

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PRICILA ROMÃO MARCONDES ÁVILA

**AVALIAÇÃO DOS SIMBIÓTICOS EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE PEDIÁTRICA**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para a obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Co-orientador: Prof^a Dra. Cristiane
Ritter

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A958a Ávila, Pricila Romão Marcondes.

Avaliação dos simbióticos em modelo animal de SEPSE pediátrica / Pricila Romão Marcondes Ávila ; orientador: Felipe Dal Pizzol, coorientador: Cristiane Ritter. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

83 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

1. Sepsis. 2. Sepsis pediátrica. 3. Síndrome de resposta inflamatória sistêmica. 4. Probióticos. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD. 22^a ed. 616.944

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Prícila Romão Marcondes Ávila** sob o título “**Avaliação dos simbióticos em modelo animal de sepse pediátrica**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

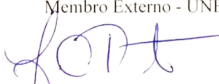
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

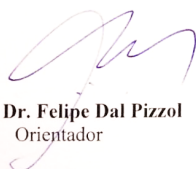
Criciúma, SC, 14 de dezembro de 2016.


Prof.^a Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC


Prof.^a Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Membro Interno – UNESC


Prof.^a Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo - UNESC


Prof.^a Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Externo - UNISUL


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador


Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Seria injusto citar apenas algumas pessoas neste espaço, uma vez que todos que passaram pela minha vida, de uma maneira ou outra, acabaram influenciando minha jornada até esse momento. Sempre tive como verdade a certeza de que nunca realizamos nada sozinhos, sempre dependemos, e muito, da ajuda e colaboração de outras pessoas se quisermos concretizar algo.

Ao criador, que me deu a vida, a clareza de pensamentos que me permitiu chegar até aqui.

Agradeço primeiramente a meu orientador, Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, que durante esses anos guiou meus estudos, incentivando-me a descobrir o “mundo” do laboratório de pesquisa com bom humor e sabedoria. A sua equipe maravilhosa, começando pela Cristiane Tomasi e Larissa Constantino, que me acolheram num primeiro momento no laboratório de pesquisa. Continuando com a Francieli Vuolo e Monique Michels, que continuaram comigo até o término deste projeto, me mostrando os caminhos da pesquisa, tirando dúvidas, ensinando, incentivando na busca pelo conhecimento, e principalmente sendo referência, sem vocês, Monique e Fran, esta pesquisa não teria se tornado realidade. Aos nossos queridos alunos de iniciação científica, Henrique, Beatriz, Rafaela, Vitória, Mariane, Celso, Juliano, Diego, Vanessa, Heloísa, Ana, Luana, enfim essa rapaziada maravilhosa que enche de alegria nosso laboratório. Aos colegas de pós-graduação, afinal formamos uma equipe, Cleonice, Wolnei, Leandro, Christian. A Iara Santana, que colaborou imensamente para que a minha técnica de histologia fosse aprimorada. A toda estrutura proporcionada pela Unesc, instituição que eu tenho muito orgulho em fazer parte, afinal são 10 anos estudando e acompanhando a sua transformação. Ao pessoal do biotério, PPGCS (Diana), almoxarifado, compras, laboratórios (microbiologia - Grazi e Lu, Rhaissa), meninas da limpeza, outros laboratórios de pesquisa, enfim todos os que com seus trabalhos tornaram possível a realização desta conquista.

Agradeço imensamente a minha família, meu marido Paulo Ávila, afinal “Um sonho que se sonha só, é só um sonho, mas um sonho que se sonha junto, é realidade”. Aos meus filhos Rafael e Gabriel Ávila, pela compreensão, incentivo, amor. Ao meu sogro, Aucemir Ávila, meu fiel confidente de planos e estratégias profissionais, que vibra comigo em cada conquista, a quem sempre serei muito grata. Aos meus pais e meus irmãos, Marcos e Henrique.

A todos os animais que foram usados nesta pesquisa, dando sua vida em prol da ciência.

RESUMO

A sepse é uma síndrome clínica muito comum, atingindo também a população pediátrica. É considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos prematuros. A característica marcante dessa doença é o desequilíbrio da resposta inflamatória. Tem sido proposta uma relação entre sistema imunológico e o microbioma. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos dos simbióticos sobre a inflamação sistêmica induzida em modelo animal de sepse pediátrica. Os animais foram suplementados por 15 dias consecutivos com prebiótico fruto-oligossacarídeos (FOS), probióticos (*bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus acidophilus*) ou simbióticos. No 15º dia os animais foram submetidos a indução de endotoxemia pela administração de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Posteriormente avaliou-se o dano oxidativo, através da mensuração dos níveis de TBARS, carbonil e nitrito/nitrato e a inflamação sistêmica através da atividade de mieloperoxidase (MPO) e citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , em cérebro, rim, pulmão e intestino. Foi determinada também a presença de crescimento bacteriano nos linfonodos mesentéricos. Em seguida, avaliou-se o papel da microbiota intestinal através de transplante de microbiota fecal (TMF), em dois modelos de sepse, LPS e zimosan. Os animais doadores de fezes receberam suplementação prévia de duas cepas de probióticos (*lactobacillus rhamnosus* e *casei*), por 15 dias consecutivos. Avaliou-se os mesmos parâmetros de dano oxidativo e inflamação sistêmica já citados e nos mesmos tecidos, avaliou-se a lesão tissular através de histologia. No geral, os resultados mostram que o tempo de tratamento de 15 dias teve um efeito protetor mais eficaz do que o tempo de sete dias. Quando avaliado o papel protetor das diferentes cepas de simbióticos, percebe-se que em cada tecido, e em cada marcador, as cepas tiveram comportamentos diferentes. Observa-se no tecido intestinal que os simbióticos parecem ter um maior efeito protetor nos marcadores avaliados. Já no tecido pulmonar esse efeito parece ser uma consequência dos *lactobacillus rhamnosus*. No tecido renal destaca-se os *lactobacillus casei*, *acidophilus* e os simbióticos (conforme o marcador avaliado). Entretanto, no cérebro fica menos evidente qual cepa teve a maior participação na proteção desse tecido. Quando avaliado o papel da microbiota intestinal através do TMF, observa-se que todos os tratamentos com transplante fecal tiveram efeitos protetores, independente da administração prévia de probióticos aos grupos doadores de fezes. Os resultados demonstram que as cepas probióticas diferem s

ignificativamente entre si, tendo diferentes efeitos sobre a saúde do hospedeiro. Sendo assim, não se pode extrapolar os resultados obtidos entre diferentes cepas. É importante ressaltar o papel da microbiota intestinal *per se*, pois os resultados do presente estudo mostram uma proteção, sobre os parâmetros inflamatórios e de dano oxidativo, no TMF, independente da administração prévia de probióticos. Com base nestes resultados pode-se concluir que os simbióticos e o TMF podem oferecer um benefício imunomodulatório adicional ao tratamento medicamentoso, e assim podendo ser uma nova alternativa terapêutica em pacientes pediátricos com sepse.

Palavras-chave: Sepse pediátrica. Probióticos. Simbióticos. Transplante de microbiota fecal.

ABSTRACT

Sepsis is a very common clinical syndrome, also affecting pediatric population. It is considered one of major causes of morbidity and mortality in premature newborns and has a complex and challenging treatment. The main characteristic of this condition is the imbalance of inflammatory response. A relation between immune system and microbiome has been proposed. This study aimed to investigate the effects of synbiotics on systemic inflammation induced in animal models of pediatric sepsis. Animals were supplemented for 15 consecutive days with prebiotic fructo-oligosaccharides (FOS), probiotics (*bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus acidophilus*) or synbiotics. On the 15th day, animals were induced to endotoxemia by administering lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS). Afterwards, oxidative damage was evaluated by measuring TBARS, carbonyl and nitrite/nitrate and systemic inflammation over the myeloperoxidase activity (MPO) and cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- α) on the brain, kidney, lung and intestine. Bacterial growth on mesenteric lymph nodes was also determined. Next, the role of intestinal microbiota through fecal microbiota transplant (FMT) in two models of sepsis, LPS and zymosan were evaluated. The fecal donor animals received previous supplementation of two probiotic strains (*lactobacillus rhamnosus* and *lactobacillus casei*) for 15 consecutive days. The same parameters of oxidative damages and systemic inflammation already mentioned were evaluated, such as tissues and also tissue injury through histology. Overall, results showed that treatment time of 15 days had a more protective effect than 07 days. Once evaluated the protective role of the different synbiotic strains, it was observed the strains had different behaviors on each tissue and in each marker. It was noticed synbiotics seem to have a greater protective effect on the evaluated markers on the intestinal tissue. On lung tissue, yet, this effect seems to be a consequence of *lactobacillus rhamnosus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus acidophilus* and synbiotic (according to the evaluated marker) stand out on renal tissue. However, on the brain, there was no significant difference on which strain had a more effective protection. Evaluated the role of the intestinal microbiota through FMT, all fecal transplant treatments have been shown to have protective effects, independently of previous administration of probiotics to fecal donor groups. Results showed probiotic strains differ significantly from each other, having different effects on host health. Therefore, results obtained between different strains cannot be extrapolated. It is important to emphasize the role of the

intestinal microbiota *per se*, as results of the present study showed a protection on inflammatory parameters and oxidative damages in FMT, independent of previous administration of probiotics. Based on the results, it can be concluded that synbiotics and FMT may offer an additional immunomodulatory benefit to medical treatment and thus may be new therapeutic approach in pediatric patients with sepsis.

Key words: Pediatric sepsis. Probiotics. Symbiotic. Fecal microbiota transplant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CLP - Ligação e Perfuração Cecal (do inglês *cecal ligation and puncture*)
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
FOS - frutooligossacarídeo
IgA - Imunoglobulina A
IL-1 - Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
IL-13 - Interleucina 13
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
LPS - Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*
LTA - Ácido Lipoteicóico
MPO - Mieloperoxidase
O₂⁻ - Ânion Superóxido
NO - Óxido nítrico
SIRS - Síndrome da Resposta inflamatória Sistêmica (do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)
SNC - Sistema Nervoso Central
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*)
TMF - Transplante de Microbiota Fecal
TNF - α – Fator de Necrose Tumoral (do inglês *tumoral necrosis factor*)
UTI - Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 SEPSE PEDIÁTRICA	11
1.1.1 Definição e Epidemiologia	12
1.1.2 Fisiopatologia – Aspectos Básicos	12
1.1.3 Diagnóstico e Tratamento	13
1.2 INFLAMAÇÃO E SEPSE	13
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SEPSE	15
1.4 MICROBIOTA INTESTINAL E SEPSE	16
1.5 NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO NA SEPSE	17
1.5.1 Suplementação de Simbióticos	17
1.5.2 Transplante Fecal	19
1.6 MODELO ANIMAL DE SEPSE.....	19
2 OBJETIVO	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 ANIMAIS	23
3.2 MODELO ANIMAL DE ENDOTOXEMIA PELA ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	23
3.3 MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO ESTÉRIL PELA ADMINISTRAÇÃO DE ZIMOSAN A DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	24
3.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	24
3.5 SUPLEMENTAÇÃO DE SIMBIÓTICOS.....	24
3.6 TRANSPLANTE FECAL	25
3.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS E escala temporal.....	25
3.7.1 Experimento I - Escolha do Tempo de Tratamento Profilático	26
3.7.2 Experimento II - Probióticos X Prebióticos X Simbióticos	27
3.7.3 Experimento III - Transplante Fecal	28
3.8 ANÁLISES LABORATORIAIS	30
3.8.1 Resposta Inflamatória	30
3.8.1.1 Atividade de mieloperoxidase - MPO.....	30
3.8.1.2 Citocinas pró-inflamatórias.....	30
3.8.2 Dano oxidativo	31
3.8.2.1 Preparação do tecido e homogenado.....	31
3.8.2.2 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS.....	32
3.8.2.3 Formação de proteínas carbonil.....	32
3.8.2.4 Nível de nitrito/nitrato.....	32
3.8.3 Cultura de linfonodo mesentérico	33
3.8.4 Análise histológica	33
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4 RESULTADOS	33
4.1 EXPERIMENTO I.....	34

4.1.1 Efeitos do tratamento por sete dias com simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS	34
4.1.2 Efeitos do tratamento por sete dias com simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS.....	35
4.1.3 Efeitos do tratamento por 15 dias com simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS	39
4.1.4 Efeitos do tratamento 15 dias com simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS	40
4.1.5 Avaliação da permeabilidade intestinal de animais submetidos a endotoxemia.....	44
4.2 EXPERIMENTO II.....	45
4.2.1 Efeitos do tratamento com probióticos, prebióticos e simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS	45
4.2.2 Efeitos do tratamento com probióticos, prebióticos e simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS.....	49
4.2.3 Efeitos da suplementação de probióticos, prebióticos e simbióticos em cultura de linfonodos mesentéricos em animais submetidos a endotoxemia pela administração de LPS.....	55
4.3 EXPERIMENTO III	56
4.3.1 Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo em endotoxemia induzida pelo LPS	56
4.3.2 Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica em endotoxemia induzida pelo LPS	60
4.3.3 Papel da microbiota intestinal em parâmetros de dano oxidativo na inflamação estéril induzida por zimosan	64
4.3.4 Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica induzida por zimosan.....	68
4.3.5 Análises histológicas	73
4.3.5.1 Avaliação da lesão tissular ocorrida na endotoxemia induzida pelo LPS	73
4.3.5.2 Avaliação da lesão tissular ocorrida na endotoxemia induzida pelo Zimosan.....	77
5 DISCUSSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE PEDIÁTRICA

Todo processo infeccioso desencadeia uma resposta inflamatória do hospedeiro, cuja magnitude pode variar de indivíduo para indivíduo. A interação complexa entre organismo e o agente causador resulta no processo fisiopatológico que antigamente era definido como septicemia e hoje é denominado como sepse (Vicent e Korkut, 2008). A sepse é uma síndrome clínica muito comum, com alta morbidade e mortalidade, e tratamento complexo, que demanda muitos recursos humanos e equipamentos, gerando altos custos na área da saúde (Angus *et al.*, 2011; Lagu *et al.*, 2012; Mayr *et al.*, 2014). Acredita-se que a incidência mundial possa ser de aproximadamente 19 milhões de casos ao ano (Angus e Van der Poll, 2013).

A sepse é uma das patologias mais desafiadoras da medicina. Acarretando esforços consideráveis para uma melhor compreensão da característica marcante dessa doença: o desequilíbrio da resposta inflamatória (Angus *et al.*, 2011). Apesar de sua importância e da demanda de recursos, seu diagnóstico ainda não ocorre em tempo hábil, deixando margem para a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Seu manejo sofreu profundas mudanças na última década, havendo hoje inúmeras orientações com base em evidências advindas de estudos clínicos e experimentais (O'Brien *et al.*, 2007; Dellinger *et al.*, 2013). Essa patologia também atinge a população pediátrica, sendo considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos prematuros, sendo responsável por até 40% dos óbitos neonatais nos países em desenvolvimento (WHO, 1999). Atualmente, as pesquisas, clínicas ou experimentais, concentram-se principalmente na população adulta, onde os resultados obtidos são frequentemente extrapolados para a população pediátrica (Levy *et al.*, 2003).

Baseadas em conceitos de sepse para a população adulta, em 2005 o *International Pediatric Sepsis Consensus Conference* (IPSCC) publicou definições direcionadas para a população pediátrica, como diferenças em alguns parâmetros de diagnósticos. Apesar da relevância do tema, até essa data não havia consenso em relação às definições de sepse para a população pediátrica. A dificuldade para o estabelecimento de um consenso relaciona-se ao caráter dinâmico e complexo da doença e a certas peculiaridades da infância (Goldstein *et al.*, 2005; Kuch *et al.*, 2005).

Estima-se um custo anual de 1,97 bilhão de dólares gastos com os cuidados da sepse pediátrica (Stoll, 1998; Despond *et al.*, 2001; Watson, 2003; Goldstein *et al.*, 2005). Esta representa uma das principais causas de internação e óbito em UTI. O estudo multicêntrico *Progress* revelou taxas de letalidade de 56% no Brasil, em países em desenvolvimento 45% e em países desenvolvidos 30%. A taxa de mortalidade em crianças com sepse grave alcança 20% em países desenvolvidos e pode chegar a 50% em países em desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2008).

1.1.1 Definição e Epidemiologia

A sepse pode ser definida como uma síndrome em pacientes com infecção documentada ou presumida, associada a manifestações sistêmicas gerais, desencadeada por variáveis relacionadas a resposta inflamatória, macro e micro-hemodinâmicas que levam às disfunções de múltiplos órgãos (Dellinger *et al.*, 2013). No contexto destas variáveis, encontra-se o conceito de Síndrome da Resposta inflamatória Sistêmica (SIRS), cujos sinais clínicos sozinhos não conseguem distinguir resposta inflamatória estéril ou decorrente de infecção (Vincent, 2013). Mais recentemente foi redefinido o conceito de sepse e choque séptico, com ênfase em determinar a presença de disfunção de órgãos, o que levaria a um maior risco de mortalidade, do que simplesmente uma infecção associada a, que pode refletir apenas uma inapropriada resposta do hospedeiro, frequentemente adaptativa. Uma visão consistente com o fato de que os defeitos celulares alicerçam anomalias fisiológicas e bioquímicas em sistemas de órgãos específicos. Assim, entende-se a sepse como uma disfunção de órgãos causada por resposta desregulada do hospedeiro à infecção e com risco de vida (Singer *et al.*, 2016).

1.1.2 Fisiopatologia – Aspectos Básicos

A fisiopatologia da sepse é uma complexa interação entre micro-organismos infectantes e as respostas imunes, pró-inflamatórias e pró-coagulantes do hospedeiro (Bone, 1996; Hotchkiss e Karl, 2003). A sepse pode ser uma consequência indireta da atividade de mediadores inflamatórios derivados do hospedeiro, e não resultante de uma ação direta dos micro-organismos ou de seus produtos (Marshall, 2003). Os papéis de alguns mediadores na patogênese da doença já estão bem esclarecidos, sendo que esses mediadores podem induzir grandes alterações na fisiologia da vasculatura e dos órgãos. Dentre os mediadores

envolvidos na gênese destacam-se as citocinas e as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Portella 2010).

As bactérias multiplicam-se no foco primário, podendo atingir outros órgãos e sistemas através da corrente sanguínea, instalando-se assim o quadro séptico. O sistema imune do hospedeiro, em resposta às toxinas bacterianas, participa da lesão tecidual associada à sepse. A resposta depende da capacidade de reconhecimento e neutralização do micro-organismo na corrente sanguínea e nos tecidos.

Os eventos fisiopatológicos que ocorrem nesse processo são mediados por citocinas, ativadas em resposta à presença de componentes bacterianos no compartimento vascular. Vias bioquímicas, neuroendócrinas e imunológicas são ativadas na tentativa de controlar a invasão bacteriana (Saez-Llorenz e McCracken, 1993).

1.1.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico precoce e o tratamento específico imediato podem diminuir de forma significativa as taxas de morbimortalidade, que variam de acordo com o tipo de micro-organismo envolvido, com o estado de imunocompetência e com a presença de complicações associadas. Os sinais clínicos podem ser mínimos ou inespecíficos (Moreira *et al.*, 2004).

O tratamento específico para sepse é o uso de antibacteriano. A escolha daquele que vai ser utilizado deve ser baseada na sensibilidade da bactéria que está causando o quadro séptico. Como a lentidão do resultado das culturas se contrapõe à rápida evolução clínica da sepse - que pode ser fulminante - a escolha do antibacteriano torna-se empírica, baseada na sensibilidade esperada para as bactérias mais frequentes em cada faixa cronológica de apresentação do quadro (Reiter, 2002; Oliveira *et al.*, 2016).

O uso excessivo de antibióticos gera, além dos inconvenientes da exposição aos efeitos colaterais do uso de antimicrobianos, tais como diarreia (Sekirov *et al.*, 2008), desequilíbrio da homeostase e da integridade das defesas intestinais, através da alteração da camada de muco do cólon (Wlodarska, 2011). Há também aumento da translocação bacteriana (Wang *et al.*, 2014), maior risco de seleção de flora bacteriana multirresistente, maior tempo de internação (e consequentemente maiores custos hospitalares), maior número de procedimentos invasivos, além de trazer um nível considerável de estresse aos familiares (Moreira, *et al.*, 2004).

1.2 INFLAMAÇÃO E SEPSE

A fisiopatologia da sepse é caracterizada pelo estímulo excessivo de mediadores pró-inflamatórios e uma variedade de estímulos infecciosos. O entendimento dos principais eventos pró e anti-inflamatórios que induzem a danos teciduais é, sem dúvida, o primeiro passo na tentativa de melhorar o prognóstico da sepse e estabelecer uma terapêutica adequada (Hotchkiss e Karl, 2003). Diversos estudos buscando o entendimento das vias de sinalização celular da resposta a patógenos têm demonstrado avanços na pesquisa contra o desenvolvimento de sepse (Alves *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009).

Os mecanismos de reconhecimento específico, componentes da resposta inata, têm sido caracterizados como uma via de controle da imunidade adquirida. Esses mecanismos são deflagrados por receptores de membrana celular, que, por sua vez, são ativados com o reconhecimento do micro-organismo através de estruturas conservadas, constitutivamente expressas na superfície dos patógenos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Cinel e Dellinger, 2007). Assim, os fatores desencadeadores da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos micro-organismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias Gram-positivas (endotoxinas).

Após interação da bactéria (ou outro micro-organismo) com a célula do hospedeiro, inicia-se uma série de eventos com o objetivo de deter o processo infeccioso. Um dos maiores avanços no entendimento do reconhecimento microbiano pelo sistema imune inato tem sido a identificação de receptores do tipo *Toll* (TLRs), que agem como sensores de alvos moleculares associados a patógenos, reconhecendo e disparando a resposta do hospedeiro (Medzhitov e Janeway, 2000; Creagh e O'Neill, 2006; Opitz *et al.*, 2009).

O reconhecimento do patógeno através da ativação de TLRs leva à secreção de citocinas, cujo papel é importante na fase inicial da resposta imunológica e inflamatória, pois compartilham os sinais intracelulares com receptores, distribuindo informações sobre o tipo de infecção, e assim recrutando células efetivas de defesa para o organismo (Heeg e Dalpke, 2003). E consequentemente dando início a resposta inata, com recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos que são essenciais para a morte do patógeno (Callahan *et al.*, 2001; Vincent e Abraham, 2006; Cinel e Opal, 2009; Nduka e Parrillo, 2009). Uma vez no foco infeccioso, são capazes de engolfar, resultando na formação de vesículas

citoplasmáticas formadas pela fusão dos fagossomas e dos lisossomas (Janeway e Medzhitov, 2002). Ativando uma cascata de resposta do sistema de coagulação e complemento e dos componentes celulares (endotélio e ativação de células do sistema imune) com liberação de inúmeros mediadores como: citocinas, metabólitos do ácido araquidônico, óxido nítrico (NO) e ERO.

Dessa forma, o recrutamento de neutrófilos é um evento chave para o controle do processo infeccioso, visto que o desequilíbrio desse processo pode ser verificado em diferentes patologias onde encontra-se uma redução na quimiotaxia *in vitro*, além da diminuição de migração para o tecido infectado em modelos *in vivo*, resultando no aumento da suscetibilidade do hospedeiro a infecção (Pereira *et al.*, 1987; Mastroianni *et al.*, 1999; Fiuza, 2002).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SEPSE

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, que cumpre funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Porém, a produção excessiva pode conduzir a um desbalanço entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e as defesas antioxidantes, culminando em danos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Shami e Moreira, 2004).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na produção de ERO e as defesas antioxidantes, resultando em prejuízo para o organismo (Sies e Cadenas, 1985; Fedorova *et al.*, 2014). O excesso de espécies reativas ou a redução das defesas antioxidantes propicia a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004). Entre as alterações biológicas importantes estão incluídas modificações de DNA, proteínas e lipídios, como também ativação de diferentes fatores de transcrição, com consequente aumento de citocinas, tanto pró quanto anti-inflamatórias (Birben *et al.*, 2012).

Estudos experimentais e clínicos indicam que a sepse está associada com elevados níveis de ERO, ERN, depleção de antioxidantes e acúmulo de marcadores de estresse oxidativo (Zhang, 2000; Bozza *et al.*, 2013). Isso se deve ao acúmulo de neutrófilos e sua ativação pelos mediadores inflamatórios, que levam à formação de ERO e ERN, como ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio

(H₂O₂), radical hidroxil (OH[•]), ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito (ONOO⁻). Esses radicais também podem interagir entre si, produzindo outros radicais (Hampton *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2000; Szabó *et al.*, 2007).

Todos os eventos descritos a seguir são acarretados pelo papel fundamental dos neutrófilos no controle do foco infeccioso, pois estes iniciam uma potente defesa antimicrobiana onde pode ser dividida em um processo dependente e independente de oxigênio. Mecanismos dependentes de oxigênio envolvem a transformação de oxigênio molecular em uma família de ERO que é liberada nos fagossomos ou no ambiente extracelular (Hampton *et al.*, 1998). A geração de ERO requer o complexo enzimático conhecido como nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (NADPH) oxidase na membrana fagossomal, que transfere elétrons para o NADPH no citoplasma para o oxigênio molecular dentro do fagossomo, iniciando a geração de ERO através de um processo conhecido como *burst* respiratório (Marshall, 2005).

1.4 MICROBIOTA INTESTINAL E SEPSE

Há décadas sabe-se que o intestino humano abriga milhões de bactérias comensais. Porém, apenas os estudos mais recentes é que começaram a revelar a extraordinária complexidade e diversidade da microbiota humana. Este consórcio de bactérias contém dez vezes mais células do que o corpo humano, 100 vezes o número de genes do que o genoma humano e tem a capacidade metabólica do fígado humano (Eckburg *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008).

A colonização dos diversos ecossistemas microbianos estabelecidos no organismo de todos os mamíferos dá-se início imediatamente após o nascimento por um processo de povoamento por micro-organismos exógenos, micro-organismos esses que habitam superfícies corporais ambientalmente mais expostas, tais como: pele, boca, intestino e vagina (Levy *et al.*, 2006; Dethlefsen *et al.*, 2007; Round e Mazmanian, 2009). No início da vida adulta, os seres humanos e outros mamíferos sustentam um dos ecossistemas microbianos mais complexos do planeta, com mais de 100 trilhões de bactérias no intestino distal (Eckburg *et al.*, 2005; Frank e Pace, 2008; Ley *et al.*, 2008).

Bactérias simbióticas, do intestino dos mamíferos, têm sido muito valorizadas pelos benefícios que fornecem ao organismo. Entre os benefícios pode-se destacar as funções de fornecimento de nutrientes essenciais, metabolização de compostos indigeríveis, defesa contra a colonização por patógenos oportunistas e até mesmo a contribuição para

o desenvolvimento da arquitetura intestinal (Hooper e Gordon, 2001; Hooper *et al.*, 2002; Turnbaugh *et al.*, 2007).

Além disso, parece que certas características e funções básicas do sistema imunológico dos mamíferos dependem das interações entre o ser humano e microbioma (Macpherson e Harris, 2004; Seksik *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2007). Ao contrário de agentes patogênicos oportunistas, que desencadeiam respostas imunes resultantes em danos teciduais durante a infecção, algumas espécies bacterianas simbióticas estão sendo associadas na prevenção de doença inflamatória. Portanto, a microbiota tem o potencial para exercer respostas tanto pró quanto anti-inflamatórias, e a composição das comunidades bacterianas no intestino está intimamente ligada ao bom funcionamento do sistema imunitário (Round e Mazmanian, 2009).

1.5 NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO NA SEPSE

Tendo em vista a magnitude da doença, a *Food and Drug Administration* (FDA) reconhece a importância do desenvolvimento de novas opções para tratamento e/ou prevenção da sepse, principalmente na população pediátrica (Regulations Requiring Manufacturers, 2003). Dentre as novas condutas terapêuticas pode-se incluir os simbióticos, micro-organismos já conhecidos pelo seu benefício no restabelecimento do microambiente gastrointestinal e consequente aumento na imunidade dos pacientes (Hord, 2008; Rummel *et al.*, 2009).

1.5.1 Suplementação de Simbióticos

Os probióticos são consumidos como alimentos há muito tempo, afinal são parte constituintes de iogurtes, entretanto apenas no início dos anos 1900 o pesquisador Ilya Mechnikov propôs o uso de micro-organismos vivos para manter a saúde intestinal e prolongar a vida. Atualmente o termo probiótico é usado para descrever micro-organismos dietéticos que são benéficos para a saúde do hospedeiro (Sartor, 2004).

A lista dos benefícios proporcionados pelas bactérias probióticas ainda não está completa, pesquisas estão continuamente descobrindo novos papéis e relacionamentos entre probióticos e hospedeiro (Ley *et al.*, 2006; Arumugam *et al.*, 2011). Várias questões importantes permanecem obscuras com relação ao seu uso como a dose ideal e o tempo de duração do tratamento para condições clínicas e grupos populacionais específicos (Gill, 2003).

Simbióticos são formados por micro-organismos vivos que, quando administrados em doses adequadas, podem trazer benefícios à saúde do hospedeiro. São formados pela associação de um ou mais probióticos com um ou mais prebióticos. Os prebióticos e probióticos tem ações sinérgicas, e acredita-se que associados tenham um efeito potencializado sobre a saúde do hospedeiro (Bengmark e Urbina 2005).

Os probióticos são, por natureza, não patogênicos, resistem ao processamento térmico e à passagem pelo estômago e bile; são capazes de aderir ao epitélio intestinal, colonizar por algum tempo o trato digestivo, produzir substâncias antimicrobianas, inibir o crescimento de agentes patogênicos, modular a resposta imune e influenciar várias atividades metabólicas humanas (assimilação de colesterol, síntese de vitaminas, entre outros) (Joint, 2002).

Os lactobacilos são bactérias predominantes no intestino delgado. Entre suas espécies pode-se citar os *lactobacillus casei*, *lactobacillus rhamnosus*, *lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium bifidum*. Os lactobacilos inibem a proliferação de micro-organismos não benéficos, pela competição com locais de ligação e nutrientes, e produzem ácidos orgânicos, que reduzem o pH intestinal, retardando o crescimento de bactérias patogênicas (Hooper, 2009).

Os prebióticos são definidos pela Organização Mundial de Gastroenterologia (2008) como alimentos não digeríveis pelo hospedeiro e que têm a propriedade de serem fermentados de maneira seletiva no cólon. Têm como função nutrir um grupo seletivo de micro-organismos que povoam o intestino (probióticos), favorecendo mais a multiplicação das bactérias benéficas do que as prejudiciais.

A maioria dos dados da literatura científica sobre efeitos dos prebióticos relaciona-se aos fruto-oligossacarídeos (FOS) e à inulina (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002). Frequentemente, o FOS é encontrado como veículo farmacêutico para os probióticos, em preparações comerciais de simbióticos, objetivando a sobrevivência da bactéria probiótica nas condições adversas do meio gástrico (Park e Flochs, 2007).

A aplicação clínica dos simbióticos tornou-se alvo de interesse em pediatria nos últimos anos. Estudos mostram os efeitos benéficos dos probióticos, nessa população, na gastroenterite infecciosa (Saran *et al.*, 2002; Sazawal *et al.*, 2004), na diarreia associada ao uso de antibióticos (Hayes e Vargas, 2016; Johnston *et al.*, 2016), na enterocolite necrosante (Deshpande *et al.*, 2007; Alfaleh e Anabrees, 2014; Patel e Denning, 2015; Johnson *et al.*, 2016; Nandhini *et al.*, 2016; Vongbhavit e Underwood, 2016), na síndrome do intestino irritável (Baştürk *et al.*, 2016), na esteatose hepática (Famouri *et al.*, 2016).

1.5.2 Transplante Fecal

A composição fecal humana tem sido intensamente estudada desde os anos 70. A matéria orgânica fecal é composta de aproximadamente 75% de água e 25% de matéria sólida, sendo essa formada principalmente por células microbianas, entre elas vírus e bactérias (Stephen e Cummings, 1980; Rose *et al.*, 2015).

O transplante fecal é uma terapêutica em que há transferência direta de material fecal, a partir de um doador saudável, para trato gastrointestinal superior ou inferior de um destinatário. Isso pode ser realizado simplesmente através de infusão nasogástrica, enema ou ainda durante a colonoscopia. Acredita-se que esse mecanismo seja capaz de repovoar o trato intestinal doente com organismos não patogênicos, e assim manipular positivamente o microbioma intestinal do transplantado (Borody *et al.*, 2003; Bakken, 2009).

Os estudos com esse manejo terapêutico em pediatria têm se concentrado na enterocolite necrosante (Underwood, 2016), infecção recorrente por *Clostridium difficile* (Pierog *et al.*, 2015; Kronman, 2015; Lynch, 2015), colite ulcerativa (Suskind *et al.*, 2015) e enterite pseudomembranosa grave (Kelly, 2014; Kellermayer *et al.*, 2015).

1.6 MODELO ANIMAL DE SEPSE

Modelos animais de sepse têm por objetivo mimetizar as alterações bioquímicas e fisiológicas ocorridas no decurso da doença em humanos. Apesar de serem limitados em reproduzir a complexidade humana, ainda consistem no meio mais conveniente para se obter as informações necessárias e assim posteriormente implementar os tratamentos oferecidos aos pacientes (Dyson e Siger, 2009).

Os modelos animais de sepse variam em termos de complexidade e grau de repercussão para a situação clínica. Alguns modelos incluem ligadura e perfuração cecal (CLP). Outros, a administração exógena de toxinas ou bactérias vivas, replicando toxemia e bacteremia. A administração de toxinas, tais como endotoxinas ou o modelo não bacteriano, zimozan, causam uma resposta imune inata irrefutável e com algumas semelhanças à septicemia humana (Buras *et al.*, 2005; Remick e Ward, 2005).

O lipopolissacarídeo (LPS), produz um modelo de endotoxemia, ele é um componente abundante na parede celular externa de bactérias Gram-negativas (Opal, 1999). Embora não seja potencialmente tóxico, a endotoxina inicia as defesas imunitárias inatas, por interação com os

receptores de CD14 e de *Toll-like-4*, um processo que inicia a sinalização celular e transcrição de genes inflamatórios (Vincent e Abraham, 2006). Os receptores *Toll-like* têm sido citados por representar a interface entre os mamíferos e as bactérias (Marshall, 2003). Por conseguinte, a administração de endotoxina a animais ou seres humanos resulta em anormalidades hemodinâmicas e bioquímicas semelhantes às observadas na sepse (Gellerich *et al.*, 2002; Schinkel *et al.*, 2005).

Há estudos mostrando a importância do LPS como fator desencadeador da sepse. Em humanos saudáveis, após a sua administração houve reprodução de alterações hemodinâmicas observadas em pacientes com sepse e em modelos experimentais sendo provavelmente a estrutura com maior atividade imunoestimulatória entre os componentes de bactérias, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina -12 (IL-12) e substâncias inflamatórias efetoras como o NO (Sufradini *et al.*, 1989).

Alguns autores têm concentrado suas pesquisas em modelos animais pediátricos de endotoxemia através da administração de LPS. Markley e colaboradores (2002) determinaram os efeitos da glutamina sobre os hepatócitos na endotoxemia neonatal. Premer e colaboradores (2002) avaliaram a proteólise muscular e a perda de peso em modelo de sepse neonatal pela administração de LPS. Outro estudo avaliou apoptose intestinal em sepse em modelo animal infantil, também através da administração de LPS (Ozdemir *et al.*, 2012). Ainda em modelo pediátrico, Garret e colaboradores (2009) avaliaram o uso de glutamina na inflamação induzida pela endotoxemia em modelo animal de rato pediátrico.

Já o zimosan é um glicopolissacarídeo localizado na parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, indutor de estímulos não bacterianos e não endotóxicos, através do receptor Toll-like-2, liberando enzimas lisossomais, citocinas, ERO e respostas, como as observadas na sepse. Através de mecanismos múltiplos, incluindo ativação da via alternativa do sistema complemento, degranulação de mastócitos e estimulação de macrófagos e neutrófilos há a liberação de mediadores inflamatórios (Tadimeti *et al.*, 1994; Ajuebor *et al.*, 1998; Coates e McColl, 2001; Kolaczowska *et al.*, 2001). Como consequência, provoca uma resposta inflamatória sistêmica (Volman *et al.*, 2005). Em adição, quando suspenso e administrado em óleo mineral, produz uma peritonite prolongada (Minnaard *et al.*, 2005). Esse modelo tem se mostrado útil para avaliar as alterações ocorridas no decorrer da doença crítica, e assim

possibilitar aos pesquisadores testar terapias alternativas (Hill *et al.*, 2005).

A hipótese principal deste estudo é que a suplementação com simbióticos induzirão uma ação imunomoduladora na endotoxemia, podendo ser um adicional ao tratamento farmacológico na sepse pediátrica.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da suplementação de simbióticos sobre parâmetros inflamatórios e marcadores de dano oxidativo em modelo animal de sepse pediátrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qual melhor tempo de tratamento profilático com simbióticos antes do insulto endotoxêmico;
- Avaliar o dano oxidativo sistêmico (pulmão, rim e cérebro) e local (intestino delgado) em animais suplementados com probióticos, prebiótico ou simbiótico em modelo animal de endotoxemia;
- Avaliar parâmetros de resposta inflamatória MPO, IL-1, IL-6 e TNF- α sistêmico (pulmão, rim e cérebro) e local (intestino delgado) em animais suplementados com probióticos, prebiótico ou simbiótico em modelo animal de endotoxemia;
- Avaliar qual (ais) cepa (s) probióticas tem maior impacto na proteção dos danos ocasionados pela endotoxemia, e se a administração de simbióticos potencializa essa ação protetora;
- Determinar o papel da microbiota intestinal em modelo de endotoxemia induzida pela administração de LPS através da técnica de transplante fecal;
- Determinar o papel da microbiota intestinal em modelo de inflamação estéril induzida pela administração de zimosan através da técnica de transplante fecal.

3 METODOLOGIA

Deve-se ressaltar que todos os animais receberam cuidados de acordo com os “Princípios de Cuidados para Animais de Laboratório” formulado pela Sociedade Nacional para Pesquisas Médicas aprovados pelo Conselho da Sociedade Americana de Fisiologia, e todo o projeto foi executado dentro das normas estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) para pesquisas utilizando animais. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade antes de sua execução, sob os números: 16/2014; 58/2015-2 e 048/2016-2 (Anexo).

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* de ambos os sexos, com sete dias de vida, pesando aproximadamente entre 10 e 15g, acondicionados em gaiola com suas progenitoras e juntamente com todos os animais provenientes da mesma ninhada, procedentes da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais permaneceram em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (6h às 18h), com livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Como critérios de exclusão do experimento, foram descartados todos os animais que apresentaram sinais de morte iminente, como dispersão da ninhada e ausência de leite no estômago, pois esses sintomas indicam que o filhote é incapaz de se alimentar e obter calor materno, o que acarretaria a sua morte em poucas horas.

No primeiro experimento foram utilizados, adicionalmente, ratos *Wistar* de sexo masculino, com 22 dias de vida, pesando entre 20 e 25 gramas, acondicionados em gaiola em número de cinco animais por caixa, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais permaneceram em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (6h às 18h), livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2 MODELO ANIMAL DE ENDOTOXEMIA PELA ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*

O modelo adotado no estudo foi o de indução de endotoxemia pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich St. Louis, MO # L2630). Antes da aplicação o

abdômen dos animais sofreu assepsia com etanol a 70%. Os animais receberam 15mg/Kg de LPS diluídos em 0,1ml de água para injeção (soro fisiológico) administrados por via intraperitoneal. Os animais *sham* de mesma idade receberam um volume idêntico de soro fisiológico e foram mantidos sob as mesmas condições.

3.3 MODELO ANIMAL DE INFLAMAÇÃO ESTÉRIL PELA ADMINISTRAÇÃO DE ZIMOSAN A DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Foi utilizado o modelo de indução de inflamação estéril pela administração intraperitoneal de zimosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sigma-Aldrich St. Louis, MO # Z4250*). Antes da aplicação o abdômen dos animais sofreu assepsia com etanol a 70%. Os animais receberam a administração intraperitoneal de 30mg/Kg de zimosan diluídos em 0,1ml de óleo mineral. Os animais *sham* de mesma idade receberam um volume idêntico de óleo mineral e foram mantidos sob as mesmas condições. Esse modelo foi proposto por Hill e colaboradores (2015) e adaptado ao nosso laboratório.

3.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

Para avaliarmos a permeabilidade intestinal dos animais submetidos ao protocolo de indução de endotoxemia pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO # L2630*), seis horas após a administração intraperitoneal de 15mg/Kg de LPS os animais foram anestesiados conforme protocolo do laboratório. Em seguida, aplicamos 5mg fluoresceína (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO # 46960*) diluído em 100 microlitros de salina tamponada diretamente no íleo distal desses animais.

Trinta minutos após a administração de fluoresceína o sangue foi retirado para análise. Imediatamente após a retirada do sangue este foi centrifugado por cinco minutos a 5000 rpm. Uma curva padrão foi obtida a partir de uma diluição seriada de concentrações (partindo de 10g/ml de fluoresceína em PBS), sendo o último apenas PBS. A fluoresceína plasmática foi mensurada através de fluorescência no equipamento *SpectraMax* (Molecular Devices) com emissão 460nm excitação 515nm.

3.5 SUPLEMENTAÇÃO DE SIMBIÓTICOS

O protocolo de suplementação teve início quando os animais atingiram o sétimo dia de vida. Os animais foram divididos em grupos conforme a suplementação correspondente. Os probióticos foram administrados na concentração de 10^9 UFC (unidades formadoras de colônia) diluídos em 200 µl de água, administrados através de gavagem oral, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos.

O prebiótico frutooligossacarídeo (FOS) também foi administrado por via oral aos animais, uma vez ao dia, na dosagem de 20 mg de FOS diluídos em 200 µl de água, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos. As cepas utilizadas de probióticos foram *Lactobacillus acidophilus* (THT SA- Bélgica), *Lactobacillus rhamnosus* (THT SA - Bélgica), *Lactobacillus casei* (THT SA- Bélgica) e *Bifidobacterium bifidum* (THT SA - Bélgica). Cada animal recebeu os probióticos e ou prebiótico isolados ou associados (nesse caso, denominados de simbióticos).

Para a administração de simbióticos foram utilizadas as mesmas cepas, usadas isoladamente, e o FOS, nas mesmas concentrações, diluídos em 200 µl de água, administrados por gavagem oral, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos. Os animais dos grupos controle receberam água em dose e volume equivalente.

3.6 TRANSPLANTE FECAL

Imediatamente após a morte dos animais, as fezes dos animais doadores foram retiradas comprimindo o conteúdo intestinal (intestino delgado e grosso). Posteriormente, foram homogeneizadas em PBS, para cada 1 g de fezes foi usado para diluição 10 ml de PBS estéril. Após diluição, o preparado foi centrifugado por 30 segundos a 3000 r.p.m. O valor de densidade óptica do sobrenadante foi checado através do equipamento *SpectraMax* (Molecular Devices) com absorvância 625 nm, para identificar a concentração de bactérias por mL, sabendo por estudos anteriores que $DO=0,5$ equivale a 10^8 células.

Após confirmação da concentração de bactérias no preparado de fezes, ele foi novamente centrifugado, dessa vez por 5 min a 12.000 r.p.m, gerando um sedimento o qual foi homogeneizado em 1 ml de PBS e administrado ao rato uma única vez por gavagem oral. Esse método foi desenvolvido por Li Ming *et al* (2015) e adaptado para nosso laboratório.

3.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESCALA TEMPORAL

Para melhor compreensão dos experimentos realizados, segue abaixo um detalhamento dos grupos e das escalas temporais dos experimentos.

3.7.1 Experimento I - Escolha do Tempo de Tratamento Profilático

Para determinar qual o melhor tempo de tratamento profilático com simbióticos na endotoxemia foram utilizados seis grupos, cada um contendo cinco animais. Conforme descrito abaixo.

- Grupo 1 – *Sham* + Simbióticos - 7 dias
- Grupo 2 – LPS + Água - 7 dias
- Grupo 3 – LPS + Simbióticos - 7 dias
- Grupo 4 – *Sham* + Simbióticos - 15 dias
- Grupo 5 – LPS + Água - 15 dias
- Grupo 6 – LPS + Simbióticos - 15 dias

No 15^o dia de vida os animais começaram receber diariamente uma dose de simbióticos ou água conforme detalhado anteriormente. No 22^o dia de vida, antes da suplementação os animais foram pesados e a quantidade de LPS determinada de acordo com o peso média dos animais do experimento. Logo após a última dose de suplementação de simbióticos os animais receberam LPS nas dosagens especificadas anteriormente. Doze horas após a administração de LPS os animais foram mortos e as estruturas de interesse retiradas para posterior análise.

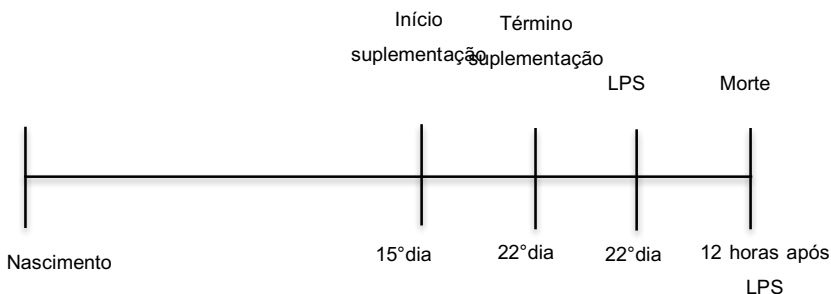


Figura 1 - Escala temporal do tratamento de 7 dias do experimento I

No sétimo dia de vida os animais começaram a receber diariamente uma dose de simbióticos ou água conforme detalhado anteriormente. No 22º dia, antes da suplementação os animais foram pesados e a quantidade de LPS determinada de acordo com o peso médio dos animais do experimento. Logo após a última dose de suplementação de simbióticos os animais receberam LPS nas dosagens especificadas anteriormente. Doze horas após a administração de LPS os animais foram mortos e as estruturas de interesse retiradas para posterior análise.

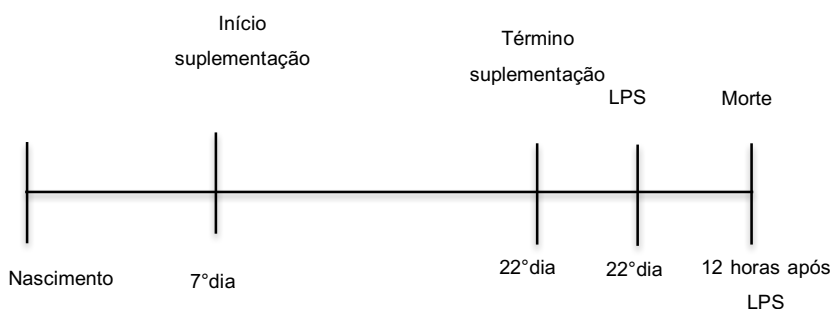


Figura 2 - Escala temporal do tratamento de 15 dias do experimento I

3.7.2 Experimento II - Probióticos X Prebióticos X Simbióticos

Para comparar, entre os suplementos testados, qual ou quais teriam o melhor efeito terapêutico na endotoxemia, utilizamos 14 grupos, cada um contendo de cinco a sete animais. Conforme descrito abaixo.

- Grupo 1 – Sham + água
- Grupo 2 – Sham + *lactobacillus acidophilus*
- Grupo 3 – Sham + *lactobacillus rhamnosus*
- Grupo 4 – Sham + *lactobacillus casei*
- Grupo 5 – Sham + *bifidobacterium bifidum*
- Grupo 6 – Sham + prebiótico
- Grupo 7 - Sham + simbióticos
- Grupo 8 – LPS + água
- Grupo 9 – LPS + *lactobacillus acidophilus*
- Grupo 10 – LPS + *lactobacillus rhamnosus*
- Grupo 11 – LPS + *lactobacillus casei*

- Grupo 12 – LPS + *bifidobacterium bifidum*
- Grupo 13 – LPS + prebiótico
- Grupo 14 - LPS + simbióticos

No sétimo dia de vida os animais começaram a receber diariamente uma dose de probióticos, prebióticos, simbióticos ou água, conforme o grupo. No 22º dia antes da suplementação os animais foram pesados e a quantidade de LPS determinada de acordo com o peso médio dos animais desse experimento. Logo após a última dose de suplementação os animais receberam LPS nas dosagens especificadas anteriormente. Doze horas após a administração de LPS os animais foram mortos e as estruturas de interesse retiradas para posterior análise.

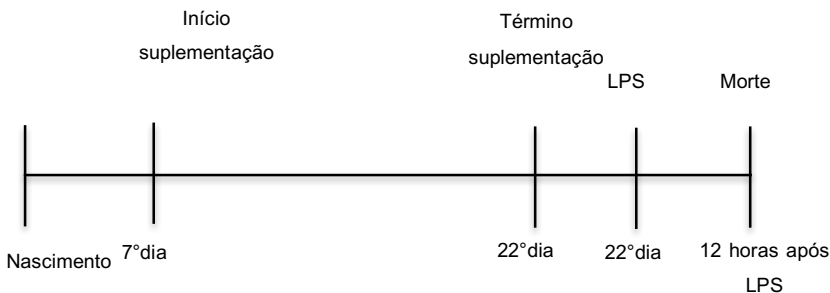


Figura 3 - Escala temporal experimento II

3.7.3 Experimento III - Transplante Fecal

Para avaliar o papel da microbiota intestinal nos efeitos da suplementação com probióticos, utilizamos 12 grupos, cada um contendo de oito a dez animais. Conforme descrito abaixo.

- ◆ Grupo 1 - Suplementação controle com água
- ◆ Grupo 2 - Suplementação com *lactobacillus casei*
- ◆ Grupo 3 - Suplementação com *lactobacillus rhamosus*
- Grupo 4 – *Sham*
- Grupo 5 – Controle LPS

- Grupo 6 –LPS + transplante controle
- Grupo 7 – LPS + transplante *lactobacillus casei*
- Grupo 8 – LPS + transplante *lactobacillus rhamnosus*
- Grupo 9 - Controle zimosan
- Grupo 10 - zimosan + transplante controle
- Grupo 11 – zimosan + transplante *lactobacillus casei*
- Grupo 12 – zimosan + transplante *lactobacillus*

rhamnosus

Para um melhor entendimento desse experimento, ele será detalhado em duas escalas temporais. Na primeira parte foi realizado o protocolo de suplementação de probióticos, igual aos experimentos anteriores. No sétimo dia de vida os animais começaram a receber diariamente uma dose de probióticos *lactobacillus casei* ou *lactobacillus rhamnosus* ou água (controle), conforme grupo e nas quantidades já descritas anteriormente, a suplementação foi feita por 15 dias consecutivos. No 22º dia os animais foram mortos e suas fezes retiradas para o preparado de fezes utilizado no transplante fecal.

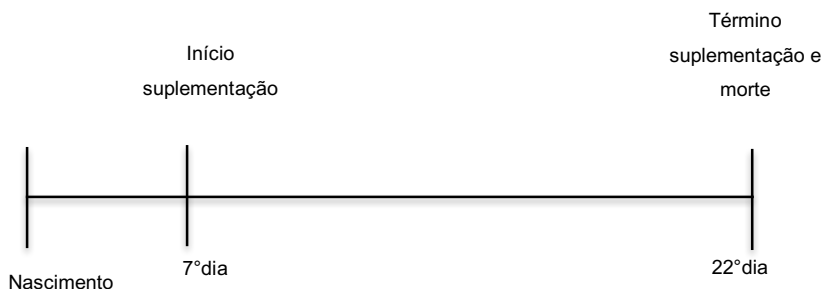


Figura 4 - Escala temporal da primeira etapa do experimento III

Na segunda parte desse mesmo experimento o preparado de fezes (transplante fecal) foi administrado aos animais quando esses completaram 21 dias de vida. Cada um recebeu o transplante conforme seu grupo. Oito horas após receber o transplante fecal os animais receberam uma dose de LPS ou zimosan, nas dosagens citadas acima.

Após 24 horas de administração de LPS ou zimosan os animais foram mortos e as estruturas de interesse retiradas.

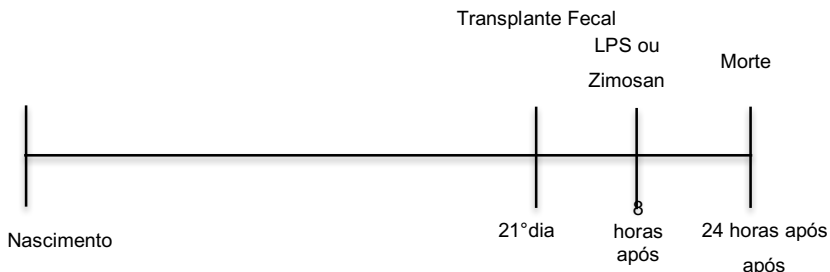


Figura 5 - Escala temporal da segunda etapa do experimento III

3.8 ANÁLISES LABORATORIAIS

Para avaliação dos danos ocasionados sistemicamente após a indução de endotoxemia ou inflamação estéril, e se o uso de simbióticos ou transplante fecal reverteriam ou atenuariam esses danos, avaliou-se as seguintes estruturas: soro, cérebro, rim, pulmão, intestino.

3.8.1 Resposta Inflamatória

3.8.1.1 Atividade de mieloperoxidase - MPO

Os infiltrados de neutrófilos nos tecidos foram avaliados pela atividade de MPO. Os tecidos foram homogeneizados (50 mg / ml) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugou-se a 15000 rpm durante 40 min. A suspensão foi então sonicada três vezes durante 30 s. Uma alíquota de sobrenadante foi misturada com uma solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e 1 mM de H₂O₂. A atividade foi medida espectrofotometricamente como a variação de absorvância a 650 nm a 37 ° C. Os dados foram expressos como mU por mg de proteína (De Young *et al.*, 1989).

3.8.1.2 Citocinas pró-inflamatórias

Citocinas pró-inflamatórias foram determinadas com o uso de kits comerciais (Peprotech® e Life Technologies®) por meio de amostras das estruturas de interesse, homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Anticorpos de captura (13 mL, contendo 0,1% de azida sódica) foram diluídos em PBS, adicionados em cada poço da placa e incubados *overnight*, na temperatura de 4°C. Após esse período, os poços foram lavados por quatro vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, USA) em PBS, pH 7,2). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio e incubadas por quatro horas em temperatura ambiente. Após o término da incubação os poços foram novamente lavados, conforme descrito anteriormente.

Após as lavagens, 100 µL de amostras e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1% de BSA em PBS, pH 7,2) foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight* (a 4°C). Após esse período, os poços foram lavados e adicionados 100 µL dos anticorpos de detecção TNF- α , IL-1 e IL-6, previamente diluídos em solução padrão de diluição.

As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo de lavagem 100 µL do polímero esptreptavidina peroxidase (1:250, Sigma, St Louis, MO, USA) foram adicionados aos poços, sendo as placas cobertas por papel alumínio e incubadas durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com o tampão de lavagem e 100 µL da solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma, St Louis, MO, USA) foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente, evitando contato direto com a luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de ácido clorídrico 2N (HCl, Vetec) sobre os poços, reação esta caracterizada por mudança de coloração azulada para amarelada. Imediatamente após as placas foram lidas em espectrofotômetro, utilizando filtro de 450 nm.

3.8.2 Dano oxidativo

3.8.2.1 Preparação do tecido e homogenado

Amostras de tecidos renal, pulmonar, intestinal, cerebral foram homogeneizados (1:10, w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM base Trizma, 50 UI/mL de heparina). Os homogenados foram centrifugados a 800 x g durante 10 min. a 4°C. Os sobrenadantes foram mantidos a - 80°C. O intervalo máximo entre a

preparação do homogenado e a análise enzimática foi sempre inferior a cinco dias. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951).

3.8.2.2 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Esterbauer e Cheeseman 1990). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3 -tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida foram agitados. A mistura da reação foi incubada a 90^oC durante 20 min. e posteriormente as amostras foram colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalentes malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

3.8.2.3 Formação de proteínas carbonil

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil. O conteúdo de proteínas carboniladas foi medido nas amostras homogeneizadas utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em um ensaio espectrofotométrico (Levine *et al.*, 1990). As amostras foram sonicadas e homogeneização gelada de tampão contendo inibidores de fosfatase e de protease (200 nM calcicolina, 10µg/ml de leupeptina, 2µg/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 µM microcistina-LR) centrifugada a 1000 x g durante 15 min para sedimentar o material insolúvel. Trezentos microlitros de alíquotas do sobrenadante contendo 0,7-1,5 mg de proteínas foram tratadas com 300µL de 10mM de DNPH, dissolvido em HCL sozinho (reagente branco). Em seguida as amostras foram incubadas.

3.8.2.4 Nível de nitrito/nitrato

Como indicativo de nível de óxido nítrico, a concentração de nitrito/nitrato no liquor foi mensurada utilizando a reação de Griess, por adição de 100 µL de reagente de Griess [0,1% (w/v) em H₂O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de H₃PO₄ concentrado, vol. [1:1] para a 100 µl da amostra (Green *et al.*, 1982). A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada em leitor de microplaca em 550 nm com resultados expressos em nmol/mg proteína.

3.8.3 Cultura de linfonodo mesentérico

Os linfonodos mesentéricos foram removidos assepticamente e inoculados em meio BBL Trypticase Soy Broth com 0,15% de agar (Becton e Dickinson - EUA). As amostras foram divididas e incubadas anaerobicamente ou aerobicamente em temperatura controlada de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. O crescimento bacteriano foi determinado pela presença de turbidez no meio.

3.8.4 Análise histológica

Imediatamente após a morte dos animais amostras do cérebro, intestino delgado, rim e pulmão foram fixadas em formalina 10% durante 48 horas. As peças foram então clivadas em posição conforme o tecido, em aproximadamente 3mm de espessura. Permaneceram em formalina por mais 48 horas. Os tecidos foram processados por 50 minutos em uma bateria contínua de desidratação em álcool com concentração crescente, após os tecidos foram clarificados em xilol até serem infiltrados em parafina líquida e incluídos em moldes específicos. Após o corte dos blocos de parafina em micrótomo, com espessura de 4 μm , as lâminas foram confeccionadas e coradas em hematoxilina de Harris e Eosina, onde passaram por uma bateria de desparafinização com xilol, hidratação do tecido através de uma bateria alcoólica em concentração decrescente, coloração com hematoxilina e eosina, na sequência nova desidratação do tecido com concentrações crescentes de álcool seguido de clarificação em xilol e posterior selagem das lâminas.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc.) foi utilizado nas análises estatísticas. Em todos os experimentos os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer. Exceto na cultura de linfonodos mesentéricos, onde usamos o teste de qui-quadrado de Pearson, e na avaliação da permeabilidade intestinal, onde usamos teste T. Em todos os experimentos um $p \leq 0.05$ foi considerado significativo. Dados estão apresentados como média \pm desvio padrão, exceto para a cultura de linfonodos mesentéricos, onde estes foram expressos como frequência absoluta e relativa de turbidez do meio.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I

Para determinação do melhor tempo de tratamento profilático dos simbióticos, objetivando um efeito mais abrangente e benéfico nos parâmetros de avaliação de danos oxidativos e inflamação, foram determinados dois tempos diferentes, um tratamento por sete dias e outro por 15 dias consecutivos.

4.1.1 Efeitos do tratamento por sete dias com simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS

Avaliou-se o marcador de dano oxidativo TBARS de animais suplementados com simbióticos por sete dias consecutivos nas estruturas cerebral (Fig. 6A), renal (Fig. 6B), pulmonar (Fig. 6C) e intestinal (Fig. 6D). Em todas as estruturas foi observado um aumento significativo desse marcador nos grupos submetidos ao protocolo de indução de endotoxemia através da administração de LPS. A administração de simbióticos teve redução significativa nesse marcador apenas no rim (Fig. 6B) e pulmão dos animais (Fig. 6C).

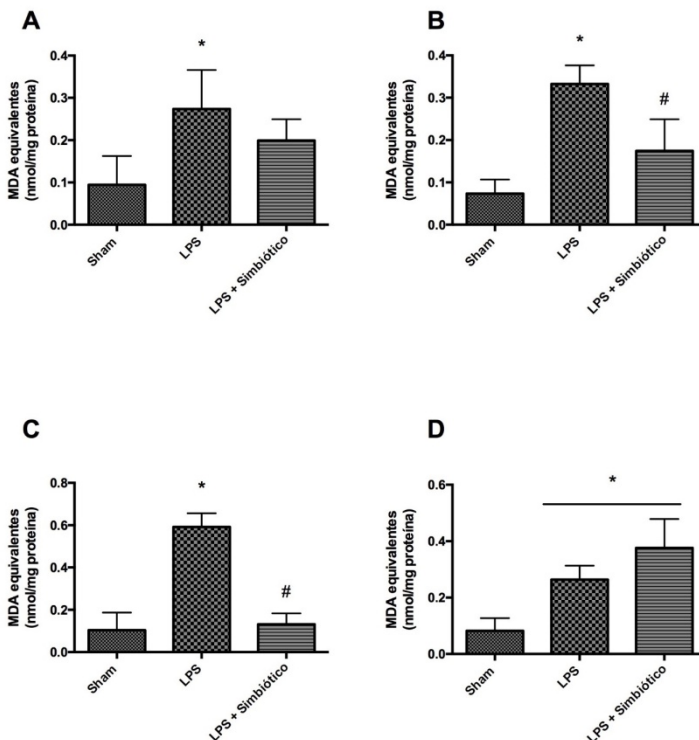


Figura 6 - Efeito da administração de simbióticos por sete dias, em marcador de dano oxidativo TBARS, em cérebro (A), rim (B), pulmão (C) e intestino (D), doze horas após os animais serem submetidos à endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de Sham, # Diferente de LPS. (A) $p=0,0261$; (B) $p=0,0010$; (C) $p<0,0001$ e (D) $p=0,0008$.

4.1.2 Efeitos do tratamento por sete dias com simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS

Também foram mensurados os efeitos do tratamento com simbióticos por sete dias consecutivos na inflamação sistêmica de cérebro dos animais submetidos à endotoxemia (Fig. 7). Os resultados mostram um aumento significativo nos marcadores de inflamação avaliados, MPO (Fig. 7A), IL-1 (Fig. 7B), IL-6 (Fig. 7C) e TNF- α (Fig. 7D), nos animais submetidos à endotoxemia. Apenas no marcador inflamatório IL-6 (Fig. 7C) foi observada uma redução significativa no grupo suplementado com simbióticos por sete dias.

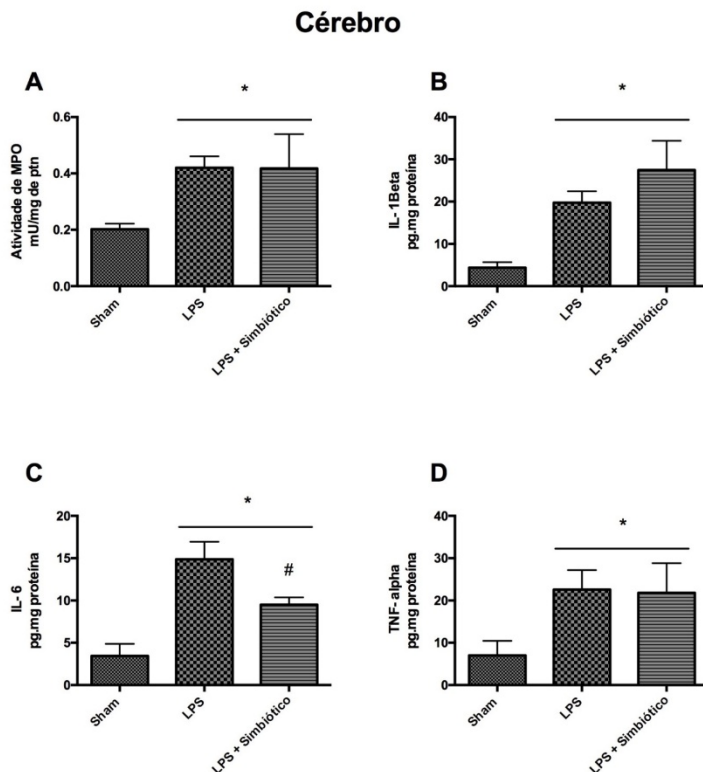


Figura 7 - Efeitos da administração de simbióticos por sete dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos à endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de Sham, # Diferente de LPS. (A) $p=0,00,92$; (B) $p=0,0017$; (C) $p<0,0001$ e (D) $p=0,0028$.

O tecido renal (Fig. 8) também foi alvo do presente estudo. Com relação aos efeitos do tratamento por sete dias com simbióticos, na inflamação, os resultados mostram um aumento significativo nos marcadores de inflamação avaliados, MPO (Fig. 8A), IL-1 (Fig. 8B), IL-6 (Fig. 8C) e TNF- α (Fig. 8D), nos animais submetidos à endotoxemia. Entretanto, quando avaliado o potencial de redução, dos simbióticos, sobre os parâmetros inflamatórios, efeitos significativos nas citocinas IL-1 (Fig. 8B), IL-6 (Fig. 8C) e TNF- α (Fig. 8D) são observados, porém, os níveis de MPO (Fig. 8A) não acompanharam essa redução.

Rim

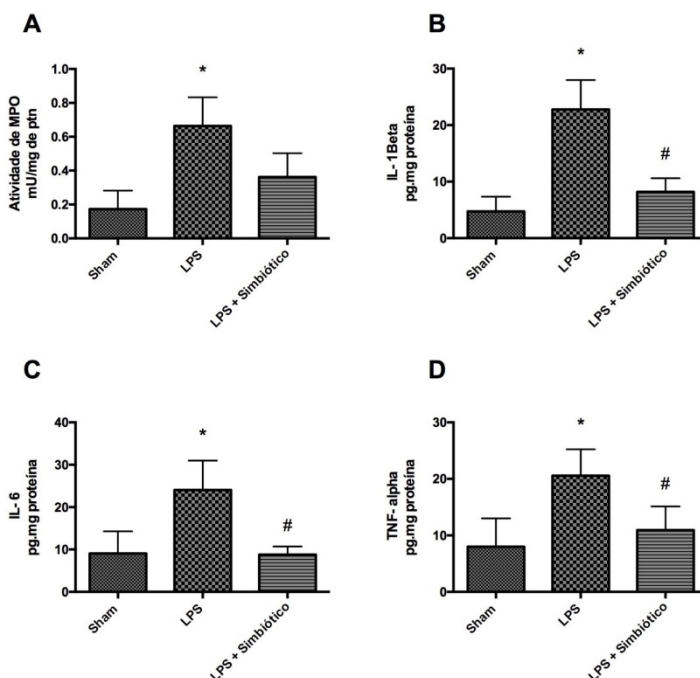


Figura 8 - Efeitos da administração de simbióticos por sete dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em rim de animais submetidos à endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de Sham, # Diferente de LPS. (A) $p=0,0035$; (B) $p=0,0020$; (C) $p=0,0029$ e (D) $p=0,0157$.

Avaliou-se o tecido pulmonar (Fig. 9) após administração de LPS. Como esperado, um aumento significativo nos marcadores de inflamação MPO (Fig. 9A), IL-1 (Fig. 9B), IL-6 (Fig. 9C) e TNF- α (Fig. 9D) foi observado. Nessa estrutura, os simbióticos foram capazes de reverter os danos inflamatórios nos marcadores IL-1 (Fig. 9B), IL-6 (Fig. 9C) e TNF- α (Fig. 9D), já nos níveis de MPO (Fig. 9A) não demonstraram redução com a administração de simbióticos.

Pulmão

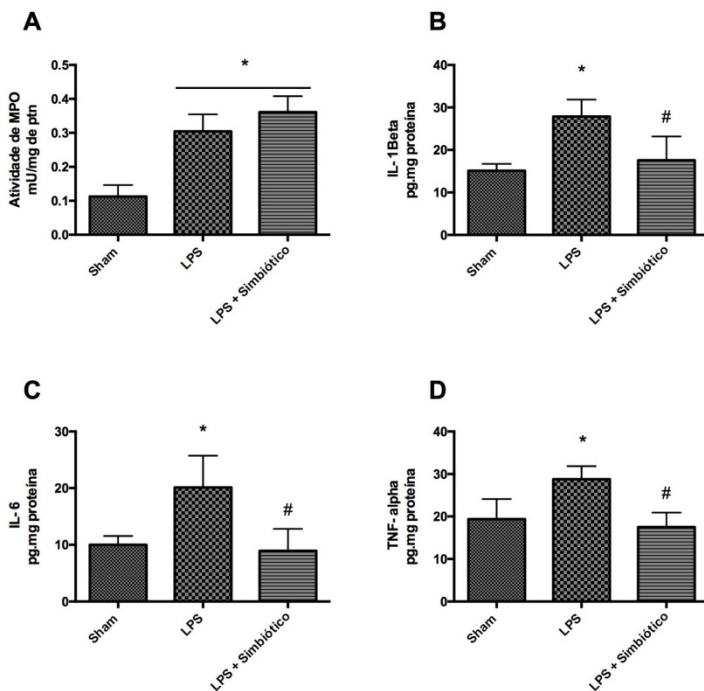


Figura 9 - Efeitos da administração de simbióticos por 7 dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em pulmão de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo. *Diferente de *Sham*, # Diferente de LPS. (A) $p=0,0011$; (B) $p=0,0020$; (C) $p=0,0122$ e (D) $p=0,0050$.

O tecido intestinal também foi alvo do presente estudo (Fig. 10), houve um aumento significativo nos parâmetros inflamatórios, após administração de LPS. Curiosamente, nessa estrutura, os simbióticos foram capazes de reverter apenas os marcadores de MPO (Fig. 10A).

Intestino

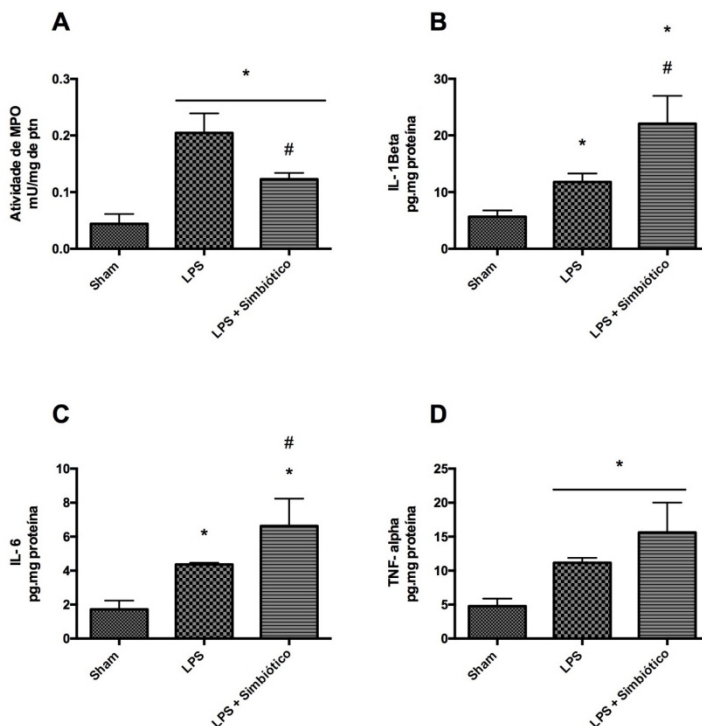


Figura 10 - Efeitos da administração de simbióticos por sete dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de *Sham*, # Diferente de LPS. (A) $p=0,0004$; (B) $p=0,0001$; (C) $p=0,0008$ e (D) $p=0,0009$.

4.1.3 Efeitos do tratamento por 15 dias com simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS

Os níveis de TBARS, na estrutura cerebral (Fig. 11A), renal (Fig. 11B), pulmonar (Fig. 11C) e intestinal (Fig. 11D) foram avaliados. Como esperado, os níveis desse marcador mostraram-se significativamente elevados, no grupo LPS, em todas as estruturas analisadas. O tratamento por 15 dias com simbióticos mostrou-se eficiente na redução desse parâmetro de dano oxidativo, em todas as estruturas analisadas, com exceção do cérebro.

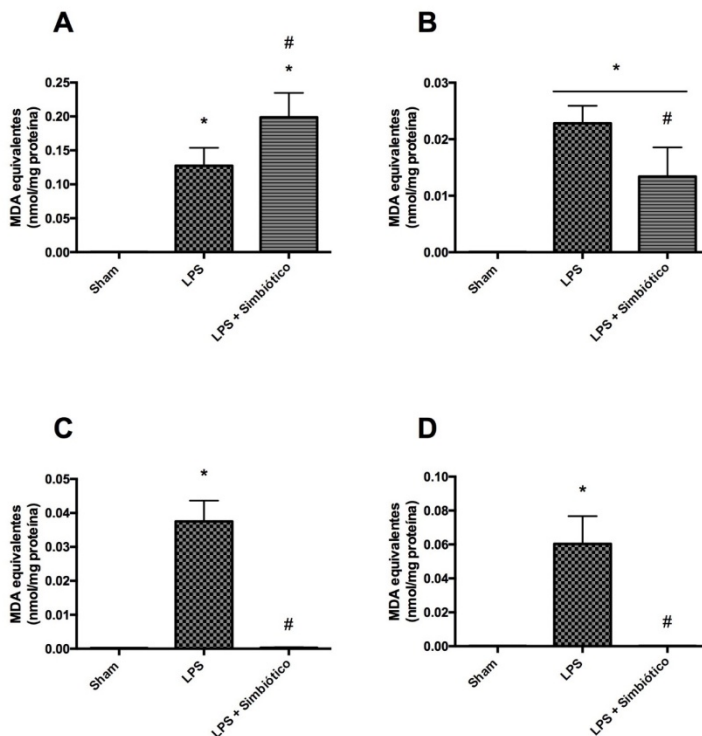


Figura 11 - Efeitos da administração de simbióticos por 15 dias, no marcador de dano oxidativo TBARS, em cérebro (A), rim (B), pulmão (C) e intestino (D) de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de *Sham*, # Diferente de LPS; $p < 0.001$.

4.1.4 Efeitos do tratamento 15 dias com simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS

No tecido cerebral dos animais (Fig. 12) observa-se um aumento significativo nos parâmetros inflamatórios MPO (Fig. 12A), IL-1 (Fig. 12B), IL-6 (Fig. 12C) e TNF- α (Fig. 12D) após indução da endotoxemia. Todavia, após o uso de simbióticos por 15 dias consecutivos há uma redução significativa em todos os marcadores.

Cérebro

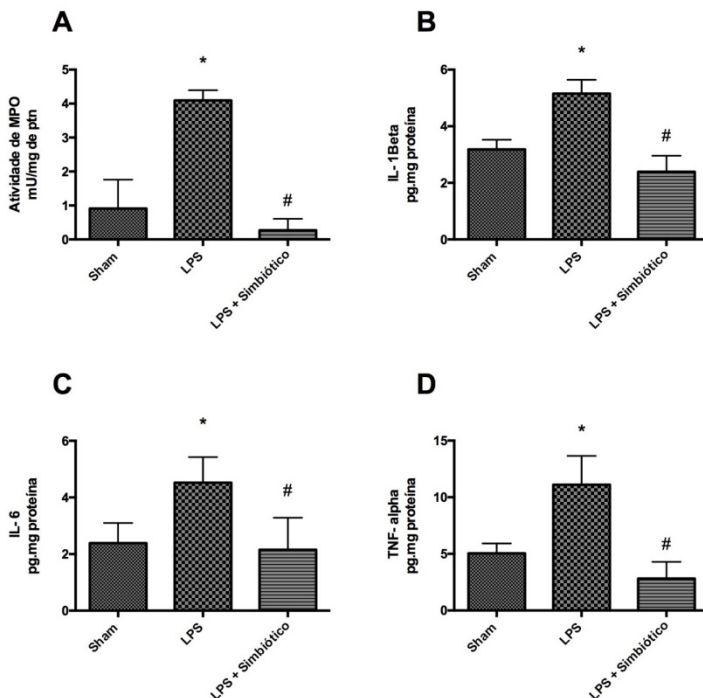


Figura 12 - Efeitos da administração de simbióticos por 15 dias, em marcador de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de *Sham*, # Diferente de LPS. (A) $p < 0.0001$; (B) $p = 0,0001$; (C) $p = 0,0217$ e (D) $p = 0,0007$.

Na estrutura renal dos animais avaliados (Fig. 13) houve um aumento significativo, como esperado, nos parâmetros inflamatórios, MPO (Fig. 13A), IL-1 (Fig. 13B), IL-6 (Fig. 13C) e TNF- α (Fig. 13D), após indução da endotoxemia. Porém, após a administração por 15 dias consecutivos de simbióticos é observada uma redução nos parâmetros avaliados, com exceção do TNF- α (Fig. 13D).

Rim

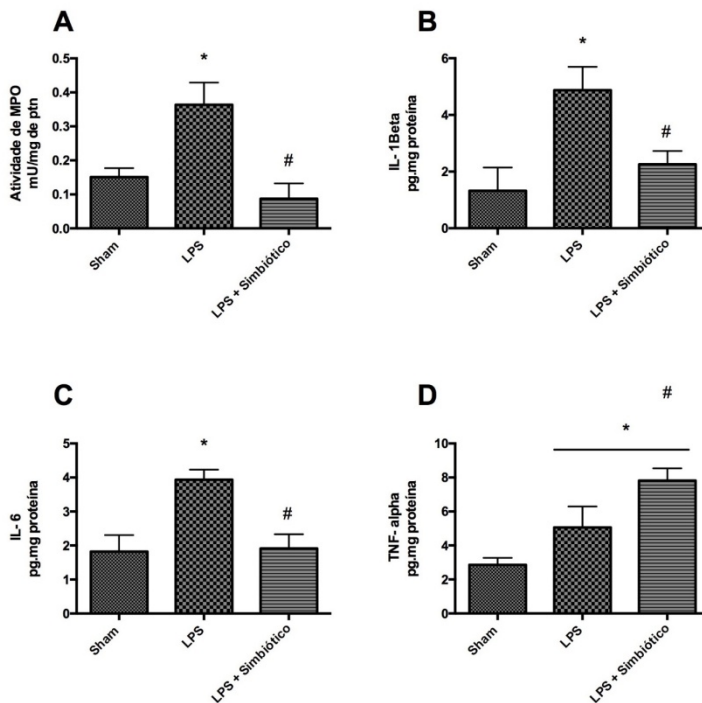


Figura 13 - Efeitos da administração de simbióticos por 15 dias, em marcador de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de Sham, # Diferente de LPS. (A) $p < 0.0001$; (B) $p = 0,0001$; (C) $p = 0,0217$ e (D) $p = 0,0007$.

Na estrutura pulmonar (Fig. 14), e assim como nas demais, houve aumento significativo nos parâmetros inflamatórios estudados, MPO (Fig. 14A), IL-1 (Fig. 14B), IL-6 (Fig. 14C) e TNF- α (Fig. 14D), após administração de LPS. Parâmetros esses que foram reduzidos, com exceção do TNF- α (Fig. 14D), após administração de simbióticos.

Pulmão

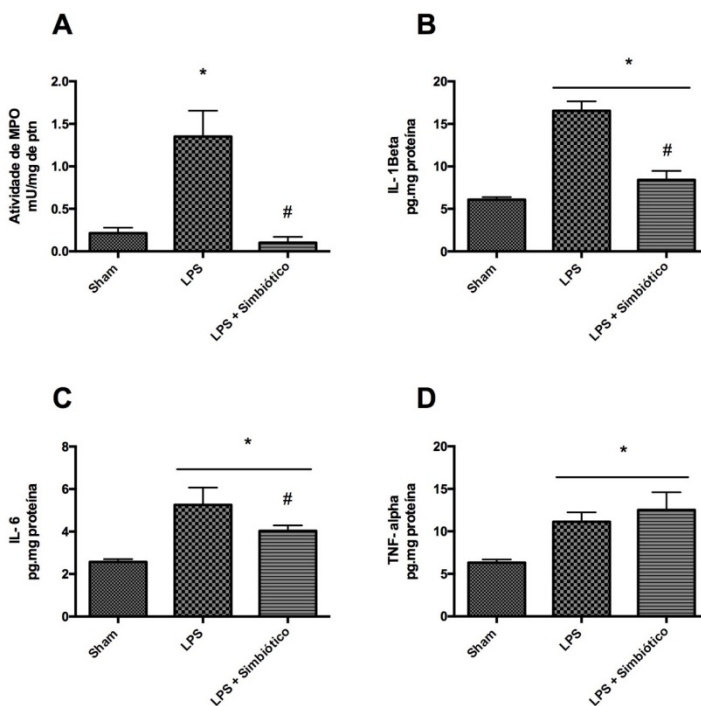


Figura 14 - Efeitos da administração de simbióticos por 15 dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em pulmão de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de Sham, # Diferente de LPS. (A) $p=0,0003$; (B) e (D) $p<0,0001$ e (C) $p=0,0001$.

O tecido intestinal também foi foco deste estudo. Assim como as demais estruturas, houve um aumento significativo nos parâmetros inflamatórios, MPO (Fig. 15A), IL-1 (Fig. 15B), IL-6 (Fig. 15C) e TNF— α (Fig. 15D), após a administração de LPS. Esse aumento foi revertido após administração de simbióticos em todos os parâmetros inflamatórios avaliados.

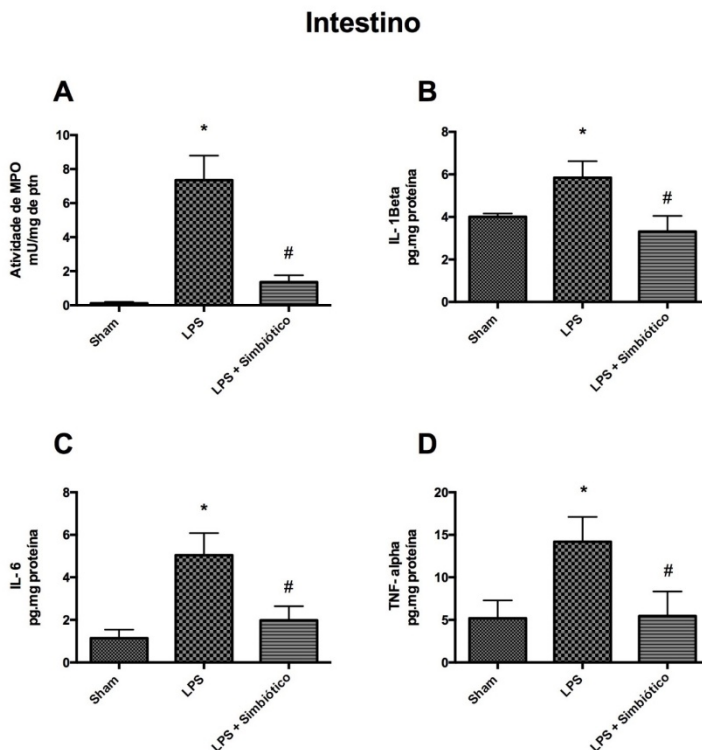


Figura 15 - Efeitos da administração de simbióticos por 15 dias, em marcadores de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF-- α (D) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. *Diferente de *Sham*, # Diferente de LPS. (A) e (C) $p < 0.0001$; (B) $p = 0,0016$ e (D) $p = 0,0014$.

4.1.5 Avaliação da permeabilidade intestinal de animais submetidos a endotoxemia

É observado aumento na concentração fluoresceína plasmática após indução de endotoxemia pela administração de LPS (Fig. 16).

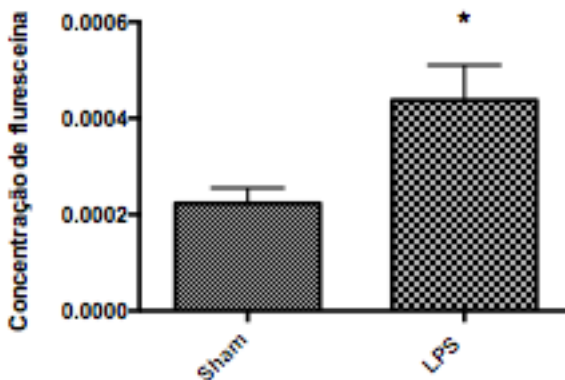


Figura 16 - Avaliação da permeabilidade intestinal de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de fluoresceína em plasma de cinco animais por grupo. *Diferente de *Sham*; $p=0.0097$.

4.2 EXPERIMENTO II

Uma vez definido o tempo de tratamento profilático, de acordo com os resultados anteriores, foi avaliado se existiam diferenças no uso das cepas de *lactobacillus* e *bifidobacterium* isoladas ou associadas (simbióticos) nos parâmetros oxidativo e inflamatórios avaliados neste estudo.

4.2.1 Efeitos do tratamento com probióticos, prebióticos e simbióticos no dano oxidativo induzido por LPS

Para avaliação de danos oxidativos nos tecidos cerebral, renal, pulmonar e intestinal, foi mensurada a atividade dos marcadores de dano oxidativo, TBARS, carbonil e a concentração de nitrito/nitrato. Em cérebro de ratos a administração de LPS foi eficaz em aumentar os níveis de TBARS no grupo controle, assim como nos grupos FOS e *bifidobacterium bifidum*. Entretanto, a administração de todos os tratamentos reduziu esses níveis, quando comparados ao grupo LPS (Fig. 17).

Desses, o grupo que recebeu os *lactobacillus acidophilus* teve seus níveis significativamente reduzidos em comparação ao grupo *sham* (Fig. 17A). Nos níveis de proteínas carboniladas no tecido em questão (Fig.17B), foi observado um aumento significativo, quando comparado ao grupo *sham*, nos grupos LPS, FOS e *lactobacillus acidophilus*. Entretanto, os grupos FOS, *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e os simbióticos tiveram seus parâmetros reduzidos quando comparados ao grupo LPS.

O grupo *lactobacillus casei* teve os menores níveis de dano oxidativo comparado aos outros grupos de tratamento (Fig. 17B). A concentração de nitrito/nitrato também foi alvo deste estudo (Fig. 17C), nesse marcador, o grupo LPS teve um aumento significativo em relação ao grupo *sham*. No entanto, todos os tratamentos foram capazes de reverter esse aumento. Desses, o grupo *lactobacillus rhamnosus* teve uma redução na concentração de nitrito/nitrato, mesmo quando comparado ao grupo *sham*.

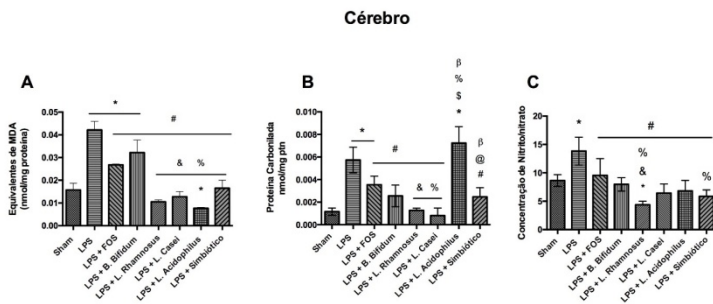


Figura 17 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcadores de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Concentração de Nitrito/Nitrato (C) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. * Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; p <0.0001.

No tecido renal foi observado um aumento na atividade de TBARS nos grupos LPS, FOS, *bifidobacterium bifidum* e simbióticos (Fig. 18A) comparados ao grupo *sham*. Entretanto, a administração de *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e simbióticos foram eficientes em reverter esse aumento, comparado ao grupo LPS (Fig. 18A). Com relação ao carbonil (Fig. 18B), houve um aumento de seus níveis no LPS, *lactobacillus casei* e *acidophilus*.

A administração de FOS, *bifidobacterium bifidum* e simbióticos reverteu esse aumento. As concentrações de nitrito/nitrato (Fig. 18C) também se apresentam aumentadas nos grupos LPS. Aumento esse reduzido significativamente com o uso de todos os tratamentos testados, tanto isolados quanto associados. Os grupos *lactobacillus rhamnosus* e *casei* tiveram seus níveis também reduzidos em comparação ao grupo *bifidobacterium bifidum*.

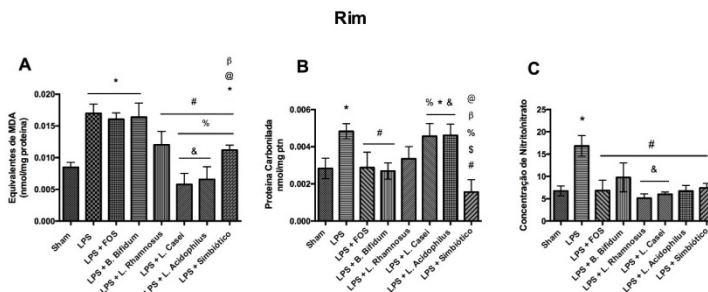


Figura 18 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B), Concentração de Nitrito/Nitrato (C) em rim de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. *Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

No pulmão houve um aumento na atividade de TBARS (Fig. 19A) nos grupos LPS, *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus* e *casei*, comparados ao grupo sham, em pulmão dos animais. Todavia, a administração de *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e simbióticos foi capaz de reverter esses níveis, comparado ao grupo LPS. O grupos *lactobacillus rhamnosus* e *casei* tiveram seus parâmetros significativamente reduzidos mesmo quando comparados ao grupo sham.

Com relação às proteínas carboniladas (Fig. 19B) é observado um aumento desse marcador no grupo LPS, como já esperado. Entretanto, todos os tratamentos foram capazes de reverter significativamente esse aumento. As concentrações de nitrito/nitrato (Fig. 19C) também se apresentam aumentadas nos grupos LPS, FOS e *bifidobacterium bifidum*, entretanto os tratamentos com *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e simbióticos reverteram as concentrações desse marcador.

Pulmão

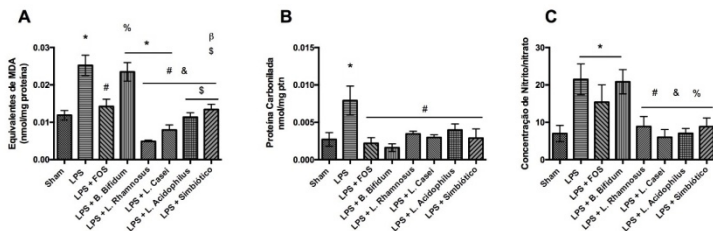


Figura 19 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B), Concentração de Nitrito/Nitrato (C) em rim de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. *Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

Foi mensurado o tecido intestinal dos animais submetidos ao protocolo de indução de endotoxemia pela administração de LPS, nos marcadores de danos oxidativos (Fig. 20). Os grupos LPS e FOS tiveram aumento expressivo na atividade de TBARS (Fig. 20A). Contudo, todos os tratamentos administrados foram capazes de reverter esse aumento, comparados ao grupo LPS.

Entre os tratamentos, os *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e *acidophilus* parecem ter um efeito potenciaizador em reverter esses danos, uma vez que as concentrações de TBARS nesses três grupos foram inferiores ao grupo sham. Com relação ao carbonil (Fig. 20B), observamos um aumento expressivo comparado aos animais sham, no grupo LPS, *lactobacillus casei* e *acidophilus*. Entretanto, os tratamentos com FOS, *bifidobacterium bifidum* e *rhamnosus* e os simbióticos foram eficazes em reverter esse aumento.

As concentrações de Nitrito/nitrato (Fig. 20C) também foram significativamente aumentadas após a indução de endotoxemia, tanto no grupo LPS como nos animais que receberam a suplementação com *bifidobacterium bifidum*. Porém, a administração dos suplementos de FOS, *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e os simbióticos foram eficientes em reverter esse aumento.

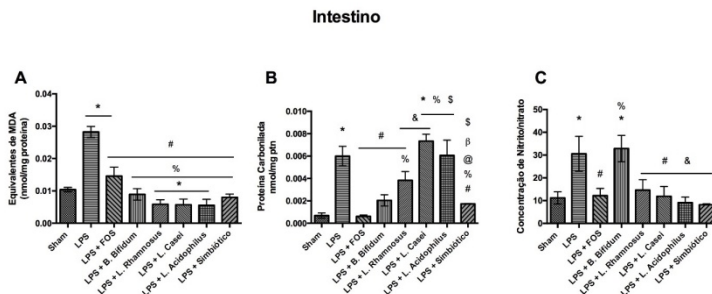


Figura 20 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B), Concentração de Nitrito/Nitrato (C) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. * Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

4.2.2 Efeitos do tratamento com probióticos, prebióticos e simbióticos na inflamação sistêmica induzida por LPS

No presente estudo foram determinados os níveis de MPO e citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α em cérebro, rins, pulmão e intestino de animais tratados com suplementos de simbióticos e posteriormente submetidos à induzidução de endotoxemia. No tecido cerebral (Fig. 21) foi observado que a atividade de MPO (Fig. 21A) está aumentada no grupo LPS, assim como no grupo que recebeu a suplementação com os simbióticos. Entretanto, esse aumento foi revertido com a administração do prebiótico FOS e dos probióticos *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus* e *casei*.

Já a administração dos probióticos e prebióticos associados, os denominados simbióticos, demonstrou um aumento na atividade de MPO quando comparados ao uso de todos os tratamentos isolados. A administração de LPS aumentou significativamente os níveis de IL-1 (Fig. 21B), em comparação com o grupo sham, nos grupos LPS, FOS e *bifidobacterium bifidum*. Todavia, nos grupos *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e *acidophilus* houve uma reversão no aumento desse parâmetro inflamatório. Os níveis de IL-6 no cérebro dos animais aumentou, como esperado, após a administração de LPS, esse aumento também foi observado nos grupos FOS e *bifidobacterium bifidum*. Contudo, nos grupos *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e os simbióticos houve uma redução significativa desse parâmetro comparado ao grupo

LPS (Fig. 21C). No TNF- α (Fig. 21D) houve um comportamento semelhante ao marcador IL-6.

Cérebro

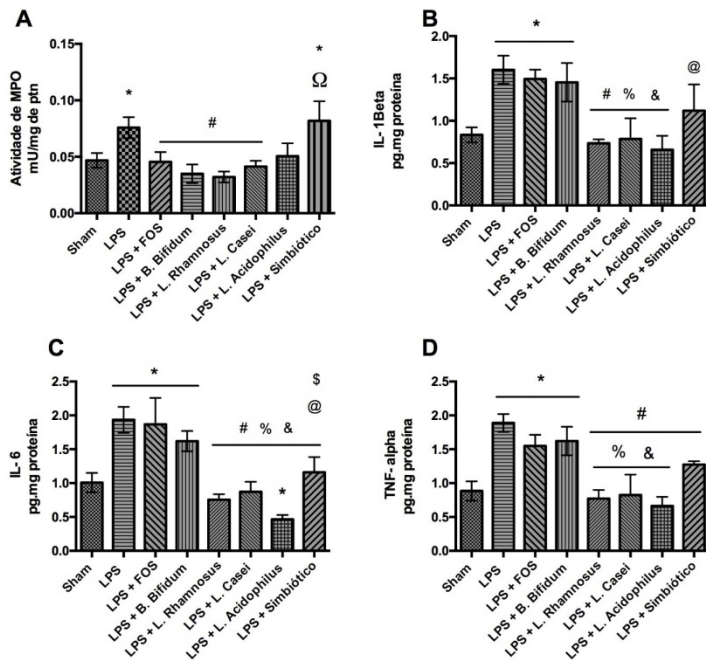


Figura 21 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de inflamação MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. * Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; Ω Diferente de todos os tratamentos; $p < 0.0001$.

A administração de LPS, como esperado, aumentou significativamente a atividade de MPO, nos rins, no grupo LPS comparado ao grupo *sham*. Entretanto, os grupos que receberam os prebióticos e probióticos, isolados ou associados, tiveram esse parâmetro reduzido significativamente. Os grupos FOS, *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e os simbióticos tiveram seus valores reduzidos mesmo quando comparados ao grupo *sham* (Fig. 22A).

Curiosamente, os níveis de IL-1 (Fig. 22B) foram significativamente maiores, comparado ao grupo *sham*, apenas no grupo que recebeu *lactobacillus rhamnosus*. Porém, nos grupos *lactobacillus casei*, *acidophilus* e os simbióticos houve uma redução significativa desse marcador inflamatório comparada ao grupo *lactobacillus rhamnosus*.

A citocina IL-6 (Fig. 22C) teve seus níveis aumentados, em comparação com o grupo *sham*, nos grupos LPS, FOS, *bifidobacterium bifidum* e *lactobacillus rhamnosus*. Entretanto, em todos os grupos de tratamento há uma reversão desse aumento, quando comparados ao grupo LPS. O TNF- α (Fig. 22D), teve seus parâmetros inflamatórios semelhantes, superficialmente, aos observados na IL-6.

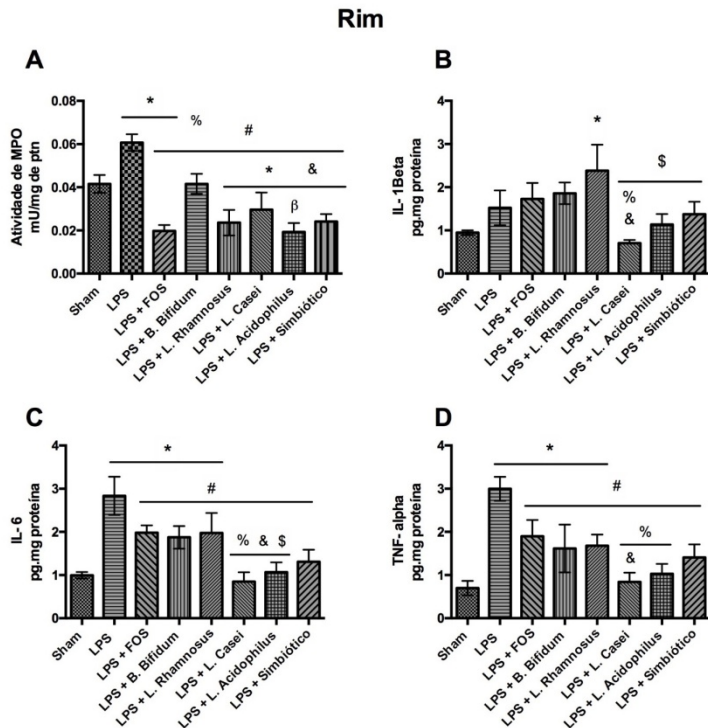


Figura 22 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de inflamação MPO (A), IL 1 (B), IL 6 (C) e TNF (D) em rim de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. * Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$ Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

No tecido pulmonar houve um aumento no marcador de infiltrado de neutrófilos, MPO (Fig. 23A), no grupo LPS comparado ao grupo sham. Todavia, todos os grupos que receberam suplementação prebióticos, probióticos ou simbióticos tiveram uma redução significativa desse marcador, comparados ao grupo LPS. O grupo *lactobacillus acidophilus*, adicionalmente, teve uma redução quando comparado ao grupo *lactobacillus casei*.

Com relação à citocina IL-1 (Fig. 23B) também houve aumento nos seus níveis no grupo LPS, FOS e simbióticos comparadas ao grupo sham. No entanto, os grupos FOS, *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus*

rhamnosus, *casei* e *acidophilus* demonstraram uma reversão desses níveis comparados ao grupo LPS. O grupo LPS e FOS na citocina pró-inflamatória, IL-6 (Fig. 23C), também teve seus valores aumentados, comparados ao grupo *sham*.

Entretanto, todos os grupos que receberam os tratamentos demonstraram uma redução nesse marcador. O TNF- α (Fig. 23D) mostra-se aumentado nos grupos LPS e FOS em relação ao *sham*. Porém, nos grupos *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e *acidophilus* observa-se uma redução significativa nos níveis de TNF- α em relação ao grupo LPS e FOS.

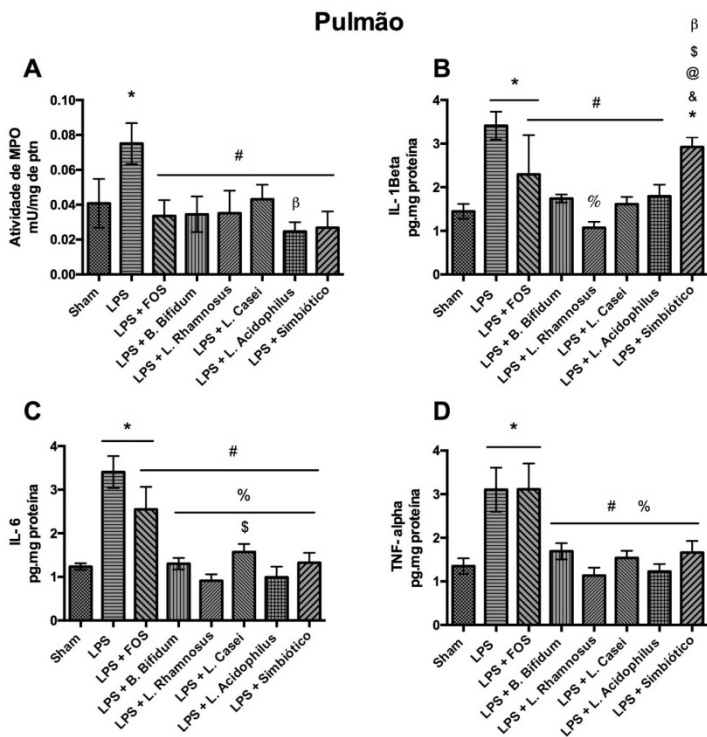


Figura 23 - Efeitos da administração de prebióticos, probióticos e simbióticos, em marcador de inflamação MPO (A), IL 1 (B), IL 6 (C) e TNF (D) em pulmão de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. * Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; \$ Diferente de LPS + *bifidum*; & Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

Assim como nos demais tecidos analisados anteriormente, o intestinal também demonstrou aumento na atividade de MPO (Fig. 24A) nos grupos LPS, FOS, *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus* comparado ao grupo *sham*. Todavia, todos os grupos que receberam suplementos tiveram uma redução significativa no aumento da atividade de MPO provocado pela administração de LPS. A IL-1 (Fig. 24B) também demonstrou valores elevados no grupo LPS e no grupo FOS comparados ao grupo *sham*.

Já os grupos *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e os simbióticos tiveram seus parâmetros reduzidos comparados ao grupo LPS. A IL-6 (Fig. 24C) teve sua atividade elevada, comparada ao grupo *sham*, nos grupos LPS e FOS. Já nos grupos tratamentos com os probióticos e os simbióticos há uma redução desse marcador comparado ao grupo *LPS*.

Os grupos *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *casei* e os simbióticos tiveram seus parâmetros reduzidos mesmo quando comparados ao grupo *sham*. Os níveis de TNF- α (Fig. 24D) mostraram-se elevados nos grupos LPS e FOS. Observa-se uma redução desse marcador nos grupos *bifidobacterium bifidum*, *lactobacillus rhamnosus*, *casei*, *acidophilus* e os simbióticos comparados ao grupo LPS. O grupo simbiótico teve seus parâmetros reduzidos mesmo quando comparado ao grupo *sham*.

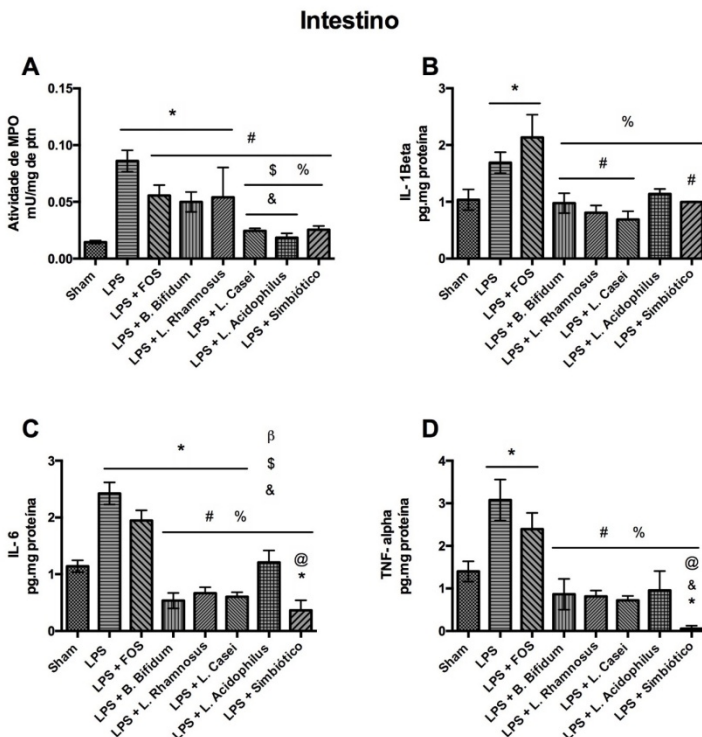


Figura 24 - Efeitos da administração de prebiótico, probióticos e simbióticos, em marcador de inflamação MPO (A), IL 1 (B), IL 6 (C) e TNF (D) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de cinco a sete animais por grupo. *Diferente de Sham; # Diferente de LPS; % Diferente de LPS + FOS; & Diferente de LPS + *bifidum*; \$Diferente de LPS + *rhamnosus*; β Diferente de LPS + *casei*; @ Diferente de LPS + *acidophilus*; $p < 0.0001$.

4.2.3 Efeitos da suplementação de probióticos, prebióticos e simbióticos em cultura de linfonodos mesentéricos em animais submetidos a endotoxemia pela administração de LPS

Na cultura de linfonodos mesentéricos (tabela 1) não se observa diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 1 - Cultura de linfonodos mesentéricos.

Grupo	Aeróbico n (%)[*]	Anaeróbico n (%)[#]
<i>Sham</i>	0 (0)	0 (0)
LPS+ água	2 (28,6)	1 (14,3)
LPS + FOS	3 (42,9)	3 (42,9)
LPS + <i>bifidobacterium bifidum</i>	1 (14,3)	1 (14,3)
LPS + <i>lactobacillus rhamnosus</i>	3 (42,9)	3 (42,9)
LPS + <i>lactobacillus casei</i>	4 (57,1)	1 (14,3)
LPS + <i>lactobacillus acidophilus</i>	1 (14,3)	1 (14,3)
LPS + simbióticos	4 (57,1)	2 (28,6)

Tabela 1 - Efeitos da administração de prebióticos, probióticos e simbióticos em linfonodos mesentéricos de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos como frequência absoluta e relativa de turbidez do meio. *p=0,275 # p=0,293. Teste de Qui-quadrado de Pearson.

4.3 EXPERIMENTO III

Após definição das melhores cepas de probióticos em dano oxidativo e inflamatórios, foi avaliado o papel da microbiota intestinal nesses parâmetros. Para isso, comparou-se os efeitos do transplante de microbiota fecal em animais que receberam suplementação controle (água), *lactobacillus casei* e *rhamnosus*.

4.3.1 Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo em endotoxemia induzida pelo LPS

Avaliou-se o soro de animais submetidos ao protocolo de endotoxemia pela administração de LPS. Nesses animais houve um aumento expressivo nos níveis de TBARS, nos grupos LPS, transplante controle e transplante *lactobacillus casei*. No grupo transplante com os *lactobacillus rhamnosus*, observou-se uma redução significativa desse marcador de dano lipídico (Fig. 25A). Com relação ao carbonil (Fig.

25B), também houve um aumento significativo desse marcador no grupo LPS e no grupo controle transplante, comparados ao grupo *sham*. O grupo transplante *lactobacillus rhamnosus* teve uma redução significativa comparada ao grupo *sham*. As concentrações de nitrito/nitrato (Fig. 25C) tiveram aumento expressivo no grupo LPS e transplante com *lactobacillus casei*. O único grupo que demonstrou uma redução dos danos ocasionados pelo LPS foi o transplante fecal com *lactobacillus rhamnosus*.

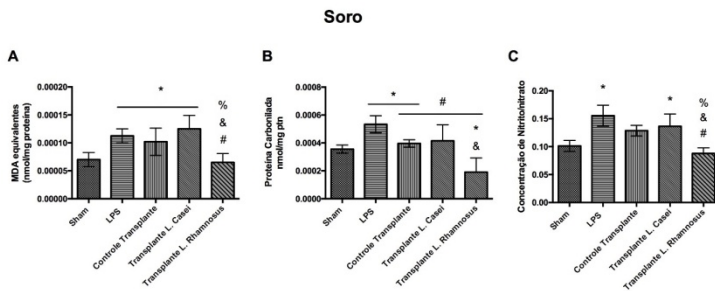


Figura 25 - Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/Nitrato(C) em soro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

No cérebro dos animais submetidos ao protocolo de endotoxemia pela administração de LPS observa-se um aumento significativo no marcador de dano oxidativo TBARS, nos grupos LPS e no transplante com *lactobacillus rhamnosus*, comparados ao grupo *sham*. O transplante controle foi eficaz em reverter esse aumento comparado ao grupo LPS (Fig. 26A). Os níveis de carbonil também se mostraram aumentados no grupo LPS, comparado ao grupo *sham*, entretanto, todos os grupos transplantados tiveram uma redução significativa desse aumento comparados ao grupo LPS (Fig. 26B). Curiosamente as concentrações de nitrito/nitrato não demonstraram diferenças entre o grupo *sham* e LPS, apenas diferenças entre os grupos transplantados, deles o grupo transplante controle e o transplante com *lactobacillus casei* tiveram parâmetros menores comparados ao grupo transplante *lactobacillus rhamnosus* (Fig. 26C).

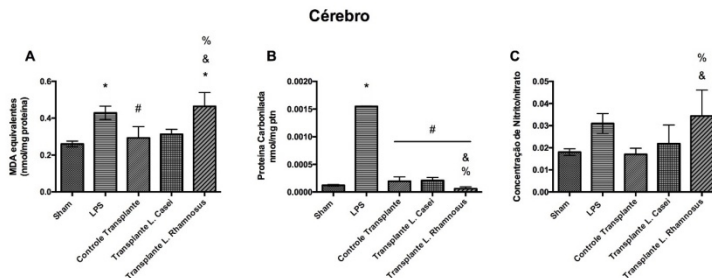


Figura 26 - Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/Nitrato(C) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; A e B $p < 0.0001$; C $p = 0,0073$.

No tecido renal houve um aumento significativo no grupo LPS, no parâmetro oxidativo TBARS (Fig. 27A), aumento esse revertido nos grupos transplantes. O carbonil também teve resultados idênticos ao TBARS (Fig. 27B). Já nas concentrações de nitrito/nitrato observamos uma redução desse marcador nos grupos LPS e transplante *lactobacillus rhamnosus*, contudo, nos grupos transplante controle e transplante *lactobacillus casei* houve uma reversão desse aumento (Fig. 27C).

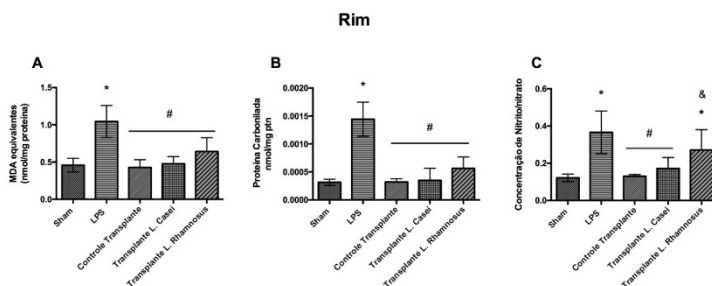


Figura 27 - Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/Nitrato (C) em rim de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; A e B $p < 0.0001$; C $p = 0,0002$.

O tecido pulmonar teve comportamento similar aos tecidos já descritos acima, em que o grupo LPS demonstrou aumento significativo no TBARS, comparado ao grupo *sham*. Todavia, esse aumento foi

revertido em todos os grupos transplantes testados (Fig. 28A). O carbonil também demonstrou níveis elevados no grupo LPS, assim como no grupo transplante *lactobacillus rhamnosus*. Contudo, nos grupos transplante controle e transplante *lactobacillus casei* houve uma redução significativa desse aumento (Fig. 28B). Já o nitrito/nitrato teve aumento expressivo nos níveis desse marcador nos animais do grupo LPS, no entanto, todos os grupos transplantes foram eficazes em reduzir esse marcador. Chama atenção o grupo transplante controle, pois teve seus níveis de nitrito/nitrato significativamente inferiores ao grupo *sham* (Fig. 28C).

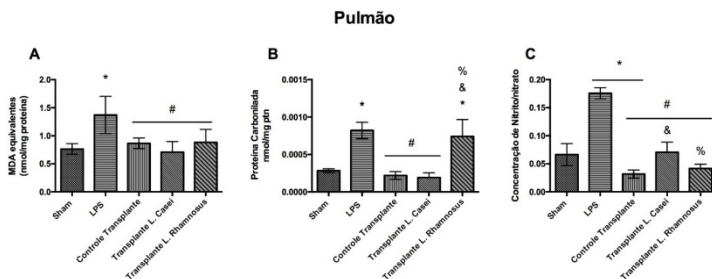


Figura 28 - Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/Nitrato (C) em pulmão de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

O intestino desses animais também apresentou níveis elevados de TBARS no grupo LPS, comparados ao grupo *sham*, quando submetidos ao protocolo de endotoxemia. Esses níveis mostram-se significativamente reduzidos em todos os grupos transplantes testados (Fig. 29A). O carbonil também teve seus valores aumentados no grupo LPS e grupo transplante *lactobacillus rhamnosus*, comparados ao grupo *sham*. Valores esses também reduzidos nos grupos controle transplante e transplante *lactobacillus casei* (Fig. 29B). Os níveis de nitrito/nitrato mostram-se expressivamente elevados, comparados ao *sham*, no grupo LPS, entretanto, em todos os grupos transplantes há uma redução significativa desse marcador comparado ao grupo LPS (Fig. 29C).

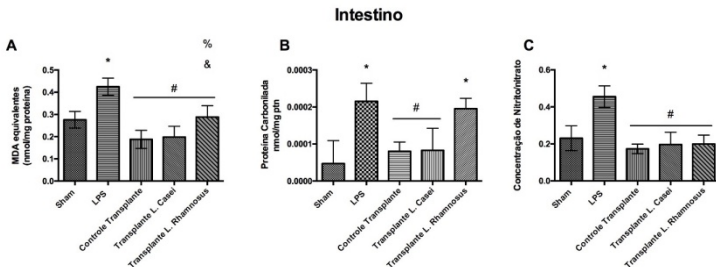


Figura 29 - Papel da microbiota intestinal no dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/Nitrato (C) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

4.3.2 Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica em endotoxemia induzida pelo LPS

A inflamação sistêmica nas estruturas, cérebro, rim, pulmão e intestino, foi mensurada através das dosagens de MPO, IL-1, IL-6 e TNF- α (Fig. 30). Houve um aumento na atividade de MPO, nos grupos LPS e no transplante *lactobacillus rhamnosus*, quando comparados com o grupo *sham*. Todavia, os grupos transplante controle e transplante *lactobacillus casei* tiveram seus valores significativamente reduzidos comparados ao grupo LPS (Fig. 30A). Os marcadores inflamatórios IL-1 (Fig. 30B), IL-6 (Fig. 30C) e TNF- α (Fig. 30D) tiveram resultados significativos idênticos, seus níveis mostraram-se aumentados após administração de LPS, aumento esse retrocedido em todos os grupos transplantados.

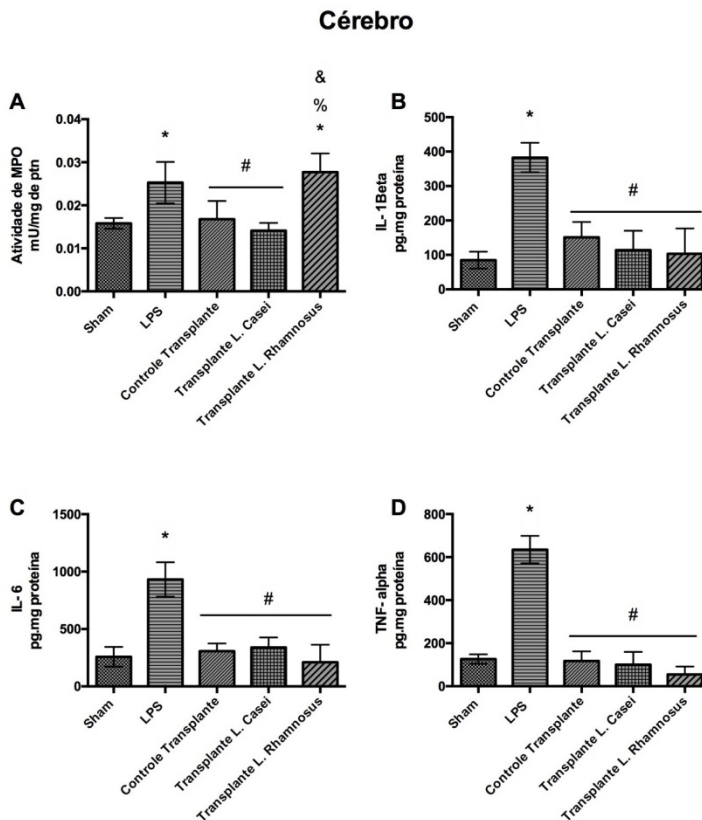


Figura 30 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de Sham; # Diferente de LPS; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

Da mesma forma que o tecido cerebral, a inflamação sistêmica no tecido renal dos animais teve um considerável aumento na atividade de MPO, no grupo LPS comparado ao sham. Todavia, os grupos transplante controle e transplante *lactobacillus rhamnosus* tiveram seus parâmetros revertidos comparados ao grupo LPS (Fig. 31A). Quando avaliada a IL-1, na mesma estrutura, percebe-se um aumento da atividade dessa citocina no grupo LPS, nenhum dos grupos com transplante demonstrou uma redução significativa desse marcador inflamatório (Fig. 31B). Entretanto, tanto a IL-6 (Fig. 31C) quanto o TNF- α (Fig. 31D) tiveram resultados

idênticos, aumento das atividades nos grupos LPS, transplante *lactobacillus casei* e *rhmanosus* comparados ao *sham* e uma redução desse marcador no grupo transplante controle, quando comparados ao LPS.

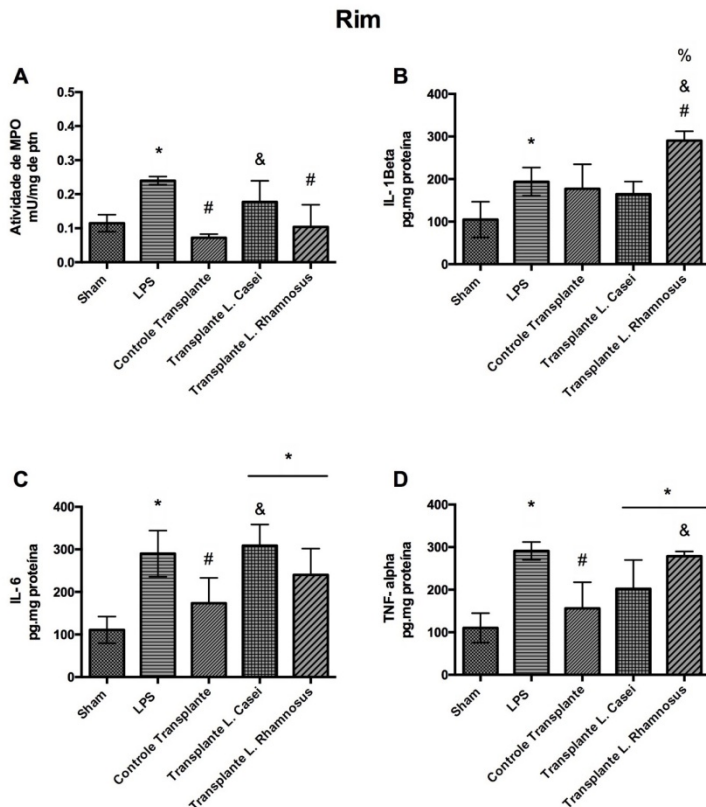


Figura 31 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

As atividades de MPO (Fig. 32A), IL-1 (Fig. 32B), IL-6 (Fig. 32C) e TNF- α (Fig. 32D) no tecido pulmonar mostraram-se aumentadas no grupo LPS comparadas aos grupos *sham*. Todavia, todos os grupos transplantes tiveram redução desses parâmetros comparados ao grupo LPS.

Pulmão

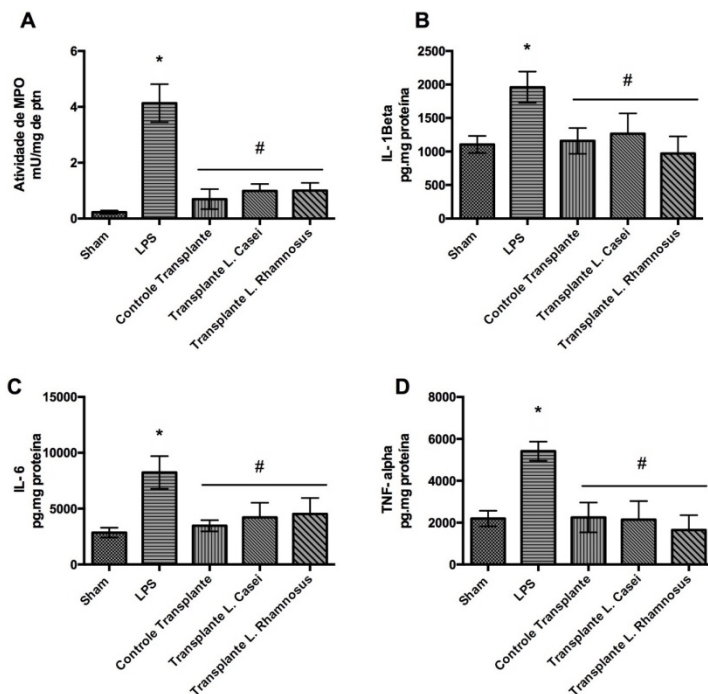


Figura 32 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em pulmão de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

No tecido intestinal dos animais, em relação à atividade de MPO (Fig. 33A) e IL-1 (Fig. 33B), houve aumento nos grupos induzidos a endotoxemia, grupo LPS, comparado aos grupos *sham*. Todavia, todos os grupos transplantes tiveram uma redução desses marcadores, comparados ao grupo LPS. Os grupos transplantes *lactobacillus casei* e *rhamnosus* tiveram redução significativa, dos mesmos parâmetros mensurados, quando comparados ao grupo *sham*. Na IL-6 (Fig. 33C) observamos um aumento, comparado ao grupo *sham*, nos níveis do grupo LPS. Entretanto, todos os grupos transplantes tiveram uma redução desse aumento. Curiosamente, na atividade da citocina TNF- α (Fig. 33D) não foi observado nenhum aumento no grupo LPS, comparado ao grupo *sham*.

Porém, em todos os grupos transplantes houve uma redução desse marcador, comparados com o grupo *sham* e LPS.

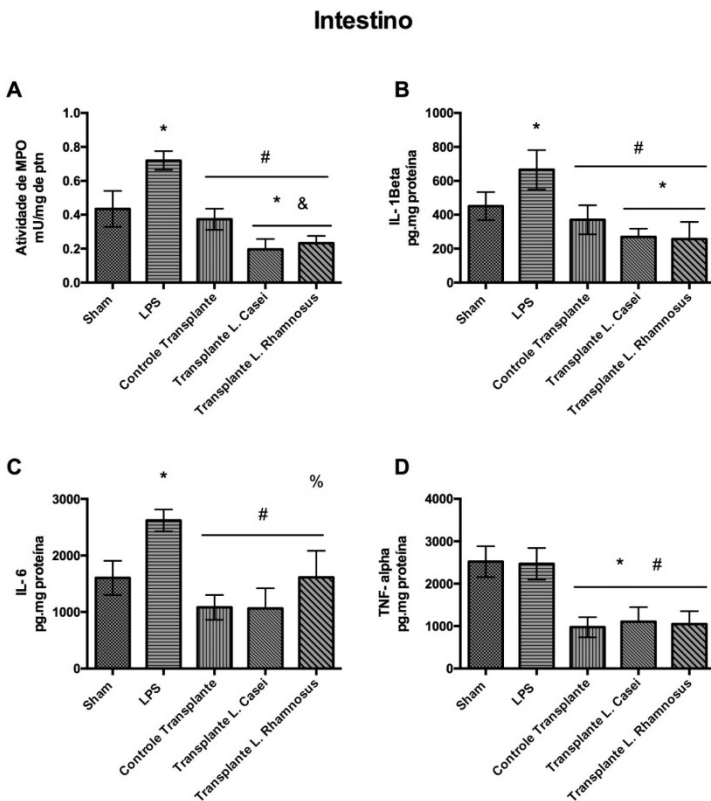


Figura 33 - Papel da microbiota intestinal na inflamação local MPO (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) em intestino de animais submetidos a endotoxemia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *Sham*; # Diferente de LPS; Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

4.3.3 Papel da microbiota intestinal em parâmetros de dano oxidativo na inflamação estéril induzida por zimosan

Avaliando o soro com relação aos danos oxidativos ocasionados pela inflamação estéril houve um aumento na atividade de TBARS (Fig. 34A) no grupo zimosan, quando comparado ao grupo *sham*. Porém, percebe-se uma redução significativa nesse aumento, quando comparados

ao grupo zimosan, nos grupos transplante controle e transplante *lactobacillus casei*. Com relação ao carbonil (Fig. 34B), nesse mesmo tecido há um aumento significativo no grupo zimosan, comparado ao grupo *sham*. No entanto, em todos os grupos que receberam tratamentos com transplantes houve redução significativa desse marcador comparado ao grupo zimosan. Avaliando a concentração de nitrito/nitrato (Fig. 34C), percebe-se valores elevados no grupo zimosan comparado aos animais do grupo *sham*. Entretanto, a redução desse parâmetro é observada no grupo transplante controle e no transplante *lactobacillus rhamnosus*.

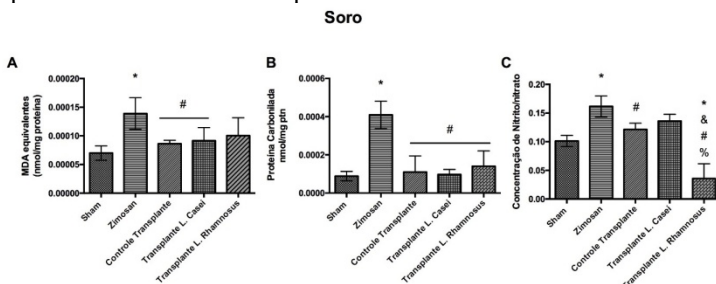


Figura 34 - Papel da microbiota intestinal nos marcadores de dano oxidativos TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/nitrato (C) em soro de animais submetidos a inflamação sistêmica. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; (A) $p=0,0010$; (B) e (C) $p<0.0001$.

Os níveis de TBARS no cérebro dos animais mostraram-se aumentados no grupo zimosan, assim como o grupo transplante com *lactobacillus rhamnosus*, comparados ao grupo *sham*. Entretanto, esse aumento foi reduzido significativamente nos grupos transplante controle e transplante *lactobacillus casei*, comparados ao grupo zimosan (Fig. 35A). Com relação ao carbonil, o grupo zimosan teve seus valores de proteínas carboniladas significativamente maiores do que o grupo *sham*. Todavia, todos os grupos transplantes foram eficazes em reverter esse aumento, usando como parâmetro de comparação o grupo zimosan (Fig. 35B). A concentração de nitrito/nitrato também teve seus parâmetros aumentados no grupo zimosan, assim como no grupo transplante com *lactobacillus rhamnosus*, comparado ao grupo *sham*. Esse aumento foi revertido significativamente no grupo transplante controle (Fig. 35C).

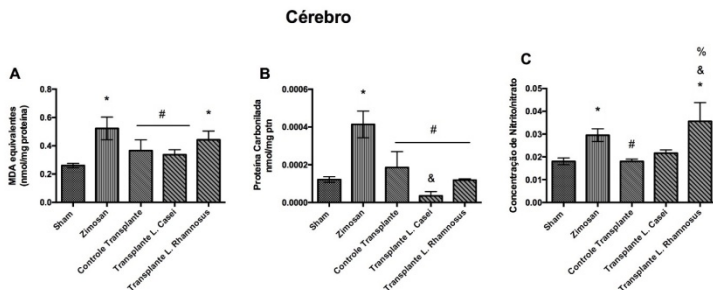


Figura 35 - Papel da microbiota intestinal nos marcadores de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/nitrato (C) em cérebro de animais submetidos a inflamação sistêmica. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; (A) e (B) $p < 0.0001$; (C) $p = 0,0002$.

No tecido renal dos animais há um aumento nos níveis de TBARS (Fig. 36A) em todos os grupos, comparados ao grupo *sham*. Curiosamente, nenhum dos grupos teve seus parâmetros reduzidos de forma significativa quando comparados ao grupo zimosan. Contudo, quando analisados os parâmetros de carbonil (Fig. 36B) e nitrato/nitrito (Fig. 36C) observa-se uma tendência similar em ambos, aumento dos níveis no grupo zimosan, comparados ao grupo *sham*, e uma redução significativa nesses níveis em todos os grupos transplantados.

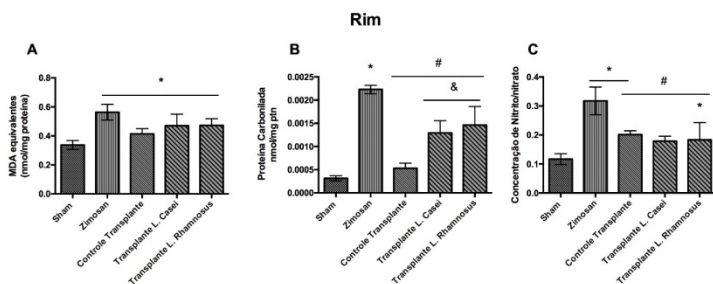


Figura 36 - Papel da microbiota intestinal nos marcadores de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/nitrato (C) em rim de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; (A) $p = 0,0006$; (B) e (C) $p < 0.0001$.

Avaliou-se também a estrutura pulmonar dos animais com relação aos danos oxidativos. Nesse tecido há uma semelhança no TBARS (Fig. 37A) e nitrato/nitrito (Fig. 37C), onde houve um aumento considerável, em ambos os marcadores, nos grupos zimosan, comparados aos grupos *sham*. Entretanto, todos os grupos transplantes foram capazes de reverter esse aumento. Já o carbonil (Fig. 37B) teve aumento no grupo zimosan e transplante *lactobacillus rhamnosus*, comparado ao grupo *sham*. E os grupos que apresentaram redução desse marcador de danos às proteínas foram os grupos controle transplante e transplante *lactobacillus casei* (Fig. 37B) em relação ao zimosan.

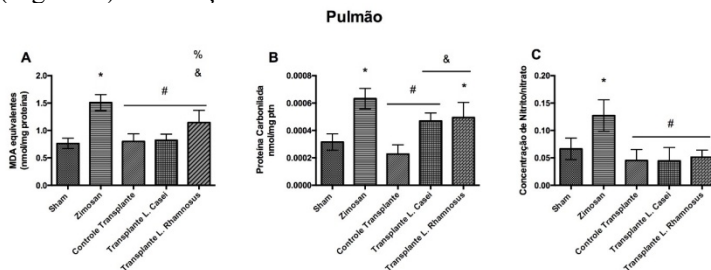


Figura 37 - Papel da microbiota intestinal nos marcadores de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/nitrato (C) em pulmão de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; (A) e (C) $p < 0.0001$; (B) $p = 0,0010$.

Os três marcadores de dano oxidativo tiveram resultados similares no intestino dos animais, TBARS (Fig. 38A), carbonil (Fig. 38B) e nitrito/nitrato (Fig. 38C). Quando comparados ao grupo *sham*, observa-se um aumento significativo nos grupos zimosan. Todavia, em todos os grupos transplantes há uma redução desses marcadores.

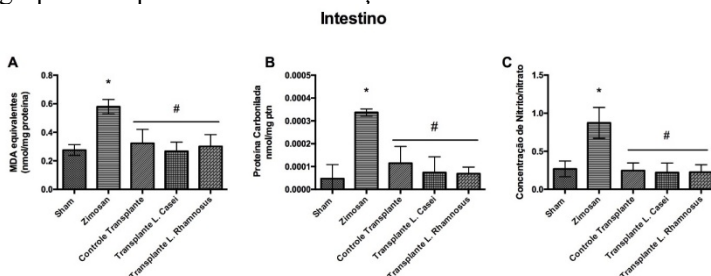


Figura 38 - Papel da microbiota intestinal nos marcadores de dano oxidativo TBARS (A), Carbonil (B) e Nitrito/nitrato (C) em intestino de animais

submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

4.3.4 Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica induzida por zimosan

O soro dos animais teve um aumento na atividade de MPO, comparada ao controle *sham*, no grupo zimosan. Esse aumento foi revertido nos grupos transplantes *lactobacillus casei* e *rhamnosus* (Fig. 39).

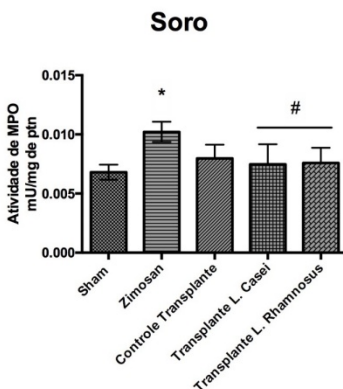


Figura 39 - Papel da microbiota intestinal na atividade de MPO em soro de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de 8 a 10 animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

No cérebro dos animais observa-se um aumento na atividade de MPO no grupo zimosan e *lactobacillus rhamnosus*, comparados ao *sham* (Fig. 40A). Porém, nos grupos transplantes controle e *lactobacillus casei* há uma redução significativa nesse parâmetro comparados ao grupo zimosan. Os marcadores IL-1 (Fig. 40B), IL-6 (Fig. 40C) e TNF- α (Fig. 40D) demonstram comportamentos similares, aumento nos grupos zimosan, comparados ao *sham*, e redução em todos os grupos transplantes.

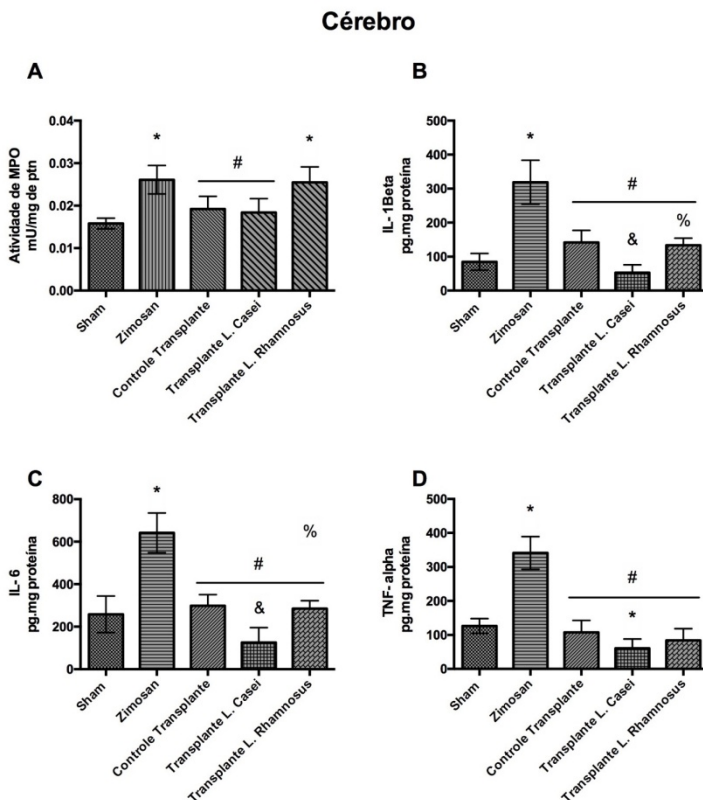


Figura 40 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em cérebro de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de sham; # Diferente de zimosan; & Diferente de transplante controle; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; (A) $p = 0,0004$ (B), (C) e (D) $p < 0,0001$.

No tecido renal houve um aumento nos níveis de MPO (Fig. 41A) no grupo zimosan, comparado ao sham. Entretanto, em todos os grupos transplantes observa-se uma redução desse marcador comparados ao grupo zimosan. A IL-1 (Fig. 41B) também apresenta aumento significativo nos grupos zimosan, transplante *lactobacillus casei* e *rhamnosus*, usando como parâmetro de comparação o grupo sham. Entretanto, no grupo transplante controle houve uma redução significativa desse parâmetro inflamatório comparado ao grupo zimosan. Na IL-6 (Fig. 41C) há um aumento no grupo zimosan e no grupo transplante

lactobacillus casei, comparados ao grupo *sham*. Todavia, nos grupos transplantes controle e *lactobacillus rhamnosus* observa-se uma reversão desse aumento, quando comparados com o grupo zimosan. O TNF- α (Fig. 41D) também demonstrou um aumento em seus níveis nos grupos zimosan e nos transplantes *lactobacillus casei* e *rhamnosus*. Apenas o grupo transplante controle obteve uma redução nesse marcador, quando comparado ao grupo zimonsan.

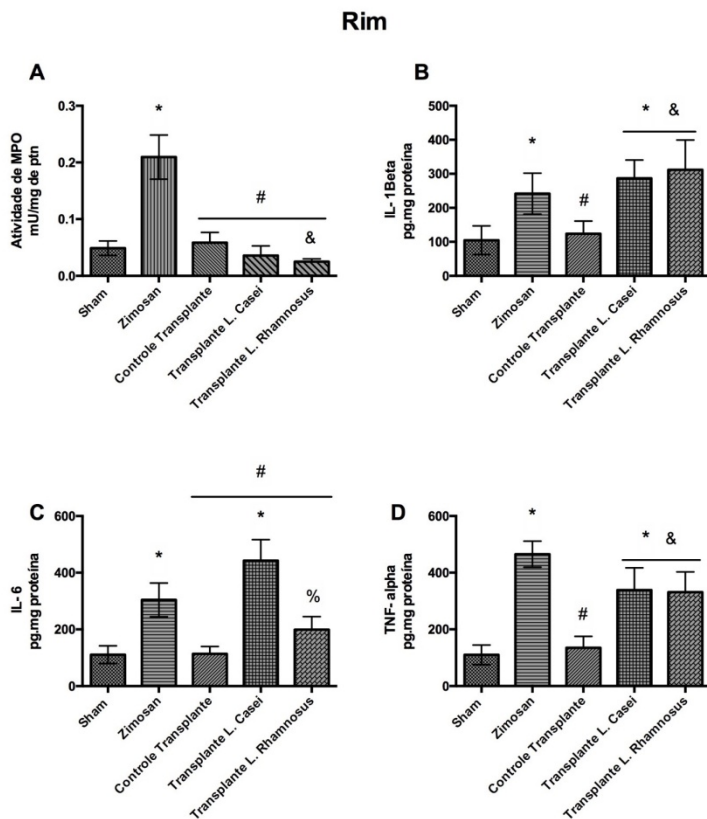


Figura 41 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em rim de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de 8 a 10 animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

Os níveis de MPO no tecido pulmonar mostram-se elevados nos grupos zimosan, transplante *lactobacillus casei* e *rhmanosus*, comparados ao grupo *sham* (Fig. 42A). Porém, os grupos transplante controle e *lactobacillus casei* tiveram uma redução significativa, comparados ao grupo zimosan nesse marcador. A IL-1 (Fig. 42B) mostrou-se significativamente elevada, no grupo zimosan, comparada ao grupo *sham*. Entretanto, nos grupos transplante controle e *lactobacillus casei* houve uma redução nesse marcador. Os níveis de IL-6 mostraram-se aumentados nos grupos zimosan e transplante *lactobacillus rhamnosus*, comparados ao grupo *sham*. Porém, nos grupos transplantes controle e *lactobacillus casei* houve redução desse parâmetro (Fig. 42C). Já os níveis de TNF- α ficaram elevados no grupo zimosan, comparado ao grupo *sham*. Todavia, em todos os grupos transplantes esses níveis mostraram-se reduzidos quando comparados ao grupo zimosan (Fig. 42D).

Pulmão

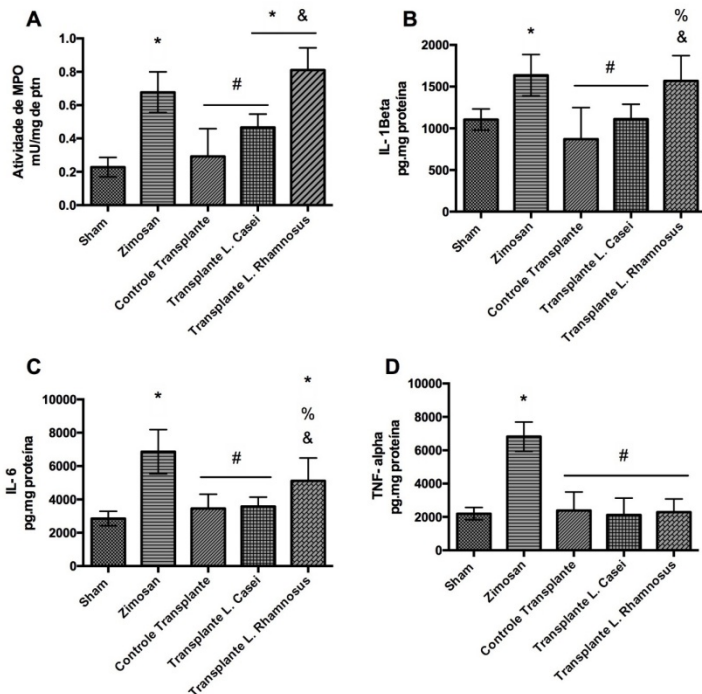


Figura 42 - Papel da microbiota intestinal na inflamação sistêmica MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em pulmão de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de *sham*; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *lactobacillus casei*; $p < 0.0001$.

Os níveis de MPO no intestino encontram-se aumentados no grupo zimosan, comparados ao grupo *sham* (Fig. 43A). Entretanto, em todos os grupos que receberam os transplantes houve uma redução significativa desse marcador inflamatório comparado ao grupo zimosan. Desses grupos, merece destaque o grupo transplante controle, pois teve a atividade de MPO reduzida mesmo quando comparado ao grupo *sham*. As citocinas IL-1 (Fig. 43B), IL-6 (Fig. 43C) e o TNF- α (Fig. 43D) tiveram comportamentos semelhantes, aumentadas nos grupos zimosan, quando comparadas aos grupos *sham*. Todavia, em todos os grupos transplantes houve uma redução significativa nesses parâmetros inflamatórios, quando comparados ao grupo zimosan.

Intestino

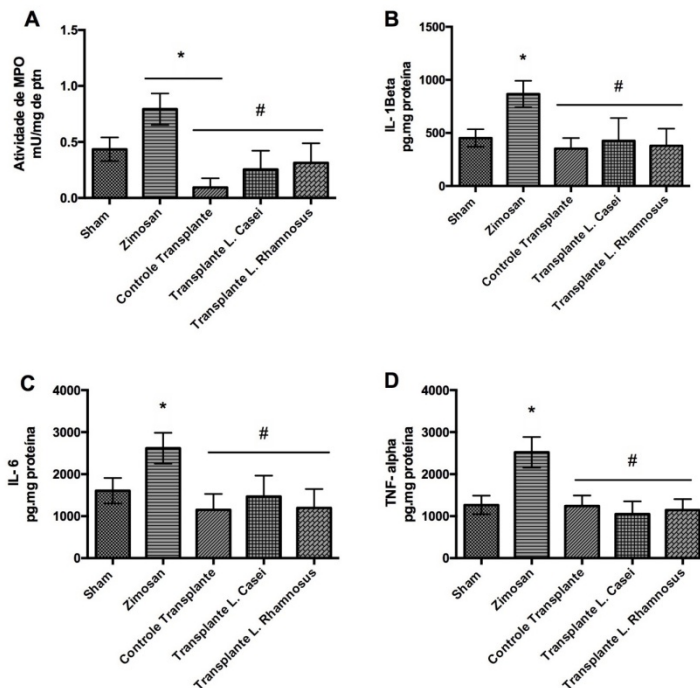


Figura 43- Papel da microbiota intestinal na inflamação local MPO (A), IL1 (B), IL6 (C) e TNF- α (D) em intestino de animais submetidos a inflamação estéril. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de oito a dez animais por grupo. *Diferente de sham; # Diferente de zimosan; & Diferente de controle transplante; % Diferente de transplante *Lactobacillus casei*; (A), (C) e (D) $p < 0.0001$; (B) $p = 0,0009$.

4.3.5 Análises histológicas

4.3.5.1 Avaliação da lesão tissular ocorrida na endotoxemia induzida pelo LPS

Para avaliação da lesão tissular ocorrida nos tecidos cerebral, renal, pulmonar e intestinal, na endotoxemia induzida pela LPS, foi realizada análise histológica desses tecidos. No cérebro dos animais avaliados (Fig. 44) observa-se ausência de particularidades microscópicas no grupo sham (A), havendo uma ausência de inflamação nas amostras desse grupo.

Entretanto, quando avaliadas as lâminas do grupo LPS, há presença moderada de infiltrado linfocitário (B). Já nos grupos transplante controle, transplante *lactobacillus casei* e *rhamnosus* observamos um discreto infiltrado de linfócitos (C).

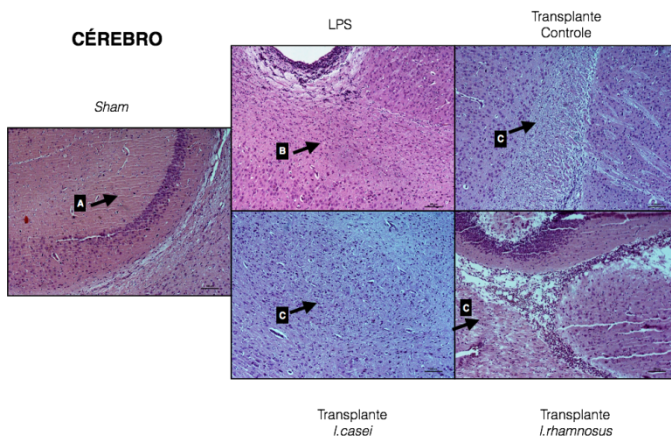


Figura 44 – Cortes histológicas de tecido cerebral, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a endotoxemia. (A) ausência de infiltrado de linfócitos; (B) moderado infiltrado de linfócitos e (C) discreto infiltrado de linfócitos.

Curiosamente, no tecido renal (Fig. 45) não foi evidenciado processo inflamatório crônico ou agudo. Os glomérulos encontram-se preservados (A) e os túbulos (B) com relativa uniformidade do diâmetro. Observa-se também, no grupo transplante *casei*, tecido adiposo perirenal normal (C). No grupo transplante *rhamnosus* é possível observar que a suprarenal se encontra normal (D).

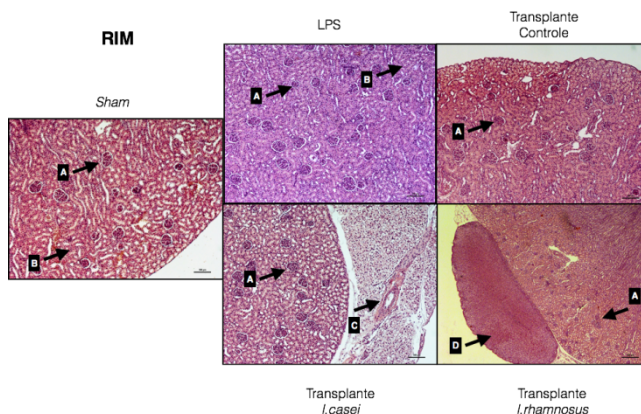


Figura 45 – Cortes histológicas de tecido renal, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a endotoxemia. (A) glomérulos normais; (B) túbulos normais (C) tecido adiposo perirenal normal e (D) suprarenal normal.

Entretanto, quando avaliadas as lesões tissulares ocorridas no tecido pulmonar (Fig. 46) observa-se no grupo *sham* alvéolos normais, com septos interalveolares delicados (A). Já no grupo LPS há presença de septos interalveolares espessados e presença de infiltrado linfocitário no parênquima pulmonar (B). Todavia, nos grupos transplante controle e *lactobacillus casei* há presença de discreto infiltrado linfocitário (C). Entretanto, no grupo *lactobacillus rhamnosus* observa-se presença de poucos alvéolos expandidos (D).

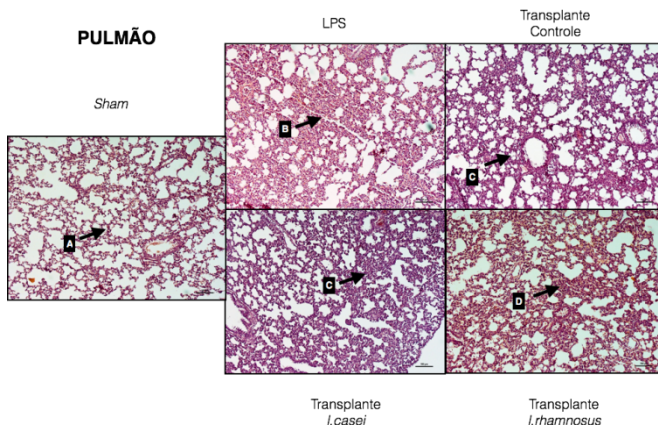


Figura 46 – Cortes histológicas de tecido pulmonar, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a endotoxemia. (A) alvéolos normais, com septos interalveolares delicados; (B) septos interalveolares espessados e presença de infiltrado linfocitário no parênquima pulmonar; (C) discreto infiltrado linfocitário e (D) presença de poucos alvéolos expandidos.

O tecido intestinal dos animais (Fig. 47) demonstrou alterações significativas nesse estudo, no grupo *sham* observa-se que as vilosidades intestinais foram preservadas (A). No grupo LPS observam-se as vilosidades encurtadas (B) e hiperplasia de folículos linfóides (C). Nos animais que receberam o transplante controle observa-se que no tecido adiposo peri-entérico há presença de inflamação crônica (D) e moderado infiltrado linfocitário (E). No grupo transplante *casei* é perceptível a presença moderada de infiltrados linfocitários (E) e edema de submucosa (F). Já no grupo transplantes *rhmanosus* também observa-se um encurtamento das vilosidades intestinais (B), assim como um infiltrado inflamatório discreto na submucosa (G).

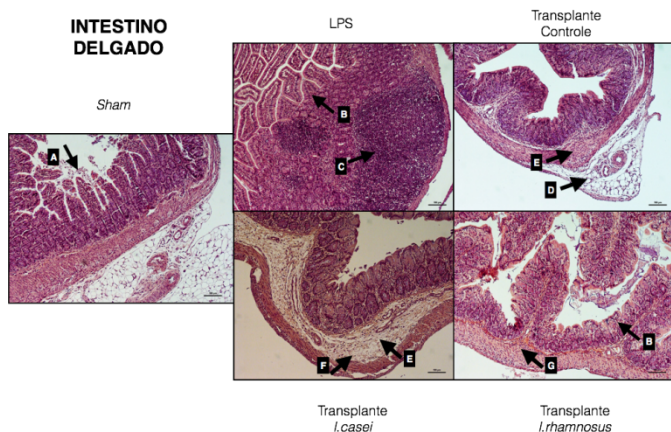


Figura 47 – Cortes histológicas de tecido intestinal, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a endotoxemia. (A) vilosidades preservadas; (B) vilosidades encurtadas; (C) hiperplasia de folículos linfóides; (D) tecido adiposo peri-entérico com inflamação crônica; (E) moderado infiltrado linfocitário (F) edema de submucosa; (G) submucosa com infiltrado inflamatório discreto.

4.3.5.2 Avaliação da lesão tissular ocorrida na endotoxemia induzida pelo Zimosan

O dano tissular ocorrido após a inflamação estéril induzida por zimosan foi avaliado. Observa-se no tecido cerebral (Fig. 48) no grupo *sham* a ausência de infiltrado linfocitário (A). Porém, quando avaliado o grupo zimosan, há presença moderada de infiltrado de linfócitos (B). Entretanto, em todos os grupos de tratamento, transplante controle, *lactobacillus casei* e *rhamnosus* percebe-se um discreto infiltrado linfocitário (C).

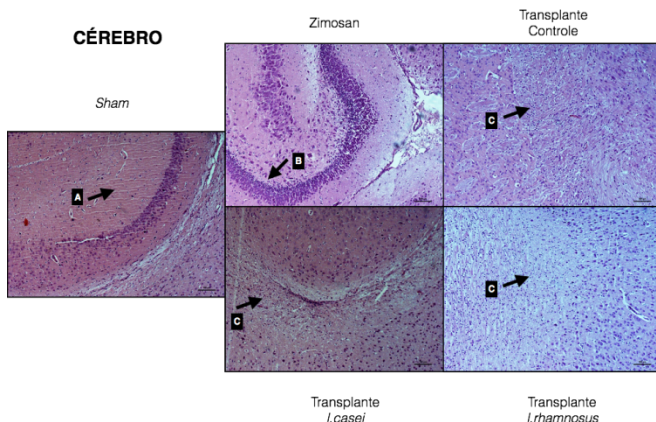


Figura 48 – Cortes histológicas de tecido cerebral, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a inflamação estéril por zimosan. (A) ausência de infiltrado de linfócitos; (B) moderado infiltrado de linfócitos e (C) discreto infiltrado de linfócitos.

Os cortes histológicos do tecido renal dos animais (Fig. 49) apresentaram em todos os grupos glomérulos normais (A) e túbulos normais (B), sem qualquer alteração microscópica.

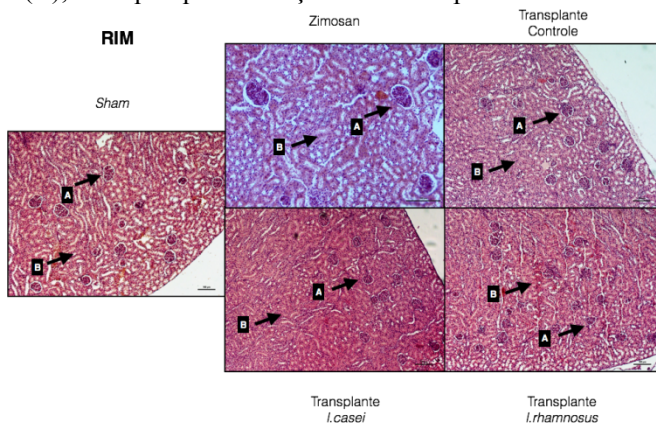


Figura 49 – Cortes histológicos de tecido renal, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a inflamação estéril por zimosan. (A) glomérulos normais; (B) túbulos normais.

O tecido pulmonar (Fig. 50) no grupo *sham* apresentou alvéolos normais (A), sem alterações microscópicas. No grupo zimosan há septos interalveolares espessados e presença de infiltrado linfocitário no

parênquima pulmonar (B). Porém, nos grupos transplante controle e *lactobacillus casei*, há septos interalveolares espessados e presença de infiltrado linfocitário no parênquima pulmonar (C). Entretanto, no grupo transplante *rhamnosus* há presença de poucos alvéolos expandidos (D).

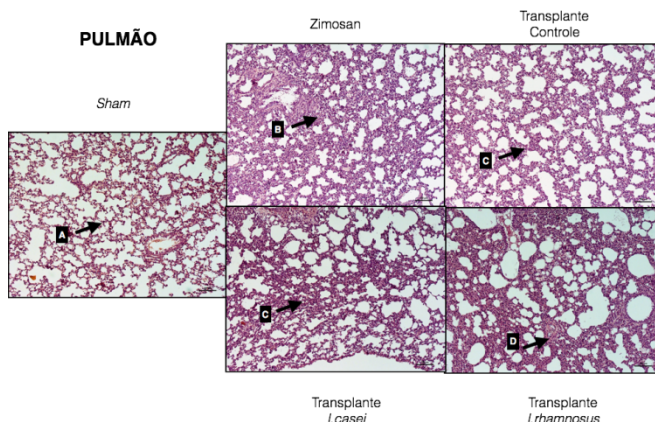


Figura 50 – Cortes histológicos de tecido pulmonar, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a inflamação estéril por zimosan. (A) alvéolos normais, com septos interalveolares delicados; (B) septos interalveolares espessados e presença de infiltrado linfocitário no parênquima pulmonar; (C) discreto infiltrado linfocitário e (D) presença de poucos alvéolos expandidos.

No intestino delgado (Fig. 51) observa-se no grupo *sham* as vilosidades intestinais preservadas (A). Já no grupo zimosan há acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na submucosa com hiperplasia de foliculo linfóide (B). No grupo que recebeu transplante controle observa-se tecido adiposo peri-entérico com discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (C). Os animais do grupo transplante *casei* discreto infiltrado linfocitário na lâmina própria (D) e no grupo transplante *rhamnosus* observa-se um discreto infiltrado linfocitário na submucosa (E).

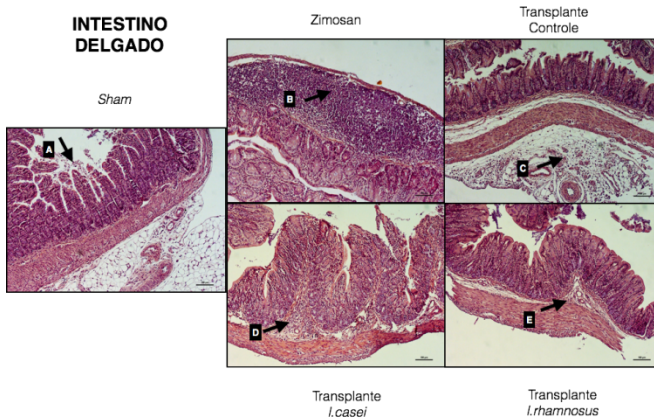


Figura 51 – Cortes histológicas de tecido intestinal, corados pela hematoxilina-eosina, de animais submetidos a inflamação estéril por zimosan. (A) vilosidades preservadas; (B) acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na submucosa com hiperplasia de folículo linfoide; (C) tecido adiposo peri-entérico com discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário; (D) discreto infiltrado linfocitário na lâmina própria e (E) discreto infiltrado linfocitário na submucosa.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito dos simbióticos sobre a inflamação sistêmica e local (intestino) induzida por LPS, através da avaliação de marcadores de resposta lesiva. Com base nesses resultados é possível observar que os probióticos podem favorecer a modulação da microbiota intestinal, e assim oferecer um benefício imunológico adicional ao tratamento convencional na sepse pediátrica.

Parece que as cepas probióticas diferem significativamente entre si, tendo diferentes efeitos sobre a saúde do hospedeiro, sendo assim, não podemos extrapolar os efeitos benéficos entre as diferentes cepas. Merece destaque o papel da microbiota intestinal *per se*, pois os resultados mostram uma proteção, sobre os parâmetros inflamatórios, de danos oxidativos e histológicos, no transplante de microbiota fecal, entre os animais saudáveis e doentes. Essa proteção foi independente da administração prévia de probióticos aos animais dos grupos doadores de fezes.

Existe uma relação fundamental entre o intestino e a saúde. A microbiota intestinal pode ser pensada como um sistema de órgãos, essencial para a aquisição de nutrientes, metabolismo de compostos indesejáveis, defesa contra a colonização por patógenos, desenvolvimento da arquitetura intestinal e do sistema imunológico (Pedron e Sansonetti, 2008; Round e Mazmanian, 2009), visto que o intestino representa o maior órgão linfóide do corpo humano, sendo responsável por 80% da resposta imunológica. Essa ação deve-se à presença de anticorpos e várias células imunocompetentes, dispersas no tecido conjuntivo e epitélio ou organizadas em estruturas, que exercem papel fundamental na apresentação antigênica e elaboração da resposta imune a microorganismos (Gill, 2006; Morais e Jacob, 2006).

A relação intestino e saúde é consolidada pelo conceito de permeabilidade intestinal, uma vez que as alterações da composição na microbiota intestinal, entre elas infecções, toxinas, estresse ou substâncias alimentares, podem levar a grave desregulação da homeostase intestinal fisiológica e imunológica. Essa desregulação pode acarretar alterações da permeabilidade intestinal, através da modificação da função de barreira gastrointestinal, com sérias consequências adversas para o hospedeiro, como a transferência de antígenos, incluindo a microflora residente através do intestino, e na sequência o desencadeamento de respostas imunológicas inapropriadas, como inflamação e reações autoimunes (Isolauri *et al.*, 1993; Round e Mazmanian, 2009).

O epitélio intestinal e sua cobertura protetora de mucina são as defesas primárias contra a permeação de micro-organismos (Fioramonti *et al.*, 2003). Ela fornece defesa contra patógenos, impedindo a penetração bacteriana do epitélio intestinal, desempenhando assim um papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal saudável (Van Klinken *et al.*, 1995; Makkink *et al.*, 2002).

Enquanto a microbiota provavelmente representa uma barreira física que impede que os patógenos penetrem na mucosa intestinal (Stecher e Hardt, 2008), outros estudos sugerem um grau muito maior de complexidade que envolve um papel direto da microbiota ao ditar o tom imunológico do intestino (Cash *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2006; Salzman *et al.*, 2007).

Durante o episódio séptico as bactérias multiplicam-se rapidamente, podendo atingir outros órgãos e sistemas através da corrente sanguínea. O sistema imune do hospedeiro, em resposta às toxinas bacterianas, participa da lesão tecidual associada à sepse. A resposta depende da capacidade de reconhecimento e neutralização do micro-organismo na corrente sanguínea e nos tecidos. Os eventos fisiopatológicos que ocorrem nesse processo são mediados por citocinas, ativadas em resposta à presença de componentes bacterianos no compartimento vascular (Saez- Llorenz e Cracken, 1993). A reação fisiológica em resposta à sepse, perda do equilíbrio basal entre os mediadores pró e pré-inflamatórios, podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento e disfunção de múltiplos órgãos (Gomez e Kellum, 2014).

Em animais, a administração de endotoxina provoca um aumento acentuado, mas transitório, de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Remick e Ward, 2005). No geral, observa-se um aumento em todos os marcadores analisados, tanto em dano oxidativo como em inflamatórios, após a administração do LPS comparados aos grupos *sham*.

Os resultados do presente estudo corroboram com trabalhos já publicados, em que o modelo de sepse induzida por LPS aumenta os níveis de marcadores de inflamação e dano oxidativo (Harkness, 1981; Hampton *et al.*, 1998; Gellerich *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Akira e Takeda, 2004; Schinkel *et al.*, 2005; Marshall, 2005; Dyson e Singer, 2009).

Além disso, o LPS, como esperado, provoca um aumento da permeabilidade da barreira epitelial intestinal. Fato esse que pode ser um dos "motores" da persistência da inflamação sistêmica após a administração de uma única dose de LPS. Portanto, neste experimento, o

modelo animal de indução de sepse teve sucesso e foi decisivo para que fossem avaliados os efeitos sistêmicos da administração de simbióticos em sepse pediátrica.

O efeito dos probióticos sobre o sistema imune tem sido alvo de numerosos estudos ao longo dos últimos 20 anos. Os mecanismos exatos através dos quais os probióticos possam contribuir para a normalização da função de barreira gastrointestinal ainda não estão totalmente elucidados (Gill, 2003). Sabe-se que certas estirpes de *lactobacillus* são capazes de estimular, bem como regular vários aspectos da resposta imune natural e adquirida. O padrão de colonização pode ser favoravelmente influenciado pelos probióticos, que excluem competitivamente os micro-organismos patogênicos do trato digestivo (Kirjavainen e Gibson, 1999).

Um importante mecanismo de ação probiótica é a capacidade dos probióticos de afetar benéficamente o hospedeiro. Isso ocorre por efeitos diretos sobre a microbiota. Tradicionalmente, a maior atenção é dada às propriedades antipatológicas dos probióticos por competição de nutrientes, a produção de agentes antimicrobianos ou exclusão competitiva. No entanto, as interações sinérgicas também poderiam ocorrer entre probióticos e os membros endógenos benéficos da microbiota. O mecanismo antipatogênico é conhecido como exclusão competitiva, e geralmente requer que os lactobacilos probióticos sejam administrados de maneira preventiva (Lebeer *et al.*, 2008). Grupos populacionais mais suscetíveis a infecções nosocomiais, como população pediátrica, podem apresentar uma microbiota alterada, principalmente em situações clínicas como a sepse. Essa população poderia se beneficiar da suplementação com simbióticos, que poderiam induzir uma influência na comunidade benéfica da microbiota intestinal e assim formar uma "barreira" contra patógenos comuns (Wang *et al.*, 2014).

A maioria dos probióticos estudados pertencem aos gêneros *lactobacillus*, *bifidobacteria* e *sacharomyces*, além do *streptococcus thermophilu* (Schwiertz *et al.*, 2003). Vários mecanismos pelos quais os probióticos podem contribuir para a defesa do hospedeiro são sugeridos pelos pesquisadores. Estes incluem o reforço das defesas não imunológicas do trato gastrointestinal (secreção de substâncias antimicrobianas, concorrência para a aderência, secreção de muco, estabilização da barreira mucosa e melhorias na motilidade do intestino) e o aumento de respostas imunes não específicas e específicas (estimulação da produção de citocinas, capacidade fagocítica das células polimorfonucleares e macrófagos, atividade de células natural killer e aumento das respostas de anticorpos específicos, especialmente de IgA na

mucosa) (Madsen *et al.*, 2001; Heyman e Heuvelin, 2006; Saad, 2006; Mimeo *et al.*, 2016).

Alguns estudos sugerem que cepas específicas de *lactobacillus* possam exercer os seus efeitos benéficos através da alteração do gene que influencia a regulação da expressão da mucina, esta por sua vez participa da composição e libertação de muco que forma a camada de barreira intestinal, e assim atenuando as respostas pró-inflamatórias (Mack *et al.*, 1999; Gill, 2006).

Recentemente, a utilização de probióticos para reduzir o estresse oxidativo tem sido proposto (Rijkers *et al.*, 2011). Estudos têm estabelecido o papel antioxidante dos *lactobacillus*, principalmente os *acidophilus* e *casei* (Singh *et al.*, 2009; Amdekar *et al.*, 2010; Amdekar *et al.*, 2012). Os probióticos podem reduzir o estresse oxidativo, diminuindo a IL-1, TNF- α e, conseqüentemente, a produção de citocinas (Bahram *et al.*, 2011). Outro mecanismo proposto para a ação protetora da microflora comensal está na sua capacidade para evitar a ubiquitinação do I- κ B, uma molécula que se liga no citoplasma de fator nuclear kappa B, um fator crítico que estimula a produção de mediadores inflamatórios (Neish, 2009).

Foi observada uma melhora nos marcadores inflamatórios (MPO, IL-1, IL-6 e TNF- α) e de dano oxidativo (TBARS), com o uso dos simbióticos. O tempo de tratamento de 15 dias foi mais eficaz do que o de sete dias, na redução desses parâmetros. Alguns estudos mostram que há um tempo de adaptação fisiológica, entre o início do tratamento de simbióticos e o surgimento dos resultados esperados (Fooks e Gibson, 2002; Dalcenserie *et al.*, 2008; OMGE, 2011). Talvez o período de tratamento por sete dias não seja suficiente para que ocorra essa adaptação, e assim potencializar os benefícios do uso de simbióticos. Sabe-se também que a microbiota intestinal pode influenciar a função imunológica para além do intestino (Maslowski e Mackay, 2011).

Os resultados aqui apresentados corroboram esse achado, pois os efeitos benéficos do tratamento profilático com os simbióticos estenderam-se para além do intestino, como para o cérebro, rim, pulmão. Porém, o intestino delgado parece ser o que apresentou uma resposta mais evidente na reversão dos parâmetros avaliados, uma vez que todos os marcadores tiveram uma redução significativa após a administração de simbióticos. Esses resultados podem ser decorrentes de um mecanismo de redução da permeabilidade intestinal.

É possível que diferentes cepas bacterianas induzam funções imunológicas distintas (Round e Mazmanian, 2006). Tem sido demonstrado que existem diferenças significativas entre a capacidade de

estirpes de *bifidobacterium* e *lactobacillus* em influenciar o funcionamento do sistema imunológico, e que este pode contribuir para diferenças na eficácia de vários probióticos (Gill, 2006). Portanto, o equilíbrio entre inflamação e homeostase no intestino pode ser devido à composição da microbiota (Round e Mazmanian, 2006).

As várias estirpes de *lactobacillus* podem gerar respostas imunológicas diferentes em relação às respostas pró ou anti-inflamatórias (Lebeer *et al.*, 2008). No entanto, evidências atuais apoiam a ideia de que certas bactérias benéficas têm moléculas evoluídas (conhecidas como fatores de simbiose) que induzem respostas imunitárias intestinais protetoras. O conhecimento de quais espécies benéficas de bactérias podem prevenir ou curar doenças e o aproveitamento do potencial imunossupressor dos fatores de simbiose serão passos importantes para a concepção de novas terapêuticas naturais para diversas doenças, entre elas a sepse pediátrica (Round e Mazmanian, 2006).

Os resultados aqui descritos mostram diferenças significativas entre as bactérias probióticas avaliadas, observa-se que elas agem de maneira diferente nos tecidos e parâmetros avaliados. Por exemplo, no tecido intestinal os probióticos e prebióticos associados, os chamados simbióticos, parecem exercer um maior efeito protetor do que as cepas usadas isoladamente, exceto IL-1.

Já no tecido pulmonar chamam atenção os efeitos protetores dos *lactobacillus rhmanosus*. No tecido renal parece que os *lactobacillus casei* têm um efeito protetor diferenciado, exceto no carbonil e na técnica de MPO, destacando-se nessa ordem os simbióticos e os *lactobacillus acidophilus*. No tecido cerebral a redução dos parâmetros inflamatórios e de danos oxidativos fica menos evidente.

Quando são avaliados os efeitos protetores dos probióticos por marcadores de danos oxidativos e inflamatórios observamos que os *lactobacillus achidophilus* têm efeitos protetores significativos nos tecidos avaliados, exceto no cérebro, quando avaliamos o MPO. A IL-1 demonstrou redução após administração de *lactobacillus casei* e *rhmanosus*. Já a IL-6 e o TNF- α não apresentaram um padrão de comportamento, relativo aos seus parâmetros alterados, conforme a cepa probiótica.

Quando avaliados os marcadores de dano oxidativo TBARS, os *lactobacillus rhmanosus*, *casei* e *acidhopilus* dividem-se como os maiores responsáveis pela redução desse marcador, diversificando seus efeitos entre os tecidos avaliados. Já nas proteínas carboniladas o grupo que recebeu os simbióticos parece ter os melhores efeitos redutores nesse

marcador. Quanto à concentração de nitrito/nitrato, fica difícil definir qual cepa probiótica teve os melhores efeitos protetores, em todos os tecidos.

Esses resultados corroboram com a literatura, de que ainda não se sabe ao certo qual o potencial benéfico de cada cepa, o que não permite afirmar com certeza qual teria um maior efeito imunomodulatório. Entretanto, quando avaliados os efeitos da administração de simbióticos em cultura de linfonodos mesentéricos, não são observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados. Esses resultados sugerem que as diferenças na translocação bacteriana não explicam os resultados observados na inflamação sistêmica.

Sem dúvida, os probióticos variam em sua eficácia conforme a espécie. Aqueles que demonstraram ser mais eficientes são provavelmente cepas mais adaptadas para sobreviver às condições físico-químicas agressivas presentes no trato gastrointestinal. Isso inclui ácido gástrico, secreções biliares e a competição com a microflora residente (Oozeer *et al.*, 2006; Round e Mazmanian, 2009; Thomas e Greer, 2010; Tachon *et al.*, 2014).

Entretanto, as meta-análises têm sido conduzidas avaliando dados sobre diferentes cepas de probióticos, embora já se saiba que as propriedades probióticas diferem significativamente entre as cepas. E, portanto, nenhuma comparação deve ser feita sobre os resultados de pesquisas com diferentes cepas de probióticos (Isolauri, 2004; Bernardo *et al.*, 2013; Alfaleh e Anabrees, 2014).

Embora muitas dessas cepas probióticas diminuam as atividades metabólicas tóxicas da microbiota, evidências mostram que esses micro-organismos podem modular as respostas imunes intestinais. A característica comum a quase todas as espécies bacterianas, que são usadas como probióticos, é a sua capacidade de controlar a inflamação (Marteau *et al.*, 2001; Round e Mazmanian, 2009; Gagnière *et al.*, 2012). Apesar de serem necessários mais estudos para determinar as respostas imunes benéficas que são induzidas pela microbiota, é importante considerar a noção teleológica entre as bactérias benéficas e a prevenção ativa de doenças ocasionadas por micro-organismos infecciosos.

Se isso for de fato comprovado, então uma aliança evolutiva tem sido estabelecida entre os mamíferos e as bactérias, o que é crucial para manter a sobrevivência a longo prazo de ambos. Ou seja, o bem-estar do indivíduo depende dos micro-organismos que habitam seu trato gastrointestinal. Os pesquisadores estão voltando sua atenção para a compreensão de como (e, mais importante, por que) mamíferos abrigam milhões de bactérias simbióticas (Round e Mazmanian, 2006; Hooper, 2009).

O uso de probióticos pode restaurar a função de barreira da mucosa (Dicksved *et al.*, 2012). No entanto, pode ser difícil erradicar completamente as bactérias prejudiciais e seletivamente restaurar e manter uma comunidade de bactérias saudáveis. O transplante de microbiota fecal (TMF) tem recebido muita atenção do público (Van Nood *et al.*, 2013), devido às taxas de sucesso dessa terapia e os mínimos riscos de efeitos colaterais (Bakken *et al.*, 2011).

As doenças inflamatórias intestinais já são alvo dessa terapia (Bennet e Brinkman, 1989; Kunde *et al.*, 2013; Kao *et al.*, 2014; Konig e Brummer, 2014; Shanahan e Quigley, 2014), os resultados benéficos desse tratamento têm gerado interesse na aplicação da presente terapia para o tratamento de outras doenças, tais como diabetes (Udayappan *et al.*, 2014), obesidade, esteatose hepática e doença cardiovascular (Smits *et al.*, 2013).

Os resultados aqui apresentados mostraram benefícios importantes na redução da inflamação sistêmica e de dano oxidativo, com o uso de prebióticos, probióticos e/ou simbióticos. Na linha de pensamento dos estudos citados no parágrafo anterior, de que o TMF pode trazer benefícios adicionais, foi avaliado o papel da microbiota *per se* na sepse.

Curiosamente, os grupos transplantes controle, de uma maneira geral, não apresentaram diferenças significativas comparados aos grupos transplantes com suplementação prévia de probióticos. As lâminas de histologia corroboram com os resultados aqui apresentados, pois observa-se pouca ou nenhuma diferença entre os grupos transplantes. Esses resultados demonstram que a microbiota tem papel protetor independente da colonização exógena com os *lactobacillus*.

6 CONCLUSÃO

A compreensão de como a microbiota intestinal pode afetar a saúde ainda não está totalmente elucidada. Sabe-se que os simbióticos se comportam de forma diferenciada nas mais variadas situações clínicas. Além disso, as diferentes cepas de probióticos variam na sua capacidade de exercer efeitos imunomoduladores. Devido a esse fato, é essencial o aprofundamento das pesquisas para estabelecer os efeitos específicos de cada cepa.

O impacto que as comunidades microbianas têm sobre a saúde humana está fornecendo novos caminhos terapêuticos para implementar o tratamento de algumas doenças, entre elas destaca-se a sepse pediátrica. O reconhecimento do mundo microbiano e os efeitos na composição da microbiota, assim como sua participação na inflamação, podem ter profundas consequências para a saúde das futuras gerações.

Com base nos resultados aqui apresentados, é possível concluir que ambos, os simbióticos e o TMF, podem oferecer um benefício imunomodulatório adicional ao tratamento medicamentoso, e assim podendo vir a ser uma opção de abordagem no manejo terapêutico de pacientes pediátricos com sepse.

REFERÊNCIAS

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(7):499-511.

Ajuebor MN, Virag L, Flower RJ, Perretti M, Szabo C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunol*. 1998; 95: 625-630.

Alfaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Rev J*. 2014; 9 (3): 584-671.

Alves-Filho JC, Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34:461-470.

Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:4018- 4023.

Amdekar S, Dwivedi D, Roy P, Kushwah S, Singh V. Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 58(3):299-306.

Amdekar S, Roy P, Singh V, Kumar A, Singh R, Sharma P. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. *Int J Inflam*. 2012.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinkys MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2011; 29:1303-1310.

Angus DC, Poll T Van Der. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369:840–51.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Bertalen M. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473:174–180.

Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA, Moore T. A. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 9:1044–1049.

Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA, Moore TA. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; 9(12), 1044-1049.

Baştürk A, Artan R, Yılmaz A. Efficacy of synbiotic, probiotic, and prebiotic treatments for irritable bowel syndrome in children: A randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol*. 2016; 27:439-43.
Bengmark S, Urbina JJ. Simbióticos: uma nueva estratégia em el tratamiento de pacientes críticos. *Nutr hosp*. 2005; 20(2): 147-156.

Bennet JD, Brinkman M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet*. 1989; 1:164.

Bernardo WM, Aires FT, Carneiro RM, Sá FPD, Rullo VEV, Burns DA. Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. *J pediatr*. 2013; 89 (1):18-24.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(1), 1.

Biswal S, Remick DG. Sepsis: redox mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9 (11):1959–1961.

Bone RC. The sepsis syndrome: definition and general approach to management. *Clin Chest Med*. 1996; 17(2), 175-181.

Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol*. 2003; 37:42 – 47.

Bozza FA, D'Ávila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Schock*. 2013; 39 (1):10-6.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:854 – 865.

Callahan LA; Nethery D; Stofan D; Dimarco A; Supinski G. Free radical induced contractile protein dysfunction in endotoxin induced sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24: 210-217.

Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(7): 1716–1723.

Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006; 313:1126–1130.

Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20: 345-352.

Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care*. 2009; 37: 291-304.

Coates NJ, McColl SR. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. *J Immunol*. 2001; 166: 5176-5182.

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006; 27: 352-357.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents actions*. 1989; 26(3-4):335-341.

Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol*. 2008; 10(1-2): 37-54.

- Dellinger Phillip M R *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock 2012. Special Artic. 2013; 41(2):580–637.
- Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *The Lancet*. 2007; 369 (9573):1614-1620.
- Despond O, Proulx F, Carcillo JA, Lacroix J. Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2001; 13(3): 247–253.
- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007; 449, 811–818.
- Dicksved J, Schreiber O, Willing B, Petersson J, Rang S, Phillipson M, Roos S. *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PloS one*. 2012; 7(9): 46399.
- Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*. 2009; 37(1): 30-S37.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308 (5728),1635-1638.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186: 407-421.
- Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013; 50 (1), 23-36.
- Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of Probiotics on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents: A Randomized Clinical Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016.

- Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2014; 33(2): 79-97.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd Bras.* 1997; 43 (1), 61-68.
- Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17(5): 711-724.
- Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:433-439.
- Fooks L, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut ora. *Br J Nutr.* 2002; 88 (1): 39-49.
- Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008; 24: 4–10.
- Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, Bonnet M. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(2): 501.
- Garland SM, Tobin JM, Pirota M, Tabrizi SN, Opie G, Donath S, Tang ML, Morley CJ, Hickey L, Ung L, Jacobs SE. The ProPrams trial: investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:210.
- Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Zierz S, Redl H. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep.* 2002; 22: 99 –113.
- Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17(5): 755-773.

Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312(5778): 1355-1359.

Goldstein, Brahm; MD; Brett Giroir, MD; Adrienne Randolph, MD; and the Members of the International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6 (1), 2-8.

Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014; 41(1): 3.

Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal biochem*. 1982; 126:131–8.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2), 231-255.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998; 92:3007–3017.

Hanna N. Sepsis and septic shock. *Top Emerg Med*. 2003; 25(2)158-65.

Harkness RA. The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte and its biochemistry. *Molec Aspects Med*. 1981; 4:191-207.

Hayes SR, Vargas AJ. Probiotics for the Prevention of Pediatric Antibiotic-Associated Diarrhea. *Explore*. 2016.

HeenK, Dalpke A. TLR-induced negative regulatory circuits: Role of suppressor of cytokine signaling (SOCs) proteins in innate immunity. *Vaccines*. 2003;(2):61-67.

- Heyman M, Heuvelin E. Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique: le paradoxe. *Nutr Clin Metabol.* 2006; 20: 85-94.
- Hill N, Saeed S, Phadke R, Ellis M, Chambers D, Wilson D, et al. Detailed characterization of a long-term rodent model of critical illness and recovery. *Crit Care Med.* 2015; 43(3): e84–96.
- Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat Med.* 2012; 18 (1):128–134.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host–bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001; 292:1115–1118.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22 (1): 283-307.
- Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:367–374.
- Hord NG, Eukaryotic-microbiota crosstalk: potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics. *Annu Rev Nutr.* 2008. 28: 215-31.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med.* 2003. 348(2): 138-150.
- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T *et al.* Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rates. *Gastroenterol.* 1993; 105: 1643–1650.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; 18(2): 299-313.
- Ivanov II, Frutos DL, Manel R, Yoshinaga R, Rifkin K, Sartor RB, Littman DR. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008; 4:337–349.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.

Johnson-Henry KC, Abrahamsson TR, Wu RY, Sherman PM. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *Adv Nutr.* 2016;7(5):928-937.

Johnston, Bradley C, Goldenberg JZ., Parkin PC. Probiotics and the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Infants and Children. *JAMA.* 2016; 316 (14):1484-1485.

Joint FAO. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, v.30, 2002.

Kao D, Hotte N, Gillevet P, Madsen K. Fecal microbiota transplantation inducing remission in Crohn's colitis and the associated changes in fecal microbial profile. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 48:625–628.

Kellermayer R, Nagy-Szakal D, Harris RA, Luna RA, Pitashny M, Schady D, Hollister EB. Serial fecal microbiota transplantation alters mucosal gene expression in pediatric ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2015; 110:604–6.

Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, Khoruts A, Surawicz C, Afzali A, Gordon S. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109:1065–71.

Kirjavainen PV, Gibson GR. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann med.* 1999; 31(4): 288-292.

Kolaczowska E, Seljelid R, Plytycz B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 33-42.

Konig J, Brummer RJ. Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes.* 2014; 4995: 247–261.

Kronman MP, Nielson HJ, Adler AL, Giefer MJ, Wahbeh G, Singh N, Suskind DL. Fecal microbiota transplantation via nasogastric tube for recurrent *Clostridium difficile* infection in pediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60(1):23-26.

Kuch BA, Carcillo JA, Han YY, Orr RA. Definitions of pediatric septic shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6(4): 501.

Kunde S, Pham A, Bonczyk S, Crumb T, Duba M, Conrad H, Kugathasan S. Safety, tolerability, and clinical response after fecal transplantation in children and young adults with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; 56: 597–601.

Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012; 40(3), 754-61.

Lebeer S, Vanderleyden J, Keersmaecker SC. "Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action." *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72 (4): 728-764.

Lee SW, Hong YS, Chun CM, Moon JD, Kim SJ, Jung IC, Yoon YH, Lee BA, Monn SW, Choi SH, Moon CK. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. *J Korean Med Sci*. 2002; 17:7-14.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods enzymol*. 1990; 186:464-478.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003; 29:530 –538

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008; 320, 1647–1651.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006; 124, 837–848.

Li M, Liang P, Li Z, Wang Y, Zhang G, et al. Fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation have comparable effects on the re-establishment of mucosal barrier function in mice with intestinal dysbiosis. *Front Microbiol*. 2015; 6:692.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.

Lynch SV. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in pediatric patients: encouragement wrapped in caution. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60 (1): 1-3.

Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing mucin gene expression. *Am J Physiol.* 1999; 276: 941–950.

Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Rev Immunol.* 2004; 4, 478–485.

Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, De Simone C Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterol.* 2001; 121: 580–591;

Makkink MK, Schwerbrock NM, Mähler M, Boshuizen JA, Renes IB, Cornberg M, Enss ML. Fate of goblet cells in experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2002; 47:2286–2297.

Marshall JC, Dellinger RP, Levy M. The Surviving Sepsis Campaign: a history and a perspective. *Surg Infect.* 2010; 11(3), 275-281.

Marshall JC, Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med.* 2005;33: 502-505.

Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: Mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(5):391– 405.

Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2): 430-436.

Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunol.* 2011;12(1): 5-9.

Mastroianni CM, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Forcina G, D'Ettoire G, Santopadre P, Vullo V. Improvement in neutrophil and

monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1999; 13:883-890.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Azziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch*. 2012; 79(1):4-18.

Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014; 19:4–11.

Medzhitov R, Janeway CJR. Innate immune recognition: Mechanisms an pathways. *Immunol Rev*. 2000; 173: 89–97.

Mimee M, Citorik RJ, Lu TK. Microbiome therapeutics — Advances and challenges, *Adv Drug Deliv Rev*. 2016.

Minnaard R, Wagenmakers AJ, Combaret L, et al. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:2217-2225.

Moncada S, Higgs EA. Mechanisms of disease. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Engl Med*. 1993; 329: 2002-2012.

Morais MB, Jacob CMA. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. *J Pediatr*. 2006; 82 (5):289-196. Suplemento.

Moreira MEL, Lopes JMA, Caralho M. O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564.

Nandhini LP, Biswal N, Adhisivam B, Mandal J, Bhat BV, Mathai B. Synbiotics for decreasing incidence of necrotizing enterocolitis among preterm neonates—a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29 (5): 821-825.

Nathan, Points of control in inflammation. *Nature Rev Immun*. 2002; 420:846-52.

Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin*. 2009; 25: 677-702.

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterol.* 2009; 136 (1): 65–80.

Neu J, Caicedo R. Probiotics: protecting the intestinal ecosystem? *J Pediatr.* 2005; 147(2): 143-146.

O'Brien JM, Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. *The Am J Med.* 2007;120(12), 1012-1022.

Oliveira CF, Oliveira DS, Gottschald AF, Moura JD, Costa G A, Ventura AC, Troster EJ. ACCM/PALS haemodynamic support guidelines for paediatric septic shock: an outcomes comparison with and without monitoring central venous oxygen saturation. *Intensive Care Med.* 2008; 34(6), 1065-1075.

Oozeer R, Oozeer R, Leplingard A, Mater DD, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Corthier G. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5615–5617.

Opal S. Endotoxin scavengers as a therapeutic strategy for sepsis. In: *Cytokines in Severe Sepsis and Septic Shock.* Redl H, Schlag G (Eds). Basel, Birkhauser, 1999, pp 247–260.

Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 1103-1109.

Organização Mundial de Gastroenterologia (OMGE). *Guias práticos: Probióticos e Prebióticos*, 2011.

Park, J. and M.H. Floch, Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007; 36(1): 47-63.

Patel RM, Denning PW. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2015; 78 (3): 232-238.

Pedron T, Sansonetti P. Commensals, bacterial pathogens and 914. Intestinal inflammation: an intriguing ménage à trois. *Cell Host Microbe.* 2008; 3:344–347.

Pereira MA, Sannomiva P, Leme JG. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. *Diabetes*. 1987; 36:1307-1314.

Pierog A, Mencin A, Reilly NR. Fecal microbiota transplantation in children with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33 (11):1198-1200.

Portella, Viviane Gomes. Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida em modelo CLP (Cecal Ligation and Puncture): avaliação morfológica e de parâmetros renais. 2010. 75 f.:il.;29,5 cm.

Puupponen-Pimiä RAMA, Aura AM, Oksman-Caldentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen AK. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Sci Technol*. 2002;13(1): 3-11.

Regulations Requiring Manufacturers to Assess the Safety and Effectiveness of New Drugs and Biological Products in Pediatric Patients. *Pediatr Res*. 2003;108 –155.

Reiter PD. Neonatal pharmacology and pharmacokinetics. *Neoreviews*. 2002; 3(11): 229-236.

Remick DG, Ward PA: Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*. 2005; 24:7–11.

Rijkers GT, De Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr*. 2011;106 (09):1291-1296.

Rios-Santos, F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, Cunha FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175:490-497.

Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced

Treatment Technology. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2015; 45: 1827-1879.

Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:313–323.

Ruemmele FM, Ruemmele FM, Bier D, Marteau P, Rechkemmer G, Bourdet-Sicard R, Walker WA, Goulet O. Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009; 48(2): 126-41.

Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciên Farm*. 2006; 42 (1):1-16.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(8):662–680.

Saez-Lorenz X, MC Cracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in ppediatrics: current concepnets of terminology, pathophysiology and management. *J Pediatr*. 1993; 123-497-508.

Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*. 2007; 19:70–83.

Saran S, Gopalan S, Krishna TP. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition*. 2002; 18 (5): 393–396.

Sazawal S, Dhingra U, Sarkar A, Dhingra P, Deb S, Marwah D, Black RE. Efficacy of milk fortified with a probiotic *Bifidobacterium lactis* (DR-10TM) and prebiotic galacto-oligosaccharides in prevention of morbidity and on nutritional status. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2004; 13: S28.

Schinkel S, Schinkel C, Pollard V, Garofallo R, Heberle H, Reisner P, Herndon DN. Effects of endotoxin on serum chemokines in man. *Eur J Med Res*. 2005; 10:76 – 80.

Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized

preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 2003; 54(3): 393-399.

Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, Finlay BB. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect Immun.* 2008. 76:4726-4736

Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, Mangin I, Marteau P. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Therap.* 2006; 24(3), 11-18.

Shami NJE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17(2):227-36.

Shanahan F, Quigley EM. Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies. *Gastroenterol.* 2014; 146:1554–1563.

Sies H, Cadenas E. O estresse oxidativo: danos às células e órgãos intactos. *Philosophical Transactions, da Royal Society de Londres B: Ciências biológicas.* 1985; 311 (1152): 617-631.

Sikora JP, Chlebna-Sokol D, Krzyzanska-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. *Arch Immunol Ther Exp.* 2001; 49 (5): 399-404.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama.* 2016; 315 (8):801–10.

Singh B, Gautam SK, Verma V, Kumar M, Singh B. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe.* 2008; 14(3), 138-144.

Smits LP, Bouter KE, deVos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterol.* 2013; 145:946–953.

- Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* 2008; 16:107–114.
- Stephen AM, Cummings JH. The microbial contribution to human faecal mass. *J Med Microbiol.* 1980; 13: 45-56.
- Stoll BJ, Holman RC, Schuchat A. Decline in sepsis-associated neonatal and infant deaths in the United States, 1979 through 1994. *Pediatrics.* 1998; 102(2), e18-e18.
- Suskind, David L. et al. Fecal microbial transplant via nasogastric tube for active pediatric ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60 (1): 27-29.
- Tachon S, Lee B, Marco ML. Diet alters probiotic *Lactobacillus* persistence and function in the intestine. *Environ Microbiol.* 2014; 16:2915-2926.
- Tadimeti SR, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 269:917-925.
- Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics.* 2010; 126 (6), 1217-1231.
- Turnbaugh PJ, Levy RE, Hamady M, Fraser-Ligget C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007; 449, 804–810.
- Udayappan SD, Hartstra AV, Dallinga-Thie GM, Nieuwdorp M. Intestinal microbiota and faecal transplantation as treatment modality for insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177: 24–29.
- Underwood MA. Impact of probiotics on necrotizing enterocolitis. In *Seminars in Perinatology.* WB Saunders. 2016.
- Usami M, et al. Effects of perioperative synbiotic treatment on infectious complications, intestinal integrity, and fecal ora and organic acids in hepatic surgery with or without cirrhosis. *J Parenter Enteral Nutr.* 2011 May;35(3):317-28.

- Van Klinken BJ, Dekker J, Buller HA, Einerhand AW. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol.* 1995; 269:613–627.
- Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Speelman P. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2013; 368:407–415.
- Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet.* 2013; 381(9868):774–5.
- Vincent JL, Abraham E: The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:256–263.
- Vincent JL, Korkut HA. DEfining sepsis. *Clin Chest Med.* 2008; 29:589-590.
- Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ: Zymosan-induced generalized inflammation: Experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock.* 2005; 23:291-297.
- Vongbhavit K, Underwood MA. Prevention of necrotizing enterocolitis through manipulation of the intestinal microbiota of the premature infant. *Clinical therapeutics.* 2016;38 (4): 716-732.
- Wang H, Zhang W, Zuo L, Dong J, Zhu W, Li Y, Li J. Intestinal dysbacteriosis contributes to decreased intestinal mucosal barrier function and increased bacterial translocation. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 58 (4), 384–392.
- Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, et al: The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:695–701.
- Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiol.* 2008; v. 212, n. 9, p. 715-722,
- WHO - Young Infants Study Group. Bacterial etiology of serious infections in young infants in developing countries: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18(10): 17-22.

Wolkow PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res.* 1998; 47: 152-166,

Wlodarska M, Willing B, Keeney KM, Menendez A, Bergstrom KS, Gill N, Finlay BB Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect Immun.* 2011; 79; 1536–1545.

Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Inten Care Med.* 2000; 26: 474-476.

Zhou I, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Ziegler SF. Tgf- β -induced foxp3 inhibits t_h17 cell differentiation by antagonizing ror γ t function. *Nature.* 2008; 453 (7192), 236-240.

ANEXO

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 16/2014

Professor Responsável: Felipe Dal Pizzol.

Equipe: Larissa de Souza Constantino, Monique Michels e Pricila Romão Marcondes Ávila.

Título: “Efeitos da suplementação de diferentes probióticos e prebióticos em modelo animal de sepse neonatal ”

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 690 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 16/2014

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol.

Researchers: Larissa de Souza Constantino, Monique Michels e Pricila Romão Marcondes Ávila..

Project title: "Effects of different supplementation with prebiotic and probiotic in animal model of neonatal sepsis."

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 16 de fevereiro de 2014.

Patricia Fernandez Schuck
Coordenadora da CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Efeitos da suplementação de diferentes probióticos e prebióticos em modelo animal de endotoxemia neonatal"**, Protocolo nº 058/2015-2 sob a responsabilidade de **Felipe Dal Pizzol**, equipe: **Pricila Romão Marcondes Ávila, Franciele Vuolo e Monique Michels**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	02/02/2016 a 31/10/2016
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo Wistar
Nº. De animais	140
Peso/Idade	10 a 15g, 07 dias
Sexo	M/F
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 058/2015-2

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers: Pricila Romão Marcondes Ávila, Franciele Vuolo e Monique Michels.

Project title: "Effects of different supplementation with probiotic and prebiotic in animal model of endotoxemic neonatal".

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 15 de dezembro de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCCHE
Coordenador da CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito do transplante de microbiota fecal com ou sem probióticos em diferentes modelos animais de sepse pediátrica.**", registrada com o protocolo nº **048/2016-2**, sob a responsabilidade de **Felipe Dal-Pizzol**, junto à equipe: Pricila Romão Marcondes Ávila, Monique Michels - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **18/10/2016**.

Finalidade	(X) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/11/2016 a 31/11/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	120
Idade/Peso	07 dias / 10 a 15g
Sexo	Masculino/Feminino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Efeito do transplante de microbiota fecal com ou sem probióticos em diferentes modelos animais de sepse pediátrica.**"

Protocol number: **048/2016-2**

Principal Investigator: **Felipe Dal-Pizzol**

Researchers: **Pricila Romão Marcondes Ávila, Monique Michels.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 18 de outubro de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA