice were immunized subcutaneously with  $10^8$  pfu/animal ( $10^9$  pfu/mL) of a human adenovirus type 5 (HuAdV) recombinant attenuated vaccine. To evaluate significant alterations in gut microbial contents and to correlate those with vaccine immunogenicity, two experimental designs were planned, based on different antibiotic usage schedules. In the first experimental design (A), BALB/c mice were treated with 250 mg of axetilcefuroxime and 25 mg of enramicine, diluted in 250 ml of sterile water, administered orally for 14 days. As for the second experimental design (B), different combinations of non-absorbable antibiotics were used: Gentamicin (G), Metronidazole (M), Neomycin (N) and Vancomycin (V), all of them administered orally at 1 g per liter of drinking water for 14 days. During treatment, mouse development was evaluated by measuring body weight, and fecal samples were also collected to perform bacterial cultures and to quantify total gut microbiota by quantitative PCR (qPCR). Results show that experimental design B was more efficient in terms of microbiota depletion; despite the most significant decrease in body weight was also observed in those groups of mice. Mice treated with M displayed a major reduction in body weight and did not have their gut microbiota totally depleted. In contrast, a significant reduction in gut microbiota was observed during the first ten days of antibiotic

treatment with NGV, without observing any significant reduction in mean body weight.

The most relevant result of our study relates to the fact that depletion/selection of gut microorganisms in animals treated with NGV or MGV had a significant impact in the immunogenicity of our recombinant attenuated viral vaccines, since the levels of anti-adenovirus antibodies detected were significantly lower in those groups of immunized mice when compared to the other groups of mice, with p values of 0.0154 and 0.0293, respectively.

**Key words:** Intestinal microbiota, Recombinant Vaccines.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da distribuição da microbiota no trato gastrointestinal humano.....	26
Figura 2- Desenho esquemático dos fatores que afetam a composição da microbiota intestinal.....	31
Figura 3 – Desenho esquemático do desequilíbrio da microbiota intestinal (Disbiose).....	33
Figura 4 - Algumas das interações demonstradas entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico. ....	36
Figura 5 – Desenho esquematizado representando a comparação de duas vilosidades intestinais.....	38
Figura 6 - Imagem de uma região com saneamento básico deficiente. Ilustração de uma cidade com saneamento básico deficiente.....	41
Figura 7 – Fluxograma geral das atividades práticas. ....	49
Figuras 8 e 9 – Ilustra esquematicamente os desenhos experimentais (A) e (B). ....	50
Figura 10 – Ensaio de culturas bacterianas meio bile-esculina. ....	57
Figura 11 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), do crescimento bacteriano em placas de Petri para avaliar a depleção da microbiota intestinal.....	59
Figura 12 – Níveis de IgG total medidos por titulação dos soros dos diferentes grupos de camundongos imunizados.....	61
Figura 13 – Avaliação detalhada do impacto do probiótico utilizando o pool do soro dos camundongos. ....	62
Figura 14 – Ensaio de culturas bacterianas meio BHI. ....	65
Figura 15 - Resultado obtido da avaliação do peso dos animais no decorrer do tratamento. ....	66
Figura 16 – Perfil de amplificação do DNA padrão com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250, 1:31250.....	67
Figura 17 – Padronização da curva de Melting padrão com a temperatura de desnaturação de 82.74°C do DNA com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250, 1:31250.....	68
Figura 18 – Perfil de amplificação do DNA das cinco amostras fecais dos camundongos tratado com antibióticos com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250 até 1:31250.....	69

Figura 19 – Pico da Curva de Melting do produto final da PCR com a temperatura de desnaturação de 83.4°C. ....	70
Figura 20 - Determinação da depleção da microbiota intestinal. ....	74
Figura 21- Padronização das melhores diluições para detectar as Imunoglobulina G total específica. Medidos pelo teste do ELISA de soro dos camundongos dos cinco grupos experimentais.....	76
Figura 22 – Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 15 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.....	77
Figura 23 – Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 30 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.....	79
Figura 24 - Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 15 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.....	80

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de microrganismos mais relevantes utilizados como probióticos nos seres humanos. ....	34
Tabela 2 – Diferentes combinações de antibióticos por grupos; .....	51
Tabela 3. - Cálculo do número de moléculas de cada um dos pontos da curva padrão utilizada para quantificação das bactérias presentes nas amostras fecais. ....	72
Tabela 4 – Ilustra o cálculo do número de moléculas de DNA 16S que representam o número total de bactérias nas amostras fecais dos diferentes grupos de animais experimentais, depois de 5 dias de tratamento.....	73
Tabela 5 – Ilustra os cálculos do número de moléculas de DNA 16S por gramas depois de 10 dias de tratamento. ....	73
Tabela 6 - Ilustra os cálculos do número de moléculas de DNA 16S por gramas depois de 15 dias de tratamento. ....	73



## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Antibiótico
ABNT	Associação brasileira de normas técnicas.
AMA-1	Antígeno da membrana apical – 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CD4+	Células TCD4+
CD8+	Células TCD8+
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção ligado a enzima)
G	Gentamicina
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
HuAd5V	Adenovírus humano tipo 5
IECs	Células epiteliais intestinais
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	10,17,22,23- Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
iPOL	Vacina da poliomielite inativada
LN	Nódulos linfáticos
LNRs	Receptores dos nódulos linfáticos
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Metronidazol
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MLNs	Nódulos linfáticos mesentéricos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B

NK	Natural Killer
N	Neomicina
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
OPD	Ortofinilenodiamina
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PB	Probióticos
PBS	Solução salina fosfato tamponada
qPCR	Reação em cadeia de polimerase
PF	primer forward
PR	primer reverse
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RNA	Acido ribonucleico
SBF	Bactérias segmentadas filamentosas
SES	Socioeconômicas
TGI	Trato gastrointestinal
TGU	Trato geniturinário
Th-17	Células T helper 17
TLR	Toll-like receptor
TLR5	Toll-like receptor-5
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TV	Trato vaginal
UFC	Unidades formadoras de colônias
V	Vancomicina
VAD	Deficiências de vitamina A
VIT	Vírus da influenza trivalente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
1.1 MICROBIOTA INTESTINAL .....	23
<b>1.1.1 Aquisição da microbiota intestinal</b> .....	<b>24</b>
<b>1.1.2 Distribuição da microbiota intestinal</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1.3 Classificação da microbiota intestinal</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1.4 Funções da microbiota intestinal</b> .....	<b>28</b>
<b>1.1.5 Fatores que alteram a composição da microbiota intestinal</b> .	<b>30</b>
<b>1.1.6 Disfunção da microbiota intestinal (DISBIOSE)</b> .....	<b>32</b>
1.2 PROBIÓTICOS.....	33
1.3 A MICROBIOTA INTESTINAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	34
1.4 A MICROBIOTA INTESTINAL E A EFICÁCIA DAS VACINAS .....	39
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>45</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 FLUXOGRAMAS .....	49
4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS (A) E (B) .....	50
4.3 ASPECTOS ÉTICOS .....	51
4.4 FORMULAÇÕES DAS COMBINAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS PARA DEPLEÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	51
4.5 COLETAS DE AMOSTRAS DE FEZES E PROCESSAMENTO	52
4.6 CULTURAS DAS BACTÉRIAS EM PLACA DE PETRI .....	52
4.7 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO TOTAL .....	52
4.8 qPCR PARA DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	52
4.9 RECUPERAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM PROBIÓTICOS.....	53
4.10 IMUNIZAÇÕES .....	54
4.11 COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	54

4.12 TESTES IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) .....	55
5. RESULTADOS.....	57
5.1 RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL (A) .....	57
5.1.1 Avaliação da depleção da microbiota intestinal pelo método de cultura bacteriana.....	57
5.1.2 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulina IgG totais após imunização.....	61
5.1.3 Avaliação detalhada do impacto do probiótico .....	61
5.2 RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL (B) .....	63
5.2.1 Cultura bacteriana em meio BHI .....	64
5.2.2 Avaliação do peso dos camundongos durante o tratamento ..	65
5.2.3 Padronização da técnica da qPCR desde cultura bacteriana.	67
5.2.4 Padronização da curva de melting desde cultura bacteriana.	68
5.2.5 Perfil de amplificação e curvas de dissociação da qPCR do DNA desde as amostras de fezes dos camundongos.....	68
5.2.6 Calculo da curva padrão .....	71
5.2.7 Calculos do número de moléculas de rDNA 16s nas amostras de fezes após 5, 10 e 15 dias de tratamento .....	72
5.2.8 Avaliação da depleção da microbiota intestinal dos camundongos tratados com combinações de antibioticos .....	74
5.2.9 Padronização da melhor diluição do soro para detecção da concentração das imunoglobulinas IgG totais de camundongos após 15 e 30 dias de imunização .....	75
5.2.10 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 15 dias de imunização dos camundongos .....	76
5.2.11 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 30 dias de imunização dos camundongos .....	78
5.2.12 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 45 dias de imunização dos camundongos .....	80
6. DISCUSSÃO .....	83
7. CONCLUSÕES GERAIS .....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

# 1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal humana é definida como o conjunto de microrganismos que habitam as superfícies externas e internas do nosso corpo, tais como, pele, mucosa oral e respiratória, ou o trato gastrointestinal (TGI) e geniturinário (TGU) (THOMAS, GREER, 2010).

A microbiota intestinal é um dos ecossistemas mais complexos e menos conhecidos do mundo. Estima-se, porém, que a sua importância para o ser humano baseia-se tanto em dados qualitativos quanto quantitativos (PEREZ, 2014). A microbiota intestinal comensal é composta por trilhões de microrganismos pertencentes principalmente à família Enterobacteriaceae ou aos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium* e *Enterobacter* (GUARNER; MALAGELADA, 2003; BRANDT; SAMPAIO; MUIKI, 2006).

Toda esta comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkühn, na superfície do epitélio intestinal, e em qualquer parte do trato digestivo (SAVAGE, 1987). Seu estabelecimento e manutenção constituem um processo complexo de sucessão ecológica que pode ser influenciado por vários fatores, como microbiota materna, tipo do parto, idade, dieta, ambiente, utilização de probióticos e prebióticos, tratamentos farmacológicos, tolerância oral, interações intermicrobianas e interações microrganismo-hospedeiro com a presença de certos genes e receptores (VAN DER WAAIJ, 1989; MACKIE et al., 1999; SAVAGE, 1999, BOURLIOUX et al., 2003).

Os primeiros estudos sobre a microbiota foram realizados por Hungate, (1950); Freter, (1969), a partir de cultura de material fecal em anaerobiose. Com o advento da biologia molecular, tornou-se possível determinar as espécies dominantes, subdominantes e transientes (AMANN et al., 1990; ZOETENDAL et al., 1998). Nos últimos anos, registraram-se avanços na compreensão das relações entre a microbiota e o hospedeiro, bem como entre os próprios microrganismos, em seus respectivos nichos ecológicos. Estes avanços resultam da integração translacional da microbiologia com especialidades como biologia molecular, fisiologia celular, imunologia e ecologia (PEREZ, 2014).

Além das técnicas de biologia molecular é possível realizar nos dias de hoje estudos utilizando novas tecnologias de sequenciamento em larga escala para o estudo da microbiota intestinal em seres humanos,

como as tecnologias “ômicas” (metagenômica, metatranscriptômica, metabolômica e metaproteômica etc.). Existem vários estudos publicados recentemente utilizando estas tecnologias (GOSALBES et al., 2011; KOLMEDER et al., 2012; A MARCOBAL et al., 2013; MANDAL; SAHA; DAS, 2015).

### 1.1.1 Aquisição da microbiota intestinal

Estudos publicados recentemente indicam que o trato gastrointestinal de um feto normal é considerado estéril, reconhecendo-se que a colonização microbiana pode iniciar durante o parto (CALLADO, MAND BAUERL et al., 2012), assim, durante o nascimento, dependendo do tipo de parto, o recém-nascido será colonizado por bactérias vindas da mãe (se o parto for vaginal será por microrganismos deste ambiente), e até mesmo pela microbiota da equipe técnica, quando o parto for cesariano. Portanto, imediatamente após o parto vaginal, os bebês podem ter cepas bacterianas derivadas de fezes das mães no trato gastrointestinal superior (BETTELKERIM et al., 2009).

Porém, crianças nascidas por cesariana também podem ser expostas a microbiota de suas mães, mas é mais provável que a exposição inicial seja a partir do ambiente circundante, tais como o ar, outras crianças, e a equipe de enfermagem, que servem como vetores para a transferência (SCHWIERTZ et al., 2003).

Consideram-se também outras formas mais simples de passagem de bactérias da mãe para o bebê oriundas da microbiota oral e cutânea materna, transferidas através da amamentação, por beijos e carícias também são possíveis. Durante a primeira semana de vida, as bactérias intestinais criam um ambiente próprio que facilita a permanência e evita a colonização subsequente de espécies anaeróbicas estritas principalmente pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, e *Ruminococcus* (FAVIER, 2002). Assim, podemos dizer que bebês amamentados se tornam colonizados por *Bifidobactérias*, possivelmente devido ao conteúdo de fatores de crescimento de *Bifidobactérias* do leite materno (COPPA et al., 2004; COPPA et al., 2006). Por outro lado, considera-se que a microbiota dos lactentes alimentados com formulações seja mais diversificada, com um elevado número de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bifidobactérias*, *Bacteroides*, e *Clostrídios*. Pode-se considerar que todas as crianças são inicialmente colonizadas por um grande número de *E. coli* e *Streptococcus spp.* (FANARO et al., 2003).

Dentro de alguns dias após o nascimento, o número de bactérias atinge de  $10^8$  a  $10^{10}$  por grama de fezes e começa a se estabelecer de forma permanente. Entre os 18 e 24 meses se torna já semelhante à microbiota de um adulto (MACKIE, SGHIR, GASKINS, 1999; SCHWIERTZ et al., 2003).

Em uma série de estudos publicados, os autores já afirmavam que a sequência de colonização é relativamente constante e característica em cada espécie animal com somente algumas variações dependendo do tipo de parto (cesariana ou natural), o tipo de alimento recebido (leite materno ou fórmula) e o grau de exposição ao ambiente (SIMON, GORBACH, 1984; NICOLI, 1995; MACKIE et al., 1999; MCFARLAND, 2000; SAARELA et al., 2002; GUARNER, MALAGELADA, 2003; NICOLI, VIEIRA, 2004).

### **1.1.2 Distribuição da microbiota intestinal**

Há trinta anos, já se tinha feito alguns estudos sobre a distribuição da microbiota ao longo do TGI dos mamíferos (Figura 1) e descreveu-se que nele abriga uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, podendo ser colonizado por cerca de  $10^{12}$  células microbianas indígenas procaríotas e eucariotas (SAVAGE, 1977; NICOLI, VIEIRA, 2004; KAPER, SPERANDIO, 2005).

A distribuição de bactérias no intestino delgado mostra a quantidade de bactérias que penetram de imediato pelo estômago e a motilidade apresentada pelo mesmo. O intestino delgado contém elevadas quantidades de microrganismos anaeróbios facultativos e baixas contagens de anaeróbios estritos (DRASAR, 1988; NICOLI, 1995; KLEESSEN et al., 2000).

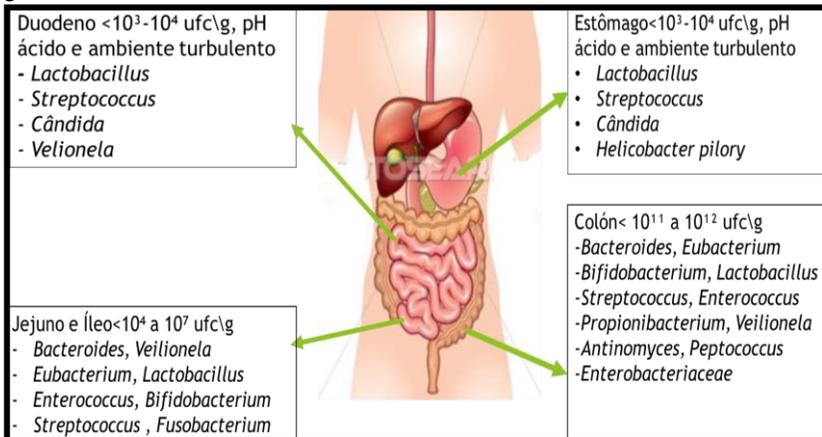
Assim, considera-se que a microbiota gastrointestinal varia em função da espécie animal, de localizações longitudinais e transversais e da idade do hospedeiro Nicoli, 1995. Em suas descrições de fatores que influenciam a microbiologia do ambiente alimentar (MACKIE et al., 1999), afirmaram que as bactérias não são distribuídas aleatoriamente por todo o trato gastrointestinal mas, ao contrário, são encontradas em níveis populacionais e em distribuições de espécies que são característicos de regiões específicas do trato gastrointestinal (DUNNE, 2001).

Porém, o conceito de intestino como o mais complexo ecossistema microbiano conhecido surge do fato de que mais de 75% do peso seco de produtos fecais são compostos por células bacterianas e que

cada grama contém, aproximadamente,  $10^{12}$  microrganismos de aproximadamente, 50 a 200 gêneros (DUNNE, 2001).

A composição e a distribuição geográfica desta microbiota ao longo do trato gastrointestinal são de grande relevância, pois permitiria conhecer a localização dos diferentes gêneros bacterianos ao longo do intestino, embora se saiba que não é uniforme, variando de  $10^1$  a  $10^3$  bactérias por grama de conteúdo do estômago e duodeno, evoluindo para  $10^4$  a  $10^7$  bactérias por grama do conteúdo do jejuno e do íleo e culminando em  $10^{11}$  a  $10^{12}$  bactérias por grama de conteúdo do colón. Estes números representam quantidades enormes de microrganismos exógenos vivendo sobre nós, mas diferente do que se acreditava anteriormente (que as bactérias estariam em número 10 vezes maior do que as nossas próprias células), estudos publicados recentemente consideram que possuímos números de bactérias bastante similares aos nossos próprios números de células; em concreto  $3.9 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colônias (ufc) contra  $3.0 \times 10^{13}$  de células humanas (SENDER, FUCHS, S; MILO, R. 2016).

Figura 1 - Desenho esquemático da distribuição da microbiota no trato gastrointestinal humano.



Fonte: Adaptado de (SENDER, FUCHS, S; MILO, R.2016).

Assim nas porções do estômago e duodeno as concentrações de microbiota variam por causa do fluxo rápido de conteúdo, secreções do intestino delgado e o pH ácido no estômago. Estas condições restringem a colonização microbiana. No jejuno/íleo devido a motilidade intestinal ser mais lenta favorece uma colonização microbiana um pouco mais acentuada e por último, na porção do colón por ter um pH neutro

abundância relativa de nutrientes (CHO não digeríveis e componentes alimentares que escaparam da digestão no TGI), tem um ambiente propício para proliferação da microbiota intestinal.

### 1.1.3 Classificação da microbiota intestinal

Considera-se desde 1977 que a microbiota intestinal pode pertencer a duas classes: autóctone e alóctone. A primeira está relacionada com aqueles microrganismos que são permanentes e residem em nós (também conhecidas como microbiota residente ou indígena). Esta residência é permanente (colonizam), mas esses microrganismos não produzem doença em condições normais e têm um papel importante na manutenção da integridade do hospedeiro, quando em equilíbrio em um sítio específico. Existem alguns estudos que afirmaram que a microbiota residente distribui-se ao longo do intestino em compartimentos espacialmente definidos e intimamente relacionados à função daquele segmento. Descrevendo que tal distribuição se dá ao longo de dois eixos básicos: longitudinalmente, aumentando o número total de bactérias progressivamente no sentido distal e radialmente, selecionando espécies em três nichos diferentes: luz intestinal, camada de muco e justapostas ao epitélio intestinal. Se houver uma perturbação da microbiota intestinal gerando estados inflamatórios ocorrerá uma redistribuição topográfica da microbiota intestinal (NICOLI JR, 2004; SWIDSINSKI et al., 2005). Assim afirma-se que a aderência da microbiota intestinal comensal a epítomos específicos de mucina garante a colonização do muco e direciona a composição de uma comunidade bacteriana específica (SHARMA, YOUNG, NEU, 2010). Salienta-se que algumas bactérias intestinais secretam produtos bacterianos (ex. lipopolissacarídeos, flagelina, etc.) que ultrapassam o muco e são identificados pelos receptores reconhecedores de padrões (ex. Toll-Like Receptor, TLR), que modulam a produção de mucina pela ativação dos genes correspondentes, principalmente a mucina do tipo 2 (MUC2). A mucina, por sua vez, mantém níveis basais em resposta à microbiota normal (tolerância ou regulação baixa) ou aumentada em caso de presença de patógenos como *Clostridium* ou *Estafilococcus* (SHARMA, YOUNG, NEU, 2010).

A segunda população de microrganismos se refere a microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, encontrados em superfícies externas e internas, durante algumas horas, dias ou mesmo semanas. É de pouca importância se a microbiota residente estiver equilibrada. Caso ocorram alterações neste equilíbrio,

os microrganismos transitórios podem proliferar-se e produzir doença (MACKIE et al., 1999). Estes microrganismos podem se associar a mucosa porém sem adesão aos receptores de reconhecimento de padrão (PETERSON et al., 2007). A diferença entre as comunidades bacterianas associada a mucosa do colón, lume e comunidade bacteriana fecal pode ser atribuída em parte a natureza diferente da microbiota encontrada em diferentes nichos dentro do intestina em um determinado momento (ZOETENDAL et al 2002). No entanto, são termos pouco usados (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

### **1.1.4 Funções da microbiota intestinal**

Em um estudo feito por MARCH et al., (1979), os autores já tinham relatado que uma das funções da microbiota intestinal é a produção de vitamina K e de vitaminas do complexo B, que são componentes essenciais para o bem estar do hospedeiro. É importante destacar também que a comunidade bacteriana do trato gastrointestinal desempenha várias outras funções tais como funções antibacterianas, imunomoduladora e metabólico-nutricionais. Funções antimicrobianas são exercidas pela competição por sítios de adesão, competição por nutrientes, tornando o microambiente fisiologicamente restrito, além da produção de substâncias antimicrobianas prevenindo infecções por organismos patogênicos (barreira microbiológica que não deixa livre nichos para colonizações exógenas).

As funções imunomoduladoras estão relacionadas com o desenvolvimento do sistema imunológico e da tolerância imunológica, por “educar” o sistema imunológico (a princípio mediante estimulação com os seus “padrões moleculares” diferenciados). Já as funções nutricionais e metabólicas estão ligadas a produção de energia, conversão do colesterol em coprostanol, conversão de bilirrubina em urobilina, inativação da tripsina e síntese de vitamina K (TANNOCK, 1995).

Salienta-se que a existência de bactérias comensais no intestino é fundamental para o desenvolvimento de várias atividades do TGI. A título de exemplo, animais que vivem em ambiente estéril apresentam função motora do intestino comprometida devido ao fato de que os movimentos peristálticos não se desenvolvem adequadamente nestes animais. (IVANOV et al., 2009).

Para que uma determinada espécie de bactéria seja considerada residente e desempenhe uma das funções descritas acima, são consideradas somente espécies bacterianas dominantes (entre  $10^9$  e  $10^{11}$

ufc/g) e subdominantes ( $10^6$  e  $10^8$  ufc/g) presentes em número suficiente para terem impacto no hospedeiro, sendo consideradas populações não residentes ou transientes as que se encontram abaixo de  $10^6$  ufc/g, incapazes de desempenhar algum impacto no hospedeiro mamífero (PEREZ et al., 2014).

Existem várias maneiras para ilustrar as funções da microbiota intestinal, entretanto em estudo feito por (OTHOMON, AGUERO, LIN, 2008), os autores tinham considerado que as principais funções benéficas da microbiota para o hospedeiro podem ser divididas em três níveis: (a) *escudo biológico*, exercendo função de barreira ativa contra o estabelecimento de populações patogênicas; (b) *atividade trófica*, como o estímulo à angiogênese pelas células de Paneth e ao sistema imune local e sistêmico; (c) *metabólicas*, exemplificadas pela fermentação de alimentos residuais não absorvíveis, matéria orgânica derivada do próprio hospedeiro, como células descamadas de epitélios, secreções e metabólitos produzidos pela própria microbiota, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas (K, B12, folato, biotina, riboflavina), substratos energéticos como ácido butílico, propiônico e acético para o consumo de colonócitos, hepatócitos e tecidos periféricos, respectivamente.

Afirma-se que o ser humano possui dois sistemas digestivos muito diferentes, mas igualmente poderosos. O mais explorado é o conjunto de secreções e enzimas do trato gastrointestinal, mas há também o “órgão microbiano”, um segundo sistema digestivo baseado na microbiota intestinal, quebrando ingredientes complexos da dieta que chegam intactos ao cólon por não serem digeridos por enzimas humanas, como fibras vegetais, tubérculos, frutas e alguns cereais (CAMPEOTTO et al., 2007).

Outros estudos têm considerado que a função de imunomodulação, em conjunto com a resistência à colonização, desenvolvida pela microbiota intestinal, são essenciais para o hospedeiro que vive num ambiente onde estão presentes inúmeros microrganismos patogênicos (FULLER, 1989; BOTTCHEER et al., 2000; WILLS-KARP et al., 2001).

A partir da composição da microbiota intestinal, suas funções para a saúde do hospedeiro em curto e em longo prazo e o seu equilíbrio, tem levado à elaboração de estratégias para manipular as populações bacterianas e garantir o bem estar para o seu hospedeiro (BOURLIOUX et al., 2003; EDWARDS, PARRET, 2002).

### 1.1.5 Fatores que alteram a composição da microbiota intestinal

Existem vários fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal. Dentre eles podem-se indicar a diarreia que pode ser tanto uma causa ou como consequência da alteração, o uso de antibióticos, a dieta alimentar, o consumo de bebidas alcoólicas, o fumo, o uso de agrotóxicos e metais pesados na agricultura que acabam contaminando alimentos e água de beber, o estresse pelo trabalho, algumas doenças crônicas (diabetes, doenças inflamatórias intestinais e outras). Tem havido algumas dúvidas ligadas ao fato de que a dieta do hospedeiro é o fator mais importante na regulação da composição da comunidade microbiana indígena. Parece que o hospedeiro mamífero é mais flexível a mudanças na microbiota condicionadas pela dieta durante o período pré-desmame que depois do desmame (QUIGLEY, 2000). Talvez situações estressantes, sob suas diversas formas, serão mais responsáveis por alterações na microbiota intestinal e o consequente predomínio de umas populações sobre as outras (MILES et al., 1981).

É fundamental entender que, se houver uma supressão da microbiota normal, cria-se um local parcialmente vazio que tende a ser preenchido por microrganismos provenientes do ambiente ou de outras partes do corpo. Estes microrganismos comportam-se como oportunistas e podem tornar-se patógenos (GIBSON; ROBERTFROID, 1995).

Portanto, a administração de antibióticos por via oral e intravenosa, frequentemente resultam na supressão de alguns, mas não de todos, os componentes da microbiota intestinal normal e de suas atividades metabólicas, produzindo mudanças mais rápidas e drásticas na microbiota normal (SAAVEDRA, 2000; NICOLI, VIEIRA, 2004).

Num estudo feito por NISBET et al., (1993), isolaram bactérias Gram-positivas e negativas da microbiota fecal de frangos de corte entre as quais destacaram o *Enterococcus faecalis*, a *Escherichia coli* e *Escherichia fergusonii*, como causadores de grandes modificações na microbiota intestinal das aves. Outro estudo feito por (MIYAMOTO et al., 1998), relatou-se que houve predominância de *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus spp.* e *Escherichia coli* na microbiota da cloaca e oviduto em galinhas.

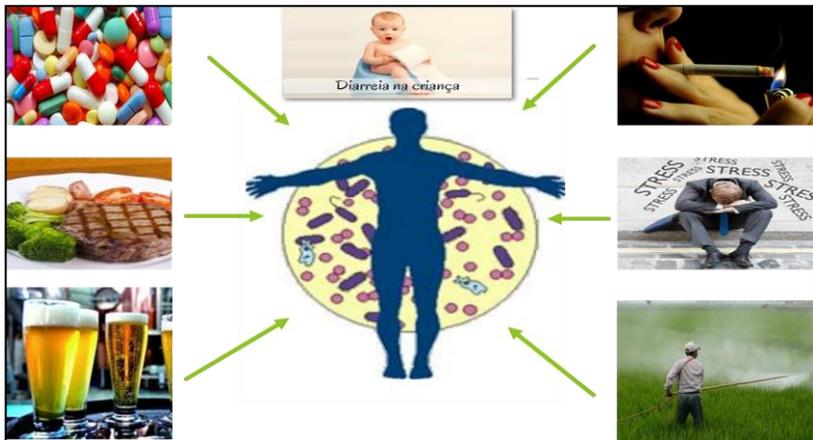
Estes dados mostram que a microbiota é um ecossistema imensamente complexo, que pode ser comparado a uma entidade funcional ou a um “órgão” dentro do hospedeiro (NICOLI, 1995).

Também foi descrito que em relação aos fatores externos ou exógenos, o ambiente do hospedeiro pode alterar a composição da microbiota, e este pode ser muitas vezes passível de alteração para se

promover o bem estar do hospedeiro (FLAVIO et al., 2010). Por exemplo, estímulos que induzem fortes emoções ou condições estressantes em animais podem alterar a composição da biota fecal, assim como alterações na pressão do ar durante mudanças de altitude podem mudar a composição da microbiota fecal em camundongos e outros mamíferos. Portanto, tais fatores alteram a fisiologia do animal, a qual altera então a composição das comunidades da microbiota (Figura 2). Qualquer mudança fisiológica que aumente ou diminua o peristaltismo, a quantidade de ácido clorídrico secretado no estômago ou mesmo o muco secretado ao longo do trato gastrointestinal, poderá alterar as comunidades microbianas nos “habitats” locais (SAVAGE, 1977).

Os fatores genéticos que determinam a composição das populações microbianas intestinais de seres humanos e animais não são, porém, bem conhecidos, embora alguns autores tenham concluído que eles sejam importantes (MCCARTNEY et al., 1996).

Figura 2- Desenho esquemático dos fatores que afetam a composição da microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de (ANANTHAKRISHNAN, A.N. 2015).

Diversos fatores podem interferir na composição da microbiota intestinal (Figura 2). **A esquerda:** na parte de cima da figura se encontra uma imagem de medicamentos para mostrar que o uso indiscriminado de antibióticos pode alterar a composição da microbiota intestinal. **No meio:** por baixo dos medicamentos, temos alimentos para demonstrar que hábitos alimentares inadequados podem também alterar a composição da microbiota intestinal. A última imagem da **esquerda:** por baixo dos

alimentos temos bebida alcoólica para mostrar que o consumo exagerado de bebidas alcoólicas altera a composição da microbiota intestinal. **A direita:** na parte de cima da figura se encontra uma imagem de um homem fumando para mostrar que o fumo do cigarro altera a composição da microbiota intestinal. **No meio:** stress pelo trabalho, também altera a microbiota intestinal. **A direita:** imagem de um homem utilizando agrotóxicos e metais pesados na agricultura, esta prática pode causar alterações na composição da microbiota intestinal. **No centro:** temos uma imagem de um corpo humano com imagens de baterias em sua volta e seis setas voltadas para do corpo humano, para poder mostrar que estes fatores todos sobre o intestino humano levam a mudanças drásticas na composição da microbiota intestinal na parte de cima da imagem do corpo humano temos uma imagem de um bebê sentado em um pinico, mostrando que esta está com diarreia, que para além de ser uma causa da alteração da microbiota intestinal é também um fator que pode causar alterações na microbiota intestinal.

### 1.1.6 Disfunção da microbiota intestinal (DISBIOSE)

O desequilíbrio na microbiota intestinal (disbiose, vide Figura 3), pode provocar danos teciduais, resultando em anergia, tolerização ou inflamação intestinal que, caso persistam, podem comprometer a resposta do hospedeiro aos antígenos, dentre eles os das vacinas.

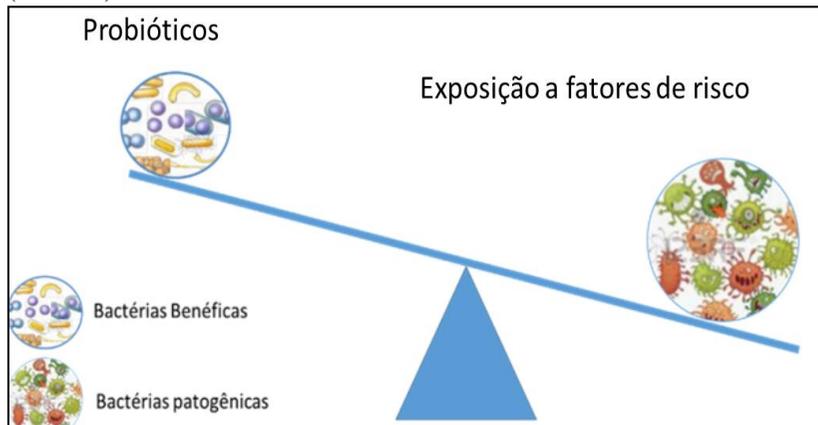
Embora sejam evidentes os benefícios que a microbiota proporciona ao hospedeiro mamífero, podem-se destacar também alguns aspectos negativos, como infecções oportunistas durante perturbações do ecossistema ou a produção de substâncias carcinogênicas (PREREZ et al., 2014).

GORBACH; TABAQCHALI (2009) demonstraram que o super crescimento bacteriano no intestino delgado ocorre por migração proximal de anaeróbios da microbiota do colón, levando à desconjugação de sais biliares, esteatorréia e má-absorção de vitamina B12.

Além disso, a presença da microbiota intestinal é importante na degradação de polissacarídeos (VANDENPLAS et al., 2011; YU LCH, 2012). Existem também vários estudos demonstrando que a resistência ou a susceptibilidade a uma série de doenças inflamatórias (ex. doença inflamatória intestinal) (KATSUYOSHI MATSUOKA; TAKANORI KANAI, 2014), metabólicas (ex. obesidade ou hipercolesterolemia), (DIBAISE, NFRANK. MATHEURS, 2012), cardíacas, neurológicas, dermatológicas (ex. doença ectópica), (ZHANG et al., 2014) e outras,

estão associadas ao desequilíbrio da microbiota intestinal (ABT et al., 2009; SEKIROV et al., 2010).

Figura 3 – Desenho esquemático do desequilíbrio da microbiota intestinal (Disbiose).



Fonte: Adaptado de: (TOJO, R. et al., 2014).

E uma figura adaptada para mostrar que o crescimento excessivo de bactérias patogênicas no intestino pode levar a um estado de desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose). **No centro:** temos um triângulo com uma barra imitando o formato de uma balança. **A direita:** pôr cima da barra da balança tem uma circunferência com imagens de bactérias (benéficas) mostrando pouco crescimento bacteriano no intestino. **A esquerda:** por cima da barra da balança temos uma circunferência maior que a primeira com imagens de bactérias (patogênicas) mostrando crescimento excessivo bacteriano. Por baixo legenda da figura de forma resumida.

## 1.2 PROBIÓTICOS

Historicamente, a aplicação mais usual de probióticos tem sido para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, incluindo diarreia infecciosa (De VRESE, MARTEAU, 2007). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/ Organização Mundial da Saúde, FAO\OMS (2002), Bactérias probióticas podem ser definidas como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro” (SANDERS 2003), definiu probióticos como uma preparação de microrganismos vivos ou estimulantes microbianos que quando

administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro.

Os probióticos comumente usados foram desenvolvidos a partir de organismos que formam parte da microbiota intestinal, isoladamente ou em combinação e podem restaurar a microbiota intestinal e oferecer benefícios semelhantes aos oferecidos pela microbiota intestinal normal, com realce, imunológicos, melhoria da função de barreira do TGI. A suplementação alimentícia com cepas probióticas de *Lactobacillus spp.* Isoladamente ou em combinação com *Bifidobacterium spp.* reduzem a incidência e gravidade de enterocolite necrosante e todas as causas de mortalidade em recém-nascidos prematuros (SINGHI, KUMAR, 2016).

As cepas bacterianas com função probióticas utilizadas com mais frequência no ser humano são *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (KLIGLER, COHRSEN, 2008), porém várias outras espécies de microrganismos comensais do intestino humano são também, utilizadas como probióticos (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de microrganismos mais relevantes utilizados como probióticos nos seres humanos.

Espécies	Exemplos
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, L. reuteri, L. paracasei, L. lactis, L. plantarum, e L. Sporogenes</i>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>B. bifidum, B. lagum, e B. lactis</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. faecalis e E. faecium</i>
<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>S. boulardii e S. cerevisiae</i>
Outros	<i>Streptococcus thermophilus, Escherichia coli, Bacillus spp. e Enterococcus spp.</i>

Fonte: SINGHI; KUMAR, (2016).

### 1.3 A MICROBIOTA INTESTINAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Um importante papel da microbiota intestinal relacionado com a manutenção do hospedeiro é a sua contribuição para o desenvolvimento de um sistema imune mais robusto e equipado com um leque de células e moléculas, que permitem maior capacidade para combater patógenos microbianos. Vários dados têm confirmado que a microbiota intestinal está envolvida em uma interação dinâmica com o sistema imune inato e adaptativo, que afeta diferentes aspectos do seu desenvolvimento e função (PURCHIARONI et al., 2013).

Outros estudos realizados em ratos livres de germes e camundongos que tiveram a sua microbiota intestinal alterada pelo tratamento com antibióticos têm revelado que a microbiota intestinal

pode moldar o desenvolvimento, a distribuição, o nível de ativação, o estado de diferenciação e o perfil inflamatório das células dendríticas, macrófagos, células *Natural Killer* (NK), células B, células TCD4+, e células TCD8+, tanto dentro do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e em locais periféricos do hospedeiro (MACPHERSON, 2006; FUJIWARA, WEI, PRESLEY et al., 2008). Além disso, tem se sugerido que as alterações da microbiota intestinal pela administração oral de antibióticos específicos (Vancomicina) resultaram também em uma percentagem reduzida de célula Th17 na lâmina própria do intestino delgado, demonstrando dessa forma que a depleção da microbiota intestinal pelo uso de antibiótico pode também influenciar na menor produção de células do sistema imunológico (IVANOV, FRUTOS, MANEL et al., 2008).

Já se afirmou em alguns estudos onde se considera que os efeitos da microbiota intestinal sobre o sistema imunológico estão além do intestino, pois também podem influenciar as respostas imunológicas em locais periféricos. Estudos realizados por SOUZA, VIEIRA, SOARES 2004; AMARAL, COSTA et al. (2008) utilizando camundongos livres de germes onde demonstraram que estes têm uma resposta a citosina pró-inflamatória subcutânea reduzida em lipopolissacarídeos (LPS).

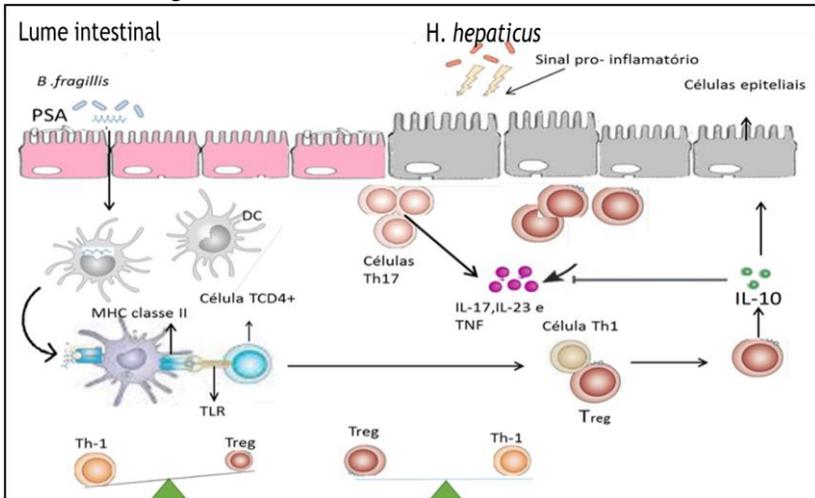
Ademais dentro do leque de células em que o sistema imunológico está envolvido destacamos as células dendríticas sendo um tipo de célula importante que modula a resposta imunitária na porção intestinal (COOMBES, POWRIE, 2008). Além disso, as células dendríticas no intestino estão expostas a produtos bacterianos, quer através da apresentação de antígenos, células M das placas de peyer no interior ou diretamente por dendritos que se estendem entre as junções apertadas de células epiteliais intestinais (IECs) e para o lúmen intestinal (RESCIGNO, URBANO, VALZASINA et al., 2001; MILLING, COUSINS, MACPHERSON, 2005). Portanto, as células dendríticas intestinais podem ser vistas como bactérias vivas que migram para os nódulos linfáticos mesentéricos, expondo deste modo às células B e T residentes para a microbiota intestinal (MACPHERSON, UHRT, 2004).

Outro sim, as células dendríticas expressam uma vasta gama de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que podem ser ativados por produtos microbianos. Os PRRs expressos pelas células dendríticas incluem membros da família de receptores Toll-like (TLR) e os intracelulares que residem como domínio de oligomerização (NOD) e receptores de ligação de nucleotídeos (NLRs), (IWASAKI, MEDZHITOV, 2004; MEDZHITOV, 2007). Os padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) estimulam diretamente os

TLR ou NLRs, conduzindo a ativação do NF- $\kappa$ B, ativado a proteína quinase por mitôgeno (MAPK), e inflamossoma pelas vias de sinalização resultando na expressão de um perfil de gene pró-inflamatório caracterizado por citosinas tais como IL-22, IL-1 $\beta$  (GIRARDIN, BONECA, VIALA et al., 2003; STROBER et al., 2006).

Outros estudos feitos por MAZMANIAN et al., (2005), MAZMANIAN, ROUND, KASPER, (2008), tinham demonstrado que a sinalização através de TLR-2 por polissacarídeos A (PSA) pode induzir um ambiente refratário à inflamação. Mais de uma forma de PSA, em particular para *Bacteroides fragillis*, pode produzir um efeito imunorregulador em células TCD4+ que foi destacada por uma produção elevada de citocina imunoreguladora IL-10, o tratamento com PSA isolado a partir de *B.fragillis* impede a indução de colite induzida por *Helicobacter hepaticus*, indicando que uma única molécula derivada da microbiota pode influenciar a resposta imunitária no âmbito do ambiente intestinal (Figura 4) (WANG, McLOUGHLIN, COBB et al., 2006).

Figura 4 - Algumas das interações demonstradas entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico.



Fonte: Adaptado de: (ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S.K. 2009).

A figura 4 ilustra uma adaptação mostrando a interação da microbiota intestinal e o sistema imunológico. O *Bacteroides fragilis*, produz polissacarídeos A (PSA), que induz um programa imunorregulador que fornece proteção contra a inflamação induzida pelo *Helicobacter hepaticus*. As a PSA são absorvido pelas células dendríticas (DC)

intestinal, presumivelmente, migram para os gânglios linfáticos mesentéricos locais, onde iniciam as respostas de células T através da apresentação de PSA em moléculas MHC de classe II às células TCD4+.O reconhecimento de PSA por células naives T helper CD4+ (TH) promove a indução das características anti-inflamatórias ou regulação que incluem a produção de interleucina – 10 ( IL-10).A IL-10, suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-17, IL-23 e fator de necrose tumoral (TNF) induzida por *H. hepaticus* e protege o intestino contra a indução de colite experimental. Ou seja o equilíbrio entre as respostas de células pró-inflamatórias Th17 para *H.hepaticus* e as respostas de células T reguladoras (Treg) para *B.fragillis*, suporta o controlo da inflamação intestinal

Em nosso estudo utilizamos para imunização dos camundongos uma vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante. Adenovírus deficiente na replicação, tem sido amplamente utilizado como vectores por serem indutores potentes de respostas imunitárias celulares e, por conseguinte, têm vindo a servir como vectores úteis para vacinas baseadas em genes, particularmente para os lentivírus e filovírus, bem como para outros patógenos não virais (RADOSEVIC et al., 2007; SANTRA et al., 2009; SHIVER et al., 2002).

Vacinas à base de adenovírus têm várias vantagens como vacinas humanas que podem ser produzidas com elevados títulos, e menos custos de fabricação, têm provado serem seguras e imunogênicas em humanos (ASMUTH et al 2010; CATANZARO et al., 2006).

Embora a maior parte dos trabalhos iniciais da vacina tem sido realizados utilizando rAd serotipo 5 (rAd5) devido à sua potência significativa na indução de anticorpo e respostas de células T CD8 +, a imunidade preexistente rAd5 nos seres humanos podem limitar a sua eficácia (BUCHBINDER et al., 2008).

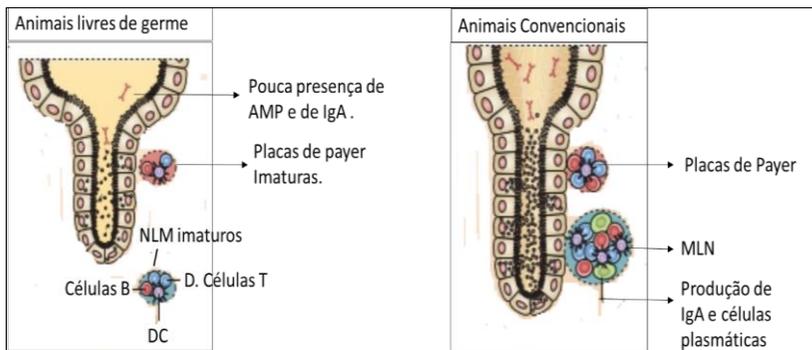
As investigações sobre o uso de vectores adenovirais derivados de animais é relativamente nova, enquanto os adenovírus humanos possuem as vantagens de ter sua biologia bem caracterizada e, apresentarem tropismo em células humanas, bem como a fabricação documentada. A imunogenicidade destes vectores e o seu potencial como vacinas tem sido demonstrada em modelos animais, principalmente como prime-boost em combinações como vectores heterólogos (ABBINK et al., 2007).

Dentro da interação microbiota e desenvolvimento de células do sistema imune, outros estudos tem demonstrado que os camundongos livres de germes têm tecidos linfóides pouco desenvolvidos, baço com

poucos centros germinativos e zonas malformadas de células T e B (KOSIEWICZ et al., 2011).

A microbiota intestinal promove mudanças substanciais na morfologia intestinal, incluindo a arquitetura das vilosidades, a profundidade das criptas, proliferação celular, densidade dos vasos sanguíneos, propriedade da camada de muco e maturação dos tecidos linfoides associados a mucosas conforme mostra a figura 5.

Figura 5 – Desenho esquematizado representando a comparação de duas vilosidades intestinais.



Fonte: adaptado de (SAMMER, BACKHED, 2013).

É uma adaptação para poder mostrar uma comparação de maturação e proliferação das células do sistema imunológico em animais livres de germes **A esquerda** com animais convencionalmente colonizados **A direita**. Mostrando que a presença de microrganismos intestinais pode participar na maturação e proliferação dessas células. A esquerda, é indicativo de uma vilosidade intestinal de um camundongo livre de germes, estes apresentam vilosidades do intestino delgado distais mais longas e mais finas e tem uma rede vascular menos complexa do que as vilosidades dos animais convencionalmente colonizados, na ausência de bactérias, as criptas intestinais são menos profundas e contem menos proliferação de células estaminais, além disso, os animais livres de germes mostraram espessura do muco reduzida e as propriedades do muco alteradas. Poucos folículos linfoides isolados, Placas de Payer imaturas, e nódulos linfáticos imaturos (MLNs) presentes em animais livres de germes, pouca presença de imunoglobulinas A (IgA) e (IgG) peptídeos antimicrobianos (PAMPs) são poucos que em animais convencionalmente colonizados.

No nosso ponto de vista, consideramos que existem muitos trabalhos concernentes ao estudo da interação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, mas estudos que relacionam a microbiota intestinal com as respostas as vacinas ainda são poucos. Será necessário fazer estudos aprofundados, tais estudos estariam ligados na identificação do tipo de bactérias, e o que estas bactérias fazem para influenciar o desenvolvimento dos variados processos fisiológicos, biológicos, metabólicos e imunológico no hospedeiro mamífero e até que ponto estas bactérias influenciam a eficácias das vacinas, identificar quais são as bactérias reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrão (Toll-like), no epitélio intestinal para que a partir destas descoberta possam ser traçados mecanismos estratégicos para o desenvolvimento novas vacinas dirigidas a um determinado patógeno, prevenção de várias doenças que surgem devido ao desequilíbrio da microbiota intestinal, produção de probióticos direcionados a um determinado desequilíbrio bacteriano.

#### 1.4 A MICROBIOTA INTESTINAL E A EFICÁCIA DAS VACINAS

Um estudo realizado por GABORIAU-ROUTHIAU et al., (2009) demonstrou que as bactérias segmentadas filamentosas (SBF), microrganismos comensais existentes nos camundongos, contribuem para a maturação e funcionamento de células T intestinais na imunidade adaptativa. Sendo assim, devido ao seu impacto no desenvolvimento da função imune, tanto no intestino quanto em outros órgãos, é razoável considerar que a microbiota intestinal possa afetar significativamente à forma como os indivíduos respondem aos antígenos das vacinas (UMESAKI, SETOYAMA, 2000). Apesar de toda atenção crescente na interface entre a microbiota e a resposta imune do hospedeiro, a influência das bactérias comensais na eficácia das vacinas ainda não está totalmente esclarecida (KOSIEWICZ et al., 2011). A microbiota pode ser vista como um importante fator durante o desenvolvimento de vacinas, e ainda poderia explicar algumas discrepâncias observadas na eficácia das vacinas em diferentes populações (WILSON, NICHOLSON; 2009; SEKIROV, 2010).

Existem vários fatores que contribuiriam para a disparidade na eficácia das vacinas em diferentes populações, dentre eles: as condições socioeconômicas, o estado nutricional, a genética do hospedeiro e também a exposição aos microrganismos. Alguns trabalhos de duas décadas atrás já tinham observado que o crescimento bacteriano excessivo no intestino delgado de crianças em países menos

desenvolvidos poderia contribuir para a baixa resposta de anticorpos das vacinas (LAGOS et al., 1999). Grandes estudos clínicos envolvendo indivíduos de diferentes regiões, provavelmente serão necessários durante os próximos anos para esclarecer se as respostas imunológicas ineficientes para algumas vacinas são consequências de fatores genéticos ou variações ambientais, tais como a comunidade microbiana do intestino (FERREIRA, ANTUNES, FINLAY, 2010). A Influência da diversidade microbiana intestinal em resposta à vacina é dependente de muitos fatores, incluindo a nutrição, idade, sexo, genética, e outros (MARKLE, FISH, 2014). No entanto, estudos correlacionando a microbiota intestinal e sua influência direta sobre a eficácia da vacina têm sido escassos (FERREIRA et al., 2010).

Em um estudo publicado recentemente por YANET VALDEZ, ERIC BROWN (2014), os autores descreveram que a relação entre a microbiota no desenvolvimento e função do sistema imunológico demonstrou novos conceitos que poderiam alterar significativamente a forma como tratar as doenças e promover o bem-estar. Além disso apontaram que a principal implicação de seus resultados era determinar se a composição da microbiota poderia vir a afetar a eficácia das vacinas. Neste estudo explorou-se o potencial papel da microbiota intestinal em responder as vacinas no contexto da relação entre a microbiota gastrointestinal, populações de células imunes residentes e a imunidade sistêmica.

Estudos publicados antes já demonstravam que a imunogenicidade de vacinas orais contra a cólera (LIVINE, 2010; HALLANDER et al., 2002) e, da poliomielite (GRASSLY et al., 2009) era mais baixa em populações de regiões com falta de saneamento que apresentavam uma maior ocorrência de exposição bacteriana fecal e oral (Figura 6). Não se sabe exatamente, porque estas baixas respostas imunes e consequentemente menores eficácias das vacinas orais ocorrem nestas populações, quando comparadas às populações de países mais industrializados.

Figura 6 - Imagem de uma região com saneamento básico deficiente. Ilustração de uma cidade com saneamento básico deficiente.



Fonte: Adaptado de (LIVINE, 2010; HALLANDER et al., 2002).

Esta deficiência de saneamento leva a uma maior exposição de crianças a agentes patogênicos podendo afetar o crescimento de bactérias intestinais patogênicas e afetar a integridade intestinal das crianças que vivem nestas localidades afetando desta forma a eficácia de certas vacinas. **A esquerda:** vemos construções de casas sem condições básicas de saneamento. **No centro:** vê-se um córrego com águas contaminadas, também é possível notar sobre as águas a presença de enormes quantidades de lixo vindo de vários locais da cidade. **A direita:** também vemos acumula de água parada.

Embora estas observações possam ser confundidas por fatores como status socioeconômico, genética e desnutrição, a hipótese é que a exposição aos micróbios nocivos pode alterar a composição de bactérias benéficas no intestino influenciando a imunogenicidade da vacina. (HUMPHREY, 2009).

Em ensaios clínicos com uma vacina oral contra cólera, realizado por HALLANDER et al. (2002) em crianças suecas e nicaraguenses, também demonstraram respostas baixas de anticorpos nas crianças nicaraguenses comparativamente as crianças suecas. Outro ensaio com vacinas contra cepas de *Shigella flexneri*, também mostraram proteção diferencial em indivíduos oriundos de países em desenvolvimento. Um estudo realizado em Bangladesh com adultos e crianças, nenhuma resposta imune significativa para a vacina foi demonstrada, embora o

mesmo antígeno tenha sido eficaz em indivíduos norte-americanos (WHO, 2006).

Outro estudo feito por LOPMAN et al (2012), os autores observaram que a eficácia da vacina contra o rotavírus variava em 90% em configurações de alto poder socioeconômico (SES), 75% para sociedades médias e 50% em configurações com baixo poder socioeconômico SES. Com a introdução da vacina contra rotavírus em países baixos, começou o entendimento do porquê da eficácia reduzida nessas configurações e também possibilitou a identificação de estratégias para melhorar o desempenho da vacina.

No seu conjunto, estes dados ilustram que indivíduos de diferentes partes do mundo podem montar diferentes respostas imunitárias contra uma variedade de vacinas.

Estudos recentes indicam que a imunidade às infecções pode ser impulsionada pela microbiota (ICHINOHE et al., 2011; ABT et al., 2012; NAIK et al., 2012). Novas evidências indicam diversos papéis para a microbiota em influenciar a saúde do hospedeiro, o mais notável deles envolve o desenvolvimento e homeostasia do sistema imune (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004; MAZMANIAN et al., 2005; IVANOV et al., 2008; ATARASHI et al., 2011, 2013).

Assim através de análises em sistemas biológicos da imunidade para a vacina inativada trivalente contra a gripe (VIT) em seres humanos, estas análises revelaram uma correlação entre a expressão de TLR-5 e a magnitude da resposta de anticorpos. Para confirmação desta correlação os autores fizeram uma avaliação em camundongos  $Tr15^{-/-}$ , resultando em títulos de anticorpos reduzidos e baixas frequências de células no plasma, demonstrando um papel importante para TLR5 na imunidade contra (VIT). Provavelmente este resultado foi devido à ausência de microbiota intestinal. Nos testes feitos em animais livres de germes e em camundongos tratados com antibióticos, também foi possível observar que as resposta de anticorpos foram baixas, (OH et al., 2014).

A capacidade estimuladora da flagelina para induzir ambas as respostas imunitárias humorais e celulares tem sido bem caracterizada (DIDIER LAURENT et al., 2004; MCSORLEY et al., 2002). Uma vez que a baixa resposta de anticorpos em animais livres de germes foi restabelecida pela reconstituição da microbiota por via oral com uma bactéria flagelada.

A detecção de flagelina mediada por TLR5 promoveu diretamente a diferenciação das células no plasma, estimulando macrófagos, nódulos linfáticos para produzir fatores de crescimento celular do plasma. Esta

detecção também induziu as respostas de anticorpos para a vacina inativada contra a poliomielite (OH et al., 2014).

Há resultados relatando que a dieta, nutrição, doenças metabólicas, patologias associadas ao intestino, e outros fatores que afetam a composição da microbiota por sua vez podem afetar a capacidade das vacinas atuais e futuras para induzir imunidade (OH et al., 2014). Finalmente, estes resultados destacam a importância do uso de sistemas que abordam não só a identificação de assinaturas moleculares da eficácia da vacina, mas também o delineamento de perspectivas mecanicistas críticas sobre a imunidade do hospedeiro à vacinação (QUEREC et al., 2009; NAKAYA et al., 2011).



## **2.HIPÓTESE**

Este estudo se baseia na hipótese de que mudanças significativas na microbiota intestinal dos indivíduos podem ter influência relevante na imunogenicidade das vacinas a eles aplicadas, como também, que esta imunogenicidade pode ser melhorada com o uso de probióticos.



### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o impacto que alterações provocadas experimentalmente na microbiota intestinal tem sobre a resposta imune de camundongos imunizados com a vacina recombinante atenuada contra o *Plasmodium vivax*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a depleção da microbiota intestinal dos grupos tratados com antibióticos frente ao grupo controle;
- Avaliar o impacto da utilização de probióticos na recuperação da microbiota intestinal de camundongos experimentalmente tratados com antibiótico;
- Avaliar a resposta imune humoral induzida por vacinas recombinantes em camundongos com a microbiota experimentalmente depletada.



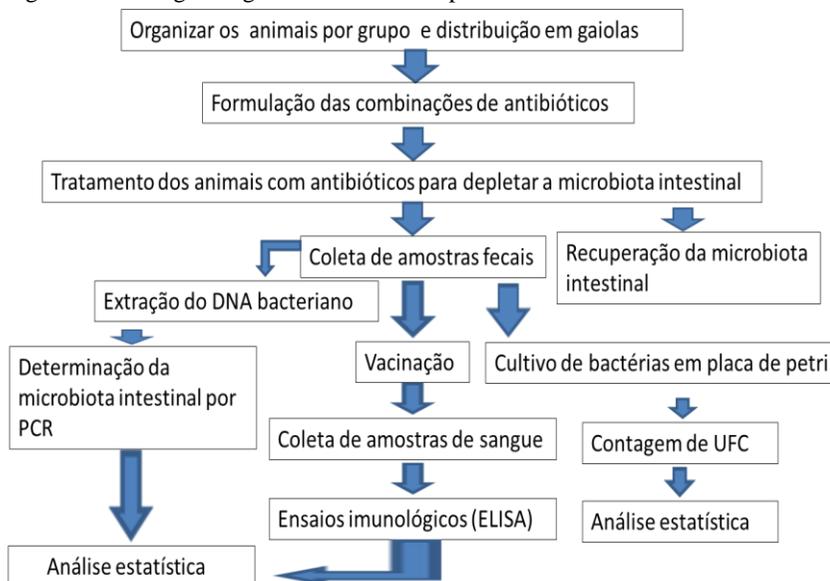
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

### 4.1 FLUXOGRAMAS

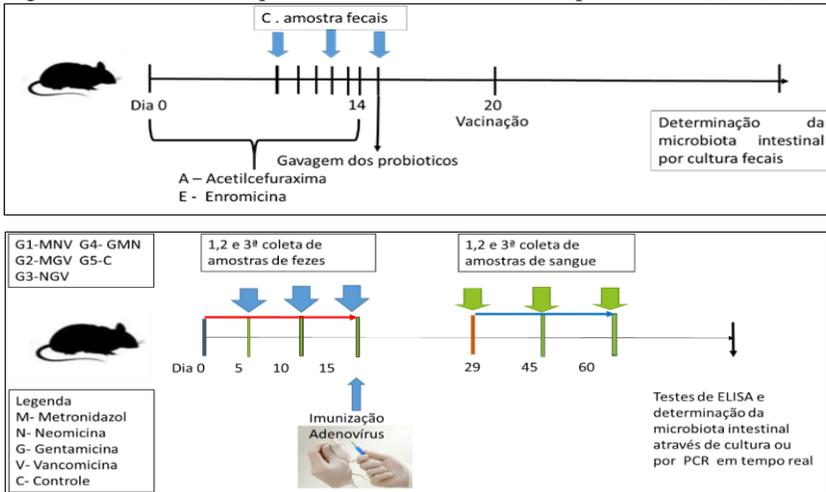
A figura 7 ilustra um fluxograma das atividades práticas executadas durante a realização deste projeto.

Figura 7 – Fluxograma geral das atividades práticas.



## 4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS (A) E (B)

Figuras 8 e 9 – Ilustra esquematicamente os desenhos experimentais (A) e (B).



**Acima (A) :** Temos imagem de camundongo mostrando que o projeto foi feito usando animais de laboratório (camundongos), as letras A e E no desenho experimental (A) são abreviaturas dos antibióticos utilizados (Axetilcefuroxima e Enramicina), o colchete em cor preta em (A), ilustra o horizonte temporal que os animais foram tratados com antibióticos, as setas verticais em cores azuis em (A), mostram os dias que foram realizadas as coletas das amostra fecais, a seta preta por baixo da azul em (A), ilustra o momento da gavagem dos próbióticos, a barra que segue mostra o momento da vacinação em (A) segue o momento do ensaio de cultivo celular e o ensaio do ELISA. **Abaixo (B):** conforme descrito em (A). Abreviação G-1,2,3,4,5 ilustram a numeração por grupo de animais e as abreviações M, N, G, V, correspondem aos antibióticos: Metronidazol, Neomicina, Gentamicina e Vancomicina em (B). O número 1, 2 e 3 são as vezes que foram feitas as coletas de amostras em (B). A barra preta indica o início do tratamento dia 0 em (B), seguidamente temos três barras verdes destacadas acima com três setas azuis indicando o momento de coletas das amostras fecais (B). A seta azul por baixo da última barra verde ilustra o momento da vacinação em (B). No fim da ilustração momento dos ensaios imunológicos, testes de ELISA e avaliação da microbiota intestinal por qPCR.

### 4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Projeto realizado de acordo com o protocolo nº. 206/2011 do comitê de ética em experimentação Animal CETEA/UFMG, aprovado na Universidade Federal de Minas Gerais (**Anexo 1**). Os estudos experimentais foram realizados com 37 camundongos BALB/c sendo 12 fêmeas, para o desenho experimental (A) e 25 machos para o desenho experimental (B), animais com idade entre 05 e 06 semanas com peso médio entre 20 a 35g. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Setorial do MIP. Os animais foram mantidos em mini isoladores (em grupos de três animais por gaiola), para (A) e (em 5 animais por gaiola) para (B), higienizadas, colocadas em estante ventilada com controle de temperatura, e ciclo de claro e escuro, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

### 4.4 FORMULAÇÕES DAS COMBINAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS PARA DEPLEÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

Para (A) foi preparado 250 mg de axetilcefuroxima e 25 mg de enromicina diluídos em 250 ml de água estéril numa garrafa separado em seguida distribuídas nos bebedouros entre 60 ml. Para (B) foram utilizados quatro tipos de antibióticos diferentes não absorvíveis e de amplo espectro de ação como a Gentamicina (44mg/ml), Neomicina (250mg/100ml), Metronidazol (25mg/ml), e Vancomicina (pó 80 mg), a partir destas concentrações foram formuladas diferentes combinações a serem fornecidas na água dos animais, conforme ilustra na Tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes combinações de antibióticos por grupos;

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5 C
Vancomicina	0, 15 g	0,15 g	0.15 g		0 ml
Metronidazol	30 ml	30 ml		30 ml	0 ml
Neomicina	6 ml		6 ml	6 ml	0 ml
Gentamicina		3,4 ml	3,4 ml	3,4 ml	0 ml
Água	114 ml	116 ml	140 ml	110 ml	0 ml
Total	150 ml				

Estas combinações foram distribuídas nos bebedouros dos animais durante 14 dias conforme os desenhos experimentais (A) e (B), com o objetivo de depletar a microbiota intestinal dos camundongos, a troca da água feita de forma alternada dia sim dia não.

#### 4.5 COLETAS DE AMOSTRAS DE FEZES E PROCESSAMENTO

Durante o tratamento, coletaram-se duas fezes frescas, as mesmas foram diluídas em PBS, homogeneizadas e centrifugadas durante 1 min a 8.000 rpm. Os sobrenadantes foram armazenados e os sedimentos homogeneizados e diluídos de forma seriada na razão  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  unidades formadoras de colônias (ufc).

#### 4.6 CULTURAS DAS BACTÉRIAS EM PLACA DE PETRI

O cultivo foi feito em placa de Petri em meios de cultura ágar sangue, ágar bile esculina para (A) e ágar BHI para (B). A diluição foi feita numa placa de 12 poços onde se colocou 1,8 ml de PBS gelado e 200µl de amostras de fezes e fez-se a mesma diluição seriada para todos os grupos e na placa de Petri foi pipetado 50µl em cada metade da placa, com auxílio de uma alça bacteriológica previamente flambada fez-se o cultivo por espalhamento em duplicata utilizando ambos os lados da placa. As placas foram envolvidas em plástico, incubadas em ambientes aeróbico e anaeróbico na estufa a temperatura de 37°C, a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc), foi feita depois de 72 horas de crescimento.

#### 4.7 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO TOTAL

Para extração do DNA bacteriano procedemos com a preparação da proteinase K, uma alíquota de (100 µl) armazenada a 4°C e tRNA transportador, uma alíquota de 310 µl de tampão AVE do Kit de acordo com o protocolo do fabricante, as alíquotas foram guardadas em freezer - 20°C, no reagente ACB, se adiciona 8 ml de isopropanol e mantido no Kit à temperatura ambiente. Prepara-se a solução tampão AW1 na qual se adiciona 25 ml de etanol puro e mantido no kit à temperatura ambiente, na solução tampão AW2 adiciona-se 40 ml de etanol puro e mantido no kit à temperatura ambiente respectivamente. Depois de todos os reagentes serem preparados, a extração do DNA bacteriano foi feita mediante um protocolo padrão.

#### 4.8 qPCR PARA DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal total foi determinada pela quantificação do rDNA 16S das bactérias usando iniciadores universais. A sequência

dos iniciadores (iniciadores) é indicada a seguir: Primer Forward (PF): 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', Primer Reverse (PR): 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.

Na determinação da microbiota intestinal pela técnica de qPCR, foi utilizado o seguinte protocolo: 2-10 ng de DNA extraído de fezes diluído em 2 µl de água livre de RNase e DNase ao que foi adicionado um mix contendo 15 picomols de primer forward 16S e mais 15 picomols de primer reverse 16S, ambos num volume final de água de 1 µl/reação, e mais 10 µl de Sybr Green PCR Core mix (Applied Biosystems/Life Technologies, USA) e água livre de DNase e RNase em quantidade suficiente para completar 20 µl de volume final de reação. As condições de amplificação foram as indicadas como padrão pelo fabricante da máquina (Thermocycler 7500 HT Applied Biosystems), consistindo em 95 °C 15 segundos e 60 °C 1 minuto. Os cálculos necessários para obtenção dos números de moléculas do DNA 16S por gramas de fezes foi realizado em planilha do Excel (Microsoft Office) através das seguintes equações: Peso molecular do DNA= (pm = (n°pbx607,4) +157,9), para o cálculo do número de moléculas do 16S DNA por cada poço usou-se a equação  $y = (-2,119) \ln(x) + 55,727$ , onde substituiremos os valores dos Ct da amplificação no logaritmo neperiano  $\ln(x)$ , o resultado obtido (N°de moléculas de 16S DNA), será multiplicado por mil, e dividindo posteriormente pelos valores do peso das amostras de fezes por (mg) (Regra de três simples) e o resultado obtido é correspondente aos números de moléculas de DNA 16S por gramas de fezes por poço.

#### 4.9 RECUPERAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM PROBIÓTICOS

A tentativa de recuperação da microbiota intestinal foi feita apenas no primeiro desenho experimental e para isso se utilizou o probiótico Simbioflora (Carboquímica), disponíveis em sachê(s) de 6 gramas, que combinam agentes probióticos (microrganismos vivos da microbiota intestinal) e prebióticos (fibras que auxiliam o desenvolvimento digestivo). Em fluxo estéril, diluiu-se o conteúdo do sachê em um tubo plástico de 50 ml contendo cinco ml de água filtrada estéril. O probiótico Simbioflora é composto pelos seguintes microrganismos: *Lactobacillus paracasei*: um lactobacilo que possui importante função imunomoduladora, que aumenta o suporte imunológico natural do nosso corpo. *Lactobacillus acidophilus*: lactobacilo que tem ação antimicrobiana e auxilia no tratamento da

intolerância à lactose, pois ele estimula a produção da enzima lactase em grande quantidade. *Lactobacillus rhamnosus*: é eficiente no combate a inflamações intestinais, pois possui maior aderência à mucosa intestinal e maior competitividade contra os patógenos. *Bifidobacterium lactis*: possui a facilidade de se fixar e multiplicar rapidamente, sendo eficaz no combate a patógenos e fungos, além de melhorar a absorção de nutrientes. *FOS (frutooligossacarídeo)*: é um oligossacarídeo composto por um polímero de frutose.

Após total diluição do probiótico, procedeu-se a gavagem de 200µl de suspensão em cada camundongo, utilizando uma sonda de escalpe estéril. O procedimento para recuperação da microbiota intestinal dos camundongos foi realizado durante cinco dias.

#### 4.10 IMUNIZAÇÕES

Os camundongos foram vacinados no vigésimo dia de experimentação, utilizando um adenovírus humano tipo 5 recombinantes que codifica o antígeno de membrana apical do parasito *Plasmodium vivax*. Este imunógeno serviu unicamente como modelo experimental de vacinação com vacina atenuada viral a semelhança de outras muito utilizadas nos calendários vacinais internacionais como são as vacinas de sarampo, caxumba, rubéola ou poliomielite infantil. Para diluição da vacina (em fluxo descontaminado) descongelou-se 4 alíquotas da vacina em gelo por 10 minutos, sonicamos em banho de água gelada por 20 segundos em tubos de ensaios de 2 ml, pipetamos 1 ml de PBS estéril contendo 15µl de soro de camundongo não imunizado e 500 µl de vacina sonicada, mantivemos a formulação em gelo. Para os desenhos experimentais, as vacinas foram administradas via subcutânea na base da cauda em ambos os lados (direito e esquerdo) utilizando agulha de insulina de 100U contendo um total de 50µl totalizando 100µl por animal. No segundo experimento os animais foram imunizados dois dias após o fim do tratamento com antibióticos, com  $10^8$  PFU/animal ( $10^9$  PFU/ml) de vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante.

#### 4.11 COLETAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE

A coleta das amostras de sangue foi realizada da mesma maneira para os dois experimentos e também em três momentos conforme ilustração no desenho experimental (B), após a vacinação. As coletas foram realizadas em fluxo laminar com auxílio da câmara de CO<sub>2</sub>, com

pipetas Pasteur, coletaram-se aproximadamente 0,2 ml de sangue por animal pelo plexo retro orbital, em seguida as amostras foram processadas, centrifugadas a 5000 rpm, separando-se o soro que foi armazenado em alíquotas de 40µl, em tubos de 600 µl, os tubos foram previamente identificados e conservados em freezer à -20°C para testes imunológicos posteriores.

#### 4.12 TESTES IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para realização do ensaio imunológico, placas de 96 poços (MAXISORP, NUNC Thermo Scientific<sup>®</sup>) foram sensibilizadas com 100 µl antígeno IgG totais. Após incubação por 24 horas em temperatura de 4°C, foi realizado o bloqueio com tampão bicarbonato contendo 3% de leite desnatado, e realizado nova incubação por 2 horas a 37°C. Após cinco lavagens com PBS, os soros dos animais imunizados foram adicionados na diluição 1/100 até 1/400, em tampão PBS e nova incubação de 1h a 37°C foi realizada. Depois de novas lavagens o conjugado anti-imunoglobulina de camundongos marcado com peroxidase a 1/5000 foi acrescentado à placa, que foram novamente incubadas a 37°C por 1h. Finalmente, após novas lavagens foi adicionada a mistura do substrato (peróxido de hidrogênio) com o cromógeno (OPD) e a reação foi interrompida após 15 minutos com adição de ácido sulfúrico (4N). A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro TECAN<sup>®</sup> modelo infinite M200 a 490nm, localizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) da UFSC.

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos foram realizados no programa Prism 5 (GraphPad<sup>®</sup>). Uma vez que possuíam uma distribuição normal, foi utilizado o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) One-Way, e o t teste. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.



## 5. RESULTADOS

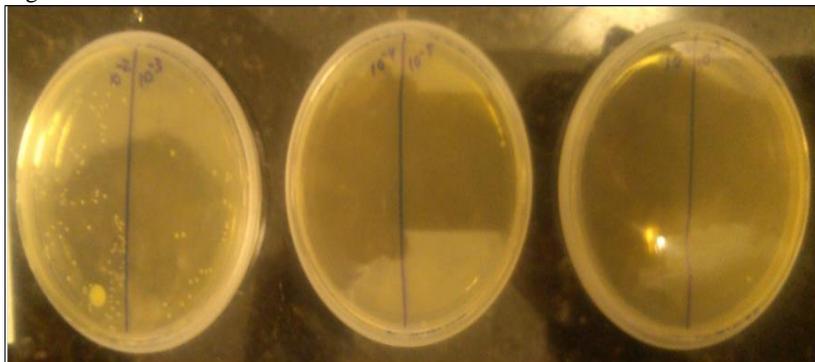
### 5.1 RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL (A)

#### 5.1.1 Avaliação da depleção da microbiota intestinal pelo método de cultura bacteriana

Para avaliação da eficiência da depleção da microbiota intestinal dos camundongos que receberam o tratamento com antibióticos, foi realizada mediante a utilização de dois meios de cultura (Ágar sangue e ágar bile-esculina) onde foram semeadas amostras fecais dos animais diluídas de forma seriada  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  respectivamente.

O primeiro meio utilizado foi o meio Bile esculina porque é um meio seletivo para identificar *Streptococcus* do grupo D (ex. *S. faecalis*) e *Enterococcus spp.* a prova de bile-esculina baseia-se na hidrólise de esculina em presença de bile por determinadas bactérias. As bactérias bile-esculina positivas crescem em presença de sais biliares, a hidrólise da esculina gera glicose e esculina. A esculina reage com íons de ferro resultando em um complexo de cor preta.

Figura 10 – Ensaio de culturas bacterianas meio bile-esculina.



**A esquerda:** diluição  $10^{-1}$  ufc podemos observar a presença de crescimento de um tipo de bactérias que pelas características não é nem de um e nem de outro tipo de bactéria mencionadas tanto do lado esquerdo como do lado direito da placa. **No centro,** na diluição de  $10^{-2}$  ufc não se observa crescimento bacteriano. **A direita**  $10^{-3}$  ufc também não se observa crescimento bacteriano respectivamente.

Pode ser observado na figura 10 que, apesar da existência de crescimento bacterianos nas placas semeadas com as diluições das fezes, nenhuma das colônias indica o crescimento dos microrganismos procurados. Assim, estes resultados não foram conclusivos porque as colônias bacterianas para além de crescerem pouco, não formaram no ágar o complexo escuro que é característico deste meio quando realmente crescem *S. faecalis* ou espécies relevantes do gênero *Enterococcus*.

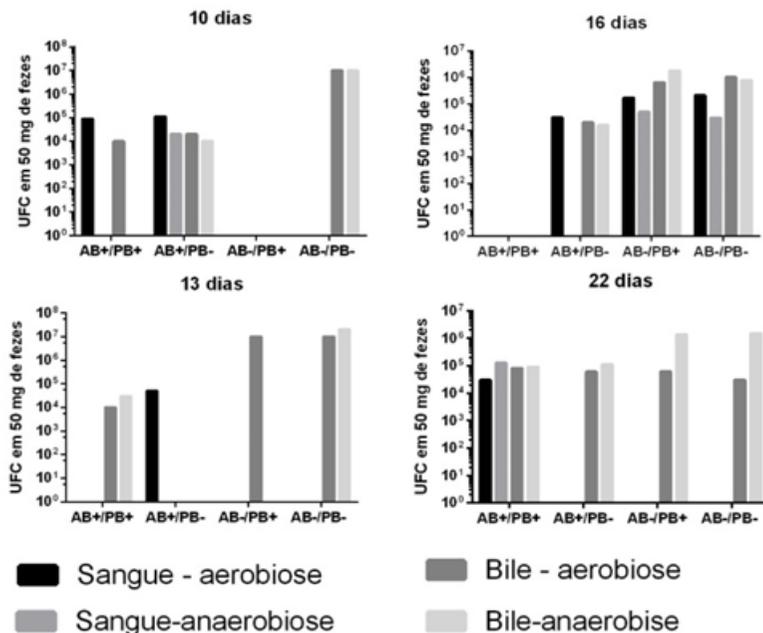
Outro meio utilizado foi o Agar Sangue, por ser um meio que oferece ótimas condições de crescimento para a maioria dos microrganismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus* alfa e beta-hemolíticos, assim como outras bactérias com estas mesmas características. O meio é assim classificado como um meio indicador para bactérias hemolíticas.

O meio é também classificado como um meio de enriquecimento não seletivo, sendo usado para o isolamento de microrganismos não fastidiosos de diferentes origens, por não limitar o crescimento da maioria das bactérias presentes na amostra.

Por ser um meio de enriquecimento, usamos este meio para tentar fazer uma quantificação total dos microrganismos existentes nas diluições das fezes a fim de conseguir uma quantificação precisa da depleção conseguida pelo tratamento antibiótico.

A figura 11 representa os resultados da quantificação das bactérias presentes nas fezes dos animais nos dois meios utilizados, em condições de aerobiose e anaerobiose (várias enterobactérias são anaeróbicas), e nos 4 grupos de animais experimentais que receberam ou não antibióticos e/ou probióticos, conforme indicado na figura. Pode ser observado nesta figura que nenhum dos meios nos permitiu tirar conclusões definitivas sobre as reais capacidades de depleção dos antibióticos usados e nem sobre a eficácia do tratamento probiótico para equilibrar o efeito dos antibióticos.

Figura 11 - Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), do crescimento bacteriano em placas de Petri para avaliar a depleção da microbiota intestinal.



Estes gráficos ilustram o crescimento de bactérias em dois ambientes de crescimento (aerobiose e anaerobiose) e em dois meios de cultura (ágar sangue e bile-esculina). Todos os resultados apresentados nestes gráficos não sugerem boas informações, porque houve pouco crescimento bacteriano nas placas de Petri cujas contagens das unidades formadoras de colônias (ufc), deram origem a estes gráficos. Assim, nas estruturas gerais dos gráficos temos uma linha vertical que corresponde ao eixo y onde se encontra as ufc em 50 mg de fezes. Na parte de baixo do gráfico encontramos o eixo x, onde está ilustrado o tipo de tratamento feito em cada um dos grupos com as suas respectivas abreviaturas, assim a abreviação AB+ significa tratamento com antibióticos e a PB+ tratamento com probiótico quando tiver acompanhado com o sinal negativo quer dizer que não recebeu este tipo de tratamento.

Assim, depois de 10 dias de tratamento, o Grupo -1 do gráfico 1, tratado com (AB+ \ PB+), os resultados correspondentes mostram crescimento bacteriano apenas nos dois meios de cultura em aerobiose

ágar sangue em aerobiose indicado pela **barra escura** do histograma e bile-esculina em aerobiose indicado pela **barra cinza escura** do histograma). No Grupo-2 do gráfico 1 (AB+\PB-) as abreviações demonstram que os camundongos foram tratados com antibióticos (AB+), sem probióticos (PB-), os resultados correspondentes mostram que houve crescimento bacteriano nos dois meios de cultura e também nas duas condições de crescimento. No Grupo-3 do gráfico 1 (AB-\PB+) mostram que os camundongos deste grupo não receberam antibióticos (AB+) mais recebeu probiótico (PB+), neste grupo não se observou nenhum tipo de crescimento. No Grupo- 4 do gráfico 1 (AB-\PB-) grupo de controle, significa que estes animais não receberam nenhum tipo de tratamento mais as bactérias cresceram apenas no meio bile esculina e nas duas condições de crescimento (**barra cinza escura e barra cinza clara**).

Após 13 dias de tratamento observaram-se os seguintes resultados: No Grupo-1 do gráfico 2 (AB+\PA+) os seus resultados mostram crescimento no meio bile-esculina nos dois ambientes, aerobiose e anaerobiose (**barra cinza escura e barra cinza clara**). No Grupo-2 do gráfico 2 (AB+\PB-) mostram crescimento apenas no meio ágar sangue em aerobiose (**barra escura**). No grupo 3 no gráfico 2 (AB-\PB+) o crescimento bacteriano foi apenas no meio bile-esculina em aerobiose (**barra cinza escura**). No grupo 3 do gráfico 2 (AB-\AP-) o crescimento foi idêntico ao que ocorreu no grupo antecedente.

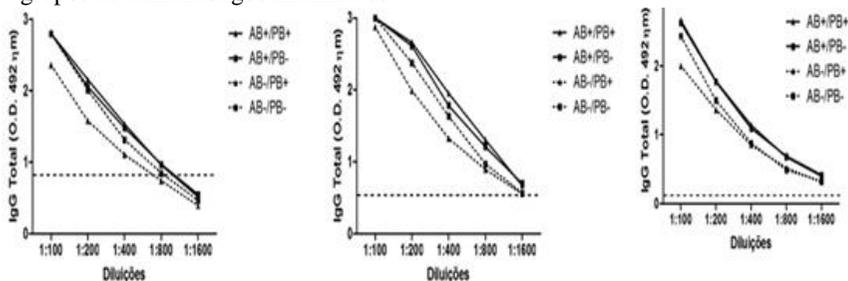
Depois de 16 dias de tratamento os resultados foram os seguintes: No grupo 1 do gráfico 3 (AB+\BP+) não se observou crescimento nenhum. No Grupo-2 do gráfico 3(AB+\BP-) no meio ágar sangue houve crescimento apenas nas condições de aerobiose não havendo crescimento em anaerobiose (**barra preta**), no meio bile-esculina houve crescimento nos dos ambientes aerobiose (**barra cinza escura**) e anaerobiose (**barra cinza clara**). No Grupo-3 do gráfico 3 (AB-\BP+) se observou crescimento nos dos meios de cultura em duas condições ambientais. No Grupo-4 do gráfico 3 (AB-\BP-) correspondente ao grupo controle o crescimento foi bom respectivamente.

Depois de 22 dias os resultados são os seguintes no Grupo-1 do gráfico 4 (AB+\BP+) observou-se crescimento bacteriano nos dois meios (aerobiose e anaerobiose) bem como nos dois ambientes de crescimento. No Grupo-2 do gráfico 4 (AB+\AB-) não houve crescimento no meio ágar sangue nem nos dois ambientes aerobiose e anaerobiose mais houve crescimento bacteriano no meio bile-esculina em aerobiose e anaerobiose este mesmo fenômeno se repetiu no Grupo-3 e G-4 respectivamente.

### 5.1.2 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulina IgG totais após imunização

Apesar de ter obtido resultados negativos na quantificação das bactérias nas culturas, decidimos determinar assim mesmo, os níveis séricos dos anticorpos totais existentes nos soros dos animais, para podermos avaliar se o efeito dos antibióticos e/ou probióticos poderia ser observado desta maneira, e os problemas poderiam ser de ordem microbiológica.

Figura 12 – Níveis de IgG total medidos por titulação dos soros dos diferentes grupos de camundongos imunizados.



Conforme o esquema A de experimentação a diferentes tempos (5, 10 e 30 dias) após a imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante. A determinação foi realizada mediante ensaio de ELISA com partículas adenovirais usadas como antígeno aderido na placa.

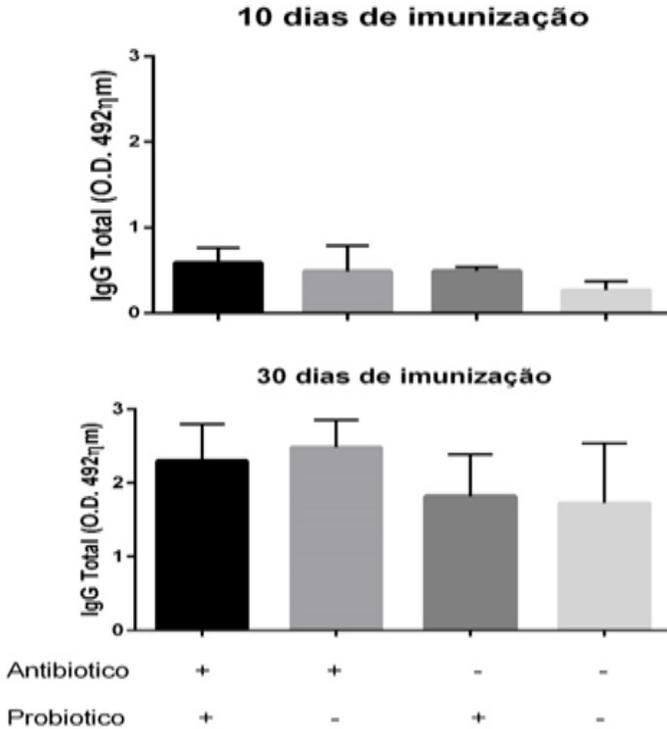
Na figura 12 apresenta os resultados de avaliação dos níveis de IgG séricos totais e, pôde ser observado, que não houve diferenças significativas entre os grupos de animais experimentais nem pelo tratamento antibiótico recebido e nem pela terapia com probióticos posterior.

### 5.1.3 Avaliação detalhada do impacto do probiótico

Embora não se tenha observado diferenças significativas nos níveis de imunoglobulinas IgG totais entre os grupos de animais experimentais pelo tratamento antibiótico e probiótico recebido, foi avaliado mesmo assim o impacto da terapia com probiótico nestes animais tratados anteriormente com antibiótico e ou probióticos, esta avaliação estava relacionada com a recuperação da microbiota intestinal

que teria sido prejudicada ou depletada pela ação antibiótica, e que provavelmente seria recuperada pela terapia com probióticos, e avaliou-se o efeito da terapia sobre os níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais que provavelmente estariam alteradas pelo tratamento antibiótico recebido anteriormente.

Figura 13 – Avaliação detalhada do impacto do probiótico utilizando o pool do soro dos camundongos.



A determinação foi realizada mediante ensaio de ELISA com partículas adenovirais usadas como antígeno aderido na placa. Os camundongos submetidos a diferentes esquemas de tratamento antibióticos e ou probióticos e imunizados com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante depois de 10 e 30 dias de imunização.

Na figura 13 é possível observar os resultados deste ensaio, que mesmo depois de 10 e de 30 dias de terapia com antibióticos e

probióticos não se consegue ver alterações nos níveis séricos de imunoglobulina no primeiro grupo, este resultado sugere que a terapia com antibióticos, não teve efeito sobre a depleção da microbiota intestinal, conforme já observados em ensaios anteriores e, também não é possível observar o impacto do probiótico neste grupo.

No segundo grupo de animais tratados apenas com antibióticos, que também foi considerado como controle dos antibióticos, e visível que a terapia não funcionou devidamente conforme esperávamos, haver uma depleção da microbiota intestinal neste grupo. No terceiro grupo de animais tratados apenas com probióticos, que é considerado como controle do probiótico também é bem visível que o probiótico não teve o efeito esperado igualmente e, no quarto grupo que é o controle dos testes, manteve o perfil dos níveis de imunoglobulinas IgG totais, na mesma proporção dos grupos que receberam terapias de antibióticos e probiótico, sugerindo que não existem diferenças negativas significativas entre os grupos.

## 5.2 RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL (B)

Como foi mencionado nos Materiais e Métodos, para realização do nosso estudo, foram adaptados dois desenhos experimentais (A) e, (B). Na continuação falaremos do desenho experimental B comparando-o com o primeiro.

Apesar de utilizarmos antibióticos do largo espectro de ação nos dois desenhos experimentais para depletar a microbiota intestinal, os antibióticos utilizados no desenho B diferem pela menor capacidade de absorção no trato gastrointestinal dos camundongos. Assim, no experimento A utilizamos antibióticos absorvíveis no trato gastrointestinal (Enramicina e Axetilcefuroxima) enquanto que para o experimento B foram utilizados os antibióticos não absorvíveis Vancomicina, Neomicina, Gentamicina e Metronidazol, todos eles combinando de forma similar os seus espectros de ação.

De igual modo nos dois desenhos experimentais foram utilizados meios de culturas bacterianas diferentes (Ágar sangue e Bile-esculina para (A) e Ágar NHI para (B), estes três meios de cultura, dependentemente de suas características, podem selecionar ou quantificar a microbiota intestinal depletada. Assim, no desenho experimental (A), o meio Bile-esculina é mais seletivo pois apresenta características de inibir o crescimento de alguns microrganismos, enquanto que o meio de Ágar sangue foram utilizados para quantificação das bactérias pois este meio, oferece ótimas condições de crescimento

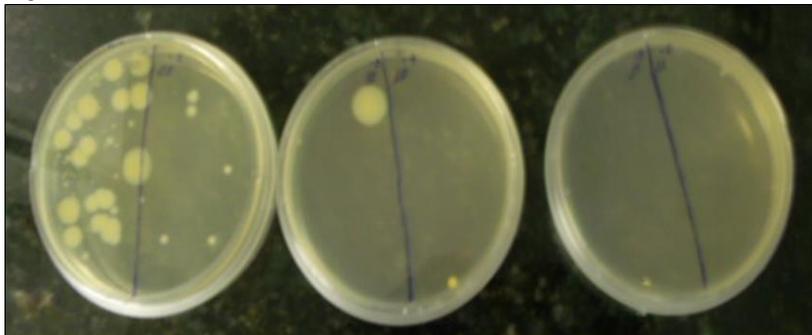
para maioria dos microrganismos. Já no desenho experimental (B), foi utilizado o meio BHI, um meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningocócos enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Este meio tem uma natureza não seletiva, tem a capacidade de crescer nele também a maioria dos microrganismos. Tanto o meio de Ágar sangue como o meio ágar BHI, têm ambos natureza não seletiva, mais no entanto, são meios diferentes quanto as suas composições nutricionais.

Apesar da técnica de cultura bacteriana ser descrita como uma técnica eficiente para o estudo da microbiota intestinal, em nossos experimentos não se mostraram ser tão eficientes assim, para poderem responder aos nossos questionamentos. Este fato motivou-nos a fazer mudanças para técnicas de qPCR, para quantificação da microbiota intestinal dos camundongos dos experimentos (B), pensando nós que esta mudança poderia fornecer melhores resultados. Optamos pela técnica da qPCR, por ser uma técnica mais eficiente comparativamente a de cultura bacteriana, pois com ela foi possível fazer a quantificação génica bacteriana a partir de iniciadores dirigidos aos genes 16S DNA das bactérias. Porém, os resultados desta técnica não são totalmente absolutos, mais pode estimar a quantidade de microrganismos existentes nas amostras de fezes depois de um tratamento prévio com antibióticos utilizados para depleção da microbiota intestinal.

### **5.2.1 Cultura bacteriana em meio BHI**

As culturas bacterianas em meio BHI, foram realizadas com o objetivo de quantificar a carga bacteriana restante depois da terapia com antibiótico.

Figura 14 – Ensaio de culturas bacterianas meio BHI.



À esquerda: diluição  $10^{-1}$  do lado esquerdo da placa é possível contar algumas bactérias até 50 ufc. No centro, diluição de  $10^{-2}$  é possível notar também do lado direito da placa 1 ufc e a direita conta-se também 1 ufc. À direita  $10^{-3}$  ufc não é possível observamos nenhuma colônia bacteriana.

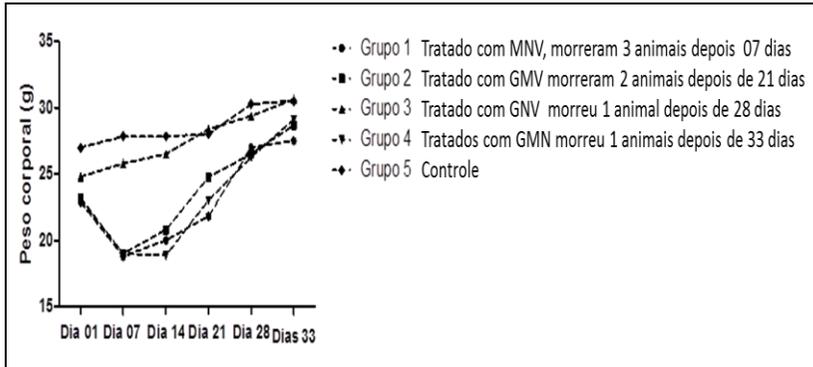
Na figura 14 podemos observar os resultados deste ensaio no que pôde-se observar que, apesar de termos utilizado antibióticos não absorvíveis para depletar a microbiota intestinal, foi possível observarmos crescimento bacteriano em este meio, em especial na placa semeada com a diluição de fezes mais concentrada (diluição 1:10). Pôde-se notar que nas outras placas com as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  não se observam crescimento de nenhum tipo de bactérias. Assim, estes resultados indicaram uma possível depleção de microrganismos significativa mas também não foram conclusivos porque os resultados não foram homogêneos em todos os animais e nem em todos os grupos.

### 5.2.2 Avaliação do peso dos camundongos durante o tratamento

A avaliação do peso dos camundongos durante o tratamento com antibióticos é um parâmetro essencial para se determinar o desenvolvimento dos animais, e também possibilita ter uma ideia da toxicidade dos antibióticos a eles administrados. Assim, no decorrer do nosso experimento foi monitorado e mensurado o peso dos animais durante os dias 07, 14, 21, 28 e 33, com o objetivo de avaliar a sua variação durante todo o período de tratamento. Os camundongos foram pesados um por um dentro do biotério, e o seu peso anotado, e os dados

recolhidos foram lançados na planilha do programa gerador de gráficos (Prisma) dos qual obtivemos o gráfico abaixo.

Figura 15 - Resultado obtido da avaliação do peso dos animais no decorrer do tratamento.



Na figura 15, observam-se os resultados da variação do peso dos animais, onde podemos notar que durante o período de tratamento, houve muita variação do peso dos camundongos submetidos a este esquema de tratamento com antibióticos. Esta variação de peso é mais notável principalmente nos animais dos grupos que receberam o antibiótico Metronidazol e suas combinações. Estes apresentaram uma perda de peso considerável entre 7 e 14 dias de experimento, mais este peso foi se estabilizando com o passar do tempo (21, 28 e 33 dias) estes grupos estão caracterizados pelas abreviações MNV, GMV e GMN respectivamente, não se sabe exatamente o porquê desta perda de peso no princípio do tratamento, mais pensamos que o mal gosto do metronidazol possivelmente tenha influenciado os animais destes grupos para não beberem a água. Já, os camundongos do grupo 3, tratados com GNV, estes mantiveram o seu perfil do peso durante todo o experimento sem no entanto ter se observado qualquer tipo de alteração. Em contrapartida morreram alguns animais em todos os grupos que receberam a terapia com antibióticos. Assim, houve a morte de 3 animais no grupo 1 tratado com MNV, 2 animais no grupo 2 tratado com GMV, 1 animal grupo 3 tratado com GNV e 1 animal no grupo 4 tratado com GMN, totalizando 7 animais mortos em todo ensaio, reduzindo de forma significativa o tamanho das amostras. Portanto, estes dados podem sugerir que para além do mal gosto de certos antibióticos como o metronidazol, eles também podem ser tóxicos, levando a morte de

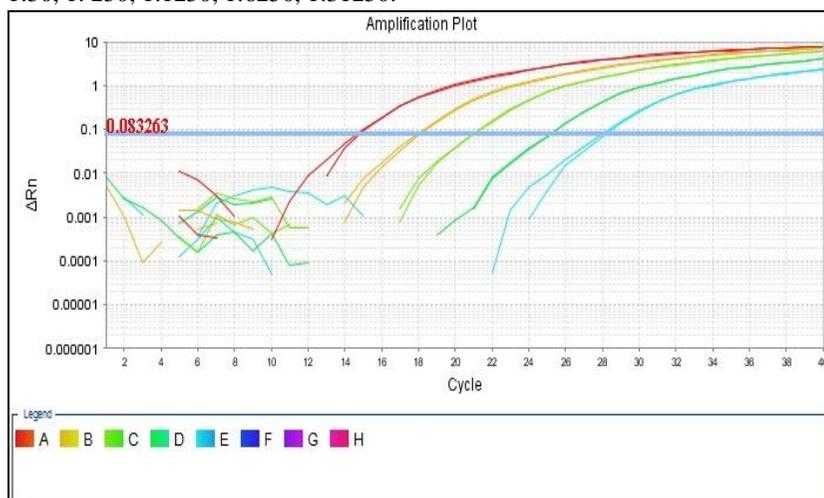
alguns animais conforme foi possível observar durante nosso experimento.

### 5.2.3 Padronização da técnica da qPCR desde cultura bacteriana

Visando conseguir maior facilidade e precisão na quantificação dos microrganismos presentes nas fezes dos animais, durante e depois do tratamento com antibióticos, foram realizadas reações moleculares de PCR em tempo real quantitativo (qPCR), que não são dependentes do crescimento da bactéria mas só da presença do seu genoma na amostra, e desta forma eliminam vários dos empecilhos experimentais associados às técnicas de crescimento bacteriano.

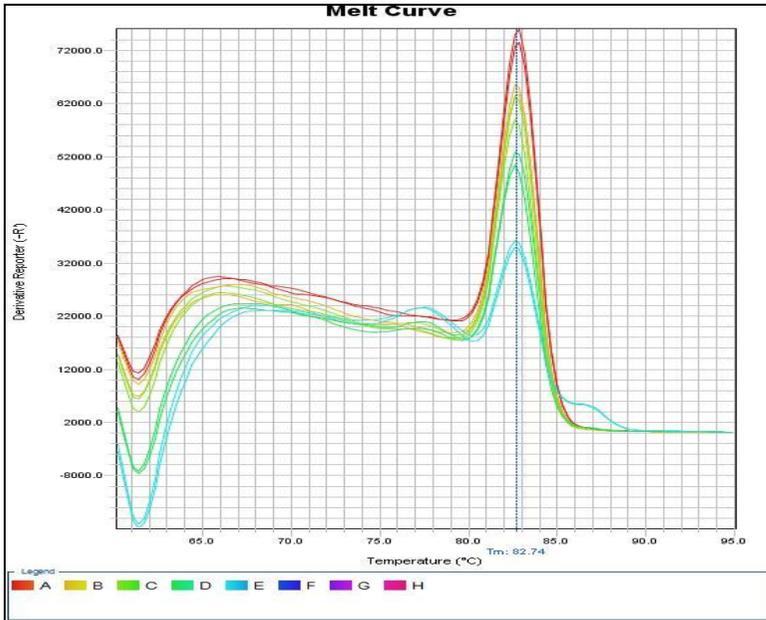
O resultado do perfil de amplificação e as curvas de melting padronizados, com as suas respectivas cores (vermelha, amarela, verde clara, verde escura e a azul) são indicativas para os diferentes grupos, e serão as mesmas a serem seguidas como indicadores para ensaios de qPCR posteriores com as amostras do DNA bacteriano dos camundongos tratados com antibióticos e os mesmos iniciadores padronizados, para com eles determinar a microbiota intestinal.

Figura 16 – Perfil de amplificação do DNA padrão com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250, 1:31250.



### 5.2.4 Padronização da curva de melting desde cultura bacteriana

Figura 17 – Padronização da curva de Melting padrão com a temperatura de desnaturação de 82.74°C do DNA com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250, 1:31250.



É possível observarmos nas figuras 16 e 17 que tivemos sucesso na padronização e normalização da técnica da qPCR em tempo real para detecção do gene que codifica o 16S rRNA das bactérias presentes nas fezes, obtendo curvas com crescimento logarítmico e com especificidade adequada (um único produto sendo detectado nas curvas de dissociação).

### 5.2.5 Perfil de amplificação e curvas de dissociação da qPCR do DNA desde as amostras de fezes dos camundongos

Depois de feita a padronização da técnica de qPCR com DNA extraído de cultura bacteriana, conseguimos definir as concentrações exatas do DNA das amostras de fezes, assim como as concentrações de iniciadores e SYBR Green a utilizar para realização da qPCR em tempo real do experimento, para determinar a microbiota dos camundongos que receberam o tratamento com antibióticos.

Para quantificação gênica e obtenção dos perfis de amplificação e a respectiva curva de melting (dissociação), correspondentes às amostras fecais dos camundongos tratados com as diferentes combinações de antibióticos usa-se assim a mesma tecnologia padronizada com anterioridade. Apesar disto, e ainda que os gráficos mostram perfis de amplificação parecidos (figura18), alguns dados mudaram levemente (ex. na figura 19 pode-se observar que a temperatura de dissociação das amostras aumentou de 82,7 para 83,4 °C). A explicação deste fenômeno ainda não está clara, mas aconteceu de forma repetida em todas as reações de todos os grupos experimentais, pelo que acreditamos que seja uma alteração sem influência nas quantificações posteriores.

Figura 18 – Perfil de amplificação do DNA das cinco amostras fecais dos camundongos tratado com antibióticos com as diluições seriadas de 1:50, 1: 250, 1:1250, 1:6250 até 1:31250.

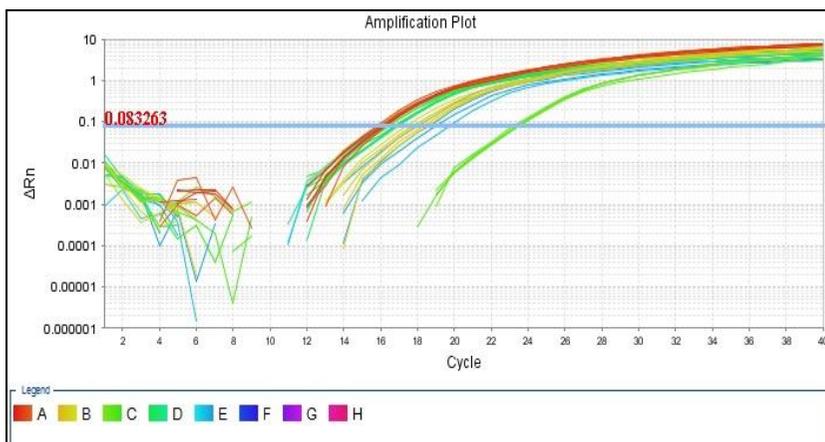
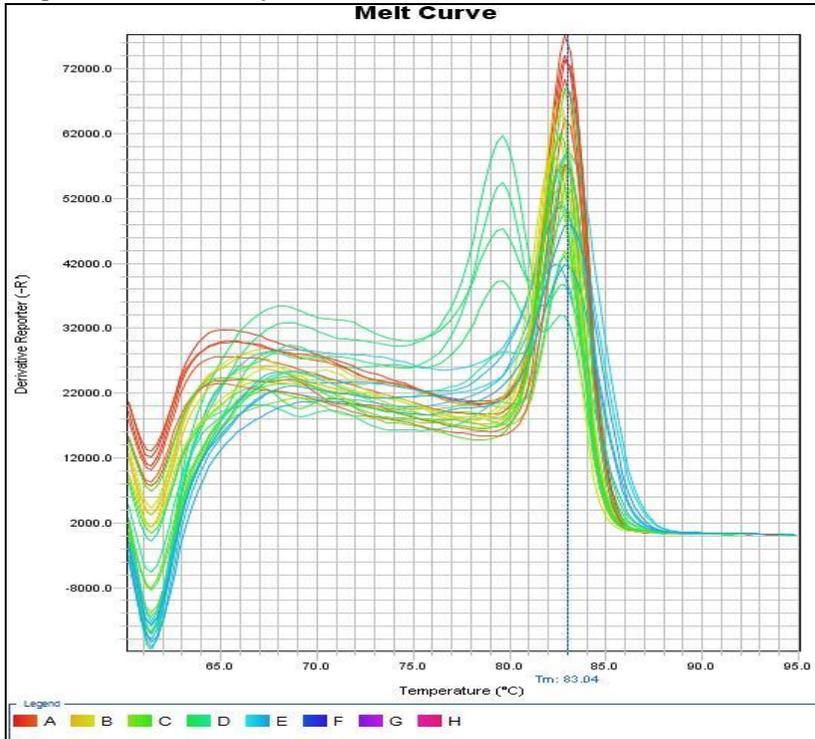


Figura 19 – Pico da Curva de Melting do produto final da PCR com a temperatura de desnaturação de 83.4°C.



Na figura 18 é possível observar claramente os resultados desta qPCR onde pode-se notar, o ruído ou background de fluorescência das amostras e a fase exponencial de crescimento dos produtos da PCR que começa exatamente na convergência do threshold e o ruído, originando o Ct que corresponde a cada amostra. Na figura 19 observa-se a curva de melting da amplificação com um pico único na região de 83.4°C, este valor numérico, é correspondente a temperatura de desnaturação do DNA das amostras fecais, ou da desnaturação do produto final da qPCR.

Nas figuras 18 e 19 as linhas vermelhas correspondem ao grupo 1 (tratados com MNV). A figura mostra que aos 5 dias a carga bacteriana em fezes deste grupo revelou um Ct de 16.4, aos 10 um Ct de 16,24 e aos 15 dias um Ct de 16.58. As linhas amarelas correspondem ao grupo 2 (GMV), que aos 5 dias teve um Ct de 18.2, aos 10 com um Ct de 18.73, e aos 15 um Ct de 16.97. As linhas verdes escuras correspondem ao grupo 3 (GNV), avaliados aos 5 dias com um Ct de 23.73, aos 10 dias

com um Ct de 23.88 e aos 15 dias tiveram um Ct médio de 16.78. As linhas verdes claras correspondem ao grupo 4 (GMN) avaliado aos 5 dias com um Ct=17.15, aos 10 dias com Ct de 17.25 e aos 15 dias apresentando um Ct de 16.42. No final temos as linhas de cores azuis que correspondem ao grupo 5 (controle) avaliados aos 5 dias com um de Ct = 16.43, e aos 10 dias com um Ct de 19.19, aos 15 dias teve um Ct de 19.16.

Perante estes resultados podemos afirmar que nos dias 5 e 10 os Ct dos grupos 1, 2 e 4 apresentaram pouca variação em comparação com grupo 3 que teve um Ct significativamente maior (menos DNA na amostra, correspondendo com menos bactérias nas fezes e uma maior depleção da microbiota intestinal). Os Ct observados aos 15 dias foram mais parecidos para todos os grupos, sugerindo que a microbiota intestinal foi se recompondo com o passar do tempo.

### **5.2.6 Calculo da curva padrão**

O cálculo da curva padrão é uma operação preliminar feita com o objetivo de saber qual é a quantidade de DNA bacteriano presente em cada amostra por comparação com quantidades conhecidas de um produto de PCR que se amplifica de forma simultânea na mesma placa de reação, e que acaba assim dando valores de Ct que são usados como referência para os cálculos matemáticos de quantificação.

Os cálculos são realizados com base no número de moléculas do 16S rRNA por poço. Para estes cálculos, começa-se medindo a concentração do DNA extraído das amostras das fezes dos animais tratados, esta mensuração é feita num equipamento próprio (Picodrop Lda). A continuação faz-se o cálculo do peso molecular do fragmento de DNA de fita dupla amplificado (no nosso caso PM = 121.637,9). Finalmente calcula-se a proporção de moléculas presentes em cada uma das amostras problema por comparação com as moléculas existentes em cada ponto da curva padrão, calculadas utilizando o número de Avogadro ( $6,023 \times 10^{23}$  moléculas por mol de qualquer substancia química, *vide* tabela 3).

Tabela 3. - Cálculo do número de moléculas de cada um dos pontos da curva padrão utilizada para quantificação das bactérias presentes nas amostras fecais.

Curva Padrão					
	[ ] ng/μl	[ ] g	n° mol / poço	CT da PCR	n° de moléculas / poço
1;50	0,04	4E-11	3,29E-16	15,33	1,98E+08
1;250	0,008	8E-12	6,58E-17	18,68	3,96E+07
1;1250	0,0016	1,6E-12	1,32E-17	21,68	7,92E+06
1;6250	0,00032	3,2E-13	2,63E-18	25,88	1,58E+06
1;31250	0,000064	6,4E-14	5,26E-19	28,78	3,17E+05
1;156250	1,28E-05	1,28E-14	1,05E-19	29,16	6,34E+04

Na tabela 3 é possível observar os resultados correspondentes a este cálculo, onde é possível ver os valores da diluição que forma a curva padrão da amostra de DNA em ng/μl, vemos também o número de mol do DNA por poço, os valores dos Ct de amplificação e por último podemos observar o número de moléculas de 16S DNA por poço.

### 5.2.7 Cálculos do número de moléculas de rDNA 16s nas amostras de fezes após 5, 10 e 15 dias de tratamento

Para que possamos saber se realmente houve depleção da microbiota intestinal depois de um tratamento prévio com os antibióticos, foi necessário também fazer alguns cálculos que nos permitiram chegar a uma conclusão sobre a depleção da microbiota intestinal durante 5,10 e 15 dias de tratamento com antibióticos. Estes cálculos, foram realizados com o objetivo de saber, a partir dos valores do Ct e o peso das fezes dos camundongos, determinar o número de moléculas do DNA por grama de fezes dos animais. Para isso, foi utilizada a equação:  $y = (- 2,119) \ln(x) + 55,727$ . Fez-se a substituição dos valores dos Ct no lugar do “x” do logaritmo neperiano para obtenção do número de moléculas de DNA por poço. O resultado obtido desta equação foi correlacionado com o peso das fezes. Este resultado foi multiplicado por mil e dividido pelo peso das fezes, e o resultado desta operação correspondeu ao número de moléculas por grama de fezes, o que originou as tabelas 4, 5 e 6 respectivamente. Estes cálculos são feitos com o objetivo de ter um valor numérico da quantidade de moléculas do 16S rDNA em cada um dos poços e, nas tabelas que seguem abaixo, poderemos observar o resultado deste cálculo.

Tabela 4 – Ilustra o cálculo do número de moléculas de DNA 16S que representam o número total de bactérias nas amostras fecais dos diferentes grupos de animais experimentais, depois de 5 dias de tratamento.

	5 dias			
	CT	Nº moléculas	Peso fezes (mg)	Moléculas/g fezes
<b>Grupo 1</b>	16,4	1,15E+08	114	1,01E+09
<b>Grupo 2</b>	18,2	4,91E+07	147	3,34E+08
<b>Grupo 3</b>	23,73	3,63E+05	182	1,99E+06
<b>Grupo 4</b>	17,15	8,06E+07	101	7,98E+08
<b>Grupo 5</b>	16,43	1,13E+08	86	1,32E+09

Tabela 5 – Ilustra os cálculos do número de moléculas de DNA 16S por gramas depois de 10 dias de tratamento.

	10 dias			
	CT	Nº moléculas	Peso fezes (mg)	Moléculas/g fezes
<b>Grupo 1</b>	16,24	1,24E+08	67	1,85E+09
<b>Grupo 2</b>	18,73	3,82E+07	194	1,97E+08
<b>Grupo 3</b>	23,88	3,37E+06	132	2,55E+07
<b>Grupo 4</b>	17,25	7,69E+07	86	8,94E+08
<b>Grupo 5</b>	19,19	3,08E+07	194	1,59E+08

Tabela 6 - Ilustra os cálculos do número de moléculas de DNA 16S por gramas depois de 15 dias de tratamento.

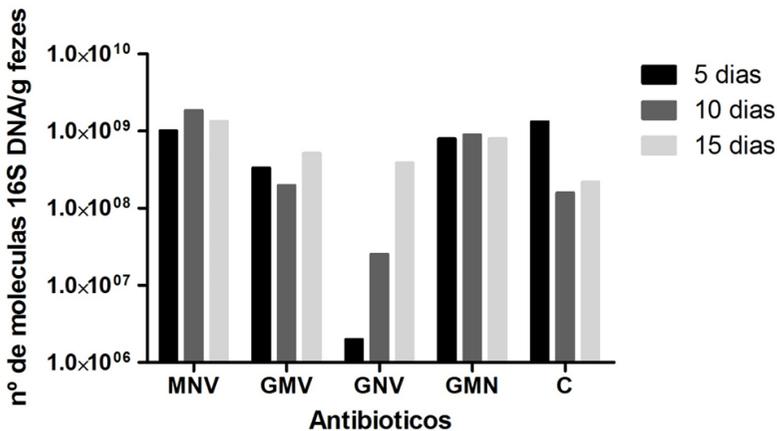
	15 dias			
	CT	Nº moléculas	Peso fezes (mg)	Moléculas/g fezes
<b>Grupo 1</b>	16,58	1,06E+08	79	1,34E+09
<b>Grupo 2</b>	16,97	8,78E+07	169	5,19E+08
<b>Grupo 3</b>	16,78	9,60E+07	248	3,87E+08
<b>Grupo 4</b>	16,42	1,14E+08	142	8,01E+08
<b>Grupo 5</b>	19,16	3,12E+07	143	2,18E+08

Nas tabelas 4, 5 e 6, podemos ver os resultados obtidos partindo dos cálculos descritos anteriormente, nos quais, já é possível observar os números de moléculas de DNA por poço e, os números de moléculas 16S rRNA por gramas de fezes, das coletas feitas nos dias 5, 10 e 15, com estes dados foi possível determinar a depleção da microbiota intestinal durante este período de tempo.

### 5.2.8 Avaliação da depleção da microbiota intestinal dos camundongos tratados com combinações de antibióticos

Depois de termos efetuado todos os cálculos acima referidos, os dados finais obtidos destes cálculos, foram introduzidos numa planilha do programa gerador de gráficos (Prisma), que gerou o gráfico de barras ou histograma de frequências que é possível ver abaixo, nele ainda observa-se claramente que no terceiro grupo de animais (tratados com GNV) a depleção é significativa nos dois primeiros pontos analisados (5 e 10 dias após o início do tratamento).

Figura 20 - Determinação da depleção da microbiota intestinal.



Podemos ver o número de moléculas de 16S DNA por gramas de fezes, dos animais nos diferentes grupos avaliados durante os dias 5 após o início do tratamento antibiótico (identificados pela barra preta do histograma), dia 10 (identificados pela barra cinza escura do histograma) e 15 dias (identificados pela barra cinza do histograma).

Na figura 20 é possível observar que os resultados da depleção da microbiota intestinal são bem aparentes no grupo 3, pode ser visto a redução do número de moléculas 16S rDNA nas amostras de fezes nos primeiros 5 e 10 dias de tratamento. Isso nos sugere que a combinação de antibióticos GNV do terceiro grupo seja a ideal para futuros protocolos de depleção da microbiota intestinal.

Uma situação que nos chamou atenção foi o número de moléculas de 16S rDNA por grama de fezes calculadas no grupo controle. Os

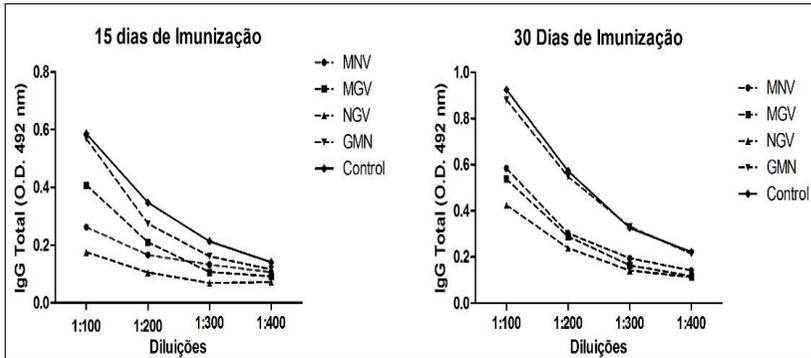
valores que correspondem a este grupo foram mais baixos comparativamente aos grupos que receberam tratamento antibiótico, não se sabe exatamente porque mais, pensamos nós que durante o processamento das amostras houve perda de bactéria, que provavelmente possa ser a causa desta redução.

Além disso, podemos observar que nos grupos 1 e 4, que foram tratados com MNV e GMV, não foi possível observarmos o efeito dos antibióticos sobre a depleção da microbiota intestinal. Apesar de não resultar aparente, no grupo 2 de animais tratados com GMV, já é possível vermos alguma depleção embora pouco significativa. Já, **para os camundongos do grupo 3 tratados com (GNV)**, os resultados foram significativamente menores do que os dos outros animais, tanto no dia 5 após o começo do tratamento antibiótico quanto no dia 10 após esse tratamento, **sendo possível verificar uma significativa depleção da microbiota intestinal de quase 3 ordens de magnitude (ou 99,9987% de depleção do conteúdo intestinal)**. Para os camundongos do grupo 5 (Controle), os resultados deste foram semelhantes aos dois primeiros (1 e 4) mencionados, estes camundongos do grupo controle provavelmente tenham mantido o seu perfil bacteriano em suas amostras.

### **5.2.9 Padronização da melhor diluição do soro para detecção da concentração das imunoglobulinas IgG totais de camundongos após 15 e 30 dias de imunização**

O ensaio da padronização da melhor diluição dos soros para detecção das concentrações de imunoglobulinas IgG totais, foi realizado com os mesmos objetivos descritos para a primeira padronização. Para sabermos qual é a concentração de IgG totais existentes usamos durante a padronização diluições dos soros dos animais imunizados 15 e 30 dias antes, e a partir destes dados, inferimos quais delas seriam as melhores a serem empregues nos ensaios imunológicos posteriores. Esta padronização serviu também para observar as diferenças significativas nas quantidades de anticorpos induzidos pela imunização nos dias 15 e 30 após administração das vacinas.

Figura 21- Padronização das melhores diluições para detectar as Imunoglobulina G total específica. Medidos pelo teste do ELISA de soro dos camundongos dos cinco grupos experimentais.

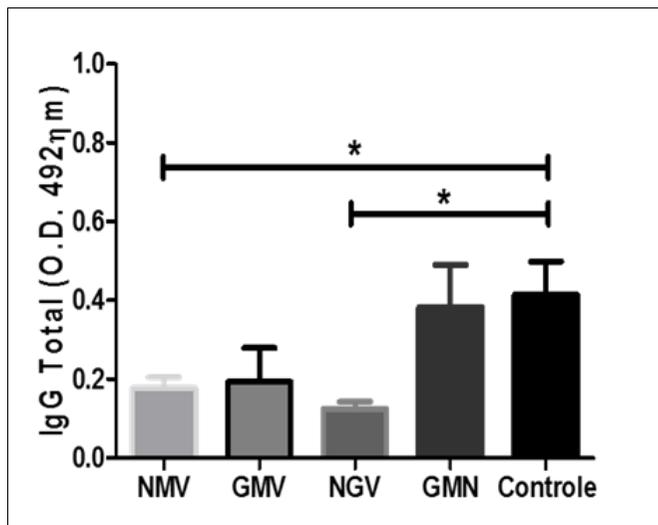


Na figura 21, é possível vermos os resultados da padronização do ensaio do ELISA. Nela pode se observar que dentre as diluições 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400 a melhor diluição para observar diferenças significativas foi 1:100. Na figura apodemos observar também que o aumento no título de anticorpos também foi significativamente maior no dia 30 quando comparado com o dia 15 pós-imunização.

### 5.2.10 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 15 dias de imunização dos camundongos

Depois da padronização do ensaio do ELISA, tivemos a certeza de qual diluição, poderíamos utilizar em nosso teste, (1:100) que apresentou títulos mais diferentes de IgG entre os grupos. Com o objetivo de fazermos a detecção dos níveis séricos de IgG total após 15 dias da imunização dos camundongos, amostras de sangue foram coletadas e processadas e, o soro dos animais por grupo foi analisado, Esta análise sorológica foi realizada por meio do teste do ELISA, em uma placa de 96 poços, aderindo no fundo da placa de policarbonato as partículas adenovirais totais. Foi determinada então a reatividade das amostras duas semanas depois do tratamento com antibióticos, e nos dias 15, 30, e 45 após imunização com a vacina atenuada de adenovírus tipo 5 humanos recombinante.

Figura 22 – Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 15 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.



O grupo 1 tratados com NMV e o grupo 3 tratados com NGV (apresentaram diferenças negativas significativas) em comparação com o grupo controle. \*  $P < 0.05$ .

Na figura 22 podemos ver que no eixo Y temos a numeração referente às quantidades de IgG totais em O.D 492  $\mu\text{m}$  de comprimento de onda (absorbância) e no eixo X temos o tipo de tratamento que cada grupo recebeu. Este formato gráfico será abrangente para as figuras 23 e 24, onde poderemos detectar outros níveis de IgG totais depois de 30 e 45 dias de imunização conforme poderemos ver mais adiante.

A figura 22, mostra os resultados da detecção dos níveis séricos IgG totais depois de 15 dias de imunização onde é possível notar que nos grupos 1,2 e 3, compostos pelos animais tratados com NMV, GMV e GNV, neles, podemos ver claramente que os níveis de IgG totais são relativamente mais baixos que os níveis de IgG nos grupos 4 tratados com GMN, enquanto que o grupo controle manteve os seus níveis de imunoglobulina comparativamente aos grupos tratados. Apesar dos níveis de IgG totais observados serem mais baixos nestes três grupos, os resultados da análise estatística dos grupos pelos testes de variância (ANOVA) e o teste t-Student, apresentaram valores de  $*p < 0.05$  apenas

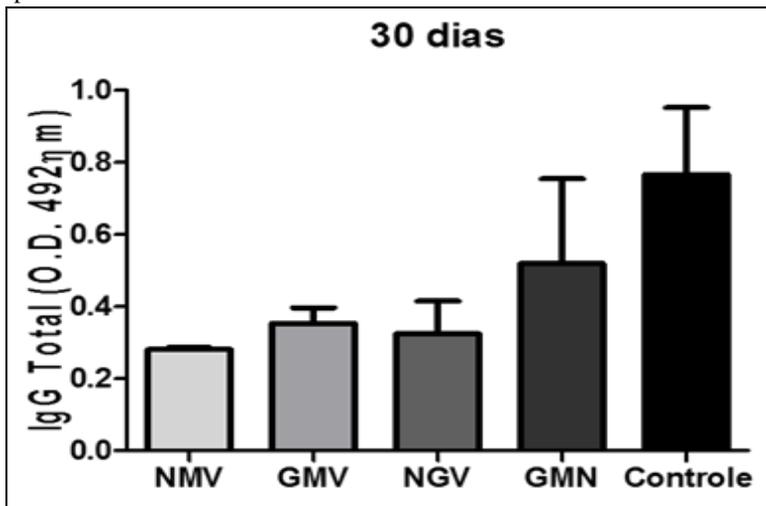
para os grupos 1 e 3 que, para os nossos estudos valores de  $*p < 0.05$  implica dizer que os dados apresentam diferenças estatísticas negativas significativas em comparação com o grupo controle.

Uma vez que observamos diferenças negativas significativas nos níveis de IgG totais durante os 15 dias de imunização nos grupos submetidos ao esquema de tratamento com os antibióticos, NMV e NGV, (1 e 2) medidas pelo ensaio de ELISA, a confirmação estatística dos dados apresentam valores de absorbância de  $(0.1755 \pm 0.05593)$ ;  $(0.4143 \pm 0.1687)$  e  $(0.1258 \pm 0.03382)$ ;  $(0.4143 \pm 0.1687)$  confirmando a existência de diferenças significativas entre os dois grupos em comparação ao grupo controle que tiveram os valores de p associado a análise estatística desta diferença de  $*p=0,03$  e  $*p=0.01$  respectivamente.

### **5.2.11 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 30 dias de imunização dos camundongos**

Com a finalidade de determinar se as diferenças nos níveis de imunoglobulina G total foram mantidas no período de memória imunológica (aquele que realmente é considerado vacinação) um novo ensaio de ELISA foi realizado com os soros dos diferentes grupos de animais após 30 dias da imunização. A figura 24 mostra os resultados desse experimento.

Figura 23 – Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 30 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.

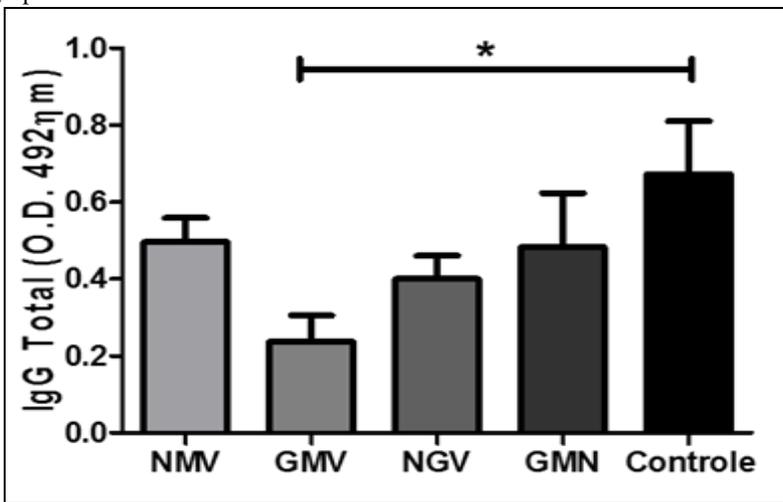


Os resultados de detecção de anticorpos séricos após 30 dias da imunização mostram que, apesar de não ter sido detectada em alguns grupos de animais tratados com antibióticos uma diminuição significativa na população de microrganismos presente nas fezes mediante a qPCR, **os níveis de imunoglobulinas séricas sim que sofreram alterações significativas detectáveis 30 dias após imunização.** Apesar desta observação ser clara, e de indicar uma tendência de diminuição dos níveis de anticorpos séricos nos animais tratados, a confirmação pela análise estatística inicial dos dados não conseguiu chegar a valores de significância estatística suficientes ( $p$  próxima mas não inferior a 0,05), o que sugere que devam ser aumentados os números de animais por grupo e realizados com mais cuidados os ensaios de sorologia, além de incluir outras determinações mais finas de respostas imunes acessórias como podem ser as de linfócitos T CD4+ e CD8+ que possam ter sido induzidas durante o processo de vacinação.

### 5.2.12 Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais após 45 dias de imunização dos camundongos

Com a finalidade de observar se a tendência de diminuição das respostas imunes de memória por causa da depleção da microbiota intestinal era mantida com o tempo, novas determinações de níveis séricos de anticorpos específicos contra a vacina adenoviral foram realizadas aos 45 dias após a vacinação. O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos em aquele ponto de tempo.

Figura 24 - Detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas IgG totais, após 15 de imunização com a vacina atenuada de adenovírus humano (HuAd5V) recombinante medidas pelo ensaio do ELISA em soro dos camundongos por grupo.



O grupo 2 tratados com GMV (apresentou diferença negativa significativa) em comparação com o grupo controle. \*  $P < 0.05$ .

Os resultados de detecção dos anticorpos séricos depois de 45 dias de imunização não só mantiveram um perfil similar àqueles obtidos 30 dias após a imunização, mas também permitiram obter os primeiros dados significativos desde o ponto de vista estatístico. Assim, o grupo de animais tratado com GMV (medida de absorbância para IgG total =  $0.2375 \pm 0.1355$ ), já indicou que a resposta imune humoral induzida mediante a vacinação adenoviral foi objetivamente menor do que a resposta induzida nos grupos de animais controle que não tinham sido tratados com antibióticos para depletar a sua microbiota intestinal

(medida de absorvância para IgG total de  $0.6733 \pm 0.2743$ ), e o valor de p associado a análise estatística desta diferença foi de  $*p=0,02$ .

Vale a pena mencionar que a mesma tendência de diminuição das respostas humorais anti-adenovirais totais foi mantida em todos os outros grupos de animais tratados com antibióticos quando comparados com o grupo controle, apesar de não ter conseguido ainda os dados estatísticos que deram suporte a esta afirmação de forma objetiva.



## 6. DISCUSSÃO

Este estudo baseou-se na hipótese de que a microbiota intestinal influenciaria nas propriedades imunológicas das vacinas recombinantes.

Por isso, independente do desenho experimental, selecionaram-se diversos antibióticos e se formaram combinações com espectros de ação complementares que foram colocadas na água de beber dos camundongos para depletar a microbiota intestinal com o objetivo de se avaliar qual seria o efeito desta depleção sobre os antígenos das vacinas.

### 6.1 DESENHO EXPERIMENTAL (A)

No primeiro desenho experimental, além da depleção da microbiota intestinal foi a nossa intenção a subsequente administração de probióticos que poderiam recuperar a microbiota intestinal experimentalmente depletada e assim recuperar uma resposta imune inicialmente deficitária. Pamer e colaboradores (2016), descrevera, recentemente estudos que estão a identificar espécies de bactérias comensais que podem ser desenvolvidas como probióticos, a serem utilizados para gerações futuras com o objetivo de restabelecer ou melhorar a resistência à colonização.

O objetivo final deste desenho experimental seria poder desenvolver um protocolo terapêutico que pudesse ser aplicado em situações reais de crianças e adultos que tivessem passado por situações terapêuticas que alterassem de forma intensa a microbiota intestinal normal (neonatos pré-termo tratados com coquetéis antibióticos, pacientes de câncer com tratamentos intensos de quimioterapia, pacientes com infecções hospitalares por *Clostridium difficile* e outros) ou patológicas (crianças em áreas subdesenvolvidas com diarreias intensas e repetitivas).

O uso de antibióticos de amplo espectro de ação em crianças recém-nascidas tem sido uma prática constante em áreas subdesenvolvidas. Segundo Francino e colaboradores (2016), esta prática tem levado a alterações da microbiota intestinal, estas alterações podem persistir até a vida adulta e influenciar negativamente a homeostase do sistema imune, que também podem afetar as respostas dos antígenos das vacinas a eles administradas. Ainda, Nakaya; Bruna Romero (2015), já tinham revisado e comentado o fato de que a microbiota intestinal em comensalismo com o hospedeiro, pode desempenhar um papel importante na imunogenicidade dos antígenos vacinais.

Segundo Reikvam e colaboradores (2011), uma alternativa de sucesso geral ao uso de animais livres de germes para estudar a interação hospedeiro microrganismo *in vivo* é esgotar a microbiota intestinal dos camundongos através da utilização de uma combinação de antibióticos de amplo espectro administrados por via oral *ad-libitum*. Já Oh e colaboradores (2014), concordam com esta afirmativa reforçando que este tem sido o método mais utilizado para estudar a influência da microbiota intestinal sobre os processos fisiológicos, metabólicos e imunológicos em camundongos.

O nosso protocolo para depletar a microbiota intestinal dos camundongos no desenho experimental (A), foi usado uma combinação de antibióticos de amplo espectro absorvíveis no trato gastrointestinal (Axetilcefuroxima e Enramicina) administrados via oral durante 14 dias na água de bebida. Para avaliar a depleção, foram coletadas amostras de fezes que foram cultivadas em meio ágar sangue e ágar bile esculina, processadas e incubadas a 37°C por 72 horas. Porém, nossos resultados da depleção da microbiota e do cultivo bacteriano, não foram concretizados, porque não se observou depleção da microbiota intestinal com esta combinação de antibióticos e também as bactérias não cresceram conforme se esperava. Diferente dos resultados de Reikvam e colaboradores (2011) quando fizeram um estudo sobre o esgotamento da microbiota intestinal murina e avaliação dos efeitos sobre a própria mucosa mediante medição da expressão de um gene epitelial. Os nossos resultados sobre avaliação dos níveis séricos de IgG totais dos camundongos tratados com antibióticos (Axetilcefuroxima e Enramicina) também não foram concretizados, atendendo ao fato de que não se observou depleção da microbiota intestinal, também era de esperar que as análises gráficas dos dados não sugerissem diferenças negativas significativas nos níveis de IgG totais entre os grupos tratados com esta combinação de antibióticos.

Igualmente, não conseguimos observar efeito algum da administração do probiótico nos animais, o que era esperado pelo fato de não ter observado previamente depleção da microbiota natural do animal. Também, não sabemos se a utilização de um probiótico humano em roedores (Simbioflora, Carboquímica Ltda) haveria de ter qualquer efeito benéfico, sendo que as bactérias que se comportam como probióticas nos animais podem ser significativamente diferentes, ainda que pertençam às mesmas famílias ou grupos bacterianos.

## 6.2 DESENHOS EXPERIMENTAL (B)

Olhando para as dificuldades apontadas no desenvolvimento do desenho experimental (A), traçamos o desenho experimental (B): cumprindo as recomendações seguintes: melhorar o protocolo de depleção da microbiota intestinal, (antibióticos não absorvíveis), utilizar a técnica da qPCR utilizando iniciador dirigido para os genes rRNA 16S bacteriano (para determinar a microbiota intestinal sem necessidade de realizar cultivos bacterianos), manter os testes imunoenzimáticos (ELISA) e não utilizar probióticos até não estar melhor definido o protocolo de depleção.

Em nosso estudo, as observações feitas no desenho experimental (B) sugerem que a depleção da microbiota intestinal influenciou negativamente as respostas IgG séricas dos camundongos. Podemos assim atribuir desta maneira significativa importância à presença da microbiota intestinal na geração de anticorpos do tipo imunoglobulinas IgG no soro de camundongos. Foi possível demonstrar isso utilizando camundongos que tiveram as suas microbiotas intestinais depletadas com antibióticos de largo espectro em diferentes esquemas de tratamento e imunizados com uma vacina de adenovírus humano (HuAd5v) recombinante contra *Plasmodium vivax* (e não esperaríamos qualquer diferença caso o adenovírus tivesse carregado qualquer outro gene recombinante no seu interior).

Um aspecto surpreendente foi o efeito dos antibióticos sobre a perda do peso dos camundongos e a morte de 7 animais durante o período de tratamento principalmente os grupos que continham nas suas combinações o Metronidazol (MNV, GMV e GMN) mais, não apresentaram uma significativa depleção da microbiota intestinal. Revisando a literatura pudemos ver que estes resultados foram similares aos que Rakoff-Nahoum e colaboradores (2004) obtiveram quando tentaram depletar a microbiota intestinal de camundongos, fornecendo uma combinação de Ampicilina, Vancomicina, Neomicina, e Metronidazol *ad libitum* na água de beber, de acordo com um protocolo previamente publicado. Em seus resultados observaram que o motivo principal foi que os camundongos BALB/c não beberam a mistura, presumivelmente devido ao mal gosto de metronidazol e assim os animais perderam > 20% do peso corporal inicial. Nossos resultados estão também de acordo com Carlos Ubeda; Eric Pamer, e colaboradores (2012) que descreveram que o metronidazol (M), não diminui

significativamente a densidade bacteriana total no intestino, ainda que possa eliminar várias populações de bactérias (variação qualitativa).

A utilização da técnica de qPCR foi feita para estimar a depleção da microbiota intestinal, para isso utilizamos iniciadores universais dirigidos aos genes rRNA 16S bacteriano. Segundo Furrie; Mathys; Matsuki (2006); Furet (2009); Turroni, e colaboradores (2012) e diversos outros autores a diversidade, variabilidade e a complexidade da microbiota intestinal faz com que seja melhor avaliá-la usando técnicas moleculares e não de crescimento microbiano. Também reforçaram que a qPCR é a metodologia de escolha para a detecção e quantificação de bactérias específicas, através da utilização de iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas 16S rRNA.

Com base nesta técnica, e depois de analisarmos os nossos resultados, conseguimos observar que realmente houve depleção efetiva da microbiota intestinal no grupo de camundongos do grupo número 3 tratados com NGV. E a quantificação permitiu a confirmação da redução do número de cópias 16S RNA bacteriano por gramas de fezes depois de 5 e 10 dias de tratamento com a combinação dos antibióticos Neomicina, Gentamicina e Vancomicina, seguido do grupo 2 tratados com MGV que também apresentou depleção comparativamente aos outros grupos (1 e 4), acreditando nós que esta depleção foi por causa da combinação entre a Gentamicina e a Vancomicina. Esta análise, permitiu-nos chegar à conclusão de que as maiores taxas de depleção da microbiota intestinal foram observadas nestes dois grupos. Já, Sekirov e colaboradores (2008); Ubeda e colaboradores (2010); Buffie e colaboradores (2012) estudaram o efeito dos antibióticos sobre a microbiota intestinal em camundongos descrevendo que o tratamento de camundongos com uma combinação de Clindamicina, Ampicilina e Vancomicina causava mudanças significativas na microbiota intestinal em camundongos, semelhante ao observado em nossos resultados nos dois grupos analisados GNV e GMV.

Para a detecção dos níveis séricos de IgG totais, nós camundongos submetidos aos diferentes esquemas de tratamento com antibióticos e imunizados com a vacina de adenovírus recombinante humano (HuAd5v) contra o *Plasmodium vivax*, avaliada com ensaio do ELISA, foi possível a observação de valores baixos de absorvância indicando que as propriedades imunológicas desta vacina foram influenciadas negativamente pela depleção da microbiota intestinal nos camundongos induzindo menores títulos de anticorpos IgG totais.

Foi possível observar este fenômeno nos grupos tratados com as combinações de antibióticos NGV e GMV em espaços de tempo

diferentes (15 e 45 dias de imunização). Assim, durante a análise estatística dos dados após 15 dias de imunização, conseguimos encontrar diferenças negativas significativas entre os grupos de animais tratados com, NGV e também nos animais do grupo tratado com GMV após 45 dias, apresentando baixos níveis de anticorpos IgG totais comparativamente ao grupo controle apresentando valores de absorvância de  $(0.1258 \pm 0.03382)$ ;  $(0.4143 \pm 0.1687)$  e  $(0.2375 \pm 0.6733)$ ;  $(0.1355 \pm 0.2743)$ . Apresentando valores de  $*P=0.03$ ,  $*P=0.01$  e  $*P=0.02$  ou  $*P \leq 0.05$  respectivamente. Estes resultados corroboram com os de Chang e colaboradores (2011), quando testaram em camundongos a administração oral de antibióticos de amplo espectro conseguiram observar uma redução significativa de IgG total em camundongo apesar de ser usado um antígeno completamente diferente nas imunizações.

Ho J.Z e colaboradores (2014) publicaram um estudo envolvendo seres humanos que não tinham em sua microbiota bactérias flageladas. Neste estudo, os autores estudaram o efeito da estimulação através de TLR5 para geração de respostas de anticorpos contra a vacina sazonal inativada contra gripe (“trivalent influenza vaccine” ou TIV). Os autores observaram em camundongos  $Tlr5^{-/-}$  que os níveis de anticorpo foram reduzidos, apresentando também, baixa frequência de células plasmáticas, atribuindo uma importância grande à presença de TLR5 na estimulação de respostas imunes adaptativas contra algumas vacinas. Uma vez atribuída esta importância ao receptor Toll-like5, os autores tentaram reforçar esta correlação em camundongos livre de microrganismos e camundongos tratados com antibióticos de largo espectro, ficaram surpreendidos quando observaram o resultado do teste, vendo que a geração de anticorpos IgG séricos também foi prejudicada, atribuindo uma importância da microbiota intestinal no estímulo de geração de anticorpos vacinais, uma vez que os níveis de anticorpos foram reconstituídos pela ingestão de uma bactéria flagelada. Os mesmos autores afirmaram também que a ativação do TLR5 mediada pela microbiota intestinal tem influência nas respostas de anticorpos para vacina inativada contra a poliomielite. Nossos resultados da depleção da microbiota intestinal após tratamento com antibióticos de amplo espectro e imunização dos camundongos, com a vacina de adenovírus humano tipo 5 contra o *Plasmodium vivax* (HuAd5v), foi possível observar que a depleção da microbiota intestinal influenciou negativamente nas respostas aos antígenos vacinais, atribuindo também importância da presença da microbiota intestinal em estimular as respostas das vacinas, a única diferença estava relacionada com o tipo de vacina utilizado no

nosso experimento. Corroborando com os resultados de Ho e colaboradores (2014).

Os nossos achados sobre a depleção da microbiota intestinal, mostraram-nos que embora que aparentemente a maior parte da microbiota intestinal tenha sido depletada do intestino após tratamento com antibiótico por via oral, ainda era possível observar bactérias no intestino. Estes achados corroboram com os de Ichinohe e colaboradores (2011); Rakoff-nahoum e colaboradores (2004) quando descreveram em seus experimentos sobre a depleção da microbiota intestinal em camundongos, que mesmo depois do tratamento dos camundongos com antibióticos, ainda era possível observar uma concentração de  $10^6$  ufc/g no conteúdo intestinal. Os nossos resultados, assim como os encontrados na literatura, sugerem que não é necessária uma eliminação completa da microbiota intestinal para testar a influência dela para estimular respostas imunológicas nas vacinações.

Um fato relevante a considerar durante a nossa pesquisa estava relacionado às respostas imunológicas das vacinas que eram menos eficientes em populações que vivem em reassentamentos populacionais com deficiência de saneamento básico. Este fenômeno foi analisado por Lagos e colaboradores (1999); Hallander e colaboradores (2002) em crianças Suíças; Levine e colaboradores (2010) e países como: Índia, África, Gambia, Brasil, Peru, Malawi, Bangladesh, Gana, Kenya, Mali, Paquistão, Indonésia, Tailândia, Equador, Nicarágua; Lopmam e colaboradores (2012) em países como Inglaterra, México e Sul da Índia; Grassly e colaboradores (2010) no Sul da Índia, considerando que crianças que vivem em localidades com problemas de saneamento básico estavam mais expostas a contaminações bacterianas, e o crescimento excessivo de bactérias nocivas nos intestinos afetaria negativamente na eficácia das vacinas.

Além disso, Gensollem e colaboradores (2016) consideraram que a fraca resposta aos antígenos vacinais em crianças na infância possa estar correlacionada a colonização bacteriana intestinal em excesso no início da vida.

Ainda Gensollem e colaboradores (2016) puderam demonstrar por meio de camundongos livres de germes que a colonização microbiana dos tecidos das mucosas durante a infância desempenha um papel fundamental ao desenvolvimento do sistema imunológico. Ademais, esta colonização no início da vida pode ter consequências duradouras facilitando a tolerância às exposições ambientais ou que contribuíram para o desenvolvimento de doenças mais tarde na vida, incluindo doenças inflamatórias intestinais, alergias e asma.

Futuramente outras vacinas produzidas em nossos laboratórios poderão ser testadas para estudar o impacto da microbiota intestinal nas propriedades imunológicas de diferentes tipos de vacinas podendo assim colaborar junto a este estudo na geração de um conhecimento que possa embasar futuros planos de vacinação melhores para populações em áreas de risco por falta de saneamento básico ou para indivíduos (crianças ou adultos) com alterações intestinais significativas e de natureza diversa.



## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- Os antibióticos Vancomicina e a Gentamicina provocaram -em diferentes graus, e sempre dependendo das suas associações- alterações significativas na microbiota intestinal dos animais experimentais e dessa forma permitiram realizar alguns estudos experimentais sobre o efeito dessas depleções sobre as vacinas administradas com posterioridade.
- As depleções observadas foram temporárias em número (os animais recuperaram o número total de bactérias em menos de 20 dias após o fim do tratamento antibiótico), porém não podemos afirmar que a re-colonização tenha resultado numa microbiota igual (qualitativamente) àquela inicial presente no animal. Este fato pode ser a causa de posteriores observações nas alterações imunitárias pós-vacinais desses animais.
- Os grupos de animais que receberam o antibiótico metronidazol (M) como substância indutora de depleção da microbiota intestinal tiveram seu peso corporal significativamente reduzido, mas este antibiótico não parece ser responsável por uma significativa depleção da microbiota intestinal.
- As maiores taxas de depleção da microbiota intestinal foram observadas nos grupos de animais tratados com NGV e GMV, acreditando assim que seja a associação de Vancomicina com Gentamicina a maior responsável por essa ação farmacológica.
- Os nossos resultados sugerem a existência de uma diferença negativa significativa nos níveis de resposta humoral (IgG total) detectados após vacinação nos grupos de animais tratados com NMV, NGV após 15 dias de imunização, e com GMV após 45 dias.
- Fica demonstrada, portanto, a existência de uma diferença significativa de imunogenicidade vacinal quando existem alterações intensas da microbiota intestinal, o que deveria ser tido em consideração quando planejadas as ações de imunização/vacinação da população geral, e em especial quando considerados grupos especiais de crianças (neonatos pré-termo com tratamentos antibióticos de longa duração ou

com diarreias intensas durante os primeiros dois anos de vida) ou adultos com alterações significativas da microbiota intestinal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A MARCOBAL, et al. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1933-1943, 6 jun. 2013.
- ABBINK, P. et al. Comparative Seroprevalence and Immunogenicity of Six Rare Serotype Recombinant Adenovirus Vaccine Vectors from Subgroups B and D. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 81, n. 9, p.4654-4663, 28 Feb. 2007.
- ABT, Michael C et al. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 6, p.496-502, 2009.
- ABT, Michael c. et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. **Immunity**, v. 37, n. 1, p.158-170, 2012.
- ABT, Michael C; ARTIS, David. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 6, p.496-502, 2009.
- AMANN, R.I. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl Environ Microbiol** v.56, n.6, p.1919-1925, 1990.
- AMARAL, F. A. et al. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p.2193-2197, 2008.
- ANANTHAKRISHNAN, Ashwin N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 4, p.205-217, 2015.
- ASMUTH, D. M., et al. Comparative cell-mediated immunogenicity of DNA/DNA, DNA/adenovirus type 5 (Ad5), or Ad5/Ad5 HIV-1 clade B gag vaccine prime-boost regimens. **J. Infect. Dis**, v. 201, p. 132–141, 2010.
- ATARASHI, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. **Science**, p.331: 337-341, 2011.

ATARASHI, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridium strains from the human microbiota. **Nature**, v. 500, p. 232–236, 2013.

BETTELHEIM, K. A. et al. "The origin of serotypes of Escherichia coli in babies after normal delivery". **Journal of Hygiene**, v.72 n, p.67–70, 2009.

BÖTTCHER, M. et al. Microflora associated characteristics in faeces from allergic and non-allergic children. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 30, n.11 p. 1590, 2000.

BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium: **"The Intelligent Intestine"**, held In Paris, v. 78, n.4 p. 675 - 683, 2003.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 91 14, 2002. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 675-683, 2003.

BRANDT, K.G. et al. Importância da microflora intestinal. **Pediatrics (São Paulo): Revisões e Ensaios**, p.28, v.2, p.117-27, 2006.

BUCHBINDER, Susan P et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. **The Lancet**, [s.l.], v. 372, n. 9653, p.1881-1893, nov. 2008.

BUFFIE, C. G. et al. Profound Alterations of Intestinal Microbiota following a Single Dose of Clindamycin Results in Sustained Susceptibility to Clostridium difficile-Induced Colitis. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 1, p.62-73, 2012.

CAMPEOTTO, F. at al. Establishment of the intestinal microflora in neonates. **Gastroenterology Clin Biol**, v. 31, n.5, p. 533-542, 2007.

CATANZARO, Andrew t. et al. Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 Candidate Vaccine Delivered by a Replication-Defective Recombinant Adenovirus Vector. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 194, n. 12, p.1638-1649, 15 dez. 2006.

CHANG, J.-h. et al. IFN- Secreted by CD103+ Dendritic Cells Leads to IgG Generation in the Mesenteric Lymph Node in the Absence of Vitamin A. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 186, n. 12, p.6999-7005, 13 maio 2011.

COLLADO, M.; BÄUERL, C. et al. Defining microbiota for developing new probiotics. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 23, p. 18579, 2012.

COOMBES, J.L.; POWRIE, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. **Nature reviews Immunology**, v.8, n.6, p. 435-446, 2008.

COPPA GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. The first probiotic in humans: human milk oligosaccharides. **J Clin Gastroenterol**, v.38, n.3, p. 80 – 82, 2004.

COPPA, G.v. et al. Prebiotics in human milk: a review. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p.1-4, dez. 2006.

DE VRESE, P.R.; MARTEAU. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea, **J. Nutritional**. v. 137, n.3, p. 8035 - 8115, 2007.

DIBAISE, J.K. et al. Gut Microbiota and Its Possible Relationship with Obesity. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n.4, p.460-469, 2012.

DIDIERLAURENT A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, Blomhoff R, Akira S, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J Immunol**, v.172, p.6922-6930,2004.

DRASAR, B.S. et al. The Bacterial Flora of the Intestine. **Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer**, p.23-38, 1988.

DUNNE, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. **Inflam. Bowel Dis**, v. 7, p. 136-145, 2001.

DUNNE, Colum. Adaptation of Bacteria to the Intestinal Niche: Probiotics and Gut Disorder. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 7, n. 2, p.136-145, 2001.

EDWARDS, C. A.; PARRETT, A. M. Intestinal flora during the first months of life: **new perspectives**. *Bjn*, v. 88, n. 1, p.1-8, set. 2002.

FANARO, S. et al. "Intestinal microflora in early infancy: Composition and development". **Acta paediatrica**, v.91, n.441, p. 48-55, 2003.

FAO/WHO. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London, Ontario, Canada**, 2002.

FAVIER, C. F. et al. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p.219-226, 2002.

FERREIRA, Rosana B. R.; ANTUNES, L. Caetano M.; FINLAY, B. Brett. Should the Human Microbiome Be Considered When Developing Vaccines? **Plos Pathog**, v. 6, n. 11, p.1-2, 2010.

FERREIRA, Rosana B. R.; ANTUNES, L. Caetano M.; FINLAY, B. Brett. Should the Human Microbiome Be Considered When Developing Vaccines? **Plos Pathog**, v. 6, n. 11, p.1-2, 2010.

FRANCINO, M. P. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. **Front. Microbiol.**, [s.l.], v. 6, p.1-11, 12 jan. 2016.

FUJIWARA, D. et al. Systemic control of plasmacytoid dendritic cells by CD8+ T cells and resident microbiota. **J Immunol**, v.180, n.9, p.5843-5852, 2008.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bactériol., Oxford**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FURET, Jean-pierre et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **Fems Microbiology Ecology**, v. 68, n. 3, p.351-362, 2009.

FURRIE, e et al. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v. 55, n. 2, p.141-143, 2006.

GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**. v.31, n.4, p. 677- 689, 2009.

GENSOLLEN, T. et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, v. 352, n. 6285, p.539-544, 2016.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. **Journal Nutrition, Bethesda**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIRARDIN, S. E. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p.8869-8872, 2003.

GOSALBES, María José et al. Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota. **Plos One**,[s.l.], v. 6, n. 3, p.1-9, 8 mar. 2011. Public Library of Science (PLoS).

GRASSLY, Nicholas c. et al. Mucosal Immunity after Vaccination with Monovalent and Trivalent Oral Poliovirus Vaccine in India. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 200, n. 5, p.794-801, 2009.

GUARNER, Francisco; MALAGELADA, Juan-r. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p.512-519, 2003.

HALL, J.A, et al. "Commensal DNA Limits Regulatory T cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses." **Immunity**, v. 29, n.4, p.637-649, 2008.

HALLANDER, H. O et al. Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. **Vaccine**, v. 21, n. 1-2, p.138-145, 2002.

HUMPHREY, Jean H. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. **The Lancet**, v. 374, n. 9694, p.1032-1035, 2009.

HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic Bacéria. **Bactérial Rev**, v. 14, n.1, p.1-49, 1950.

ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 13, p.5354-5359, 2011. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. (Eds.). **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: **Médica e Científica Ltda**, p. 1037-1047, 2004.

IVANOV, Ivaylo I. et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p.485-498, 2009.

IVANOV, Ivaylo I. et al. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. **Cell Host & Microbe**, v.4, n.4, p.337-349, 2008.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p.987-995, 2004. .

KAPER, J. B.; SPERANDIO, V. Bactérial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p.3197-3209, 19 maio 2005.

KLEESSEN, B.; BEZIRTZOGLU, E.; MATTO, J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human

gastrointestinal microflora. **Microbiol. Ecol. Health Dis**, v. 12, n.2, p. 53-63, 2000.

KLIGLER, B.; COHRSEN, A. Probiotics. **Am Fam Physician**, v.78 n.9, p. 1073-1078, 2008.

KOLMEDER, Carolin A. et al. Comparative Metaproteomics and Diversity Analysis of Human Intestinal Microbiota Testifies for Its Temporal Stability and Expression of Core Functions. **Plos One**, v. 7, n. 1, p.1-14, 18 jan. 2012.

KOSIEWICZ MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut Microbiota, Immunity, and Disease: A Complex Relationship. **Frontiers in Microbiology**, v.2, p.180, 2011.

LAGOS, Rosanna et al. Effect of Small Bowel Bacterial Overgrowth on the Immunogenicity of Single-Dose Live Oral Cholera Vaccine CVD 103-HgR. The **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p.1709-1712, 1999.

LEVINE, Myron M. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p.129-10, 2010.

LOPMAN, Ben et al. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p.434-442, 2012.

LOPMAN, Benjamin A. et al. Understanding Reduced Rotavirus Vaccine Efficacy in Low Socio-Economic Settings. **Plos One**, v. 7, n. 8, p.1-7, 2012.

MACKIE, R.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr**, v.69, n.5, p. 1035-1045, 1999.

MACPHERSON, A. J. IgA Adaptation to the Presence of Commensal Bacteria in the Intestine. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, p.117-136, 2006.

MACPHERSON, A. J. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5664, p.1662-1665, 2004.

- MANDAL, Rahul Shubhra; SAHA, Sudipto; DAS, Santasabuj. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 3, p.148-158, jun. 2015.
- MANNING, J. G. et al. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on Salmonella enteritidis cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. **Avian diseases**, v. 38, n. 2, p. 256-261, 1994.
- MARCH, B. E. The host and its microflora: An ecological unit. **Journal of Animal Science, Champaign**, v. 49, n. 3, p. 857-867, 1979.
- MARKLE, J.g.; FISH, E.n. Sex matters in immunity. **Trends In Immunology**, 1990.
- MATHYS, Sophie et al. PCR and real-time PCR primers developed for detection and identification of Bifidobacterium thermophilum in faeces. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p.179-8, 2006.
- MATSUKI, T. et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacterium. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p.167-173, 2006.
- MATSUOKA, Katsuyoshi; KANAI, Takanori. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. **Seminars In Immunopathology**, v. 37, n. 1, p.47-55, 2014.
- MAZMANIAN, Sarkis K. et al. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, v. 122, n. 1, p.107-118, 2005.
- MAZMANIAN, Sarkis K.; ROUND, June L.; KASPER, Dennis L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p.620-625, 2008.
- MCCARTNEY, A.L.; WENZHI, W.; TANNOCK, G. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and Lactobacillus microbiota of humans. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, n.12 p. 4608-4613, 1996.
- MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.12, n.4, p.193-207, 2000.
- MCSORLEY, S.J. et al. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. **J. Immunol**, v.169, n.7, p. 3914-3919, 2002.

- MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p.819-826, 2007.
- MILES, R. D. et al. Effects of a Living Nonfreeze-Dried Lactobacillus acidophilus Culture on Performance, Egg Quality, and Gut Microflora in Commercial Layers. **Poultry Science**, v. 60, n. 5, p.993-1004, 1981.
- MILLING, Simon W.f.; COUSINS, Lesley; MACPHERSON, G. Gordon. How do DCs interact with intestinal antigens? **Trends In Immunology**, v. 26, n. 7, p.349-352, 2005.
- MIYAMOTO, Tadashi et al. Changes in Microflora of the Cloaca and Oviduct of Hens after Intracloacal or Intravaginal Inoculation with Salmonella enteritidis. **Avian Diseases**, v. 42, n. 3, p.536-9, 1998.
- NAIK, S. et al. Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. **Science**, v. 337, n. 6098, p.1115-1119, 2012.
- NAKAYA, Helder I et al. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p.786-795, 2011.
- NAKAYA, Hélder I; BRUNA-ROMERO, Oscar. Is the gut microbiome key to modulating vaccine efficacy? **Expert Review Of Vaccines**, v. 14, n. 6, p.777-779, 27 abr. 2015.
- NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol**, v. 15, p. 183- 190, 1995.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. (Eds.). Gastroenterologia. Rio de Janeiro: **Médica e Científica Ltda**, p. 1037-1047, 2004.
- NISBET, David J. et al. Effect of a Defined Continuous-Flow Derived Bacterial Culture and Dietary Lactose on Salmonella typhimurium Colonization in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 4, p.1017-1025, 1993.
- OH, Jason z. et al. TLR5-Mediated Sensing of Gut Microbiota Is Necessary for Antibody Responses to Seasonal Influenza Vaccination. **Immunity**, v. 41, n. 3, p.478-492, 2014.
- OTHMAN, M.; AGUERO R, LIN, H. C. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. **Curr opin Gastroenterol**, v.24, n.1, p. 11-16, 2008.

PAMER, E. G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, [s.l.], v. 352, n. 6285, p.535-538, 28 abr. 2016.

PURCHIARONI, A. F. et al. The role of intestinal microbiota and the immune system. **Eur Rev Med Sci Pharmacol**, v.17, n.3, p. 323-333, 2013.

QUEREC, Troy D et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. **Nature Immunology**, v. 10, n. 1, p.116-125, 2009.

QUIGLEY, E.M.M. Functional significance of the bowel microflora in gastrointestinal health: proceedings of a roundtable discussion. **Amer. J. Gastroenterol**, v. 95, n. 1, p.27, 2000.

RADOSEVIC, K. et al. Protective Immune Responses to a Recombinant Adenovirus Type 35 Tuberculosis Vaccine in Two Mouse Strains: CD4 and CD8 T-Cell Epitope Mapping and Role of Gamma Interferon. **Infection And Immunity**, v. 75, n. 8, p.4105-4115, 25 maio 2007.

RAKOFF-NAHOUM, Seth et al. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p.229-241, 2004.

REIKVAM, Dag Henrik et al. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. **Plos One**, v. 6, n. 3, p.1-13, 2011.

RESCIGNO, Maria et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p.361-367, 2001.

REYNOLDS, D. J.; DAVIES, R. H.; RICHARDS, M. E.; WRAY, C. Evaluation of combined antibiotic and competitive exclusion treatment in broiler breeder flocks infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. **Avian pathology**, v. 26, n. 1, p. 83-95, 1997.

ROUND, June L.; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p.313-323, 2009.

SAARELA, M. et al. Gut bacteria and health foods - the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 99-117, 2002.

- SAAVEDRA, J. Probiotics and infectious diarrhea. **The American Journal Of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, p.1-4, 2000.
- SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p.91-99, 2003.
- SANTRA, Sampa et al. Heterologous prime/boost immunizations of rhesus monkeys using chimpanzee adenovirus vectors. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p.5837-5845, set. 2009.
- SAVAGE, D C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. **Annual Review Of Microbiology**, v. 31, n. 1, p.107-133, 1977.
- SAVAGE, D. C. 1987. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technol**, v.41, n.22, p 82-87, 1987.
- SAVAGE, D.C. Mucosal microbiota, In: OGRA, P.L.; MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE, J.R. (Eds). Mucosal Immunology. **San Diego: Academic Press**, p. 19-30, 1999.
- SCHWIERTZ, Andreas et al. Development of the Intestinal Bacterial Composition in Hospitalized Preterm Infants in Comparison with Breast-Fed, Full-Term Infants. **Pediatr Res**, v. 54, n. 3, p.393-399, set.2003.
- SEKIROV, I. et al. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p.859-904, 1 jul. 2010.
- SEKIROV, I.; TAM, N.M.; JOGOVA, M. et al. antibiotics induced disorders Susceptibility host Alter intestinal microbiota for Enteric Infection. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p.4726-4736, 2008.
- SENDER R, FUCHS S, MILO R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, v.28, n.3, p164-337, 2016.
- SHARMA, Renu et al. Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p.1-15, 2010.
- SIMON, G.L.; GORBACH, S.L, Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, v.86, n.1, p. 174-193, 1983.
- SINGHI, Sunit C.; KUMAR, Suresh. Probiotics in critically ill children. **F1000research**, v. 5, p.407-11, 29 mar. 2016.

SOMMER, Felix; BÄCKHED, Fredrik. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p.227-238, 25 fev. 2013.

SOUZA DG, Vieira AT, Soares AC, et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J Immunol**, v.173, n.6, p.4137–4146, 2004.

STROBER, Warren et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 1, p.9-20, 9 dez. 2006.

SWIDSINSKI, A. et al. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Microbiol**, v.43, n.7, p.3380-3389, 2005.

TANNOCK, Gerald W. The normal microflora: an introduction. **Medical Importance of the Normal Microflora**, p.1-23, 1995.

TEITELBAUM, Jonathan E.; WALKER, W. Allan. N UTRITIONAL I MPACT OF P RE- AND P ROBIOTICS AS P ROTECTIVE G ASTROINTESTINAL O RGANISMS \*. **Annu. Rev. Nutr**, v. 22, n. 1, p.107-138, jul. 2002.

THOMAS DW, Greer FR. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **Probiotics and prebiotics in pediatrics. Pediatrics**, v.31, p.126:1217, 2010.

TOJO R, Suárez A, Clemente MG, et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of Bifidobacterium in gut homeostasis. **World Journal of Gastroenterology : WJG.** , v.20, n.41, p.15163-15176, 2014.

TRABULSI, L.R., SAMPAIO, M.M.S.C., A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo, Os Probióticos e a Saúde Infantil, v. 1, **Brasil: Nestlé Ltda.**, p. 3-11, 2000.

TURRONI, Francesca et al. Diversity of Bifidobacterium within the Infant Gut Microbiota. **Plos One**, v. 7, n. 5, p.1-12, 11 maio 2012.

UBEDA, Carles et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 12, p.4332-4341, 1 dez. 2012.

UBEDA, Carles et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 12, p.4332-4341, 1 dez. 2010.

UMESAKI, Yoshinori; SETOYAMA, Hiromi. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. **Microbes And Infection**, v. 2, n. 11, p.1343-1351, set. 2000.

v. 35, n. 3, p.97-104, 2014.

VALDEZ, Yanet; BROWN, Eric M.; FINLAY, B. Brett. Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. **Trends In Immunology**, v. 35, n. 11, p.526-537, nov. 2014.

VAN DER WAAIJ, D. Bioregulation of the digestive tract microflora. **Rev Sci. Techn. Off. Inter. Epizoot**, v. 8, n.2, p. 333-345, 1989.

VANDENPLAS, Yvan et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **J Pediatr (rio J)**, v. 87, n. 4, p.292-300, 23 ago. 2011.

WANG, Qun et al. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 203, n. 13, p.2853-2863, 18 dez. 2006.

WILLS-KARP, Marsha; SANTELIZ, Joanna; KARP, Christopher L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p.69-75, out. 2001.

WILSON, I.; NICHOLSON, J. The Role of Gut Microbiota in Drug Response. **Cpd**, v. 15, n. 13, p.1519-1523, 1 maio 2009.

World Health Organization: Future needs and directions for Shigella vaccines. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 81, n.6, p.51-58, 2006.

YU, Linda Chia-hui. Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Food Hypersensitivity. **Journal Of Allergy**, v. 2012, p.1-11, 2012.

ZHANG, Husen et al. Probiotics and virulent human rotavirus modulate the transplanted human gut microbiota in gnotobiotic pigs. **Gut Pathog**, v. 6, n. 1, p.1-7, set. 2014.

ZOETENDAL, E.G.; AKKERMANS, A. D.; VOS, W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. **Apple Environ Microbial**, v. 64, n.10, p.3854-3859, 1998.

ZOETENDAL EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Appl Environ Microbiol** , v.68,p.3401–3407, 2002 .

PETERSON DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. **Cell host & microbe**, v.2,p.328-339,2007.

FLAVIO et al Microbiota indígina do trato gastrointestinal, **Revista de biologia e ciência da terra**, v.10,n.1,p.1519-5228, 2010.

PEREZ, H. J.; MENEZES, M. E.; D'ACÂMPORA, A. J. Microbiota intestinal: **estado da arte. Acta Gastroenterológica Latinoamericana, Buenos Aires**, v. 44, n. 3, p. 265-272, out. 2014.

MARKLE, J.g.; FISH, E.n.. SeXX matters in immunity. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.97-104, mar. 2014.