



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

FELIPE EDUARDO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE *Lactobacillus*
ramnosus EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS
ESTIMULADOS COM LIPOPOLISACARÍDEO,
ÁCIDO LIPOTEICÓICO E MANANA**

2013

FELIPE EDUARDO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE *Lactobacillus*
rhamnosus EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS
ESTIMULADOS COM LIPOPOLISACARÍDEO, ÁCIDO
LIPOTEICÓICO E MANANA**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira
Co-orientadora: Mariella Vieira Pereira Leão

São José dos Campos

2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Titular Antônio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Célia Regina Gonçalves e Silva

Instituto Básico de Biociências

UNITAU – Universidade de Taubaté

São José dos Campos, 18 de Dezembro de 2013.

Dedicatória

A Deus

A minha mãe

Ao meu pai

Aos meus irmãos

A todos os meus amigos

Aos meus mestres

Agradecimentos

À Deus, em primeiro lugar, que com toda sua bondade e sabedoria, me deu discernimento e resiliência para enfrentar os meus obstáculos. Pai, eu Lhe agradeço de todo coração e serei eternamente grato por tudo que me concedeu.

À mulher mais importante de toda a minha vida, minha mãe. Mãe, você é meu exemplo de fortaleza na adversidade. Se um dia eu for metade do que você é, serei extremamente honrado e realizado em minha vida. Nunca fomos muito bons com palavras, mas hoje eu te compreendo e sei exatamente o amor e o zelo que cada gesto e cada olhar que você tem sobre mim carregam, Eu nada seria sem você na minha vida, eu te amo!

Ao meu pai, que mesmo afastado por anos, foi capaz de me acolher e aceitar quem sou. Um homem bom de coração e que me causa inveja com sua simplicidade e humildade. De poucas palavras mas de muita atitude, capaz de derrubar qualquer um com uma simples palavra. Pai, obrigado por ser tão maravilhoso comigo, eu te amo!

Ao meu padrasto, Agnaldo, por tudo que ele fez por mim. Sempre presente em toda a minha vida e sempre fazendo de um tudo por mim. Muito obrigado pela amizade!

À minha madrastra, Elizabete, sempre amorosa e brincalhona. Seu jeito sempre sincero e descontraído sempre me cativaram e eu sou muito grato por tudo que você me fez!

Aos meus irmãos Ícaro, João Vitor, Gui, Luciana, Jean, Camila, Rafa e Ariana, meus primos Rafael e Fernanda, minhas tias Marli e Cida, meu avô Pacífico e minha avó Helena. Vocês todos tem um lugar especial no meu coração e na minha vida. Amo todos vocês.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, nas pessoas do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos,

Professor Doutor Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor, Professor Doutor Estevão Tomomitsu Kimpura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora, Professora Doutora Juliana Campos Junqueira pela disposição em ajudar e desejo de sempre fazer o melhor pelo programa e pelo corpo discente.

À Professora Doutora Luciane Dias de Oliveira, minha orientadora, que se tornou uma pessoa muito querida por mim. Desde o primeiro contato, quando me recebeu de braços abertos em sua sala, eu senti que Deus havia me colocado ao lado de uma pessoa especial. Mesmo sem me conhecer muito, ela confiou no meu trabalho, o que, para mim, significou muito. Lu, eu te agradeço por tudo que você me ensinou, você não imagina o quanto eu cresci e amadureci como seu aluno. Obrigado por ser essa orientadora e amiga maravilhosa. Você tem minha gratidão, respeito, lealdade e carinho, hoje e sempre.

À Professora Doutora Mariella Vieira Pereira Leão, minha co-orientadora por toda a sua ajuda nos momentos difíceis e por ter se mostrado sempre interessada e pronta para ajudar nos momentos em que precisei. Você foi indispensável para o desenvolvimento desta dissertação, muito obrigado.

Ao Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, não só por fazer parte da minha banca examinadora, mas por seus ensinamentos e apoio dado no final da graduação. Eu jamais esquecerei o suporte e as palavras de incentivo dadas a mim. Obrigado por tudo, Professor Olavo.

À Professora Doutora Célia Regina Gonçalves e Silva por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora da minha dissertação de Mestrado, pela simpatia e presteza.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, por todos os ensinamentos passados.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Marcelo por anos e anos de amizade, muitas histórias, respeito e cumplicidade. Obrigado por me entender e ter estado ao meu lado desde sempre. Amo você!

À Rosana por toda a amizade, o amor, os carinhos e os puxões de orelha de mãe postiça que sempre recebi. Você consegue cativar um amor em mim que é único. Amo você!

À Vera por toda a amizade, o amor, os carinhos e os puxões de orelha de irmã mais velha que sempre recebi. Não vejo mais a minha vida sem você nela, amo você!

À Vivian, por toda a amizade e companheirismo. Seu apoio e lealdade sempre me moveram. Obrigado por sempre acreditar em mim. Você não imagina como isso é importante para mim e como isso me toca. Eu te amo!

À Érica, por toda a nossa antiga amizade. Obrigado por esses 8 anos de amizade sincera. Você é uma pessoa essencial em minha vida. Obrigado por sempre me ouvir e apoiar. Eu te amo!

À Rose, por toda a amizade e a caminhada. Ter você ao meu lado sempre foi maravilhoso. Seu jeito sempre carinhoso é muito importante para mim. Eu te amo!

À Professora Doutora Graziella Back-Brito por toda a amizade e por sempre acreditar em mim. Estimular um aluno não faz somente com que ele se desenvolva, faz ele criar afeto por você também.

Ao Professor Doutor Bruno Mattos por toda a amizade, as histórias e bons conselhos, sempre. Você foi o melhor amigo que encontrei na faculdade, levarei sempre comigo sua cumplicidade e lealdade.

À Professora Doutora Polyana das Graças Figueiredo Vilela, que sempre esteve presente comigo no laboratório e hoje é uma amiga sem igual. Eu serei sempre grato a você, Poly, por tudo que você me ensinou e pelo quanto me fez crescer. Amo você, Magrela!

Aos amigos do laboratório que sempre estiveram presentes, compartilhando todas as suas dificuldades e alegrias diárias e ajudando em tudo que fosse possível. Obrigado pelo companheirismo.

À Ana Cláudia Xavier que me ajudou muito para a conclusão da minha dissertação. Se não fosse a sua ajuda, eu não sei o que seria de mim, Ana! Obrigado não só pela ajuda, mas principalmente pela amizade, companheirismo e paciência.

Aos meus amigos de república, Rodnei, Evelyn e Tânia. Morar com vocês faz o pior dos dias não parecer tão ruim. Obrigado por toda a amizade, pelos bons momentos e pelo carinho. Deus não poderia ter colocado pessoas melhores no meu caminho para formar um lar. Vocês são demais.

À Emily Hashimoto Miranda por toda a amizade, cumplicidade e pelas conversas maravilhosas. Te amo muito, Top!

Às minhas amigas de longa data e muitas histórias Camilinha, Aline, Jéssica e Heloíse.

Aos técnicos do laboratório, Sérgio, por toda a sua amizade, ajuda no laboratório, conselhos e boas risadas, e Domingos, por toda a amizade e ajuda.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e aprimoramento, seja ele profissional ou pessoal.

*“É preciso amar as pessoas
Como se não houvesse amanhã
Porque se você parar pra pensar
Na verdade não há.”*

Renato Russo

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Probióticos e sua relação com a resposta imune.....	18
2.2 Constituintes das paredes celulares microbianas.....	23
2.2.1 Lipopolissacarídeo (LPS).....	23
2.2.2 Ácido Lipotecóico (LTA).....	26
2.2.3 manana.....	28
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	33
4.2 Moléculas microbianas.....	34
4.3 Cultura de macrófagos.....	34
4.4 Ensaio de ativação celular.....	36
4.5 Detecção e quantificação de citocinas.....	39
4.6 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Fator de necrose tumoral- α	42
5.2 Interleucina-1 β	47
5.3 Interleucina-4.....	52
5.4 Interleucina-6.....	54

5.5 Interleucina-10.....	59
5.6 Interleucina-12.....	64
6 DISCUSSÃO.....	69
6.1 Fator de necrose tumoral-α.....	70
6.2 Interleucina-1β.....	75
6.3 Interleucina-4.....	77
6.4 Interleucina-6.....	79
6.5 Interleucina-10.....	82
6.6 Interleucina-12.....	84
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS.....	87

Oliveira FE. Atividade imunomoduladora de *Lactobacillus rhamnosus* em macrófagos de camundongos estimulados com Lipopolissacarídeo, Ácido Lipoteicóico e manana. [dissertação] São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Paulista; 2013.

RESUMO

Os probióticos são capazes de equilibrar a microbiota residente e modular a resposta imune aos diferentes estímulos microbianos, entretanto, seus efeitos imunomoduladores ainda não estão claramente elucidados. O presente estudo avaliou o efeito imunomodulador de *Lactobacillus rhamnosus* ou seus produtos sobre macrófagos (RAW 264.7) ativados por lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico (LTA) ou manana, pela análise da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12). Foi utilizada a cepa padrão de *L. rhamnosus* ATCC 7469, semeada em Ágar Man-Rogosa-Shape (MRS) e cultivada a 37°C/5% CO₂ por 24 h. Foram empregadas três diferentes preparações de probióticos: 1) *L. rhamnosus* vivo (LV) na concentração de $2,5 \times 10^7$ células/mL; 2) *L. rhamnosus* morto (LM) obtido por autoclavagem da preparação anterior a 121°C/15 min; 3) Sobrenadante da suspensão de *L. rhamnosus* (SL), resultante da centrifugação da suspensão LM a 8300 xg/10min. Foram utilizados macrófagos de camundongos (RAW 264.7), cultivados em meio DMEM completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino) foram distribuídos em microplacas de poliestireno na concentração de 5×10^5 células viáveis/poço/mL de meio DMEM completo. Após 24 h de incubação (37°C/5% CO₂) para adesão celular, as placas foram lavadas com PBS estéril e apirogênico e as células foram estimuladas com LPS de *Escherichia coli*, LTA de *Streptococcus faecalis* ou manana de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 1 μ g/mL, na presença ou ausência das diferentes preparações dos probióticos por 2,5h. Em seguida as placas foram lavadas com PBS, tiveram seu meio trocado e foram incubadas por 16

h (37°C/5% CO₂). Os sobrenadantes das culturas foram coletados para a detecção e quantificação das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) pelo método imunoenzimático ELISA. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Com exceção da IL-4 (citocina anti-inflamatória), a produção de todas as demais citocinas foi estimulada pelas moléculas microbianas com diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com as diferentes preparações de *L. rhamnosus* ($p < 0,001$) e o controle negativo da cultura celular. LPS foi o indutor antigênico mais potente, seguido de manana e LTA. Concluiu-se que as diferentes preparações de *L. rhamnosus* foram capazes de modular a resposta de macrófagos frente aos desafios das moléculas microbianas (LPS, LTA, manana), regulando a produção de todas as citocinas avaliadas, com exceção da IL-4, de acordo com a força do estímulo microbiano.

Palavras-chave: Probióticos. Imunomodulação. Ativação de macrófagos. Citocinas.

Oliveira FE. Immunomodulatory activity of Lactobacillus rhamnosus in mouse macrophages stimulated with Lipopolysaccharide, Lipoteicoic Acid and Mannan. [dissertation] São José dos Campos (SP), Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Paulista, 2013

ABSTRACT

Probiotics are able to balance the resident microbiota and modulate the immune response to different microbial stimuli, however its immunomodulatory effects are not clearly understood. This study intends to evaluate the immunomodulatory effect of Lactobacillus rhamnosus or its products on macrophages (RAW 264.7) activated by lipopolysaccharide (LPS), lipoteicoic acid (LTA) or mannan through the analysis of the production of pro and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12). It was used the standard strain of L. rhamnosus ATCC 7469, seeded on Agar Man-Rogosa-Shape (MRS) and grown at 37°C/5% CO₂ for 24 h. Three different preparations of probiotics were prepared: 1) L. rhamnosus solution at a concentration of 5×10^7 cells/mL; 2) Heat-killed L. rhamnosus, obtained by autoclaving previous preparation at 121°C/15 min, 3) Supernatant of L. rhamnosus suspension, obtained through centrifugation of the suspension with heat-killed probiotic at 8300 xg/10 min. Mouse macrophages (RAW 264.7) grown in complete DMEM medium (supplemented with 10% fetal bovine serum) were distributed in polystyrene microplates at a concentration of 1×10^6 viable cells/well/ml complete DMEM medium. After 24 h incubation (37°C/5% CO₂) for cell adhesion, plates were washed with sterile-apyrogenic physiologic saline and cells were stimulated with Escherichia coli LPS, Enterococcus faecalis LTA or Saccharomyces cerevisiae mannan at a concentration of 1 μ g/mL, in the presence or absence of the different preparations of probiotics at the same time for 2,5 h. Then the plates were washed, had its medium traded and were incubated for 16 h (37°C/5% CO₂). Culture supernatants were

collected for the detection and quantification of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12) by ELISA immunoenzymatic method. The results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey tests ($p \leq 0,05$). With the exception of IL-4 (anti-inflammatory cytokine), the production of all other cytokines was stimulated by microbial molecules with statistically significant difference among the groups treated with different preparations of L. rhamnosus ($p < 0.001$) and negative cell culture control. LPS was the strongest antigenic inducer, followed by mannan and LTA. It was concluded that different preparations of L. rhamnosus could modulate macrophages response against microbial challenges (LPS, LTA, mannan), regulating the production of all the tested cytokines, with the exception of IL-4, according to the strength of microbial stimulation.

Keywords: Probiotics. Immunomodulation. Activation of macrophages. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são preparações microbianas, preferencialmente de origem humana, que quando consumidas como suplemento alimentar são capazes de sobreviver no trato gastrointestinal humano e modular os sistemas fisiológicos do hospedeiro, incluindo o sistema imune, conferindo benefícios à saúde do mesmo (Mercenier et al., 2003; Reid et al., 2003; Caselli et al., 2011). A definição internacional de probióticos é dada pela Organização Mundial de Saúde (OMS): são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (*Food and agriculture organization of the United Nations*).

São muitos os micro-organismos que podem ser aplicados como probióticos. Dentre elas temos as bactérias ácido-láticas como os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias não ácido-láticas como algumas cepas das espécies *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* e leveduras, como o *Saccharomyces boulardii* (Coppola, Turnes, 2004; Williams, 2010).

Os efeitos salutareos dos micro-organismos probióticos no hospedeiro se dão por incremento das propriedades da microbiota pré-existente (nativa), entretanto, os mecanismos com que exercem sua função ainda não foram completamente elucidados. Alguns

processos, independentes ou associados, têm sido citados por alguns autores. Em um deles ocorre uma competição entre probióticos e patógenos por nutrientes e sítios de fixação, impedindo transitoriamente a ação deste último (Cross, 2002). Outro processo é transcorrido por síntese, pelos probióticos, de substâncias como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e algumas enzimas atuantes (Coppola, Turnes, 2004).

Para serem bem sucedidos em suas funções, os probióticos devem possuir determinadas características que resultem em efeitos benéficos mensuráveis na saúde do hospedeiro. Para tal, os probióticos devem ser específicos e compatíveis com o hospedeiro, com um histórico sem patogenicidade e com segurança para uso humano; devem ser capazes de resistir ao meio físico quando da passagem pelo tubo digestivo, quanto ao pH ácido e à ação biliar; devem estar aptos a aderir e colonizar a mucosa intestinal rapidamente, interagindo com outras espécies; devem ser metabolicamente ativos no intestino, capazes de estimular o sistema imune e produzir substâncias antimicrobianas, ao mesmo tempo que primam pela ausência de genes determinantes na resistência aos antibióticos (Saad, 2006).

Estudos demonstram que os probióticos são capazes de modular a resposta imune induzida por antígenos provenientes dos constituintes da parede celular de micro-organismos (Thomas et al., 2009; Liu et al., 2010). Os probióticos participam na imunomodulação da resposta imune de várias maneiras, seja favorecendo a atividade fagocítica inespecífica por meio da ativação dos macrófagos (Cross,

2002; Jain et al., 2008) ou alterando o equilíbrio de citocinas (Amital et al., 2007).

Sendo assim, torna-se importante analisar os efeitos imunomoduladores de *Lactobacillus rhamnosus* quando as células de defesa são estimuladas por importantes constituintes de bactérias Gram-negativas, como lipopolissacarídeo (LPS), de bactérias Gram-positivas, como ácido lipoteicóico (LTA) e de leveduras, como a manana (MAN), a fim de compreender melhor os benefícios dos probióticos bem como melhorar sua indicação terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos e resposta imune

Os probióticos tem se tornado, cada vez mais, um assunto de grande relevância dentro do meio científico. Procurando esclarecer os mecanismos pelos quais eles agem na microbiota residente ou na resposta imunológica do hospedeiro, alguns autores têm utilizado em seus estudos tanto os micro-organismos probióticos vivos, como somente alguns de seus componentes isolados (Gilbert et al., 2013; Ganguli et al., 2013; Habil et al., 2011; Miyazawa et al., 2011).

Veckman et al. (2004) analisaram a capacidade de bactérias Gram-positivas, *Streptococcus pyogenes* (patogênico) e *Lactobacillus rhamnosus* (não patogênico) de induzirem a maturação de células dendríticas derivadas do monócito humano. A estimulação das células dendríticas com *S. pyogenes* induziu produção de Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-12 (IL-12), além de algumas subunidades das interleucinas IL-23 e IL-27. Em contraste, o estímulo de *L. rhamnosus* sobre as células dendríticas produziu baixos níveis de citocinas e quimiocinas. Além disso, não houve produção de IL-2 ou IL-12. A maturação das células dendríticas e produção de citocinas e

quimiocinas induzida por bactérias foram reduzidas quando as bactérias foram inativadas pelo calor, demonstrando a propriedade imunomoduladora presente nos probióticos.

Ryu et al. (2009) avaliaram os efeitos imunoestimulatórios de três bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (patogênico), *Bacillus subtilis* (não patogênico) e *Lactobacillus plantarum* (probiótico) sobre macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7. Quando os macrófagos foram estimulados com uma suspensão de *S. aureus* ou *B. subtilis* mortos pelo calor houve uma produção de óxido nítrico dose dependente enquanto no caso de *L. plantarum*, houve uma produção mínima deste mediador inflamatório. Já LTA purificado de *S. aureus* ou *B. subtilis* induziu a produção de óxido nítrico e TNF- α , o que não aconteceu com LTA purificado de *L. plantarum*, que apresentou uma fraca indução dessas substâncias.

Liu et al. (2011) investigaram a atividade antioxidante e imunomoduladora dos exopolissacarídeos de *Lactobacillus paracasei* subespécie *paracasei* NTU 101 e *Lactobacillus plantarum* NTU 102 sobre células RAW 264.7. Os exopolissacarídeos apresentaram potencial antioxidante e induziram a produção de IL-6, IL-1 β e TNF- α , os quais variaram de acordo com a dose utilizada, podendo ser utilizados como um imunomodulador benigno para os macrófagos.

Embora os estudos de Veckman et al. (2004), Ryu et al. (2009) e Liu et al. (2011) tenham sido feitos com diferentes cepas bacterianas, todos rumam na direção dos mesmos resultados: a

indução de citocinas e outros mediadores das células avaliadas na resposta imune, frente ao estímulo probiótico, atinge níveis mais equilibrados. Ryu et al. (2009), no entanto, embasam a sua argumentação no fato de que as diferentes bactérias apresentam diferenças na constituição do seu LTA, o que propicia diferentes respostas do sistema imune, enquanto Liu et al. (2011) apontam os exopolissacarídeos como outro promotor dessa atividade imunomoduladora benéfica.

Muito comum também são os estudos feitos em modelos animais, saudáveis ou com doenças induzidas. Em 2012, Smelt et al. investigaram os efeitos imunomoduladores de duas cepas de lactobacilos tidos como probióticos, *L. plantarum* WCFS1 e *L. salivarius* UCC118, e uma cepa não probiótica, *Lactococcus lactis* MG1363, em ratos saudáveis. Todas as três cepas bacterianas reduziram a produção de citocinas por linfócitos T auxiliares do baço, após reestimulação *ex vivo*. O efeito sobre a produção de IFN- γ , IL-5, IL-10 e IL-17 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi dependente da cepa administrada. A imunomodulação sistêmica também foi observada, não só após tratamento com bactérias probióticas, mas também após o tratamento com bactérias não probióticas. Assim, os autores concluíram que em ratos saudáveis, os lactobacilos podem ajustar a imunidade de células T em favor de um estado que favoreça a defesa do hospedeiro.

Oliveira et al. (2011), Philippe et al. (2011), Jeon et al. (2012) e Zhao et al. (2013) investigaram o papel de vários probióticos, *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2116), *Bifidobacterium lactis*,

Bifidobacterium breve, e Bifico (uma mistura de bifidobactérias, lactobacilos e enterococos) na inflamação intestinal usando o modelo de colite experimental em ratos. Como resultados foram obtidos redução significativa na perda de peso dos animais, no infiltrado de neutrófilos e na expressão de IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ e aumento de IL-2, IL-4 e IL-10, concluindo-se que a administração desses probióticos foi segura e teve efeito preventivo contra a colite.

Villena et al. (2012) demonstraram que a administração via oral de *Lactobacillus rhamnosus* foi capaz de aumentar os níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-10 no trato respiratório de ratos expostos a uma molécula viral, modulando de modo benéfico a imunidade da mucosa respiratória.

Além disso, os probióticos podem apresentar papel regulador na microbiota oral, defendendo-a contra agentes infecciosos ou até mesmo oportunistas. Riccia et al. (2007) analisaram os efeitos anti-inflamatórios de *L. brevis* em pacientes com doença periodontal, os quais inibiram a produção de óxido nítrico. Iniesta et al. (2012) investigaram os efeitos de probióticos administrados via oral na microbiota oral e concluíram que houve redução no número de patógenos periodontais *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Dos Santos et al. (2009) avaliaram se o consumo de probióticos seria capaz de influenciar a resposta imunológica específica contra *Candida* e a presença dessas leveduras na cavidade bucal. Foi constatado que o uso de probióticos reduziu a contagem de *Candida* na cavidade bucal, principalmente devido a concorrência entre os micro-organismos e não tão somente devido a secreção de

fatores específicos da estimulação da resposta imune. Mendonça et al. (2012) avaliaram se o consumo do probiótico Yakult LB[®] (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*) foi capaz de influenciar a resposta imunológica contra *Candida* em indivíduos idosos. Os resultados mostraram que houve redução significativa na prevalência de *Candida* e um aumento significativo dos níveis de IgA anti-*Candida*. Matsubara et al. (2012) analisaram os efeitos de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* ou *L. rhamnosus*) em comparação com a nistatina em ratos imunossuprimidos, que foram submetidos a inoculação oral com *Candida albicans*. Os grupos dos probióticos apresentaram menos colonização por *C. albicans* na mucosa oral quando comparado com o grupo não tratado ou tratado com nistatina. Burton et al. (2013) constataram que a ingestão regular do probiótico *Streptococcus salivarius* M18 pode proporcionar benefícios a saúde oral, diminuindo a contagem de *Streptococcus mutans*, um dos principais micro-organismos envolvidos na etiologia da cárie de superfície lisa.

Estudos demonstraram também a ação dos probióticos na inibição da adesão de alguns micro-organismos. Segundo Candela et al. (2005), os probióticos podem desalojar as bactérias patogênicas e suas toxinas, previamente aderidas ao epitélio. Tinrat et al. (2011) observaram que *Lactobacillus salivarius* MTC 1026 inibiu significativamente o processo de adesão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 em monocamadas de Caco-2 (células de adenocarcinoma coloretal) além de reduzir a invasão de ambos os agentes patogênicos. Dhanani et al. (2013)

demonstraram que *L. plantarum* CS24.2 foi capaz de inibir a adesão de *Escherichia coli* e atenuar a expressão de TNF- α e IL-8 em células HT-29 (células de carcinoma do cólon).

A literatura aponta os probióticos como reguladores do sistema imune e de microbiotas das mucosas, promovendo o equilíbrio nos mesmos. Estudos têm demonstrando estimulação na liberação de citocinas pelas células do sistema imune, outros, inibição, ou ainda nenhum efeito sobre as mesmas (Torii et al., 2007; Segawa et al., 2008; Jang et al., 2012), de modo que este papel imunomodulador dos probióticos é de grande importância e requer estudos mais aprofundados a fim de compreender melhor seu mecanismo de ação nas células de defesa, especialmente quando estas são estimuladas por algum patógeno, podendo contribuir para maior indicação terapêutica dos probióticos.

2.2 Constituintes das paredes celulares microbianas

2.2.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

Classicamente, LPS ou endotoxinas derivados da membrana externa de bactérias Gram-negativas tem sido usados para estimular a resposta inflamatória, como controle positivo, em muitos experimentos *in vitro*. LPS apresenta múltiplos e diferentes efeitos

sobre macrófagos, como a regulação das funções dos mesmos (Van Lenten, Fogelman, 1992; Hsu, Twu, 2000) e uma grande estimulação na produção de mediadores inflamatórios (Hsu, Wen, 2002), podendo causar, *in vivo*, lesões pulmonares agudas (Tumurkhuu et al., 2008) ou a síndrome do choque séptico (Watson et al., 1999).

Está documentado que a endotoxina estimula a via de imunidade inata, por meio da ativação de receptores toll-like (TLR)-4 e de diversas proteínas, incluindo a proteína de ligação de LPS (LBP), CD14 e proteína diferencial mielóide 2 (MD2). Isto leva a ativação intracelular do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e resulta na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Qureshi et al., 1999; Poltorak et al., 2000; Creely et al., 2007; Baker et al., 2009; Youssef-Elabd et al., 2012).

As endotoxinas são responsáveis por vários efeitos biológicos importantes, como quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN), ativação do sistema complemento, indução de febre, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos (Harper et al., 1994; Nair, 2004; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

Vários estudos mostraram que células do sistema imune, quando colocadas sob o estímulo de LPS, liberam diversas citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-1, IL-6 e IL-8, óxido nítrico, prostaglandina E₂, leucotrienos, ciclo-oxigenase e fator ativador de plaquetas (PAF) (Morse, 1981; Matsushita et al., 1999; Walport et al., 2010; Yang et al., 2012; Kim et al., 2013; Park et al., 2013). Dentre estas citocinas liberadas em resposta ao LPS, destacam-

se IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , que são ativadoras de osteoclastos, participando do processo de reabsorção óssea, que é extremamente importante no desenvolvimento da alteração periapical (Murakami et al., 2001; Nair, 2004; Hong et al., 2004; Islam et al., 2007; Oliveira et al., 2012).

LPS já é tido como um importante indutor de células. Chiu et al. (2010) testaram a influência de diferentes cepas probióticas na expressão relativa de TNF- α em células da linhagem THP-1 (monócitos humanos) ativados com LPS. Foi notada que a diferença entre o grupo tratado apenas com LPS e os grupos tratados com LPS e diferentes probióticos se deve principalmente a cepa utilizada. Em alguns grupos notou-se a manutenção da expressão de TNF- α e em outros o aumento ou diminuição da expressão do mesmo.

LPS também pode participar na formação do biofilme, modulando a sua formação e resistência. Henry-Stanley et al. (2003) demonstraram que LPS pode proteger contra a disseminação extra-intestinal de *C. albicans*, inoculadas oralmente, pela inibição da adesão das leveduras ao epitélio intestinal. Bandara et al. (2009) avaliaram a interação *in vitro* de seis espécies de *Candida* e de *E. coli* na formação de biofilmes heterotípicos de cada espécie de *Candida* com *E. coli*, para avaliar o efeito de LPS na formação do biofilme de *Candida*. Foi constatada uma significativa inibição da formação do biofilme de *Candida* por *E. coli* com aumento da formação do biofilme de *E. coli*, simultaneamente. Masadeh et al. (2013) constataram que o perfil de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* influenciou o padrão de formação de biofilme, contribuindo para sua

resistência frente aos antibióticos, se comparadas a sua forma planctônica.

Assim, sendo LPS um importante fator de virulência das bactérias Gram-negativas, contribuindo para indução e/ou exacerbação do processo inflamatório, torna-se importante sua utilização como um forte estímulo microbiano para o estudo da imunomodulação induzida por bactérias probióticas.

2.2.2 Ácido Lipoteicóico (LTA)

As bactérias Gram-positivas apresentam parede celular composta por uma rede complexa, cujos componentes principais são o peptidoglicano e o ácido lipoteicóico (LTA), ambos associados à manutenção da integridade estrutural e morfologia bacteriana (Saar-Dover et al., 2012). Embora muito menos relatado que LPS, LTA já é considerado como o equivalente a LPS em diversos aspectos (Kengatharan et al., 1998; Sriskandan, Cohen, 1999).

LTA é um polímero de glicerolfosfato ou ribitolfosfato covalentemente ligado ao glicolípídeo na membrana citoplasmática e projeta-se através da camada de peptidoglicano (Neuhaus, Baddiley, 2003; Siqueira Jr, Rôças, 2007; Weidenmaier, Peschel, 2008), sendo essencial para o crescimento bacteriano (van Amersfoort et al., 2003). LTA do tipo poliglicerolfosfato é produzido pela maior parte das bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis e *Lactobacillus plantarum*, enquanto que um pequeno número de bactérias tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus oralis* expressa LTA do tipo poliribitolfosfato (Hogg et al., 1997; Seo et al., 2008).

Zeng et al. (2010) constataram que os proteomas de monócitos humanos tratados com LTA de *S. aureus* e *L. plantarum* apresentavam algumas similaridades, entretanto, várias proteínas de resposta imune foram expressas de maneira diferente nas células após o estímulo com os dois tipos de LTA. Em outro estudo feito por Kim et al. (2008), com LTA de *S. aureus* e *L. plantarum*, foi encontrado que LTA de *L. plantarum* pode agir como um antagonista de LTA de *S. aureus* e que esse antagonismo poderia ser útil para suprimir o choque séptico causado por bactérias Gram-positivas. LTA desses micro-organismos são apenas um exemplo das diferenças estruturais e químicas existentes na estrutura de sua parede celular.

Alguns autores (Wang et al., 2003; van Amersfoort et al., 2003; Kang et al., 2011) relataram que LTA pode ativar macrófagos e com isso induzir a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e sugeriram que a habilidade do LTA de influenciar a resposta imune é espécie dependente e também que a ativação celular ocorre pela sinalização via TLR-2 e PAFR (Wang et al., 2003; van Amersfoort et al., 2003; Siqueira Jr, Rôças, 2007; Park et al., 2013). Estes resultados foram observados também com *S. pneumoniae* (Schwandner et al., 1999), *S. aureus* (Han et al., 2003) e *Enterococcus faecalis* (Baik et al., 2008). LTA, assim como o peptidoglicano, pode ainda induzir a liberação de IFN- γ , induzir

falhas circulatórias e causar uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica moderada (Mattsson et al., 1993; van Amersfoort et al., 2003).

Além da resposta inflamatória e síndrome séptica, também está envolvido com formação de biofilme e adesão a superfícies, como o dente, devido sua atividade adsortiva à hidroxiapatita (Han et al., 2006; Fabretti et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). LTA também vem sendo associado a patogênese de pulpíte. Telles (2003) confirma que LTA de estreptococos é capaz de induzir o aumento do fator de crescimento vascular endotelial, bem como desencadear a ocorrência de apoptose em odontoblastos e a expressão de um fator pró-angiogênico.

Como verificado na literatura, LTA é um importante fator de virulência de bactérias Gram-positivas e ativador de macrófagos, sendo importante estudar seu papel sobre macrófagos na ativação de diferentes citocinas anti e pró-inflamatórias na presença ou ausência de cepas probióticas.

2.2.3 manana

A parede da célula fúngica apresenta como principal constituinte a manana, que é um componente glicoprotéico, rico em manose, com capacidade antigênica, sendo capaz de estimular macrófagos a produzirem citocinas (Garner et al., 1994). Campos

(2004) afirmaram que este componente fúngico também pode estar envolvido na supressão da resposta inflamatória.

Sabe-se que a manana exerce várias funções biológicas importantes, como auxílio na adesão a células do hospedeiro (Dalle et al., 2003), interação com macrófagos (Hobson et al., 2004), manutenção da integridade da parede celular (Singleton et al., 2005) e envolvimento na virulência (Mille et al., 2004). mananas são polissacarídeos altamente ramificados, constituídos por um arcabouço de resíduos de manose unidos principalmente por ligações α -1,6, apresentando ligações cruzadas α -1,2 e raramente α -1,3. Altas proporções de moléculas de fosfato ligadas por meio de pontes fosfodiéster são encontradas nas mananas (Jorge, 2012). Dalle et al. (2003) mostraram que os oligomanosídeos α -1,2 e β -1,2 estão envolvidos na interação entre *C. albicans* e enterócitos e participam da adesão de leveduras a superfície mucosa. Hobson et al. (2004) demonstraram que a perda de manosilfosfato da parede celular de *C. albicans* não influenciou o reconhecimento dos macrófagos. Mille et al. (2004) mostraram que a inativação do gene CaMIT1 causa uma grande mudança na manosilação de manoproteínas de *C. albicans* e reduz a virulência dessa levedura. Singleton et al. (2005) afirmaram que a perda da fração ácido lábil resulta numa mudança em toda a conformação da manoproteína, o que influencia na hidrofobicidade da parede celular.

As mananas de diferentes espécies tem diferentes composições, embora todas elas guardem semelhanças entre si. Existem diferenças até mesmo entre as mananas de uma mesma

espécie fúngica. A manana de *Saccharomyces cerevisiae* contém uma manobiose ligada ao grupamento α -1,3 através de grupos fosfato na cadeia lateral (Rosenfeld, Ballou, 1974). Já as mananas de *C. albicans* variam de acordo com o seu sorotipo. As cadeias do sorotipo A são maiores e possuem maior quantidade de ligações α -1,2 entre os carbonos das manoses se comparadas ao sorotipo B (Suzuki, 1997).

Da mesma forma que LPS e LTA, os fungos tem suas estruturas reconhecidas por receptores TLR-2 e TLR-4. Alguns autores descreveram o papel de TLR-2 e TLR-4 na resistência de células murinas a infecção e a produção de citocinas *in vitro* em resposta a células de *C. albicans* (Netea et al., 2002; Bellocchio et al., 2004; Van der Graaf et al., 2005). Figueiredo et al. (2012) ao estudarem *Pseudallescheria boydii*, constataram que TLR-2 reconhece os α -glucanos desse micro-organismo, enquanto TLR-4 medeia o reconhecimento de ramnomananas de *P. boydii* e de mananas de *C. albicans*. TLR-2, identificado como o receptor do PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) de fosfolipomanana associados à parede celular de *C. albicans*, desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio de ativação do NF- κ B (Jouault et al., 2003; Roeder et al., 2004).

Peres et al. (2010) constataram que a incubação da manana de *Trichophyton rubrum* purificada com células mononucleares levou à inibição da resposta inflamatória a vários estímulos diferentes. Além disso, verificaram que a manana inibiu a proliferação de queratinócitos, o que poderia permitir o desenvolvimento de uma infecção crônica. A manana liga-se

seletivamente a monócitos, causando um efeito inibitório na função imune mediada por células (Campos, 2004), de modo que a manana torna-se um fator importante a ser estudado na estimulação de macrófagos na presença de bactérias probióticas.

A literatura tem demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica de macrófagos, bem como sua ativação e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Entretanto, as condições que influenciam seus efeitos imunomoduladores ainda não estão claramente definidas. Assim, torna-se de grande importância avaliar o papel imunomodulador dos probióticos em macrófagos na presença de diferentes estímulos de origem bacteriana e fúngica, a fim de ampliar a compreensão de seus efeitos em condições patológicas, possibilitando uma melhor indicação de uso terapêutico.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* ou seus produtos na imunomodulação, pela análise de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL10) produzidas por macrófagos estimulados com diferentes moléculas de origem microbiana (LPS, LTA e manana).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Neste estudo foi utilizada a cepa padrão de *L. rhamnosus* ATCC 7469, obtida no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP.

As cepas foram semeadas em Ágar Man-Rogosa-Shape (MRS) e cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ por 24 h. A partir das colônias isoladas pela técnica de semeadura por esgotamento, e confirmadas pela coloração de Gram, foram obtidas colônias puras de *L. rhamnosus* as quais foram semeadas em caldo MRS. Após o cultivo, foram obtidas três preparações diferentes do micro-organismo probiótico para ensaios posteriores:

1) *L. rhamnosus* vivo (LV): as culturas puras bacterianas foram centrifugadas por 10 min a 8300 xg e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em solução fisiológica estéril e apirogênica e centrifugados novamente. Este procedimento foi repetido mais uma vez e após a última centrifugação, o sedimento foi resuspenso em PBS estéril e apirogênico até a concentração de 5×10^7 células/mL, padronizada em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm na densidade óptica de 0,4;

2) *L. rhamnosus* morto (LM): uma fração da suspensão anterior (LV) foi autoclavada a 121°C por 15 min e reservada para posterior utilização;

3) Sobrenadante de *L. rhamnosus* (SL): uma fração da suspensão anterior (LM) foi centrifugada por 10 min a 8300 xg, o sedimento foi descartado e o sobrenadante reservado para posterior utilização.

4.2 Moléculas microbianas

Foram utilizados LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Alemanha), LTA de *Streptococcus faecalis* (Sigma-Aldrich, Alemanha) e manana de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, Alemanha), todos na concentração 1 µg/mL.

4.3 Cultura de macrófagos

Foram utilizados macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7, obtidos do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ).

Essas células foram cultivadas em frascos de cultivo celular com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino), e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂ (Figura 1A).

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e houve o controle de cada frasco de cultivo celular com auxílio de microscopia com luz invertida (Nikon) (Figura 1B).

A partir do momento que foi constatado estado de confluência das células, o qual pode ser descrito pela ocupação de mais de 70% do frasco, foram realizados subcultivos celulares. Para esse subcultivo, o meio DMEM do frasco da cultura foi aspirado com auxílio de pipeta aprotogênica e descartado. Posteriormente, foram acrescentados 3 mL de meio fresco, com o qual foram realizadas três lavagens, e a seguir, descartado. Mais 3 mL de meio fresco foram acrescentados e as células foram liberadas com a ajuda de um varredor celular e transferidas para tubo tipo Falcon (TPP, Suíça). A suspensão de células foi centrifugada a 3300 xg durante 5 min a 25°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio fresco e distribuídas em novos frascos de cultivo celular. Cada subcultivo equivale a uma passagem. Os macrófagos utilizados em todos os experimentos estavam na sétima passagem.

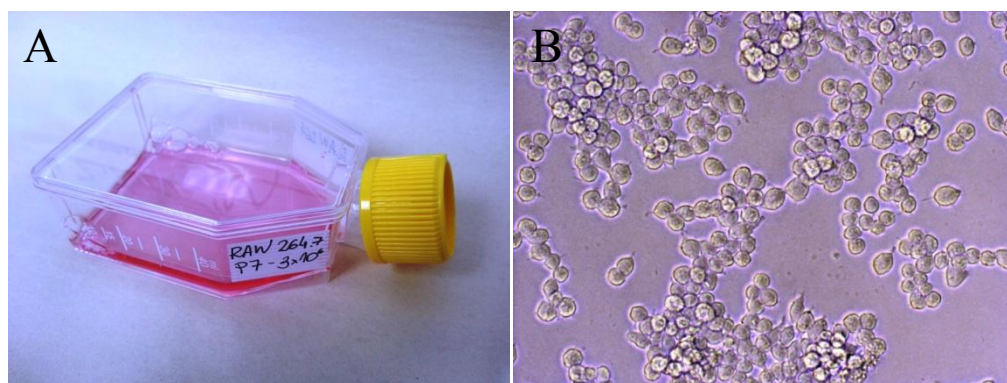


Figura 1 – (A) Frasco de cultivo celular com meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino; (B) Morfologia e controle da cultura celular de macrófagos (RAW 264.7) após o subcultivo. Microscopia óptica, aumento de 200x.

4.4 Ensaios de ativação celular

Para realização dos testes, foram realizados os mesmo passos para o subcultivo da linhagem celular, no entanto, após a ressuspensão das células foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, pelo método de exclusão utilizando azul de Tripan.

Os macrófagos foram distribuídos em microplacas de poliestireno de 24 poços, sendo que em cada poço foram colocadas 5×10^5 células viáveis acrescentado do meio DMEM completo até obter o volume final de 1 mL. As placas foram incubadas por 24 h ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$), para ocorrer a aderência celular. Após, as células não aderidas foram removidas e as demais células foram lavadas três vezes com PBS estéril e apirogênico (Figura 2A). Foram acrescentados 500

μ L de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino sem adição de antibióticos (Cross et al., 2004).

As diferentes preparações dos probióticos bem como os diferentes produtos microbianos (LTA, LPS ou manana) foram adicionados concomitantemente na cultura celular. Aliquotas de 500 μ L de cada suspensão de *L. rhamnosus* (LV, LM ou SL) foram adicionadas em diferentes poços da placa (Figura 2B), totalizando volume final de 1 mL. Nos poços dos grupos controles foi acrescentado o mesmo volume de solução fisiológica estéril e apirogênica. No mesmo momento, foram acrescentados LPS, LTA ou manana, na concentração final de 1 μ g/mL. Os testes foram realizados em triplicata, sendo 4 repetições em cada, totalizando 12 amostras para cada grupo experimental. A distribuição dos grupos e os respectivos ensaios de ativação celular encontram-se esquematizados no Quadro 1.

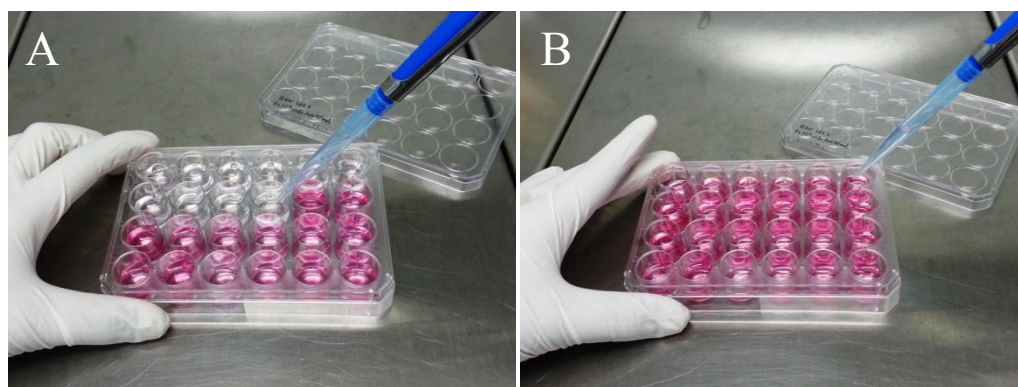


Figura 02 – (A) Lavagem com PBS estéril e apirogênico das células não aderidas para a remoção das mesmas. (B) Acréscimo das aliquotas das diferentes preparações de *L. rhamnosus*, de acordo com o grupo experimental.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais e controle.

GRUPOS	SUSPENSÃO DE <i>L. rhamnosus</i>	PRODUTOS MICROBIANOS
EXPERIMENTAL (n=108)	LV (n=36)	LPS (n=12) LTA (n=12) manana (n=12)
	LM (n=36)	LPS (n=12) LTA (n=12) manana (n=12)
	SL (n=36)	LPS (n=12) LTA (n=12) manana (n=12)
CONTROLE DAS MOLÉCULAS MICROBIANAS (n=36)	--	LPS (n=12) LTA (n=12) manana (n=12)
CONTROLE DO PROBIÓTICO (n=36)	LV (n=12) LM (n=12) SL (n=12)	--
CONTROLE NEGATIVO (n=12)	--	--

Após a adição das suspensões de *L. rhamnosus* e/ou produtos microbianos, as placas foram incubadas por um período de 2,5 h a 37°C e 5% de CO₂. Passado este período, as células foram lavadas três vezes e foi acrescentado meio DMEM com gentamicina

(Gibco[®], São Paulo, Brasil) na concentração de 50 µg/mL de meio. A placa de cultura celular foi incubada por mais 16 h e, após, os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados em freezer (-80°C) para a posterior análise das citocinas.

4.5 Detecção e quantificação de citocinas

Para o teste ELISA, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina de camundongo (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti-IL-12) (R & D Systems, NE), sendo 100 µL/poço. As placas permaneceram *overnight* em temperatura ambiente.

Posteriormente, as placas foram lavadas com 300 µL de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) por três vezes com auxílio de pipetador multicanal. Após, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino - BSA). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por uma hora.

Após os procedimentos de lavagem, foram adicionados nas placas 100 µL do padrão de citocinas (curva-padrão) ou 100 µL das amostras (sobrenadantes da cultura celular) (Figura 3A). Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram mantidas por duas horas em temperatura ambiente.

Após os procedimentos de lavagem, foram acrescentados em cada poço das placas 100 μ L de anticorpo de detecção (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-4, IL-6, anti-IL-10 ou anti-IL-12) marcado com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h. Novas lavagens foram feitas e logo após foram adicionados em cada poço 100 μ L de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente por 20 min.

Após os procedimentos de lavagem, foram adicionados em cada poço 100 μ L da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1 (Figura 3B). As placas foram mantidas, cobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 min.

Logo após foram adicionados 50 μ L da solução de parada da reação (ácido sulfúrico 2N) (Figura 3C). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas (Nunc, Dinamarca), com comprimento de onda de 450 nm (Figura 3D).

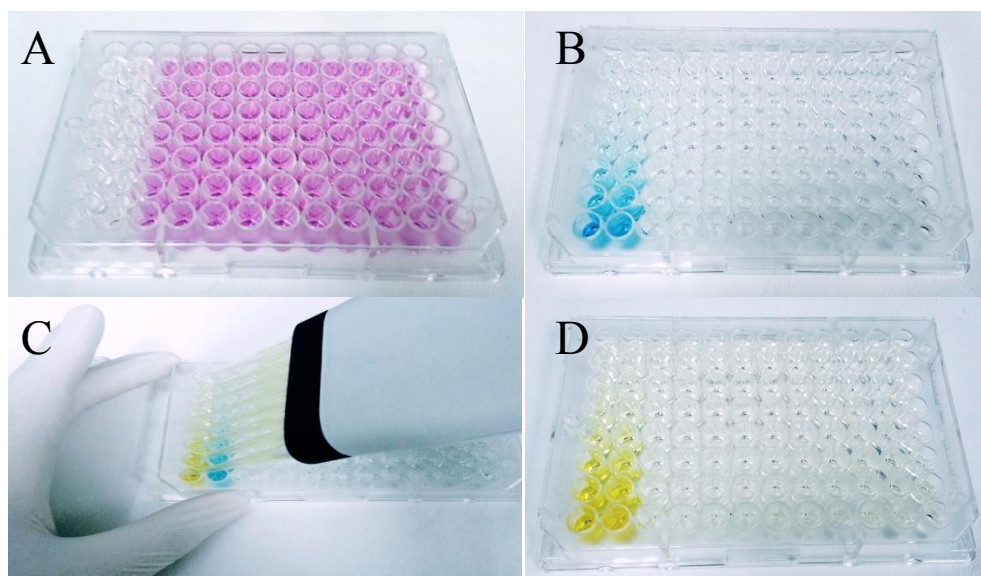


Figura 03 – (A) Adição das amostras padrão (curva) e sobrenadantes das culturas celulares; (B) Adição da solução de substrato cromogênico; (C) Adição da solução de parada (ácido sulfúrico 2N); (D) Placa com a reação terminada e pronta para ser levada ao leitor de microplacas.

Após obtenção das densidades ópticas, foram determinados, em pg/mL, os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 presentes nas amostras, com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0.

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, complementado pelo teste de Tukey, a fim de verificar as diferenças entre grupos. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism e o nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Fator de necrose tumoral- α

Após a obtenção dos valores da concentração de TNF- α , os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão
LPS+LV	11945,64	1117,00
LPS+LM	11589,50	1116,00
LPS+SL	1436,46	613,10
LPS+--	1769,99	119,80
LTA+LV	615,42	49,41
LTA+LM	509,24	45,23
LTA+SL	957,75	102,30
LTA+--	139,20	17,26
MAN+LV	4948,21	386,10
MAN+LM	4307,28	320,80
MAN+SL	7338,24	1450,00
MAN+--	823,76	204,90
--+LV	1548,45	287,40
--+LM	1621,33	293,30
--+SL	426,35	167,10
controle	8,48	8,90

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Os valores de TNF- α (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* estão demonstrados nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente. A comparação do

poder indutor da produção de TNF- α de cada molécula microbiana isolada está demonstrada na figura 7. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

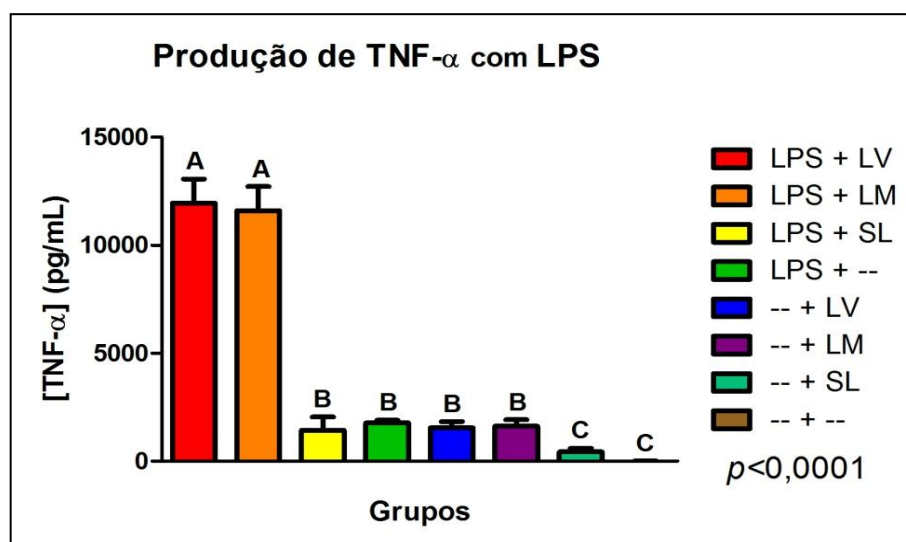


Figura 4 – Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LPS, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Com relação ao estímulo com LPS, pode-se observar que nos grupos nos quais as células foram estimuladas na presença de LV ou LM houve produção de TNF- α significativamente superior aos demais grupos ($p < 0,0001$). Os grupos estimulados com LPS na presença de SL, ou somente com LPS, LV ou LM apresentaram produção semelhante de TNF- α , inferior aos grupos LPS+LV e LPS+LM e superior ao grupo estimulado apenas com sobrenadante (SL) ou grupo controle negativo da cultura celular.

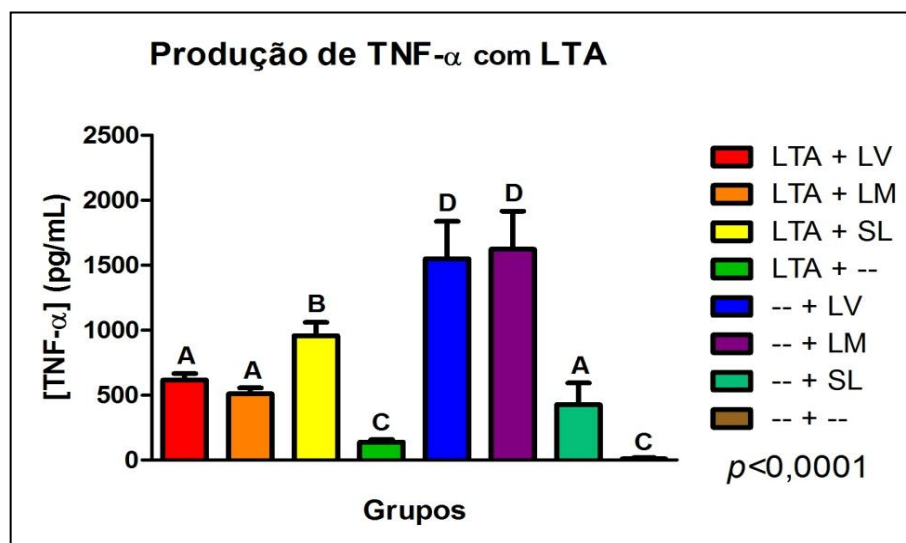


Figura 5 – Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LTA, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Já no que diz respeito ao LTA, observou-se maior produção de TNF- α nas culturas estimuladas apenas com LV e LM. O grupo LTA+SL apresentou produção de TNF- α estatisticamente menor que os grupos anteriores e maior que os demais grupos. A estimulação da cultura com o sobrenadante de lactobacilos produziu efeitos semelhantes ao estímulo com LTA na presença de lactobacilos vivos ou mortos. A estimulação somente com LTA induziu pouca síntese de TNF- α , semelhante ao grupo controle.

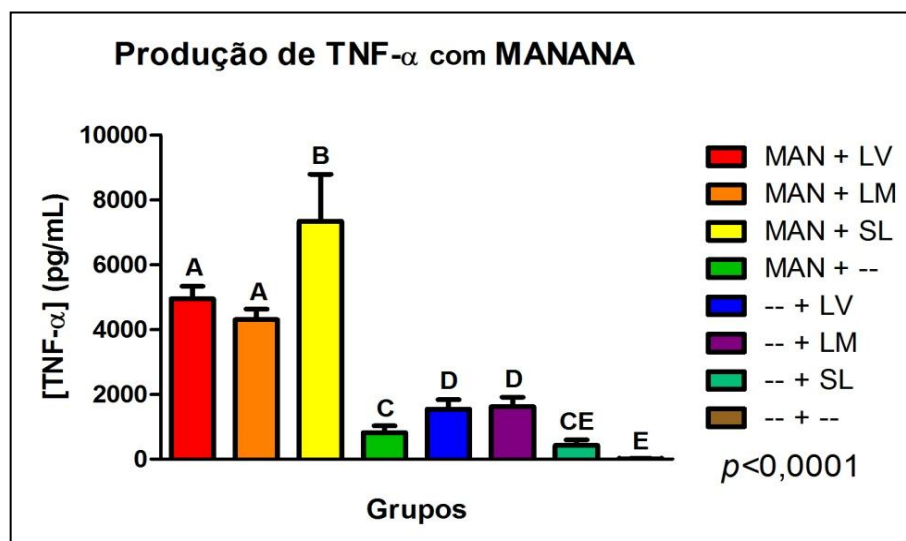


Figura 6 – Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação a manana, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Nos grupos estimulados com manana, a maior produção de TNF- α se deu no grupo MAN+SL, sendo este grupo estatisticamente diferente de todos os demais. O estímulo com MAN na presença de lactobacilos vivos ou mortos também induziu a produção desta citocina, em níveis menores que o grupo anterior e maiores que os demais grupos. Os grupos estimulados somente com lactobacilos vivos ou mortos apresentaram pequena produção de TNF- α , entretanto maior que os grupos estimulados somente com manana, SL ou controle.

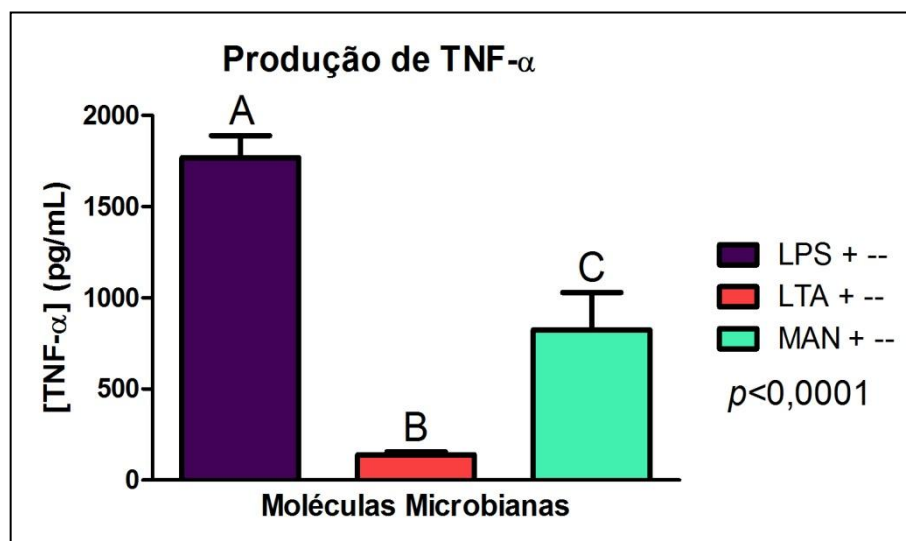


Figura 7 - Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada molécula microbiana isolada, bem como a formação de grupos homogêneos.

Observa-se que LPS é capaz de induzir maior produção de TNF- α , seguido da manana e do LTA, sendo que todos os grupos apresentam-se estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,0001$).

5.2 Interleucina-1 β

Após a obtenção dos valores da concentração de IL-1 β , os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão
LPS+LV	12,82	3,58
LPS+LM	7,56	2,91
LPS+SL	1,53	1,73
LPS+--	5,57	2,68
LTA+LV	0,00	0,00
LTA+LM	0,25	0,52
LTA+SL	0,11	0,39
LTA+--	0,00	0,00
MAN+LV	2,33	2,57
MAN+LM	0,67	1,44
MAN+SL	0,24	0,85
MAN+--	1,25	2,04
--+LV	7,82	6,85
--+LM	9,58	4,91
--+SL	0,00	0,00
controle	0,47	1,30

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Os valores de IL-1 β (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* estão demonstrados nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente. A comparação

do poder indutor da produção de IL-1 β de cada molécula microbiana isolada está demonstrada na figura 11. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

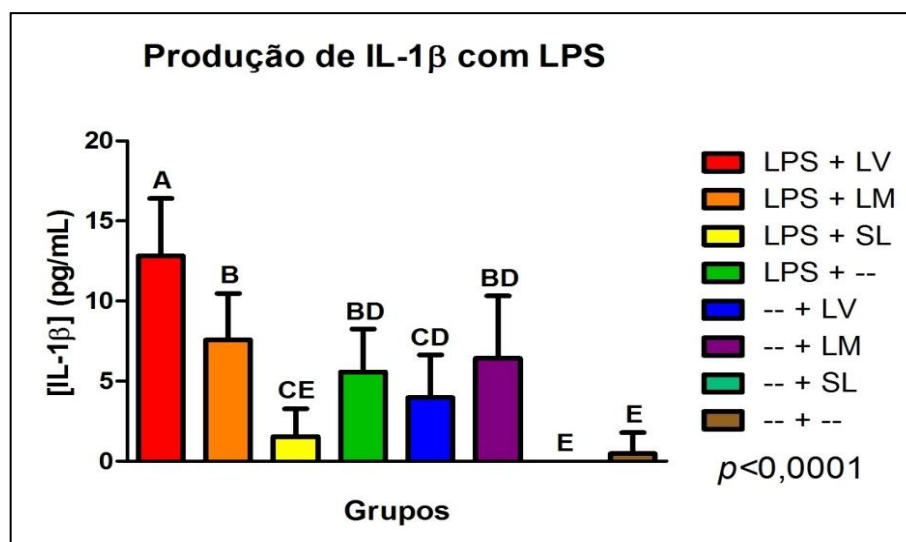


Figura 8 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LPS, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

LPS estimulou a produção de IL-1 β também, com diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$), sendo que o grupo estimulado com LV e LPS apresentou a maior média de produção, seguido pelo grupo estimulado com LM e lactobacilos. Os grupos estimulados apenas com as suspensões LV, LM forma estatisticamente semelhantes entre si e com o grupo estimulado somente com LPS. Os grupos estimulados apenas com SL, com SL na presença de LPS ou sem nenhum estímulo apresentaram as menores médias de produção, sendo semelhantes entre si.

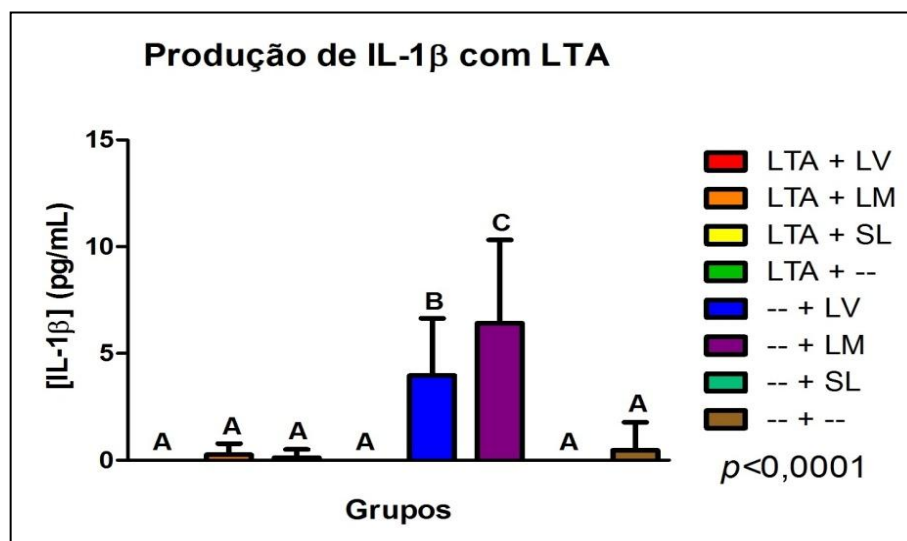


Figura 9 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LTA, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

LTA mostrou-se um fraco indutor da produção de IL-1 β . Os grupos estimulados apenas com as suspensões LV e LM apresentaram as maiores médias de produção de IL-1 β , no entanto estatisticamente diferentes entre si. Os demais grupos estudados apresentaram médias muito inferiores ou indetectáveis, sendo todos eles estatisticamente semelhantes entre si ($p \geq 0,05$).

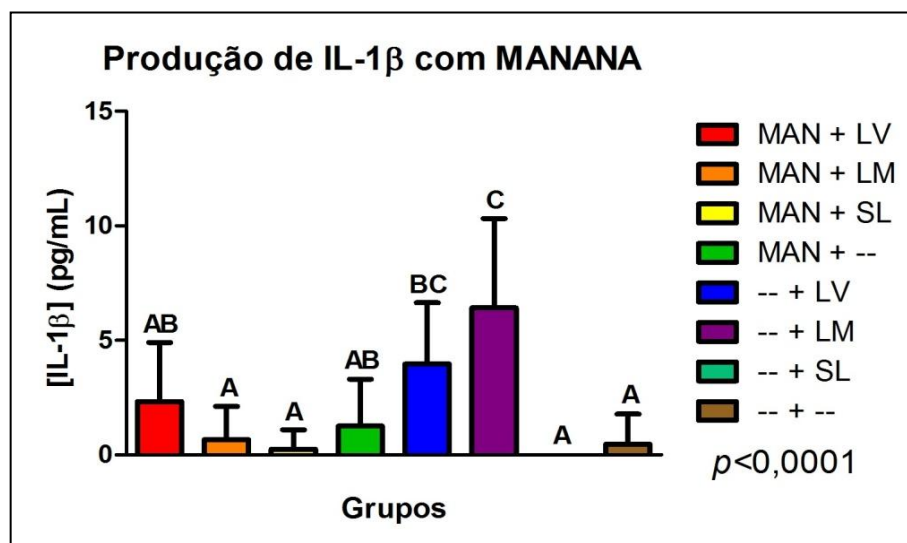


Figura 10 – Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação a manana, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

manana, assim como LTA, induziu fracamente a produção de IL-1 β . O grupo com maior produção desta citocina foi aquele ativado apenas com a suspensão LM. Os grupos ativados com LV e/ou manana obtiveram uma produção intermediária, quando comparados aos demais grupos, que apresentaram produção desta citocina muito fraca.

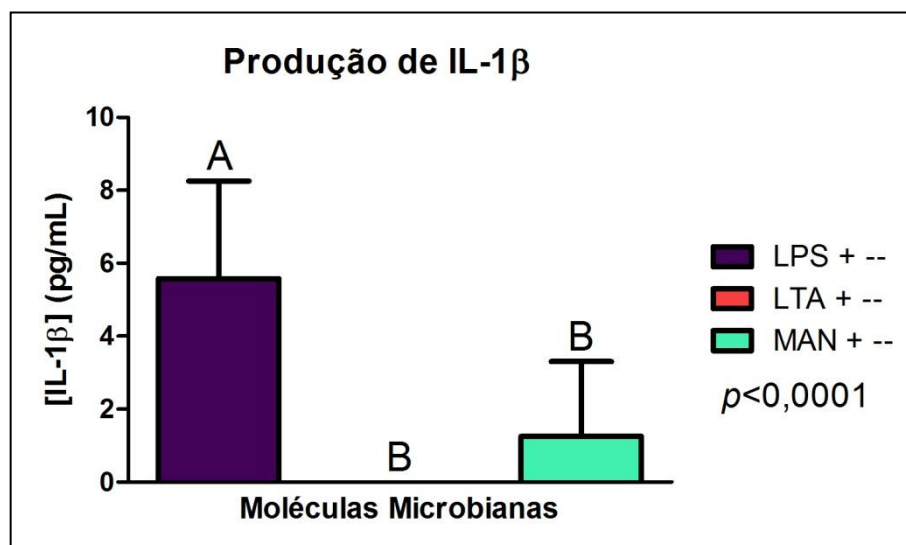


Figura 11 - Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada molécula microbiana isolada, bem como a formação de grupos homogêneos.

Observa-se que o LPS é capaz de induzir maior produção de IL-1 β , seguido da manana e do LTA, sendo que todos os grupos estimulados com LTA e manana apresentam-se estatisticamente semelhantes entre si ($p < 0,0001$).

5.3 Interleucina-4

Os valores de IL-4 (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* não obtiveram diferença estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) entre si. A estatística descritiva das médias, desvios padrão e os valores de p estão demonstrados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Valores médios de IL-4 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão
LPS+LV	0,0000	0,00
LPS+LM	0,0000	0,00
LPS+SL	0,0000	0,00
LPS+--	0,0000	0,00
LTA+LV	0,2195	0,76
LTA+LM	0,0000	0,00
LTA+SL	1,0471	2,39
LTA+--	0,7724	2,13
MAN+LV	0,0572	0,19
MAN+LM	0,2255	0,78
MAN+SL	0,0000	0,00
MAN+--	0,0000	0,00
--+LV	0,0000	0,00
--+LM	0,0000	0,00
--+SL	0,0982	0,22
controle	0,1095	0,37

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

5.4 Interleucina-6

Após a obtenção dos valores de concentração de IL-6, os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 4 – Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão
LPS+LV	1126,44	95,92
LPS+LM	1134,08	29,00
LPS+SL	1115,80	18,04
LPS+--	1119,32	40,54
LTA+LV	43,26	79,43
LTA+LM	60,20	36,01
LTA+SL	0,16	0,47
LTA+--	0,00	0,00
MAN+LV	64,42	18,22
MAN+LM	61,05	9,01
MAN+SL	0,00	0,00
MAN+--	0,00	0,00
--+LV	39,47	27,70
--+LM	14,18	18,82
--+SL	0,00	0,00
controle	0,00	0,00

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Os valores de IL-6 (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* estão demonstrados nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente. A comparação do poder

indutor da produção de IL-6 de cada molécula microbiana isolada está demonstrada na figura 15. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

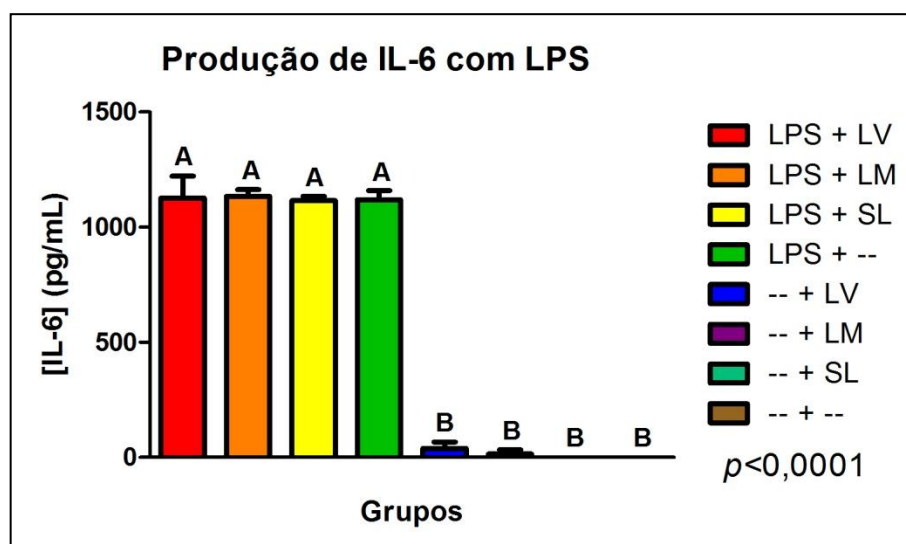


Figura 12 – Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LPS, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-6, estimulada por LPS, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Os grupos estimulados com LPS na presença ou ausência das suspensões bacterianas obtiveram médias de produção de IL-6 superior aos demais grupos. Os grupos estimulados apenas com as suspensões LV, LM ou SL apresentaram produção de IL-6 semelhantes entre si e ao grupo controle.

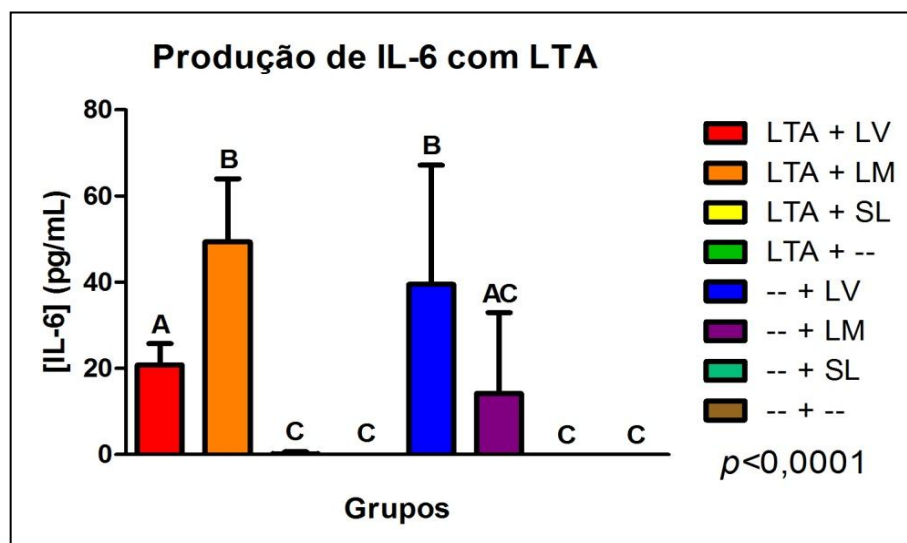


Figura 13 – Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LTA, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados com LTA ($p < 0,0001$). Os grupos estimulados com as suspensões LV ou LM na presença ou ausência do estímulo combinado com LTA apresentaram as maiores médias. Os demais grupos apresentaram médias de produção de IL-6 inferiores e semelhantes entre si ($p \geq 0,05$).

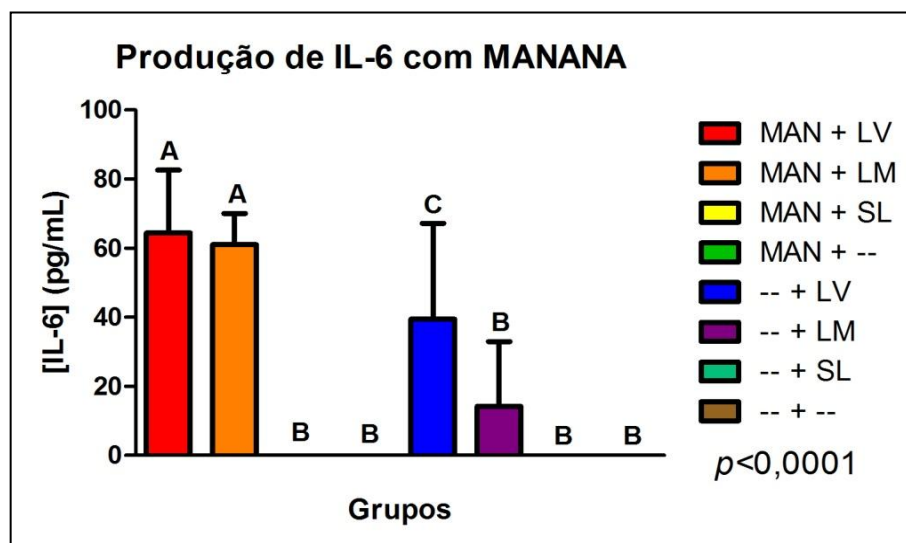


Figura 14 – Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação a manana, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados com manana ($p < 0,0001$). Os grupos que apresentaram as maiores médias de produção de IL-6 foram aqueles estimulados com as suspensões LV ou LM em conjunto com a manana. O grupo estimulado apenas com a suspensão LV apresentou uma produção IL-6 inferior aos anteriores e maior que o grupo estimulado apenas com a suspensão LM. Os demais grupos obtiveram produção de IL-6 semelhante e inferior a todos os grupos já mencionados.

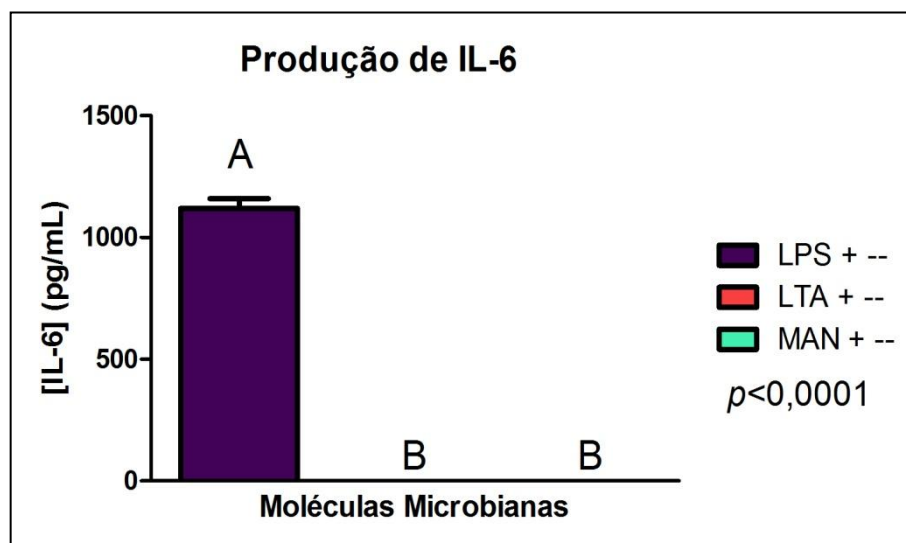


Figura 15 - Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada molécula microbiana isolada, bem como a formação de grupos homogêneos.

Observa-se que o LPS é capaz de induzir maior produção de IL-6 ($p < 0,0001$), uma vez que a indução da produção de IL-6 por LTA e manana não foi detectável.

5.5 Interleucina-10

Após a obtenção dos valores de concentração de IL-10, os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 5 – Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão
LPS+LV	1480,85	163,60
LPS+LM	1436,48	354,60
LPS+SL	1460,60	268,40
LPS+--	1469,06	836,40
LTA+LV	28,43	31,29
LTA+LM	389,27	668,80
LTA+SL	14,63	18,73
LTA+--	7,28	10,96
MAN+LV	232,89	104,30
MAN+LM	1096,08	215,70
MAN+SL	204,50	89,24
MAN+--	1,04	1,90
--+LV	84,15	107,80
--+LM	98,69	85,06
--+SL	7,67	8,44
controle	15,65	9,38

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Os valores de IL-10 (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* estão demonstrados nas figuras 16, 17 e 18, respectivamente. A comparação

do poder indutor da produção de IL-10 de cada molécula microbiana isolada está demonstrada na figura 19. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

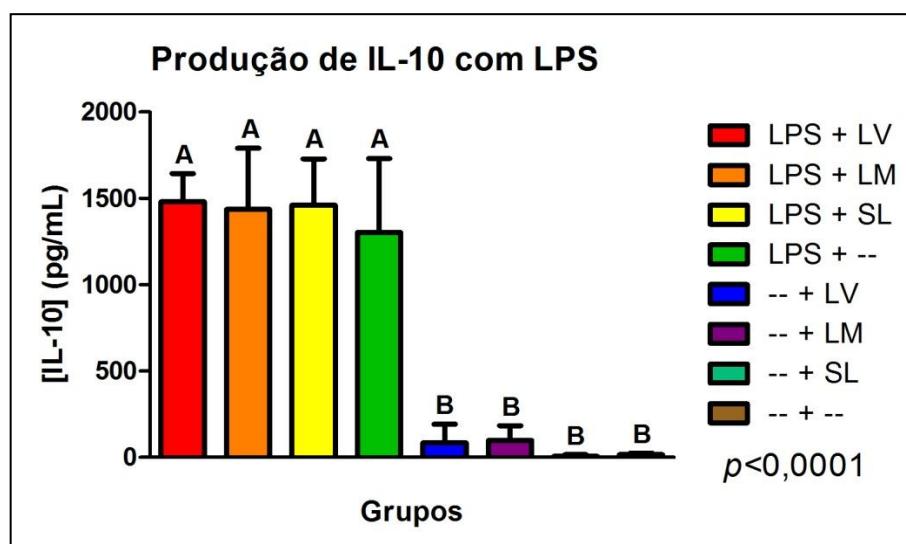


Figura 16 – Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LPS, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-6, estimulada por LPS, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Os grupos estimulados com LPS na presença ou ausência das suspensões bacterianas obtiveram médias de produção de IL-10 superior aos demais grupos. Os grupos estimulados apenas com as suspensões LV, LM ou SL apresentaram produção de IL-10 semelhantes entre si e ao grupo controle.

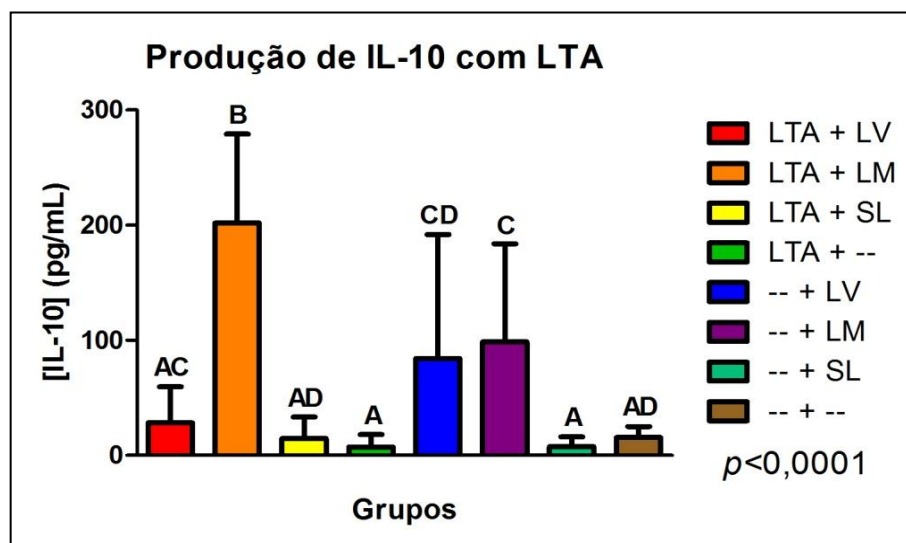


Figura 17 – Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LTA, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-10 com LTA houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo estimulado com a suspensão LM juntamente com LTA obteve a maior produção de IL-10, sendo estatisticamente diferente de todos os demais grupos. Os grupos estimulados apenas com LV e LM obtiveram medias intermediárias e semelhantes entre si. Os demais grupos mostraram médias de produção de IL-10 semelhantes e inferiores aos grupos citados anteriormente.

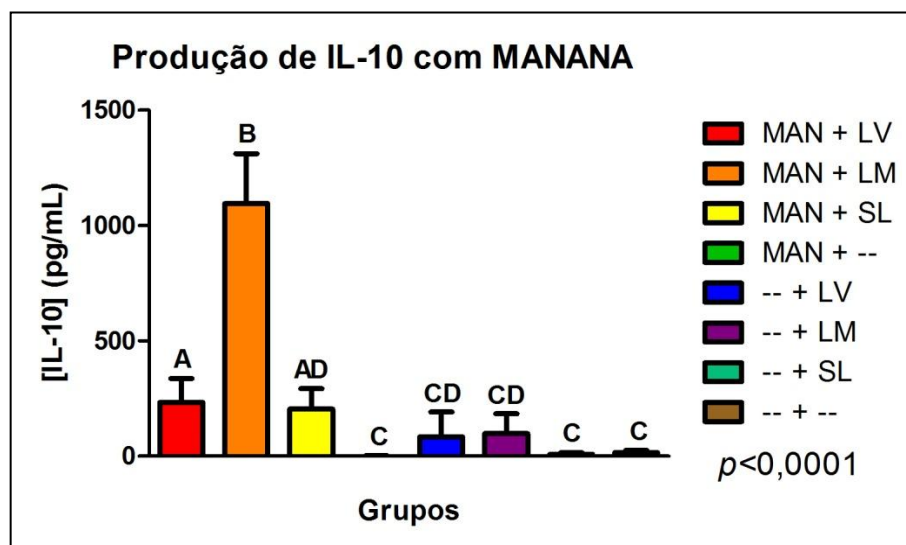


Figura 18 – Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação a manana, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-10 com manana houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo estimulado com manana e a suspensão LM obteve uma grande produção de IL-10, quando comparado aos demais grupos. Os grupos estimulados com LTA e umas das suspensões LV ou SL exibiram produção de IL-10 semelhantes entre si e diferentes do grupo estimulado apenas com LTA. O restante dos grupos apresentou produção baixa de IL-10, sendo semelhantes ao controle negativo ($p \geq 0,05$).

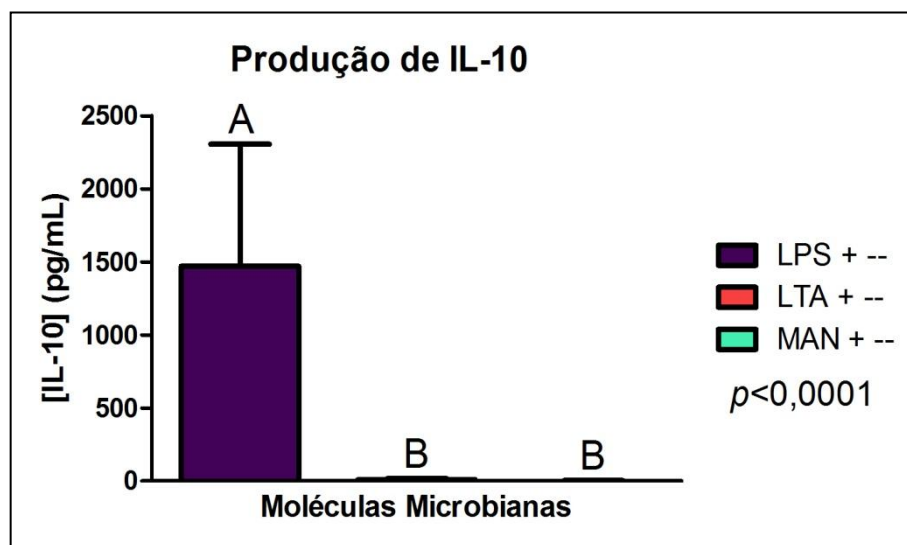


Figura 19 - Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada molécula microbiana isolada, bem como a formação de grupos homogêneos.

Observa-se que o LPS é capaz de induzir maior produção de IL-10, seguido de LTA e manana, sendo que, os grupos de células ativadas apenas com LTA ou manana não apresentam-se estatisticamente diferentes entre si ($p \geq 0,05$).

5.6 IL-12

Após a obtenção dos valores de concentração de IL-12, os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 6 – Valores médios de IL-12 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio Padrão
LPS+LV	0,58	1,83
LPS+LM	0,39	1,27
LPS+SL	0,50	1,76
LPS+--	0,41	1,44
LTA+LV	0,53	1,32
LTA+LM	1,19	2,38
LTA+SL	0,11	0,40
LTA+--	0,35	0,91
MAN+LV	1,65	2,88
MAN+LM	2,65	4,12
MAN+SL	3,39	5,84
MAN+--	1,93	2,85
--+LV	1,65	2,65
--+LM	2,76	3,48
--+SL	10,38	5,30
controle	0,59	1,24

LPS = Lipopolissacarídeo; LTA = Ácido lipoteicóico; MAN = manana; LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Os valores de IL-12 (pg/mL) produzidos por macrófagos sob estimulação de LPS, LTA ou manana na presença ou ausência de diferentes suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* estão

demonstrados nas figuras 16, 17 e 18, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A comparação do poder indutor de IL-12 de cada molécula microbiana isolada não obteve diferença estatisticamente significativa, sendo $p=0,0884$. As médias da produção de IL-12 estimulada por cada molécula microbiana isolada encontram-se em seus respectivos grupos experimentais.

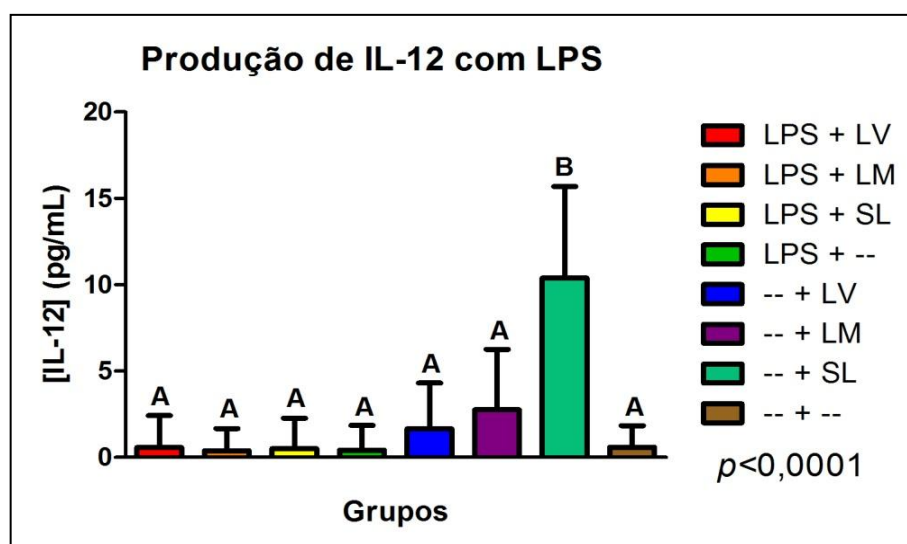


Figura 20 – Valores médios de IL-12 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LPS, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-12 com LPS houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo estimulado apenas com a suspensão SL apresentou um índice de produção de IL-12 estatisticamente superior a todos os demais grupos.

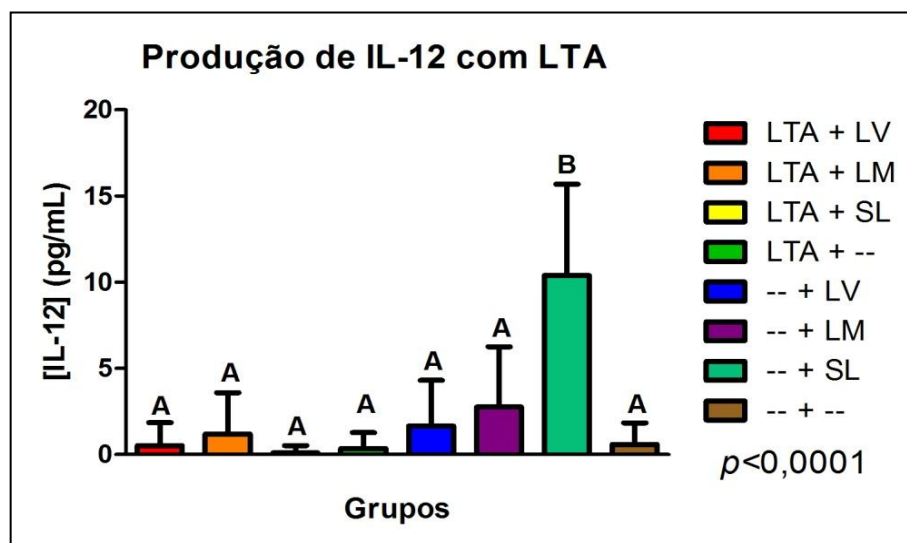


Figura 21 – Valores médios de IL-12 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação ao LTA, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-12 com LTA houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo estimulado apenas com a suspensão SL também apresentou um índice de produção de IL-12 estatisticamente superior a todos os demais grupos.

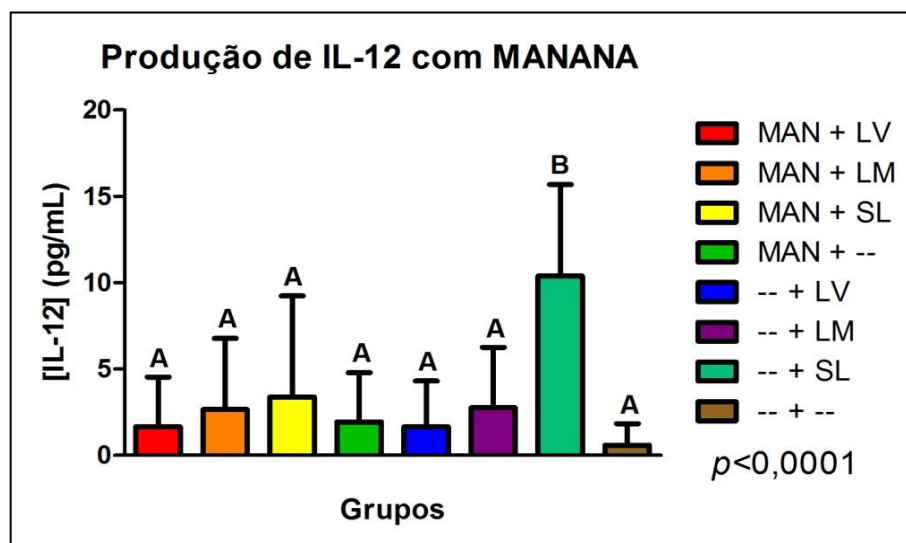


Figura 22 – Valores médios de IL-12 (pg/mL) e desvios padrão obtidos para cada grupo experimental, em relação a manana, bem como a formação de grupos homogêneos. LV = Suspensão de *L. rhamnosus* vivo; LM = Suspensão de *L. rhamnosus* morto; SL = Suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*; -- = Ausência de estímulo.

Na produção de IL-12 com manana houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). O grupo estimulado apenas com a suspensão SL apresentou um índice de produção de IL-12 estatisticamente superior a todos os demais grupos.

6 DISCUSSÃO

Probióticos são micro-organismos comensais que exercem diversas funções benéficas sobre a saúde do hospedeiro, entre elas atividades anticarcinogênica, anti-infecciosa e imunomodulatória (Takahashi et al., 2006). Neste estudo, foi utilizada a cepa padrão de *L. rhamnosus* ATCC 7469, por se tratar de uma bactéria probiótica extensivamente estudada (Gorbach, 2000; Goldin, Gorbach, 2008), utilizada em diversas pesquisas que avaliam o seu papel no tratamento de infecções virais (Villena et al., 2012), artrite reumatóide (Nowak et al., 2012), dermatite atópica (Marsella et al., 2012), entre outras doenças.

No atual estudo, foi possível identificar diferenças significativas quanto à produção de citocinas, dependendo do tratamento ao qual os macrófagos foram submetidos. Alguns autores já descreveram os efeitos dos probióticos como controversos, uma vez que essas bactérias podem aumentar, diminuir ou não influir na liberação de citocinas (Torii et al., 2007; Segawa et al., 2008; Jang et al., 2012).

6.1 Fator de necrose tumoral- α

TNF- α é uma proteína de fase aguda, que inicia a produção de uma série de citocinas, aumentando a permeabilidade vascular, o recrutamento de novos macrófagos e neutrófilos para o local da infecção e tem o papel de ativador dessas células (Castillo et al., 2011). Monócitos e macrófagos são a maior fonte de TNF- α , embora linfócitos T e B também o produzam em grandes quantidades (Vassali, 1992; Tamma et al., 1997; Wilson et al., 1997; Underhill et al., 1999).

A quantidade de TNF- α produzida depende do estado de ativação da célula e do estímulo indutor. A estimulação de macrófagos com LPS induz eficientemente a produção de TNF- α (Wilson et al., 1997), o que vai de encontro com os resultados obtidos quando comparamos a produção de TNF- α induzida pelas três moléculas microbianas testadas, nos quais LPS demonstrou maior capacidade de estimular esta produção. Da mesma forma, Finney et al. (2012) compararam a liberação de algumas citocinas, entre elas TNF- α , estimulando macrófagos da linhagem J774. Quando estimuladas com LPS (0-10 μ g), as células apresentaram produção significativa de TNF- α , enquanto o estímulo com LTA (0-10 μ g) não gerou produção detectável desta citocina.

No presente estudo, observou-se que LPS na presença *L. rhamnosus* promoveu um aumento significativo na produção de TNF- α por macrófagos. Este efeito potencializador dos micro-

organismos probióticos na produção de TNF- α também foi verificado por Correa Franco et al. (2013), em ratos com infecção induzida por *Giardia intestinalis*. Esses ratos foram divididos em 4 grupos: controle negativo (G1), ratos infectados por *G. intestinalis* (G2), ratos tratados com a solução probiótica (G3) e ratos infectados por *G. intestinalis* e tratados com a solução probiótica (G4). Houve um incremento significativo na produção de TNF- α no grupo G4 e uma redução na infecção intestinal destes animais. Embora o desafio ao qual os ratos tenham sido submetidos seja diferente de LPS, os resultados obtidos se assemelham, pois demonstram que os probióticos podem potencializar a produção desta citocina pró-inflamatória, contribuindo para melhoria da resposta imunológica e eliminação do patógeno.

Chiu et al. (2010) avaliaram a influência de diferentes cepas probióticas na expressão relativa de TNF- α em células da linhagem THP-1 (monócitos humanos) ativados com LPS. Foi notado que a diferença entre o grupo tratado apenas com LPS e os grupos tratados com LPS e diferentes probióticos se deveu principalmente à cepa utilizada. Em alguns grupos notou-se a manutenção da expressão de TNF- α e em outros o aumento ou diminuição da expressão do mesmo, quando comparados ao grupo controle negativo. Assim, os resultados do presente trabalho significam que o aumento na produção de TNF- α observado ocorreu com a utilização desta cepa específica de *L. rhamnosus*, e que resultados diferentes poderiam ser obtidos com a utilização de outras cepas ou espécies.

As células inativadas (mortas) de várias cepas probióticas têm sido relatadas como estimuladoras de várias citocinas

em macrófagos, entre elas TNF- α , melhorando a imunidade inata (Shida et al., 1998; Morita et al., 2002; Villena et al., 2009). De fato, no presente trabalho verificou-se que a suspensão contendo *L. rhamnosus* mortos potencializou a produção de TNF- α da mesma forma que *L. rhamnosus* vivos, sugerindo que apenas a presença das moléculas microbianas sejam suficientes para produzir o mesmo efeito.

No estudo de Chiu et al. (2010), foi avaliado o poder de indução da produção de citocinas do sobrenadante do probiótico *Lactobacillus casei rhamnosus* sobre células THP-1 tratadas com LPS de *Escherichia coli*. As células tratadas apenas com LPS mostraram elevados índices de produção de TNF- α , enquanto as células incubadas com LPS e sobrenadante de probiótico apresentaram uma diminuição significativa da produção desta citocina. No presente estudo, o sobrenadante de lactobacilos não influenciou a produção de TNF- α , uma vez que níveis semelhantes desta citocina foram observados quando somente LPS foi utilizado. Estas diferenças observadas nos resultados provavelmente se devem às diferentes cepas e células utilizadas, e às variadas metodologias para obtenção do sobrenadante de micro-organismos. No presente estudo foi utilizado sobrenadante da suspensão de lactobacilos mortos pelo calor em solução fisiológica, a fim de se excluir possíveis influências exercidas pelos meios de cultura utilizados no cultivo destes micro-organismos.

Já na resposta ao LTA, observamos *L. rhamnosus*, vivos ou mortos, e principalmente seu sobrenadante, estimularam a produção de TNF- α , uma vez que os níveis desta citocina se

apresentaram mais elevados nestes grupos quando comparados ao grupo estimulado somente com LTA. Entretanto, níveis mais elevados foram encontrados quando somente lactobacilos vivos ou mortos foram utilizados. Sendo *L. rhamnosus* uma bactéria Gram-positiva e, portanto constituída também de LTA, os resultados sugerem que o LTA destes lactobacilos e/ou a dose utilizadas nas suspensões são mais eficientes em estimular a produção de TNF- α que o LTA purificado utilizado. De fato, a habilidade de LTA influenciar as respostas imunes é espécie dependente e a ativação celular ocorre pela sinalização via receptor TLR-2 (Matsuguchi et al., 2003; Wang et al., 2003; van Amersfoort et al., 2003; Siqueira Jr, Rôças, 2007; Park et al., 2013). E quando as culturas foram estimuladas com o LTA mais as suspensões vivas e mortas de lactobacilos, a produção de TNF- α diminuiu (quando comparada à LV e LM), provavelmente em função da competição entre ambas as moléculas microbianas pelo sítio de ligação do receptor, uma vez que o receptor de ambos os tipos de LTA é apenas um, ou seja, TLR-2. Quando se tratou de LPS, este fenômeno não foi observado uma vez que o principal receptor do mesmo é o TLR-4 (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Mohammadi, 2011). Ainda em relação ao efeito estimulatório de LTA purificado, pode-se sugerir que o próprio processo de purificação pode ter diminuído o seu efeito antigênico. Num estudo sobre LTA de *Staphylococcus aureus*, realizado por Morath et al. (2001), foi demonstrado que algumas alaninas desta molécula microbiana são perdidas durante o processo de purificação, o que resultaria numa indução atenuada pelo LTA da produção de citocinas.

A manana foi capaz de induzir a produção de altos níveis de TNF- α por macrófagos. Chen et al. (2013) demonstram que o tratamento com manana em células polimorfonucleares aumentava a produção de TNF- α quando comparado com o grupo sem tratamento, indo de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo.

Quando as suspensões de *L. rhamnosus* foram utilizadas juntamente com a manana, houve aumento significativo na produção de TNF- α . O receptor de manose é um receptor endocítico multifuncional presente na maioria dos macrófagos teciduais (Apostolopoulos, McKenzie, 2001; Taylor et al., 2005; McKenzie et al., 2007; van Kooyk, 2008). Além dos receptores de manose, temos outros receptores de reconhecimento de patógenos como TLR-2, TLR-4, CR3 e dectina-2 interagindo com resíduos de manosil, ao passo que o receptor de manose interage com resíduos N, ligados na parede celular de alguns fungos, como *Candida albicans* (Apostolopoulos, McKenzie, 2001). Outro componente de *C. albicans*, a fosfolipomanana, é uma ligante da parede celular para TLR-2 (Levitz, 2004). Esses dados sugerem que, devido a maior variedade de possíveis receptores capazes de reconhecer manana, houve uma somatória de estímulos, que contribuíram para maior produção de TNF- α observada nos grupos MAN+LV, MAN+LM e MAN+SL, sendo nos dois primeiros pode ter existido competição pelos receptores TLR-2 entre a fosfolipomanana e o ácido lipoteicóico, o que explicaria a diferença entre estes grupos e o grupo MAN+SL. Assim, são necessários estudos mais profundos sobre

sinalização intracelular a fim de confirmar tais somatórias de estímulos e competição entre receptores.

6.2 Interleucina-1 β

Interleucina-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória que é crucial para a defesa do hospedeiro em resposta a infecção e injúria (Dinarello, 1996). Ela é também a melhor caracterizada e mais estudada dos membros da família de IL-1. É produzida e secretada por uma variedade de tipos celulares embora em sua grande maioria os estudos tenham focado na sua produção em células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos (Takeuchi, Akira, 2010).

No presente estudo observou-se que embora tenha havido diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pesquisados, a produção de IL-1 β se apresentou muito baixa. A maior produção desta citocina se deu quando do estímulo com LPS juntamente com suspensão LV, seguida da estimulação dos macrófagos apenas com o LPS ou apenas as suspensões LM e LV. Todos os demais grupos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle negativo. Estes resultados concordam com Bleau et al. (2007), que relataram baixa produção de IL-1 β em culturas de macrófagos ativados com extratos de lactobacilos, LPS ou peptidoglicano. Estes autores observaram que o grupo estimulado apenas com LPS também apresentou médias de produção de IL-1 β

semelhantes aos grupos estimulados somente com as suspensões de lactobacilos vivos ou mortos, e superiores ao grupo ativado apenas com sobrenadante destes micro-organismos.

Por outro lado, os resultados da atual pesquisa discordaram de Dong et al. (2012), que avaliaram seis cepas probióticas (*Lactobacillus casei* Shirota, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* NCIMB 8826, *L. reuteri* NCIMB 11951, *Bifidobacterium longum* SP 07/3 e *B. bifidum* MF 20/5) e constataram que elas induziram maior produção de IL-1 β que LPS. Já Zhao et al. (2012) avaliando o efeito de *Porphyromonas gingivalis* e *Lactobacillus acidophilus* na secreção de IL-1 β por células epiteliais gengivais, constataram que quando em conjunto, a detecção desta citocina era menor quando comparada ao grupo tratado somente com *P. gingivalis*, sugerindo um efeito imunomodulador para a bactéria probiótica. Estes resultados concordam com os resultados obtidos para o grupo tratado com LPS e a suspensão SL e discordam dos resultados obtidos para os grupos ativados com LPS e as suspensões LV e LM. No entanto, é importante ressaltar que as células e estímulos usados nesses estudos foram diferentes da atual pesquisa.

As demais moléculas microbianas (LTA e manana) não foram capazes de induzir produção de IL-1 β em níveis detectáveis ou com diferença estatística significativa do grupo controle negativo. A importância da sinalização da manana na proteção de hospedeiros mamíferos contra infecções fúngicas, como por *C. albicans*, foi claramente demonstrada pelo fato de que ratos com deficiência nos níveis de IL-1 β tinham sua sobrevivência reduzida e aumento da carga

fúngica em comparação com ratos selvagens (Vonk et al., 2006; Hise et al., 2009). Embora nesta pesquisa o grupo ativado por manana e a suspensão LV tenha apresentado uma média maior que o grupo estimulado apenas por manana, este aumento não apresentou significância estatística.

Com isso, estudos futuros devem ser realizados utilizando concentrações maiores de LTA e manana, acima de 1 $\mu\text{g/mL}$ que foi a concentração avaliada na atual pesquisa, a fim de verificar se a indução da produção de IL-1 β em macrófagos é dependente da concentração do estímulo microbiano, e se, uma vez ativados, as bactérias probióticas poderiam influenciar a secreção desta citocina.

6.3 Interleucina-4

Interleucina-4 é uma citocina que funciona como um potente regulador da imunidade, secretada primariamente por mastócitos, células Th2, eosinófilos e basófilos. Esta citocina tem um importante papel na sobrevivência de leucócitos sob condições fisiológicas e patológicas (Hu-Li et al., 1987; Minshall et al., 1997), assim como na imunidade mediada por células Th2 (Seder et al., 1992; Hsieh et al., 1992), ligação entre IgE e células B (Geha et al., 2003), reparação tecidual e homeostase por meio da ativação alternativa de macrófagos (Gordon, 2003). Além disso, IL-4 também é

responsável pela proteção contra parasitas gastrointestinais (Maizels, Holland, 1998; Maizels, Yazdanbakhsh, 2003).

Nikolaeva et al. (2005) analisaram os efeitos dos componentes microbianos do probiótico Acilact® nos fatores mediados pelas células na homeostase do sistema imune. Foi usado um modelo de infecção experimental em ratos, causada por bactérias do gênero *Shigella*, responsáveis por muitos casos de disenteria. Os ratos recebiam somente os componentes microbianos do produto testado. Os autores verificaram que houve indução da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, e TNF- α), mas não de IL-4.

Outro estudo, de Drago et al. (2010), avaliou a capacidade de 4 cepas de *Lactobacillus salivarius* influenciar a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias por monócitos humanos THP-1. Das quatro cepas, apenas duas estimularam produção significativa de IL-12 e IFN- γ , enquanto para IL-4 e IL-5 houve diminuição quando comparadas as células não estimuladas, levando os autores a conclusão de que a capacidade desta bactéria de modular a resposta imune está estritamente ligada a cepa utilizada, sendo que cepas diferentes de uma mesma espécie podem produzir diferentes respostas.

No presente estudo, em todos os grupos, independentemente da molécula microbiana usada para a ativação celular e/ou da suspensão de *L. rhamnosus* utilizada, a produção de IL-4 obtida foi extremamente baixa ou indetectável, não havendo diferença estatística entre nenhum dos grupos. Estes resultados

concordam com Kimoto et al. (2004) que demonstraram em células obtidas do baço de camundongo que a cepa de *Lactococcus* G50 induziu maior produção de IL-12 e IFN- γ e menor produção de IL-4 e IL-6 em comparação com o grupo controle, sugerindo que esta cepa tem papel imunomodulador na resposta imune tipo Th1. Os resultados do atual estudo concordam também com Amital et al. (2007) que relataram que muitas cepas de *Lactobacillus* apresentam efeito inibitório sobre a produção de IL-4, entretanto, são potentes estimuladores de citocinas Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α .

Também é importante ressaltar que no presente estudo foram utilizados macrófagos de uma linhagem específica (RAW 264.7), e nem todas as linhagens de macrófagos ou condições de cultivo dos mesmos levam à produção de IL-4 (Pouliot et al., 2005).

6.4 Interleucina-6

Interleucina-6 é uma citocina multifuncional e tem um importante papel nas inflamações crônicas e agudas e autoimunidade (Ishihara, Hirano, 2002). Ela age com parte da rede que faz a transição da imunidade inata para adquirida durante o início de uma nova resposta imune, através de diferentes controles de recrutamento de leucócitos, ativação e diferenciação, e apoptose (Hoebe et al., 2004; Jones, 2005). Infecções, injúrias e estresse induzem a produção de IL-6 e sua expressão elevada está associada com várias doenças

inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes e câncer (Ishihara, Hirano, 2002; Naugler, Karin, 2008).

Nos grupos tratados com LPS na presença ou ausência de *L. rhamnosus*, não houve diferença estatisticamente significativa, mostrando que as suspensões desta bactéria probiótica não foram capazes de modular a secreção desta citocina induzida por essa molécula microbiana. Já nos grupos tratados com LTA ou manana, as suspensões LV e LM influenciaram a produção de IL-6, aumentando-a significativamente. O mesmo não foi observado para a suspensão SL, evidenciando que nesses casos, para a indução desta citocina, são necessários componentes da parede celular de *L. rhamnosus*. Nos grupos ativados somente com as suspensões de *L. rhamnosus*, observou-se a mesma ocorrência, ou seja, somente as suspensões LV e LM foram capazes de ativar a produção de IL-6. A liberação deste mediador químico depende da forma como o probiótico é apresentado, isto é, se os produtos bacterianos estão associados a parede celular (sinal por contato) ou se são produtos solúveis secretados (sinais não mediados por contato) (Habil et al., 2011).

Os resultados da presente pesquisa discordam de Ganguli et al. (2013), que avaliaram os sobrenadantes de duas cepas probióticas, *Bifidobacterium infatis* e *Lactobacillus acidophillus* sobre enterócitos humanos imaturos, xenoenxertos intestinais humanos imaturos e culturas primárias de enterócitos de tecidos com enterocolite necrozante. Nos xenoenxertos, os probióticos conseguiram atenuar a expressão de IL-6 após a exposição a LPS. O

mesmo aconteceu para as culturas de enterócitos, onde a indução de IL-6 foi significativamente diminuída. Habil et al. (2011) constataram que tanto as bactérias mortas pelo calor como as proteínas secretadas de *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *B. breve* foram capazes de suprimir a produção de IL-6 por macrófagos estimulados com LPS, apontando um resultado diferente do obtido na atual pesquisa. Zhang et al. (2010) avaliaram o efeito pré-operatório da administração de suplementos com *Bifidobacterium* na microbiota intestinal de pacientes com câncer colorretal. No nono dia após a operação, a leitura de IL-6 foi estatisticamente menor no grupo que recebeu os suplementos com probiótico que no grupo controle. Nos pacientes que receberam o tratamento com probióticos, tanto o equilíbrio da microbiota intestinal quanto a imunidade foram melhorados, além de diminuir o risco de complicações infecciosas da cirurgia.

Nestas pesquisas anteriores da literatura nas quais pode-se verificar divergências dos resultados com relação ao presente estudo, as bactérias probióticas utilizadas foram outras e a cepa de *L. rhamnosus* (NCIMB 8824) também foi diferente da utilizada na atual pesquisa, reforçando a importância que cada cepa probiótica possui em induzir diferentes citocinas em diferentes tipos celulares, consequentemente, com diferenças em seu papel imunomodulador.

6.5 Interleucina-10

IL-10 é responsável, em grande parte, pelo controle da resposta anti-inflamatória, sendo uma citocina multifuncional cuja grande gama de efeitos no sistema imune ainda permanecem não totalmente elucidados. IL-10 influencia três importantes funções dos macrófagos e monócitos: liberação de citocinas, apresentação de antígenos e fagocitose. Simplesmente, ela suprime todas as funções dos macrófagos e monócitos que são responsáveis por um papel positivo dessas células nas imunidades específica e inespecífica. Ao mesmo tempo, melhora a atividade inibitória, a tolerância induzida e a função de “limpadoras” dessas células. IL-10 inibe a produção de mediadores pró-inflamatórias de macrófagos e monócitos e a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 G-CSF e GM-CSF (de Waal Malefyt et al., 1991; Keel et al., 1997).

No presente estudo, as maiores produções de IL-10 foram observadas nos grupos ativados com LPS, na presença ou ausência de lactobacilos. De fato, esta molécula microbiana possui alto potencial de ativação de células da resposta imunológica, induzindo a secreção de inúmeras citocinas pró e anti-inflamatórias.

Os resultados do presente estudo concordaram com Zhang et al. (2013), que constataram indução significativa da produção de IL-10 por células sanguíneas estimuladas com LPS, sendo que essa produção aumentava conforme passava o tempo.

No presente estudo, observou-se ainda que nos grupos ativados com LTA ou manana as suspensões contendo *L. rhamnosus* mortos favoreceram a produção desta citocina pelos macrófagos, sugerindo um papel imunomodulador, provavelmente para as moléculas da parede celular destes micro-organismos, especialmente numa infecção por bactérias Gram-positivas ou fungos. Zanvit et al. (2012) já haviam sugerido uma estimulação da atividade anti-inflamatória induzida por componentes da parede dos micro-organismos probióticos.

Da mesma forma, Rajput et al. (2013) demonstraram que o uso dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus subtilis* na alimentação de frangos de corte foi capaz de aumentar a produção das citocinas intestinais IL-6, IL-10 e TNF- α , quando comparados ao grupo controle. Já o estudo de Kmonickova et al. (2012) demonstrou que o uso de sobrenadantes de *Lactobacillus casei* DN-114001 em células peritoneais de ratos aumentaram a produção de TNF- α e IL-6, mas não de IL-10. Díaz-Ropero et al. (2007) analisaram a habilidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius* CECT5713 e *Lactobacillus fermentum* CECT5716) de modular a resposta imune. Macrófagos da medula óssea de roedores na presença de *L. fermentum* produziram citocinas pró-inflamatórias, em contraste com a produção de IL-10, induzida por *L. salivarius*. No entanto, ambas as cepas testadas conseguiram diminuir a resposta inflamatória nos macrófagos, sendo que essa diminuição foi mais acentuada no caso do *L. salivarius*, provavelmente devido a sua maior produção de IL-10.

Zanvit et al. (2012) também demonstraram que *Bacillus firmus* e *B. firmus* conjuntamente com partículas virais administrados via intranasal aumentaram a expressão de IL-10, melhorando, acelerando e prolongando a resposta antiviral.

6.6 Interleucina-12

Interleucina-12 é produzida em respostas imediatas a infecções (Macatonia et al., 1995) e tem um poderoso efeito nas funções das células Natural-Killer e no desenvolvimento de linfócitos T (Trinchieri, 2003). No entanto, vem se tornando cada vez mais evidente que IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas tem um significativo efeito nas células apresentadoras de antígenos, por meio de mecanismos autócrino e parácrinos (Langrish et al., 2004).

No presente estudo, apenas os macrófagos ativados pela suspensão SL apresentaram produção de IL-12 estatisticamente superior aos demais grupos e grupo controle negativo. Soltan Dallal et al. (2012) administraram uma suspensão de *L. casei* ou PBS para ratos com carcinoma ductal invasivo. Os resultados mostraram que os ratos que recebiam a suspensão de *L. casei* via oral tiveram um aumento significativo na produção de IL-12 em relação aos ratos que recebiam PBS. Já Miyzawa et al. (2011) analisaram a capacidade de *L. gasseri* (vivo ou morto pelo calor) induzir a produção de IL-12 por

macrófagos da linhagem J774.1 e constataram que as células estimuladas pela suspensão com a bactéria morta apresentaram uma produção desta citocina significativamente maior do que quando as células eram estimuladas pela suspensão das bactérias vivas.

Nota-se que em cada estudo, uma das soluções de probióticos apresentou maior produção de IL-12. Isso mostra que bactérias ácido lácticas, como *L. rhamnosus*, podem modular a atividade dos macrófagos tanto suprimindo como aumentando a produção de IL-12 (Shida et al., 2006; Foligne et al., 2007; Ichikawa et al., 2007; Habil et al., 2011) e que essa produção se mostra dependente da cepa utilizada e da apresentação da mesma, como demonstrado no atual estudo.

Assim, observa-se que em cada condição, cada suspensão de *L. rhamnosus* exerceu um efeito diferente, demonstrando a capacidade desta cepa de estimular ou modular a secreção de citocinas e consequentemente influenciar na resposta imunológica contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas ou fungos. O conhecimento exato destas diferentes ações é importante para administração correta dos probióticos em casos de necessidade de estimulação da resposta ou diminuição de processos inflamatórios exacerbados.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- a) Diferentes preparações de *L. rhamnosus* (vivos, mortos e sobrenadante) foram capazes de modular a resposta imune dos macrófagos quando desafiados com diferentes moléculas microbianas (LPS, LTA e manana), aumentando ou diminuindo a produção de diversas citocinas, de modo que a resposta imunomoduladora foi dependente do tipo de preparo da suspensão probiótica e do tipo de estímulo microbiano;
- b) As suspensões de *L. rhamnosus* vivos, mortos ou seus sobrenadantes foram capazes de estimular e modular a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 em macrófagos;
- c) Nenhuma suspensão de *L. rhamnosus* e/ou molécula microbiana (LPS, LTA ou manana)

induziu produção significativa de IL-4 em macrófagos;

d) As moléculas microbianas (LPS, LTA ou manana) possuem diferentes poderes de indução da produção de citocinas em macrófagos, sendo que LPS é o indutor mais potente, seguido por manana e LTA.

8 REFERÊNCIAS

Ambadoyiannis G, Hatzikamari M, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Probiotic and technological properties of enterococci isolated from infants and cheese. *Food Biotechnol* 2005;18(3):307–25.

Amital H, Gilburd B, Shoenfeld Y. Probiotic Supplementation with *Lactobacillus casei* (Actimel) induces a TH1 response in an animal model of antiphospholipid syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1110:661-9.

Apostolopoulos V, McKenzie IF. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med*. 2001;1(4):469–74.

Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, Lee K, Han SH. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008;34(8):975–82.

Baker AR, Harte AL, Howell N, Pritlove DC, Ranasinghe AM, da Silva NF, et al. Epicardial adipose tissue as a source of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase mediated inflammation in patients with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):261–7.

Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 12):1623–31.

Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, et al. The contribution of the Toll-like / IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol*. 2004;172(5):3059–69.

Bleau C, Savard R, Lamontagne L. Murine immunomodulation of IL-10 and IL-12 induced by new isolates from avian type 2 *Lactobacillus acidophilus*. *Can J Microbiol*. 2007;53(8):944–56.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [acesso ago. 2008] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JD. The influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* M18 on indices of dental health in children: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 6):875-84.

Campos MRM. Interação de *Trichophyton rubrum* com macrófagos peritoneais de camundongos. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo; 2004.

Candela M , Seibold G , Vitali B , Lachenmaier S, Eikmanns BJ, Brigidi P. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol.* 2005;156:887–95.

Caselli M, Vaira G, Calo G, Papini F, Holton J, Vaira D. Structural bacterial molecules as potential candidates for an evolution of the classical concept of probiotics. *Adv Nutr.* 2011;2(5):372-6.

Castillo NA, Perdígón G, de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice. *BMC Microbiol.* 2011;11:177.

Chen A, Wang Y, Zhang L, Lu X, Zuo D, Chen Z. Effects of mannan-binding lectin on the functions of human polymorphonuclear cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013;33(6):842–6.

Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clin Nutr.* 2010;29(1):131–40.

Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural.* 2004;34(4):1297-303.

Correa Franco M, Golowczyc MA, De Antoni GL, Pérez PF, Humen M, Serradell MD. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J Med Microbiol.* 2013; 62(Pt 12):1815-22.

Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):740-7.

Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(4):245-53.

Cross ML, Ganner A, Teitelab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;42(2):173-80.

Dalle F, Jouault T, Trinel PA, Esnault J, Mallet JM, d'Athis P. Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun*. 2003;71(12):7061-8.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.

Dhanani AS, Bagchi T. *Lactobacillus plantarum* CS24.2 prevents *E. coli* adhesion to HT-29 cells and also down-regulates enteropathogen induced TNF- α and IL-8 expression. *Microbiol Immunol*. 2013; 57(4):309-15.

Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol*. 2007;102(2):337-43.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.

Dong H, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br J Nutr*. 2012;108(3):459-70.

Dos Santos AL, Jorge AO, Dos Santos SS, Silva CR, Leão MV. Influence of probiotics on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity. *Braz J Microbiol*. 2009;40(4):960-4.

Drago L, Nicola L, Iemoli E, Banfi G, De Vecchi E. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an in vitro model. *BMC Res Notes*. 2010;3:44.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2006;74(7):4164–71.

Figueiredo RT, Bittencourt VC, Lopes LC, Sassaki G, Barreto-Bergter E. Toll-like receptors (TLR-2 and TLR-4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. *Carbohydr Res*. 2012;356:260–4.

Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Med*. 2012;38(2):324-32.

Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*. 2007;13(2):236-43.

Ganguli K, Meng D, Rautava S, Lu L, Walker WA, Nanthakumar N. Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(2):132–41.

Garner RE, Rubanowice K, Sawyer RT, Hudson JA. Secretion of TNF-alpha by alveolar macrophages in response to *Candida albicans* mannan. *J Leukoc Biol*. 1994;55(2):161-8.

Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):721–32.

Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.* 2013;44(1):40.

Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis.* 2008;1(46):96–100.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012;38(8):1082-6.

Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(1 Suppl):S2–4.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23–35.

Habil N, Al-Murrani W, Beal J, Foey AD. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Benef Microbes.* 2011;2(4):283–93.

Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH. Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003;71(10):5541–8.

Han SH, Kim JH, Seo HS, Martin MH, Chung GH, Michalek SM, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol* 2006;176(1):573–9.

Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Toxicology.* 1994;92(1–3):155–67.

Henry-Stanley M J, Hess D J, Erickson E A, Garni R M, Wells C L. Effect of lipopolysaccharide on virulence of intestinal *Candida albicans*. J Surg Res. 2003;113(1):42–9.

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. Cell Host Microbe. 2009;5(5):487–97.

Hobson RP, Munro CA, Bates S, MacCallum DM, Cutler JE, Heinsbroek SE, et al. Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. J Biol Chem. 2004;279(38):39628–35.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. Nat Immunol. 2004;5(10):971–4.

Hogg SD, Whitley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. Int J Syst Bacteriol. 1997;47(1):62–6.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004;33(3):162–9.

Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(13):6065–9.

Hsu H Y, Twu Y C Tumor necrosis factor-alpha-mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. J. Biol. Chem. 2000;275(52):41035–48.

Hsu HY, Wen MH. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. J Biol Chem. 2002;277:22131–9.

Hu-Li J, Shevach EM, Mizuguchi J, Ohara J, Mosmann T, Paul WE. B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med*. 1987;165(1):157–72.

Ichikawa S, Fujii R, Fujiwara D, Komiyama Y, Kaisho T, Sakaguchi M, et al. MyD88 but not TLR2, 4 or 9 is essential for IL-12 induction by lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(12):3026-32.

Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marín MJ, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012;39(8):736-44.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4–5):357–68.

Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 2007;360(2):346–51.

Jain S, Yadav H, Sinha PR. Stimulation of innate immunity by oral administration of Dahi containing probiotic *Lactobacillus casei* in mice. *J Medic Food*. 2008;11(4):652–56.

Jang SO, Kim HJ, Kim YJ, Kang MJ, Kwon JW, Seo JH, et al. Asthma prevention by *Lactobacillus rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012 May;4(3):150–6.

Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002714.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463–8.

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, et al. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. J Infect Dis. 2003;188(1):165–72.

Kang SS, Ryu YH, Baik JE, Yun CH, Lee K, Chung DK, et al. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* induces nitric oxide production in the presence of interferon- γ in murine macrophages. Mol Immunol. 2011;48(15–16):2170–7.

Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. Blood. 1997;90(9):3356–63.

Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. J Exp Med. 1998 Jul 20;188(2):305–15.

Khani S, Motamedifar M, Golmoghaddam H, Hosseini HM, Hashemizadeh Z. *In vitro* study of the effect of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against herpes simplex virus type 1. Braz J Infect Dis. 2012;16(2):129–35.

Kim HG, Lee SY, Kim NR, Ko MY, Lee JM, Yi TH, et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- α production. J Microbiol Biotechnol. 2008 Jun;18(6):1191–6.

Kim KN, Ko YJ, Kang MC, Yang HM, Roh SW, Oda T, et al. Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Food Chem Toxicol. 2013;53:371–5.

Kimoto H, Mizumachi k, Okamoto T, Kurisaki J. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol Immunol*. 2004;48(2):75–82.

Kmonickova E, Kverka M, Tlaskalová–Hogenová H, Kostecka P, Zidek Z. Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low–molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33 Suppl 3:166–72.

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL–12 and IL–23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2004;202:96–105.

Lee JK, Baik JE, Yun CH, Lee K, Han SH, Lee W, et al. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod*. 2009;35(2):212–5.

Levitz SM. Interactions of Toll–like receptors with fungi. *Microbes Infect*. 2004;6(15):1351–5.

Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J Sci Food Agric*. 2011;91(12):2284–91.

Liu Y, Fatheree NY, Mangalat N, Rhoads JM. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(5):G1087–96.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL–12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995;154(10):5071–9.

Maizels RM, Holland MJ. Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths. *Curr Biol*. 1998;8(20):711–4.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):733–44.

Marsella R, Santoro D, Ahrens K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012;146(2):185–9.

Masadeh MM, Mhaidat NM, Alzoubi KH, Hussein EI, Al-Trad EI. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. *Infect Drug Resist*. 2013;6:27–32.

Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakame AE. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis*. 2012;18(3):260–4.

Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(2):259–66.

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod*. 1999;25(12):795–9.

Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Fleer A, Verhoef J, Vandijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;7(3):281–7.

McKenzie EJ, Taylor PR, Stillion RJ, Lucas AD, Harris J, Gordon S, et al. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J Immunol.* 2007;178(8):4975–83.

Mendonça FH, Santos SS, Faria Ida S, Gonçalves e Silva CR, Jorge AO, Leão MV. Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. *Braz Dent J.* 2012;23(5):534–8.

Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des* 9: 2003;9(2):175–91.

Mille C, Janbon G, Delplace F, Ibata-Ombetta S, Gaillardin C, Strecker G, et al. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47952–60.

Minshall C, Arkins S, Straza J, Conners J, Dantzer R, Freund GG, et al. IL-4 and insulin-like growth factor-I inhibit the decline in Bcl-2 and promote the survival of IL-3-deprived myeloid progenitors. *J Immunol.* 1997;159(3):1225–32.

Miyazawa K, He F, Kawase M, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TM0356 by heat treatment and culture medium. *Lett Appl Microbiol.* 2011;53(2):210–6

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections:a review. *J Calif Dent Assoc.* 2011;39(3):153–9.

Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, et al. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(9):1963–6.

Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970s. *Int Endod J* 1981;14(2):69–79.

Murakami T, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16:321–5.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348–81.

Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*. 2008;14(3):109–19.

Netea MG, van der Graaf CAA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR-4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002;185(10):1483–9.

Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):686–723.

Nikolaeva TN, Zorina VV, Pospelova VV, Babaian AA, Lakhtin VM. The effects of the microbial components of the probiotic Acilact on the cell-mediated immunity factors under experimental conditions. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2005;(12):40–6.

Nowak B, Ciszek-Lenda M, Sróttek M, Gamian A, Kontny E, Górski-Frączek S, et al. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(3):211–20.

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontics irrigants on endotoxins in root canals.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(1):135–42.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AOC. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. J Endod. 2012;38(8):1053–7.

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005;33(2):107–14.

Oliveira M, Bosco N, Perruisseau G, Nicolas J, Segura-Roggero I, Duboux S, et al. *Lactobacillus paracasei* reduces intestinal inflammation in adoptive transfer mouse model of experimental colitis. Clin Dev Immunol. 2011;2011(80):74–83.

Park HH, Kim MJ, Li Y, Park YN, Lee J, Lee YJ, et al. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF- κ B and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells. Int Immunopharmacol. 2013;15(2):296–302.

Park OJ, Han JY, Baik JE, Jeon JH, Kang SS, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid of *Enterococcus faecalis* induces the expression of chemokines via TLR-2 and PAFR signaling pathways. J Leukoc Biol. In press 2013.

Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol. 2010;85(5):657–67.

Philippe D, Favre L, Foata F, Adolfsson O, Perruisseau-Carrier G, Vidal K, et al. *Bifidobacterium lactis* attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. World J Gastroenterol. 2011 Jan 28;17(4):459–69.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. Science. 1998;282(5396):2085–8.

Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(5):2163–7.

Pouliot P, Turmel V, G  linas E, Laviolette M, Bissonnette EY. Interleukin-4 production by human alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(6):804–10.

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (TLR-4). *J Exp Med*. 1999;189(4):615–25.

Rajput IR, Li LY, Xin X, Wu BB, Juan ZL, et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poult Sci*. 2013;92(4):956–65.

Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2003;37(2):105–18.

Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis*. 2007 Jul;13(4):376–85.

Roeder A, Kirschning CJ, Schaller M, Weindl G, Wagner H, Korting HC. Induction of nuclear factor-kappa B and c-jun/activator protein-1 via Toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1318–26.

Rosenfeld L, Ballou CE. Genetic control of yeast mannan structure. Biochemical basis for the transformation of *Saccharomyces cerevisiae* somatic antigen. *J Biol Chem*. 1974;249(7):2319–21.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(1):127–33.

Saad SMI. Probiótico e prebiótico: o estado da arte. Rev Bras de Ciênc Farmacêuticas. 2006;42(1):1–16.

Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, et al. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group β *Streptococcus* by increasing the cell wall density. PLoS Pathog. 2012;8(9):e10002891.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem. 1999;274(25):17406–9.

Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. J Exp Med. 1992;176(4):1091–8.

Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. Int J Food Microbiol. 2008;128(2):371–7.

Seo HS, Cartee RT, Pritchard DG, Nahm, MH. A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. J Bacteriol. 2008;190(7):2379–87.

Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, et al. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. Int Arch Allergy Immunol. 1998;115(4):278–87.

Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(9):997–103.

Singleton DR, Masuoka J, Hazen KC. Surface hydrophobicity changes of two *Candida albicans* serotype B mnn4delta mutants. Eukaryot Cell. 2005 Apr;4(4):639–48.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. Braz Dent J. 2007;18(4):267–80.

Smelt MJ, de Haan BJ, Bron PA, van Swam I, Meijerink M, Wells JM, et al. *L. salivarius*, and *L. lactis* attenuate Th2 responses and increase T reg frequencies in healthy mice in a strain dependent manner. PLoS One. 2012;7(10):e47244.

Soltan Dallal MM, Yazdi MH, Holakuyee M, Hassan ZM, Abolhassani M, Mahdavi M. *Lactobacillus casei* ssp.casei induced Th1 cytokine profile and natural killer cells activity in invasive ductal carcinoma bearing mice. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2012;11(2):183–9.

Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. Infect Dis Clin North Am. 1999;13(2):397–412. Review.

Suzuki S. Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34. Curr Top Med Mycol. 1997 Dec;8(1-2):57–70. Review.

Takahashi N, Kitazawa H, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Iwatsuki K, et al. An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46(3):461–9.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010;140(6):805–20.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR-2 and TLR-4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity. 1999;11(4):443–51.

Tamma SM, Chirmule N, Yagura H, Oyaizu N, Kalyanaraman V, Pahwa S. CD4 cross-linking (CD4XL) induces RAS activation and tumor necrosis factor- α secretion in CD4⁺ T cells. *Blood*. 1997;90(4):1588–93.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23: 901–44.

Telles PDS. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res*. 2003;82(6):466–70.

Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, Schmitz J, Radbruch A, Baumgart DC. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2009 Apr;156(1):78–87.

Tinrat S, Saraya S, Traidej Chomnawang M. Isolation and characterization of *Lactobacillus salivarius* MTC 1026 as a potential probiotic. *J Gen Appl Microbiol*. 2011;57(6):365–78.

Torii A, Torii S, Fujiwara S, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol Int*. 2007;56(3):293–301.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133–46.

Tumurkhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Morikawa A, Hassan F, Islam S, et al. The mechanism of development of acute lung injury in lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(1):182–191.

Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14459–63.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):379–414.

van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signalling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun.* 2005;73(11):7458–64.

van Kooyk Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 6):1478–81.

Van Lenten B. J., Fogelman A. M. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor- α . *J Immunol.* 1992;148(1):112–6.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411–52.

Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Sirén J, Matikainen S, Julkunen I. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2004;75(5):764–71.

Villena J, Barbieri N, Salva S, Herrera M, Alvarez S. Enhanced immune response to pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with heat-killed *Lactobacillus casei*. *Microbiol Immunol.* 2009;53(11):636–46.

Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly (I:C). *BMC Immunol.* 2012;13:53.

Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JW, Kullberg BJ. Endogenous interleukin (IL)–1 α and IL–1 β are

crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* 2006;193(10):1419–26.

Walport M; Travers P; Janeway Jr CA. *Imunobiologia*. 7.ed. São Paulo: Artmed; 2010.

Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiernemann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*. 2003;20(5):402–14.

Watson WH., Zhao Y., Chawla RK. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor alpha. *Biochem J.* 1999;342(Pt 1):21–5.

Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:276–87.

WHO-World Health Organizazation. Food and agriculture organization of the United Nations. Evaluation of health and nutritional porperties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria. Cordoba, 2001.

Williams NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm.* 2010;67(6):449–58.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alphapromoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3195–9.

Yang G, Lee K, Lee M, Ham I, Choi HY. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of *Cudrania tricuspidata* in RAW 264.7 macrophages. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:250.

Youssef-Elabd EM, McGee KC, Tripathi G, Aldaghri N, Abdalla MS, Sharada HM, et al. Acute and chronic saturated fatty acid treatment as

a key instigator of the TLR-mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro. *J Nutr Biochem*. 2012;23(1):39–50.

Zanvit P, Tichopad A, Havlickova M, Novotna O, Jirkovska M, Kolostova K, et al. Adjuvant effect of *Bacillus firmus* on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A. *Immunol Lett*. 2012;134(1):26–34.

Zeng RZ, Kim HG, Kim NR, Lee HY, Jung BJ, Ko MY, et al. Protein expression changes in human monocytic THP-1 cells treated with lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*. *Mol Cells*. 2010;29(6):585–94.

Zhang JW, Du P, Chen DW, Cui L, Ying CM. Effect of viable *Bifidobacterium* supplement on the immune status and inflammatory response in patients undergoing resection for colorectal cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2010;13(1):40–3.

Zhang L, Stuber F, Stamer UM. Inflammatory mediators influence the expression of nociceptin and its receptor in human whole blood cultures. *PLoS One*. 2013;8(9):7413-8.

Zhao HM, Huang XY, Zuo ZQ, Pan QH, Ao MY, Zhou F, et al. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. 2013;19(5):742–9.

Zhao JJ, Feng XP, Zhang XL, Le KY. Effect of *Porphyromonas gingivalis* and *Lactobacillus acidophilus* on secretion of IL1B, IL6, and IL8 by gingivalepithelial cells. *Inflammation*. 2012;35(4):1330–7.