

ADELINE LACERDA JORJÃO

**EFEITOS DO *Lactobacillus rhamnosus* E SEUS PRODUTOS
SOBRE A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ E ANTI-
INFLAMATÓRIOS POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO**



2012

ADELINE LACERDA JORJÃO

**EFEITOS DO *Lactobacillus rhamnosus* E SEUS PRODUTOS SOBRE
A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS EM
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGO**

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

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

São José dos Campos

2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado,

Escola Superior de Cruzeiro
“Prefeito Hamilton Vieira Mendes”

São José dos Campos, 29 de Junho 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria Terezinha das Graças Jorjão** e **Arnaldo Jorjão**, pelo carinho, paciência e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.

As minhas irmãs, **Camila Lacerda Jorjão** e **Loureine Lacerda Jorjão**, pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis.

Os meus familiares em geral, que de alguma maneira me ajudaram a seguir em frente e que sempre acreditaram e torceram por mim.

A Deus que me abençoou com essa oportunidade e me deu saúde e sabedoria para concluir a pesquisa e por colocar somente pessoas maravilhosas em meu convívio durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli do vice-diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora À Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito também pela disposição em ajudar sempre que foi preciso.

A minha orientadora Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pelo convívio amigável, atenção, dedicação, carinho e paciência.

A Minha Co-orientadora Mariella Vieira Pereira Leão que sempre esteve presente e pronta para ajudar nos momentos que precisei.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge pelo convívio fraterno, atenção e disposição para participar da minha banca.

A Profa. Dra. Renata Falchete do Prado por aceitar o convite e se dispor a participar da minha banca.

A CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Á minha amiga, Doutoranda do programa, Ana Paula, quem me indicou o programa e me incentivou a fazer o mestrado, que sempre esta disposta a ajudar quando preciso.

As minhas amigas, Ana Carolina, Vanessa, Simone, que me receberam de braços abertos e me ajudaram muito no início, na adaptação e também sempre dispostas a ajudar.

Ao meu amigo Jonatas Rafael, que permitiu que o acompanhasse em seus experimentos, que me ajudou muito na prática e no dia a dia da pesquisa.

As amigas de mestrado, Elizabete e Michelle, companheiras de créditos e de trabalho, pela amizade, carinho e ajuda sempre que foi preciso.

A aluna de iniciação científica Talita pela ajuda em uma fase importante para os resultados dessa pesquisa.

A aluna de doutorado, do programa, Michelle, que também sempre esteve disposta a ajudar quando precisei.

Aos técnicos de laboratório, Sérgio e Domingos, sempre a disposição, pela ajuda sempre que foi preciso e que contribuíram para fluidez nos experimentos

“Qualquer pessoa que tenha experiência com o trabalho científico sabe que aqueles que se recusam a ir além dos fatos raramente chegam aos fatos em si.”

Thomas Henry Huxley

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25
4.2 Cultura Celular.....	26
4.2.1 Suspensão e Viabilidade da cultura de células.....	26
4.3 Exposição limitada da cultura celular com bactérias vivas.....	27
4.4 Cultivo de células com bactéria morta pelo calor.....	29
4.5 Cultivo de células com produtos liberados (sobrenadante) após morte de <i>L. rhamnosus</i> por calor.....	30
4.6 Quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) - teste imunoenzimático (ELISA)	31
4.7 Produção de óxido nítrico.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 TNF- α	36
5.2 IL-6.....	37
5.3 IL-1 β	39
5.4 IL-12.....	39
5.5 IL-10.....	41
5.6 IL-4.....	42
5.7 ÓXIDO NÍTRICO.....	44
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	54

Jorjão AL. Avaliação dos efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* e seus produtos sobre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios por macrófagos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

De acordo com a literatura, o uso frequente de probióticos em humanos favorece a modulação do sistema imunológico, por mecanismos ainda não totalmente definidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de *Lactobacillus rhamnosus* ou seus produtos induzirem a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e óxido nítrico) por macrófagos de camundongo (RAW 264.7). Para tanto, foram realizadas 3 preparações do microrganismo: SpL: suspensão de bactérias vivas (5×10^7 UFC/mL), SpLA: suspensão de bactérias autoclavadas a 121°C por 15 min (5×10^7 células/mL); e SnLA: sobrenadante da suspensão anterior (SpLA) após centrifugação. As células (macrófagos RAW 264.7) foram cultivadas (37°C, 5% de CO₂) em três diferentes situações: na presença de SpL, SpLA ou SnLA. Após 2 h e 30 min de cultivo, o meio de cultura foi trocado e as células foram cultivadas por mais 16 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e estocados em freezer (-80°C) para posterior análise. Como controle positivo foi utilizado LPS de *Escherichia coli* (10 EU/mL) e como controle negativo solução fisiológica. A quantificação de citocinas foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA) utilizando anticorpos específicos. A produção de óxido nítrico foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess. Os resultados foram analisados estatisticamente, pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey. As suspensões SpL e SpLA foram capazes de induzir produção significativamente superior de TNF- α , IL-6, IL-10 e óxido nítrico em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). SnLA também induziu aumento significativo na produção de TNF- α , IL-10 e óxido nítrico ($p < 0,05$), entretanto, não induziu produção significativa de IL-6 em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). Não foi observada produção significativa de IL-4 e IL-1 β por nenhuma das suspensões estudadas. Com relação a IL-12, as suspensões SpL e SnLA induziram produção semelhante ao controle negativo ($p > 0,05$) e apenas SpLA induziu diminuição significativa na produção desta citocina. Assim, pode-se concluir que as diferentes suspensões de lactobacilos (bactéria viva, bactéria morta ou somente os produtos) foram capazes de induzir a

produção de citocinas pró-inflamatórias e também de IL-10, sugerindo uma atuação tanto estimuladora como reguladora da resposta imunológica.

Palavras-chave: Probióticos, Imunomodulação, Citocinas, Óxido nítrico, Macrófagos.

Jorjão AL. Assessment of the effects of Lactobacillus rhamnosus and their products on the production of proand anti-inflammatory mediators by macrophages [dissertation]. Sao Jose dos Campos, Faculty of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

ABSTRACT

According to the literature, the frequent use of probiotics in humans favors the modulation of the immune system by mechanisms not yet fully defined. The aim of this study was to evaluate the ability of Lactobacillus rhamnosus or their products induce the release of proinflammatory mediators and anti-inflammatory (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 and nitric oxide) by mouse macrophages (RAW 264.7). To this end, there were three preparations of the microorganism: SPL: suspension of live bacteria (5×10^7 UFC/ mL), SPLA: bacteria suspension autoclaved at 121 ° C for 15 min (5×10^7 UFC / mL) and SnLA: supernatant (SPLA) after centrifugation. The cells (RAW 264.7 macrophages) were cultured (37 ° C, 5% CO₂) in three different situations: in the SpL, SPLA or SnLA presence. After 2 h 30 min cultivation, the culture medium was changed and cells were cultured for more 16 h. Then, the supernatants were removed and stored in a freezer (-80 °C) for later analysis. As positive control was used Escherichia coli LPS (10 EU / mL) and physiological solution as negative control. Cytokine quantitation was performed by immunoenzymatic test (ELISA) using specific antibodies. The production of nitric oxide was indirectly determined by nitrite concentration detected by the Griess reagent. The results were statistically analyzed by ANOVA with a significance level of 5%, and Tukey test. SPL and SPLA suspensions were able to induce significantly higher production of TNF- α , IL-6, IL-10 and nitric oxide than the negative control ($p < 0.05$). SnLA also induced a significant increase in the production of TNF- α , IL-10 and nitric oxide ($p < 0.05$), however, did not induce significant production of IL-6 in relation to the negative control ($p > 0.05$). It was not observed production of IL-4 and IL-1 β , by any of the suspensions analyzed. In relation to IL-12, SPL and suspensions SnLA induced production similar to the negative control ($p > 0.05$) and only SPLA induced a significant decrease in the production of this cytokine. Thus, it can be stated that the various suspensions of lactobacilli (live bacteria, killed bacteria or only products) were able to induce the production of proinflammatory cytokines as well as IL-10, suggesting both regulatory and stimulatory immune response performance.

Keywords: Probiotics, Immunomodulation, Cytokines, Nitric oxide, Macrophages.

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são bactérias que produzem efeitos benéficos no hospedeiro, tanto em animais como em humanos. São utilizados para prevenir e tratar doenças, como imunoestimulantes e também podem ser usados em animais como promotores de crescimento.

No Brasil, a ANVISA define probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. As características de um microrganismo para ser considerado um probiótico são as seguintes:

- a) ser seguro para o consumo;
- b) pertencer à microbiota natural do hospedeiro;
- c) sobreviver ao processo de fabricação, comercialização e consumo;
- d) ser resistente aos sucos digestivos e chegar vivo aos intestinos;
- e) ter a capacidade de se desenvolver nos intestinos;
- f) promover efeitos benéficos comprovados cientificamente.

Sugere-se que o uso freqüente de probióticos em humanos promova benefícios tais como: balanceamento da microbiota intestinal, aumento da tolerância e da digestão da lactose, atividade anticarcinogênica, modulação do sistema imunológico e como auxiliar no tratamento da diarreia, principalmente em crianças (Oliveira et. al., 2006). Penna et al. (2000) referem-se também à ação dos probióticos na diarreia associada à imunodepressão, como por exemplo em pacientes com AIDS. De acordo com ANVISA, *Lactobacillus casei rhamnosus* (probiótico)

contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal e seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

A ampla aplicação recente de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias, como probióticos, pode ser atribuída às evidências científicas que demonstraram seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, por meio da modulação da atividade do sistema imune (Yasuda et al., 2008), entretanto, os mecanismos envolvidos nesta modulação do sistema imunológico ainda não estão totalmente definidos. Alguns estudos indicam que os probióticos exercem seus efeitos imunomoduladores por alterar o equilíbrio de citocinas, tendo, por exemplo, efeito sutil inibitório sobre a produção de IL-4, mas, ao mesmo tempo, sendo potentes estimuladores de citocinas Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Amital et al., 2007). Jain et al. (2008) relataram que a administração oral de um composto de probiótico *Lactobacillus casei* reforça a ativação de macrófagos, que é benéfica para fortalecer a resposta imune inespecífica do hospedeiro. Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (Cross, 2002).

Assim, como os efeitos imunomoduladores dos probióticos ainda não estão claramente elucidados, torna-se de grande interesse avaliar os efeitos de probióticos e seus produtos sobre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos, que são células responsáveis por fagocitar elementos estranhos ao corpo e que intervêm na defesa do organismo contra infecções liberando mediadores, como citocinas, por exemplo, que são moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, com intuito de compreender melhor o mecanismo de ação dos probióticos na modulação dessa resposta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O termo probiótico foi proposto pela primeira vez por Lilly e Stillwel (1965), que utilizaram para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimulavam o crescimento de outros microrganismos. Em 1974, Parker utilizou o termo para denominar suplementos alimentares destinados a animais, incluindo microrganismos e substâncias que afetavam o equilíbrio da microbiota intestinal. Fuller (1989) considerou que os probióticos eram suplementos alimentares que continham bactérias vivas que produziam efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal. No entanto, Havenaar e In'tVeld (1992) os consideraram como sendo culturas únicas ou mistas de microrganismos que, administrados a animais ou humanos, produzem efeitos benéficos por melhorar as propriedades da microbiota nativa. Schrezenmeir e De Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização no sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos em sua saúde.

Atualmente, utiliza-se o termo para designar microrganismos comensais que produzem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro e exercem diversas funções fisiológicas, tais como anticarcinogênico, atividade anti-infecciosa e imunomodulatória (Takahashi et al. 2006). Os microrganismos utilizados como probióticos são geralmente componentes não patogênicos da microbiota normal, tais como as bactérias ácidas lácticas (principais gêneros *Lactococcus*,

Lactobacillus, *Streptococcus* e *Enterococcus*) e leveduras como *Saccharomyces* (Borges et al., 2011).

Os probióticos têm sido utilizados em diferentes aplicações, por exemplo, na odontologia, afetando a ecologia oral, principalmente impedindo a adesão de outras bactérias e modificando a composição protéica da saliva, como demonstrado em estudo *in vitro* (Haukioja et al., 2008). Souza et al. (2011) relataram que vários estudos demonstram que probióticos reduzem os níveis de bactérias cariogênicas na saliva, podendo, assim, ser um método auxiliar na prevenção da doença. Twetman e Stecksén-Blicks (2008) concluíram que bactéria probiótica como efeito inibitório sobre patógenos bucais é um conceito promissor, especialmente na infância. Santos et al. (2009) observaram que o consumo de probióticos *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* influenciou significativamente a quantidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos saudáveis, uma vez que foi observada uma redução na contagem de UFC/mL após seu consumo por 20 dias. Em 2012, Matsubara et al. analisaram os efeitos de probióticos em comparação com nistatina em ratos imunossuprimidos que foram inoculados oralmente com *Candida albicans*. Os autores verificaram que os probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *L. rhamnosus*) reduziram significativamente a colonização de *C. albicans* na mucosa oral em comparação com o grupo não tratado. No grupo tratado com *L. rhamnosus*, a redução da colonização pela levedura foi significativamente maior em comparação com a do grupo que recebeu nistatina, demonstrando que o tratamento com probiótico pode ser eficaz na prevenção da candidose.

Teanpaisan et al. (2011) relataram que o uso de *Lactobacillus* orais (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vaginalis*), como probióticos,

mostrou forte efeito inibitório contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, bem como patógenos periodontais Gram-negativos.

Ao longo dos anos várias estratégias para modular a composição da microbiota intestinal a fim de melhorar a digestão, a imunidade e resistência à doença do hospedeiro têm sido investigadas em diversos estudos tanto em animais como em seres humanos (Burr et al., 2007). Com isso, os probióticos vêm se demonstrando capazes de elevar a digestibilidade e eficiência de utilização dos alimentos (Nicodemo, 2001), e ainda, pode aumentar a resposta imune humoral dos animais (Arenas et al.2007). Em 2008, Aly et al. demonstraram que os probióticos podem ser utilizados para reforçar o sistema imune e a saúde das tilápias do Nilo e assim melhorar a resistência a doenças. De acordo com Nayak (2010), diferentes bactérias probióticas ácido lácticas, como *Lactobacillus rhamnosus*, viáveis ou não viáveis, utilizadas como suplementos na alimentação de peixes, podem elevar os níveis de imunoglobulinas. A manutenção da microbiota intestinal por meio de suplementação dietética com microrganismos benéficos é uma nova abordagem não só do ponto de vista nutricional, mas também como uma alternativa viável de terapia para superar os efeitos adversos dos antibióticos e drogas (Nayak, 2010). Doenças crônicas associadas aos hábitos de vida moderna geralmente estão relacionados ao mal funcionamento do sistema imunológico, sendo que o consumo de fibras e probióticos parece ser uma ferramenta nutricional promissora para a modulação do sistema imune em diferentes populações (Romeo et al., 2010).

Amostras histológicas mostraram um aumento de células do sistema imunológico na luz do intestino grosso de camundongos alimentados com iogurte contendo bactérias probióticas *Lactobacillus helveticus* (LeBlanc et al., 2004). Em 2005, Le Blanc e Perdigon avaliaram o papel de iogurte contendo bactérias e seus produtos sobre a redução da

atividade de enzimas pró-carcinogênicas em ratos. Os autores verificaram que os ratos que receberam injeção de substância cancerígena apresentaram atividade enzimática aumentada, contribuindo para o poder mutagênico. Nos ratos alimentados com iogurte contendo bactérias a injeção produziu níveis mais baixos de atividade enzimática em relação ao grupo controle. No entanto, este efeito não foi observado quando os ratos receberam apenas a fração não-bacteriana do iogurte (sobrenadante). Assim, os autores sugeriram que o iogurte pode estar envolvido na diminuição da atividade enzimática pró-carcinógenos e nas mudanças da microbiota intestinal, contribuindo para a prevenção do câncer de colo. Gianotti et al. (2008) observaram que os probióticos, produzidos com uma mistura de *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus johnsonii* auxiliaram na redução da concentração de patógenos e na modulação da imunidade local, em pacientes submetidos à cirurgia para retirada de câncer colo-retal. Segundo LeBlanc e Perdígón (2009), o consumo de leite fermentado pode estimular o sistema imunológico e mantê-lo em um estado de vigilância, que pode ser útil em diversas doenças, como câncer e inflamação intestinal.

Em 2009, D'Arienzo et al. destacaram que a utilização de bactérias ácido lácticas como coadjuvantes não específicos pode aumentar o mecanismo de defesa no início da resposta a infecções gastrointestinais. Fatores como forma de adesão, modo de ação, a origem, a fonte, viabilidade, dose e duração da suplementação, estresse, dieta, condições ambientais determinam a colonização de probióticos no intestino do hospedeiro e também podem influenciar suas atividades (Nayak, 2010). Takeda et al. (2011) demonstraram que probiótico de *Lactobacillus plantarum* foi eficaz na diminuição da infecção em camundongos pelo vírus da Influenza (IFV), demonstrando atividade imunomoduladora e concluíram que essa cepa como um alimento suplementar pode ser útil profilaticamente na infecção pelo IFV. Além disso, Nowak et al. (2012) induziram artrite em ratos e demonstraram que

a administração sistêmica de exopolissacarídeo (EPS), principal componente de biofilme de bactérias lácticas, derivado de *L. rhamnosus* KL37, diminuiu a produção de anticorpos anti-colagênio IgG e sugeriram que EPS ou probióticos produtores de EPS podem ser agentes promissores para a terapia de apoio a pacientes com artrite reumatóide.

Apesar de seu mecanismo de ação ainda não ser totalmente esclarecido, segundo Varavallo et al. (2008), o probiótico pode desenvolver funções no organismo, como aumentar valor nutritivo dos alimentos, aumentando a absorção e os níveis de vitamina B e equilibrando a microbiota intestinal; atuam no controle do colesterol e na redução do risco de câncer; possuem uma particular importância para minimizar a intolerância à lactose dos indivíduos, devido ao aumento de uma enzima que facilita a sua digestão. O probiótico pode atuar na prevenção de doenças e/ou como coadjuvante nos tratamentos, realizando uma proteção do organismo contra infecções e outras doenças, por bloquear a colonização de microrganismos patógenos e estimular a resposta imunológica local. Além destas funções, os probióticos podem também auxiliar no reforço do sistema imunológico, ajudando o organismo a criar defesas contra bactérias e microrganismos indesejáveis (Trois, 2005).

O efeito imunoestimulante dos probióticos pode estar relacionado à capacidade destes microrganismos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T para o intestino (Perdigón e Holgado, 2000). Vitini et al. (2000) verificaram a influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas, tais como: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* em estimular a resposta imune inespecífica e/ou específica. Os autores verificaram que todas as bactérias foram capazes de aumentar o número de células produtoras de IgA associadas com a lâmina própria do intestino

e que este efeito foi dose-dependente. Verificaram também que o aumento de células produtoras de IgA nem sempre estava correlacionado com aumento no número de células T CD4+, indicando que algumas bactérias avaliadas somente induziram expansão clonal de células B produtoras de IgA. Também foi observado que não houve influência sobre as células T CD8+, indicando que essas bactérias não foram capazes de induzir citotoxicidade. Em 2010, Irvine et al. demonstraram que em mulheres HIV positivo suplementadas com probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* houve aumento de células TCD4 em comparação com grupo suplementado com placebo.

Os probióticos podem exercer seus efeitos imunomoduladores por alterar o equilíbrio de citocinas e por interagir com células do sistema imunológico, tais como células mononucleares fagocitárias (monócitos, macrófagos), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células NK, a fim de melhorar a resposta imune inata (Nayak, 2010), bem como linfócitos B e T, importantes na resposta imune específica. Maasen et al. (2000) comprovaram que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal depende da cepa de *Lactobacillus* utilizada, salientando a necessidade de realizar uma cuidadosa seleção das cepas candidatas a probiótico. Jain et al. (2008) relataram que a administração oral de um composto de probiótico *L. casei* reforça a ativação de macrófagos, sendo assim benéfica por fortalecer a resposta imune inespecífica do hospedeiro. Nogueira et al. (2011) ressaltaram que as células dendríticas, que são consideradas eficientes células apresentadoras de antígeno com importante participação no início da resposta imune primária bem como no desenvolvimento da resposta secundária, podem ser moduladas por probióticos e que isto ocorre devido aos receptores específicos para as bactérias presentes na membrana, denominados "toll-like". Christensen et al. (2002) demonstraram que diferentes espécies de *Lactobacillus* causam diferentes formas de ativação de células dendríticas.

Kimoto et al. (2004) realizaram estudo com objetivo de avaliar a atividade imunomoduladora de 15 cepas de *Lactococcus*. Inicialmente, realizaram *in vitro* a avaliação da capacidade de indução de citocinas em cultura de macrófagos de camundongos. Neste experimento, 6 cepas de *Lactococcus* induziram produção de IL-2, IL-6, TNF- α e a maior indução foi observada com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* G50. Neste estudo, os autores demonstraram também em células obtidas do baço de camundongo BALB/c, que a cepa G50 induziu maior produção de IL-12 e IFN- γ e menos de IL-4 e IL-6 em relação ao controle, indicando que a cepa G50 pode aumentar a resposta imune tipo Th1 *in vivo*. Em ratos imunizados com um potente alérgeno do ovo, a ingestão oral da cepa G50 induziu nível de IgE total significativamente menor em relação ao controle. Estes resultados sugeriram que a cepa G50 é capaz de suprimir a resposta Th2. Assim os autores concluíram que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* G50 é um potente probiótico para supressão de reações de hipersensibilidade causadas pela resposta Th2. Em 2007, Amital et al. (2007) relataram que muitas cepas de *Lactobacillus* têm um efeito sutil inibitório sobre a produção de IL-4 *in vitro*, mas, ao mesmo tempo, muitos deles são potentes estimuladores de citocinas Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α .

Cross et al. (2001) destacaram a utilização de probióticos no controle de reações alérgicas, devido a evidências de seu efeito imunomodulador, sendo que certas cepas de lactobacilos podem oferecer benefícios clínicos por meio da melhoria da resposta imune tipo Th1 e supressão da resposta tipo Th2. A alimentação com cepas *Lactobacillus casei Shirota* mortas pelo calor suprimiram a produção de IgE total em camundongos sensibilizados com ovalbumina (Matsuzaki et al., 1998) e também a administração oral de *L. rhamnosus* GG elevou a produção de interferon (IFN- γ) por células mononucleares do sangue em crianças com alergia ao leite de vaca e dermatite associada à IgE (Pohjavuori et al., 2004). Tanto os probióticos do gênero *Lactobacillus* quanto do gênero

Bifidobacterium têm controlado a resposta alérgica, promovendo a modulação e regulação do sistema imune (Aldinucci et al., 2002).

Jain et al. (2010) relataram que bactérias ácido lácticas, especialmente lactobacilos e bifidobactérias, têm sido utilizadas para controlar as reações alérgicas em diferentes modelos animais, bem como em seres humanos. Em 2006, Taylor et al. verificaram em crianças nascidas de mulheres com história de doença alérgica e teste cutâneo alérgico, se a dieta suplementada com probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) nos primeiros 6 meses de vida poderia modificar as respostas imunes específicas a alérgenos e vacina, como toxina do tétano (TT), ácaros da poeira doméstica (HDM), ovalbumina (OVA), β -lactoglobulina (BLG), enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) e fitoemaglutinina (PHA). As crianças que receberam o probiótico demonstraram redução de IL-5 e TGF- β em resposta à ativação policlonal com SEB. Também demonstraram menor produção de IL-10 em resposta à vacina. Entretanto, não ocorreram efeitos significantes dos probióticos nas respostas Th1 e Th2 aos alérgenos. Assim, os autores concluíram que apesar de não ocorrer nenhum efeito consistente nas respostas alérgeno-específicas, este estudo sugeriu que os probióticos podem ter efeitos imunomoduladores nas respostas a vacina, sendo necessário ampliar os estudos.

Bifidobacterium longum, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasceie* *Lactobacillus plantarum* podem regular a expressão de vários tipos de citocinas em diferentes hospedeiros (Perdigon et al., 2002). D'Arienzo et al. (2009) verificaram *in vitro* que em células humanas, obtidas de pessoas com doença celíaca, incubadas com lactobacilos houve produção de IL-12, mas não de IL-10, concordando com Mohamadzadeh et al. (2005), onde cepas *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus brevis* foram responsáveis por induzir liberação de citocinas Th1, IL-1 α , IL-2, e TNF- α , por células dendríticas, mas não citocinas Th2, como IL-10 e IL-4. *L. rhamnosus* GG e uma mistura de

cepas probióticas *L. gasseri* e *L. coryniformis* parecem aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, embora não tenha efeito ou promova ligeira diminuição na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ e TNF- α . Dong et al. (2010) verificaram *in vitro* que *Lactobacillus casei Shirota* foi responsável por melhorar a atividade das células NK e induzir a produção de IL-12 e que, mesmo mortos pelo calor, foram capazes de estimular a produção IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ por essas células. No entanto, estes autores alertaram que uma série de estudos em humanos não demonstraram efeito dos probióticos na produção de citocinas *in vivo*.

Lactobacillus rhamnosus é uma das bactérias mais comumente utilizadas em terapias probióticas. Em estudos clínicos, *L. rhamnosus* GG reduziram significativamente a incidência de infecções respiratórias, reduziram a duração de diarreia e melhoraram os sintomas de dermatite atópica, mas tantos efeitos clínicos benéficos são difíceis de serem explicados sem entendimento dos mecanismos responsáveis pela interação entre lactobacilos, seus produtos secretados e células hospedeiras (Ciszek-Lenda et al. 2011). Francavilla et al. (2012) relataram que é de grande importância que as publicações científicas ressaltem que os probióticos devem ser definidos não só pelo seu gênero e espécie, mas principalmente pelo nome específico da cepa, o que pode ser de importância crítica em estudos dos efeitos biológicos e clínicos de bactérias probióticas.

Assim, de acordo com a literatura, pode-se verificar que os probióticos apresentam diferentes atividades, tais como promotores de crescimento, reguladores da microbiota das mucosas e como imunomodulador e, contudo, este efeito imunomodulador ainda não está claramente elucidado, necessitando ampliar os estudos nesta área a fim de verificar, por exemplo, sua influência na produção e secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias por células de defesa.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar a capacidade de *Lactobacillus rhamnosus* ou seus produtos induzirem a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e óxido nítrico) por macrófagos de camundongo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Neste estudo foi utilizada cepa padrão da espécie *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, considerada uma bactéria com propriedades probióticas.

As cepas foram semeadas em Ágar Man-Rogosa-Shape (MRS- Oxoid, Basingstroke, Hampshire, England) e cultivadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 h. A partir das colônias isoladas e foi feita uma coloração de Gram para confirmação de culturas puras de *L. rhamnosus* e cultivadas em caldo MRS. Após cultivo a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 h, foram obtidas três diferentes preparações do microrganismo para ensaios posteriores:

- a) SpL (suspensão de lactobacilos vivos):** as culturas puras bacterianas foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm, e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos 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 ressuspenso em solução fisiológica estéril e apirogênica até a concentração de 5×10^7 UFC/mL, padronizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e DO 0,400;
- b) SnLA (sobrenadante do lactobacilos mortos):** as suspensões anteriores (SpL) foram autoclavadas a 121 °C por 15 min. Em seguida, centrifugadas por 10 min a 5000 rpm e os sobrenadantes reservados para posterior utilização;

c) SpLA (suspensão de lactobacilos mortos): as suspensões anteriores (SpL) foram autoclavadas a 121 °C por 15 min e utilizada.

4.2 Cultura Celular

Uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) obtida do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ) foi mantida em meio DMEM (LGCBio, São Paulo) completo [acrescentado 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e gentamicina (20 µg/mL)]. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂.

4.2.1 Suspensão e Viabilidade da cultura de células

Para realização dos testes, foi realizada suspensão celular com a remoção mecânica das células aderidas utilizando varredores de células (*cells crapper* – Corning Costar) (Figura 1). Após, o meio de cultura contendo as células foi transferido para tubo e submetido à centrifugação (9000 rpm, 5 min, 25 °C).

O sobrenadante foi descartado e as células (*pellet*) ressuspendidas em meio DMEM completo. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão utilizando azul de tripan e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.



Figura 1 – Remoção mecânica das células utilizando varredores celulares (*cells crapper* –Corning Costar).

4.3 Exposição por tempo limitado da cultura celular com bactérias vivas (Cross et al., 2004)

Para realização dos testes, foram colocadas 1.10^6 células viáveis em cada poço da microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP), acrescentado de meio DMEM completo até obter volume final de 1 mL (Figura 2), para permitir a aderência celular por 18 h (Figura 3) antes do início do experimento (Cross et al., 2004). No dia seguinte, as células não aderidas foram removidas e as células aderidas foram lavadas 2 vezes com solução fisiológica estéril e apirogênica. O meio antigo foi substituído por 500 μ L de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino sem adição de antibióticos (Cross et al., 2004).



Figura 6 - Microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP), com meio DMEM completo e as células viáveis (1.10^6 céls/mL).

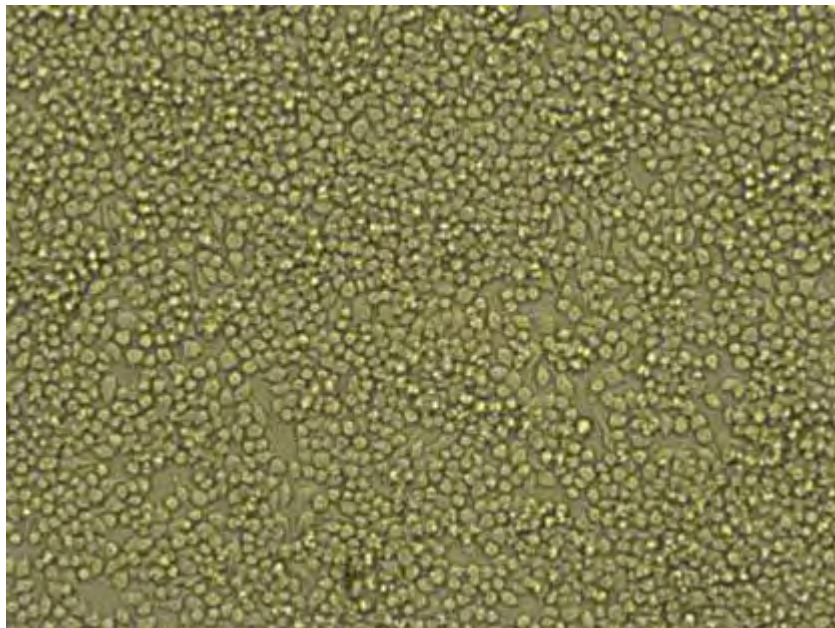


Figura 3 - Macrófagos aderidos ao fundo da microplaca de 24 poços após aderência *overnight*. Microscopia óptica, aumento de 100X.

Para este teste, foi utilizada a suspensão bacteriana 1 (SpL) na concentração de 5×10^7 bactérias viáveis/mL. Alíquotas desta suspensão (0,5 mL) foram adicionadas aos poços da microplaca de 24 poços contendo as células RAW 264.7 na concentração final de 1.10^6 células em 1 mL de meio DMEM completo, sem antibiótico. Assim, as células foram cultivadas com $2,5 \times 10^7$ bactérias vivas, representando uma relação bactéria: célula de 25:1 (Cross et al., 2004).

As células foram cultivadas na presença de bactérias vivas por um tempo limitado (2,5 h – 37 °C e 5% de CO₂). Após, as bactérias não fagocitadas foram removidas da cultura celular por 2 lavagens com solução fisiologia estéril e apirogênica. Foi adicionado aos poços da microplaca 1 mL de meio DMEM completo (com gentamicina). As células foram cultivadas por 16 h a 37 °C (5% de CO₂). Após, os sobrenadantes foram removidos dos poços e estocados em freezer (-80 °C) para posterior análise de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) e óxido nítrico.

Como controle negativo foi utilizado, em todos os cultivos, solução fisiológica estéril e apirogênica e como controle positivo LPS de *E. coli* (10 EU/mL). Foram realizadas 12 repetições (amostras) para cada grupo.

4.4 Cultivo de células por tempo limitado com bactéria morta pelo calor

Para realizar cultivo de células com bactéria morta pelo calor, foi utilizada a suspensão bacteriana 3 (SpLA) na concentração de 5×10^7 UFC/mL. Alíquotas desta suspensão (0,5 mL) foram adicionadas aos poços da microplaca de 24 poços contendo as células RAW 264.7 na

concentração final de 1.10^6 células em 1 mL de meio DMEM completo. Assim, as células foram cultivadas com $2,5 \times 10^7$ bactérias mortas por calor, representando uma relação bactéria: célula de 25:1 (Cross et al., 2004).

As células foram cultivadas na presença de bactérias mortas por um tempo limitado (2,5 h – 37 °C e 5% de CO₂). Após, as bactérias não fagocitadas foram removidas da cultura celular por 2 lavagens com PBS estéril e apirogênico. Foi adicionado aos poços da microplaca 1 mL de meio DMEM completo e foram cultivadas por 16 h a 37 °C (5% de CO₂). Após, os sobrenadantes foram removidos dos poços e estocados em freezer (-80°C) para posterior análise de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) e óxido nítrico.

4.5 Cultivo de células com produtos liberados (sobrenadante) após morte de *L. rhamnosus* por calor

Para realizar cultivo de células com produtos bacterianos liberados após morte da bactéria pelo calor, foi utilizada a suspensão bacteriana 2 (SnLA – sobrenadante obtido por centrifugação da suspensão após morte da bactéria por calor). Alíquotas desta suspensão (0,5 mL) foram adicionadas aos poços da microplaca de 24 poços contendo as células RAW 264.7 na concentração final de 1.10^6 células em 1 mL de meio DMEM completo. As células foram cultivadas por tempo limitado (2,5 h – 37 °C e 5% de CO₂). Após, os produtos bacterianos não fagocitados foram removidos da cultura celular por 2 lavagens com PBS estéril e apirogênico. Foi adicionado aos poços da microplaca 1 mL de meio DMEM completo e foram cultivadas por 16 h a 37 °C (5% de CO₂). Após, os sobrenadantes foram removidos dos poços e estocados em

freezer (-80°C) para posterior análise de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) e óxido nítrico.

4.6 Quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) - teste imunoenzimático (ELISA) (ANEXO A):

Para realizar a detecção e quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) foram utilizados Kits específicos de ELISA (R & D Systems) (Figura 4). Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) 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) (100 μ L/poço), mantidas 18 h em temperatura ambiente .



Figura 4. Kits de ELISA para a detecção e quantificação de citocinas (TNF- α) da R&D Systems.

No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 h a temperatura ambiente. Após, foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e receberam 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de células e 100 μ L dos padrões de cada citocina com concentrações conhecidas (curva-padrão).

Os testes foram realizados em duplicata e as placas mantidas 2 h a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e foram acrescentados 100 μ L de anticorpos de detecção específico para cada citocina (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti-IL-12) marcados com biotina. As placas foram mantidas por 2 h em temperatura ambiente.

Após lavagem, foi acrescentada a estreptavidina (100 μ L/poço) e as placas foram mantidas por 20 min cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 μ L/poço de solução contendo substrato cromogênico (tetrametil benzidina, TMB) e peróxido de hidrogênio. As placas foram tampadas com papel alumínio para evitar a luz direta e mantidas em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 50 μ L de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) (Figura 5). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 570 nm.

Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 ou IL-12) (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinados utilizando o programa GraphPadPrism 5.0. Os resultados foram analisados estatisticamente, pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey.



Figura 5 - Esquema ilustrando as etapas da reação de ELISA para quantificação das citocina, após sensibilização com anticorpo de captura.

4.7 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess, composto por volumes iguais de 3 soluções (A, B e C). Antes do teste, os sobrenadantes foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min.

A solução A foi produzida a partir de 0,6 g de ácido sulfanílico dissolvido em 70 mL de água destilada quente. Após esfriar a solução foi adicionada de 20 mL de ácido clorídrico concentrado e de água destilada até o volume de 100 mL.

A solução B foi produzida a partir de 0,6 g de alfa-naftalamina dissolvido em 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico. O volume foi completado com água destilada até 100 mL.

A solução C foi produzida com 16,4 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em água destilada no volume de 100 mL.

Após a mistura de partes iguais das 3 soluções, o reagente de Griess foi acrescentado nos poços de uma placa de 96 poços. A seguir, o mesmo volume das amostras dos sobrenadantes foi acrescentado (Figura 6). Após 10 min, a leitura foi realizada utilizando leitor de ELISA com comprimento de onda 570 nm. Para o cálculo da concentração do nitrito, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 23 pg/mL a 0,72 pg/mL constituindo uma curva-padrão.

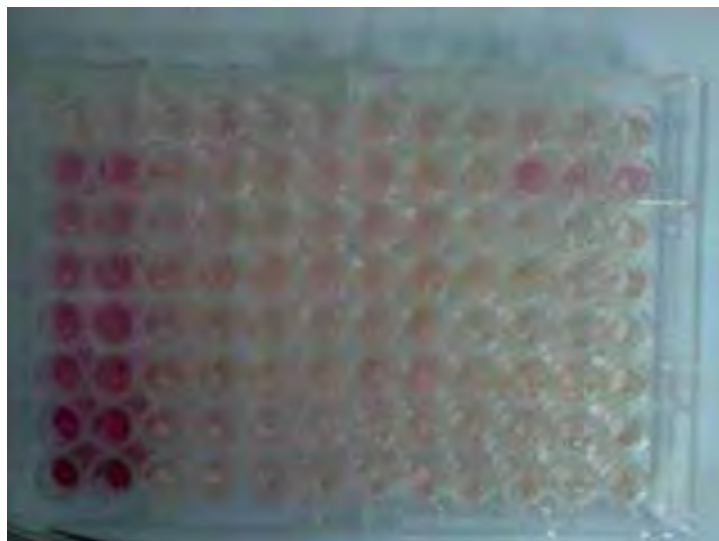


Figura 6 - Placa de 96 poços com Reagente de Griess e mesmo volume de amostras para leitura utilizando da concentração de nitrito.

Os resultados foram analisados estatisticamente, pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 TNF- α

Os valores de TNF- α (pg/mL) produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos estão demonstrados na Tabela 1. Os valores médios, desvios-padrão bem como a formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 - Produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	2904,61	1577,08	1353,38	839,05	40,83
2	2681,21	1578,78	1407,47	802,61	32,50
3	2906,59	1581,35	1261,30	1376,47	31,28
4	3009,39	2290,42	1335,59	1207,24	29,15
5	2271,31	1286,45	1527,25	1309,63	25,83
6	2322,05	2352,37	2071,63	1233,27	24,63
7	2582,36	2461,76	2057,79	1257,67	23,14
8	2439,36	2425,52	2079,54	1136,68	32,50
9	2378,07	2218,59	1465,90	1085,46	26,13
10	2393,88	1286,45	1550,14	1283,24	26,44
11	2423,54	1283,69	1466,48	741,25	24,33
12	2357,64	2218,59	1501,56	942,90	27,34

Tabela2 - Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	2431	257,7	A
Lactobacilos Vivos	1900	485,1	A
Lactobacilos Mortos	1484	301,0	A
Sobrenadante	1172	217,3	B
Controle Negativo	26,89	4,96	C

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Pode-se verificar que as suspensões contendo lactobacilos vivos ou mortos pelo calor foram capazes de induzir significativamente a produção de TNF- α , de forma semelhante ao LPS ($p > 0,05$) e diferente do grupo do sobrenadante e do controle negativo ($p < 0,05$). O sobrenadante contendo os produtos citoplasmáticos do microrganismo induziu produção intermediária desta citocina, sendo estatisticamente diferente de todos os grupos analisados ($p < 0,05$). O controle negativo apresentou pequena produção de TNF- α , sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

5.2 IL-6

Os valores de IL-6 (pg/mL) produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos estão demonstrados na Tabela 3. Os valores médios, desvios-padrão bem

como a formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 3 - Produção de IL-6 (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

Amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	1052,04	21,18	94,22	5,25	2,68
2	1061,94	17,17	77,32	3,68	2,68
3	1066,55	19,55	85,50	7,75	2,68
4	1058,63	33,57	84,03	3,11	2,68
5	1047,04	33,01	73,57	3,64	2,72
6	1054,33	37,45	84,76	2,68	2,68
7	1058,73	32,50	94,06	4,03	2,68
8	1046,28	42,88	92,56	3,72	2,68
9	1055,05	30,65	104,08	3,77	2,68
10	1061,14	22,90	104,03	6,83	2,68
11	1039,43	28,94	82,93	2,81	2,68
12	1046,60	19,60	80,01	3,16	2,68

Tabela 4 - Valores médios de IL-6 (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	1055	7,95	A
Lactobacilos Vivos	29,79	8,12	B
Lactobacilos Mortos	85,13	9,79	B
Sobrenadante	3,70	1,60	C
Controle Negativo	2,68	0,01	C

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Pôde-se observar que a estimulação com LPS induziu a maior produção de IL-6, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). As suspensões de lactobacilos com células vivas ou mortas foram capazes de induzir produção de IL-6 estatisticamente superiores aos grupos do sobrenadante e controle negativo ($p < 0,05$), entretanto, esta produção foi significativamente menor que do grupo LPS ($p < 0,05$). Já o sobrenadante com produtos de lactobacilos induziu baixa produção de IL-6, sendo estatisticamente semelhante ao grupo controle negativo ($p > 0,05$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

5.3 IL-1 β

Nenhuma suspensão de lactobacilos foi capaz de induzir produção de IL-1 β , uma vez que os níveis desta citocina só puderam ser detectados nas culturas de macrófagos estimulados com LPS, com uma média de 126,8 pg/mL e desvio padrão de 12,48.

5.4 IL-12

Os valores de IL-12 (pg/mL) produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos estão demonstrados na Tabela 5. Os valores médios, desvios-padrão bem como a formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 5 - Produção de IL-12 (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	168,54	153,04	168,54	194,44	238,25
2	286,85	147,94	153,04	221,63	283,90
3	485,71	142,88	103,55	255,14	260,83
4	425,99	173,78	113,19	205,24	260,83
5	137,85	127,89	251,16	266,55	255,14
6	147,94	195,10	132,85	260,83	266,55
7	142,88	286,85	89,32	232,68	260,83
8	98,78	509,18	122,96	289,75	227,14
9	98,78	383,77	98,78	243,85	301,56
10	195,10	113,19	118,06	307,51	408,61
11	257,00	173,78	94,04	199,83	289,75
12	280,79	108,36	118,06	199,83	331,73

Tabela 6 - Valores médios de IL-12 (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	181,8	125,2	A
Lactobacilos Vivos	163,4	123,0	A
Lactobacilos Mortos	118,1	44,66	B
Sobrenadante	238,3	37,32	A
Controle Negativo	263,7	48,78	A

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Após análise estatística, pôde-se verificar que a produção de IL-12 foi semelhante em praticamente todos os grupos avaliados. O grupo controle negativo apresentou o maior valor médio, sendo semelhante aos grupos estimulados com LPS, lactobacilos vivos e sobrenadante de

lactobacilos ($p>0,05$). Já o grupo estimulado com lactobacilos mortos apresentou níveis de IL-12 estatisticamente menores que os demais grupos ($p<0,05$).

5.5 IL-10

Os valores de IL-10 (pg/mL) produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos estão demonstrados na Tabela 7. Os valores médios, desvios-padrão bem como a formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 7 - Produção de IL-10 (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

Amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	1852,12	69,84	245,28	82,28	1,73
2	1865,99	81,29	273,33	102,60	4,67
3	1800,25	87,45	253,80	362,89	1,73
4	1977,27	104,07	279,12	270,65	1,73
5	1828,66	132,92	233,16	277,68	1,73
6	1843,13	136,22	256,73	210,42	1,73
7	1726,70	133,25	209,50	197,53	1,73
8	1753,21	128,93	264,03	253,59	1,73
9	1801,09	119,86	266,36	246,31	1,73
10	1670,90	79,46	292,40	364,79	2,32
11	1708,16	72,83	251,75	110,85	1,73
12	1818,00	96,00	211,61	99,06	1,73

Tabela 8 - Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	1810	82,02	A
Lactobacilos Vivos	100	25,57	B
Lactobacilos Mortos	255	25,27	B
Sobrenadante	228	99,39	C
Controle Negativo	1,73	0,85	C

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Pôde-se observar que a estimulação com LPS induziu maior produção de citocinas, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). As culturas estimuladas com lactobacilos vivos, lactobacilos mortos e com sobrenadante de lactobacilos produziram quantidades estatisticamente superiores de IL-10 em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), sendo que os grupos de lactobacilos mortos e de sobrenadante foram semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes do grupo de lactobacilos vivos ($p < 0,05$).

5.6 IL-4

Os valores de IL-4 (pg/mL) produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos estão demonstrados na Tabela 9. Os valores médios, desvios-padrão bem como a formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 10.

A produção de IL-4 só foi detectada em seis amostras estudadas, duas do grupo estimulado com LPS, duas do grupo estimulado com

lactobacilos vivos e duas do grupo de lactobacilos inativados pelo calor. Estes valores de IL-4 não foram estatisticamente significantes, de modo que todos os grupos foram semelhantes ($p>0,05$).

Tabela 9 - Produção de IL-4 (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

Amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	0	0	1,15	0	0
2	0	0,615	0	0	0
3	3,28	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	1,68	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0,61	0	0	0	0
12	0	0	0,080	0	0

Tabela 10 - Valores médios de IL-4 (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	0,32	0.9472	A
Lactobacilos Vivos	0,19	0.5011	A
Lactobacilos Mortos	0,10	0.3307	A
Sobrenadante	0	0	A
Controle Negativo	0	0	A

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p\leq 0,05$).

5.7 ÓXIDO NÍTRICO

Os valores de óxido nítrico produzidos por macrófagos após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos, bem como os valores médios, desvios-padrão e a formação de grupos homogêneos estão demonstrados nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Uma pequena produção de óxido nítrico foi detectada em todos os grupos estudados. Após análise estatística, pode-se verificar que as suspensões de lactobacilos e LPS induziram maior produção de óxido nítrico quando comparadas ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Produção de óxido nítrico (pg/mL) por macrófagos de camundongo após estimulação com LPS ou diferentes suspensões de lactobacilos.

Amostras	LPS	Lactobacilos Vivos	Lactobacilos Mortos	Sobrenadante	Controle Negativo
1	1,80	2,49	4,42	2,16	0,48
2	0,72	0,72	2,80	1,92	1,09
3	1,40	2,16	9,23	1,54	0
4	2,16	0,16	2,21	0,72	0
5	3,39	1,25	1,40	0	0
6	2,16	2,27	1,40	0,92	0
7	1,09	1,67	0,92	1,67	3,50
8	1,25	1,25	0,92	0,72	1,80
9	2,04	0,92	0,92	1,92	1,40
10	1,09	0,72	9,48	0,48	0
11	1,09	0,92	2,38	0	0
12	1,54	3,20	1,80	2,04	1,09

Tabela 12 - Valores médios de óxido nítrico (pg/mL) e desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental bem como a formação de grupos homogêneos.

Grupos	Média (pg/mL)	Desvio-padrão	Grupos Homogêneos*
LPS	2.005	3.062	A
Lactobacilos Vivos	1.470	0.723	A
Lactobacilos Mortos	1.250	0.890	A
Sobrenadante	1.230	0.793	A
Controle Negativo	0.240	6.662	B

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, por ser uma das bactérias probióticas mais utilizadas, especialmente em estudos recentes que avaliam seu papel no tratamento de infecções causadas pelo herpes vírus tipo 1, prevenção de asma, artrite reumatoide, dermatite atópica, entre outras doenças (Jang et al., 2012; Khani et al., 2012; Marsella et al., 2012; Nowak et al., 2012). Tem-se observado na literatura que as bactérias probióticas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são importantes bactérias imunomoduladoras, especialmente na defesa do organismo contra patógenos (Khani et al., 2012), embora o mecanismo de ação não esteja claramente definido. De acordo com Francavilla et al. (2012), como existem diversas bactérias probióticas que podem apresentar diferentes mecanismos de ação no organismo e, conseqüentemente, implicar em diferentes efeitos biológicos e clínicos, é de grande importância ressaltar seu gênero, espécie e cepa, para que cada bactéria probiótica específica possa ter uma indicação clínica mais definida.

Na atual pesquisa, pode-se verificar diferenças significativas na produção de citocinas por macrófagos quando estimulados por *L. rhamnosus*. Outros autores já haviam relatado que o efeito dos probióticos sobre citocinas é controverso, uma vez que os probióticos têm demonstrado promover, inibir ou não ter efeito na sua produção (Torii et al., 2007; Segawa et al., 2008, Jang et al., 2012).

Com relação às citocinas e mediadores pró-inflamatórios estudadas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , óxido nítrico), observou-se que a estimulação com *L. rhamnosus* (bactéria viva, morta ou produtos) promoveu alta produção de TNF- α , sendo alguns casos semelhantes ao

grupo estimulado com LPS. Estes resultados concordam com outros estudos da literatura que verificaram que diferentes bactérias probióticas (*L. casei* Shirota, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*) induziram produção de TNF- α em macrófagos (Perdigón et al., 2002; Cross et al., 2004; Dong et al., 2010; Won et al., 2011; Khani et al., 2012). Da mesma forma que no presente estudo, Khani et al.(2012) observaram que *L. rhamnosus* vivo foi capaz de promover maior indução de TNF- α , sugerindo que a presença da bactéria inteira favoreceria sua fagocitose e consequente ativação do macrófago.

Embora, *in vivo*, TNF- α possa ser produzido por diversos tipos de células, os macrófagos são seus principais produtores. É uma proteína de fase aguda, que inicia a produção de uma cascata de citocinas, aumentando assim a permeabilidade vascular e o recrutamento de novos macrófagos e neutrófilos para o local de uma infecção (Castillo et al. 2011). Algumas funções benéficas do TNF- α incluem o seu papel na resposta imunitária a bactérias, e certos fungos, invasões virais e parasitárias, bem como o seu papel na necrose de tumores específicos. TNF- α secretado por macrófagos também provoca a coagulação do sangue que pode ajudar a conter a infecção.

Com relação a IL-6, a estimulação com *L. rhamnosus* (bactéria viva ou morta) também induziu produção significativamente maior em comparação ao controle negativo, entretanto, foi estatisticamente inferior em relação ao grupo LPS. Já Habil et al. (2011) observaram que diferentes cepas de bactérias probióticas, tais como *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salivariuse* *B. breve* foram capazes de suprimir a produção de IL-6 por macrófagos previamente estimulados com LPS, indicando um papel imunomodulador. Estes autores concluíram que as cepas probióticas podem exercer diferentemente tanto ativação imune como funções supressoras.

Ainda com relação a IL-6, o sobrenadante contendo os produtos de *L. rhamnosus* induziu produção semelhante ao controle

negativo, sugerindo a necessidade da presença de componentes da parede celular para indução da síntese desta citocina. A liberação destes mediadores químicos pelos macrófagos depende da forma como o probiótico é apresentado, ou seja, se os produtos bacterianos são associados à parede celular (sinal por contato) ou se são produtos solúveis secretados (sinais não mediados por contato) (Habil et al., 2011).

A IL-6 é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (Souza et al. 2007). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma, ela participa de uma cascata de reações que se inicia com o dano tecidual e que objetiva, em última instância, a restauração do tecido (Silva et al. 2012).

Quanto à produção de óxido nítrico, embora os níveis detectados tenham sido baixos, a indução obtida pelas suspensões de lactobacilos foi estatisticamente superior ao controle negativo e semelhante ao LPS. Também Lee et al. (2008), utilizando *Bifidobacterium adolescentis*, e Khani et al. (2012), utilizando *L. rhamnosus*, observaram aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos de diferentes linhagens (RAW 264.7 e J774.1, respectivamente), embora maiores produções deste mediador sejam observadas quando os macrófagos são previamente ativados com IFN- γ .

Embora sendo uma das mais simples moléculas biológicas na natureza, o óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares (Queiroz e Batista, 1998). Assim, a estimulação de sua produção, bem como das citocinas pró-inflamatórias citadas

anteriormente, poderia beneficiar a defesa e impedir a instalação, multiplicação e permanência de patógenos nos tecidos.

Na presente pesquisa, nenhuma forma de ativação celular com *L. rhamnosus* (bactéria viva, bactéria morta ou produtos) induziu produção detectável de IL-1 β . Esta produção só foi observada quando as células foram estimuladas com LPS. Bleau et al. (2007) também verificaram baixos níveis de IL-1 β em cultura de macrófagos estimulados com extratos de lactobacilos quando comparados com LPS e peptidoglicano. Já Dong et al. (2010, 2011) verificaram aumento na produção de IL-1 β após estímulo com bactérias probióticas, entretanto, os autores utilizaram células mononucleares do sangue periférico humano, variáveis proporções de diferentes cepas probióticas e maior tempo de estimulação celular. Com isso, pode-se verificar que a produção de citocinas pró-inflamatórias é influenciada diferentemente por estas bactérias, que possivelmente apresentam a capacidade de estimular moderadamente em condições de ausência de resposta ou suprimir em condições de excesso da mesma.

Com relação a IL-12, as suspensões de bactérias vivas e somente com produtos bacterianos e até mesmo LPS não induziram produção desta citocina de forma estatisticamente diferente do grupo controle. Embora outros estudos demonstrem que bactérias probióticas possam induzir fortemente a produção de IL-12 por macrófagos ou células mononucleares do sangue periférico (Won et al., 2011; Dong et al., 2010; Cross et al., 2004), aparentemente esta produção pode ser inibida por diferentes componentes celulares, como peptidoglicano, de até mesmo outras bactérias Gram-positivas. De fato, a suspensão de *L. rhamnosus* mortos, que provavelmente continha maior quantidade de componentes da parede celular devido à lise bacteriana promovida pela autoclavagem, apresentou menor produção de IL-12. Diferentemente, Miyazawa et al. (2011), que também analisaram a capacidade de uma cepa específica de *Lactobacillus gasseri* (viva ou morta pelo calor) de induzir a produção de

IL-12 por macrófagos (linhagem J774.1), verificaram que quando as células foram estimuladas com a bactéria morta houve aumento significativo na produção de IL-12 quando comparado com a bactéria viva. Portanto, as bactérias ácido lácticas, como *L. rhamnosus*, podem modular a função de macrófagos tanto pela supressão como pelo aumento de IL-12 (Foligne et al., 2007; Ichikawa et al., 2007; Shida et al., 2006; Habil et al., 2011) e, interessante, certos componentes celulares bacterianos podem reverter o perfil de citocinas induzido por lactobacilos, modificando este perfil de produção predominante de IL-12 para produção predominante de IL-10, considerada uma citocina supressora de IL-12.

No presente estudo, todas as preparações com lactobacilos (bactéria viva, morta ou sobrenadante) induziram produção de IL-10 significativamente maior que o controle, embora menor que a induzida por LPS. E ao comparar as diferentes preparações de lactobacilos, houve maior produção de IL-10 quando foi utilizada bactéria morta ou sobrenadante. Portanto, a suspensão com microrganismos mortos induziu mais IL-10 e menos IL-12, e as suspensões de bactérias vivas e com produtos bacterianos induziram fracamente ambas. Shida et al. (2011) verificaram que *L. casei* Shirota induziu potencialmente IL-12 e fracamente IL-10, *L. plantarum* ATCC14917 induziu potencialmente IL-10 e fracamente IL-12, e *L. johnsonii* JCM2012 induziu fracamente ambas. E ainda, verificaram velocidades diferentes de indução das citocinas pelas diferentes cepas probióticas e modificações destas respostas com a utilização de componentes celulares bacterianos. Assim, o padrão de indução de IL-12/IL-10 é flexível e pode ser modificado por bactérias circunvizinhas e seus componentes quando os macrófagos são estimulados por bactérias probióticas.

Já com relação a IL-4, todos os grupos apresentaram produção extremamente baixa ou não detectável. Estes resultados são de difícil discussão, entretanto, a literatura também aponta diversos efeitos controversos de diferentes bactérias probióticas. O estudo de Drago et al.

(2010), por exemplo, avaliou a capacidade de 4 cepas diferentes de *L. salivarius* de modular a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos. Duas cepas (LDR0723 e CRL1528) promoveram aumento significativo na produção de IL-12 e IFN- γ e diminuição da liberação de IL-4 e IL-5, enquanto que as outras duas cepas (BNL1059 e RGS1746) favoreceram resposta Th2, levando a uma diminuição na relação Th1/Th2 em comparação às células não estimuladas. Assim, os autores concluíram que a capacidade de *L. salivarius* de modular a resposta imune foi estritamente cepa dependente e que cepas da mesma espécie podem apresentar resultados opostos. E ainda, uma avaliação cuidadosa das propriedades anti-inflamatórias dos lactobacilos deve ser realizada sobre cada cepa, antes de qualquer consideração sobre seu potencial uso probiótico. Em 2011, Won et al. avaliaram 26 cepas de lactobacilos, sendo a maioria isolada de *Kimchi* (comida tradicional coreana), analisando a capacidade de modular o balanço Th1/Th2. A produção mais alta de IL-12 e a mais baixa de IL-4 foi observada por 4 cepas específicas. Estas cepas induziram uma produção maior de IL-12 do que as obtidas pelas cepas controle (*L. casei* e *L. rhamnosus*), embora tenham induzido produção de IL-10, que é supressor de IL-12.

Assim, o presente trabalho demonstra que *L. rhamnosus*, e até mesmo somente seus produtos, são capazes de induzir moderadamente a síntese de citocinas pró-inflamatórias e, possivelmente, com perfil de uma resposta do tipo Th1, a qual é geralmente protetora na defesa contra a maior parte dos patógenos intracelulares e contrária aos quadros de hipersensibilidade.

Entretanto, é importante ressaltar que se trata de um estudo *in vitro* com somente uma linhagem celular em condições de repouso, uma vez que não havia recebido nenhum tratamento ou estimulação prévia. Diferente das condições clínicas, nas quais existe a participação de várias células, especialmente dos linfócitos T helper, principais células secretoras de citocinas e coordenadoras da resposta

adaptativa, além da presença simultânea de outros estímulos como patógenos, caracterizando um quadro extremamente mais complexo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados da presente pesquisa, pode-se concluir que:

- a) Todas as suspensões de *Lactobacillus rhamnosus* (bactéria viva, morta ou seus produtos) induziram significativa produção de TNF- α e óxido nítrico, sendo semelhantes à estimulação com LPS;
- b) Somente as suspensões com bactérias vivas ou mortas de *L. rhamnosus* foram capazes de estimular produção significativa de IL-6;
- c) Nenhuma suspensão de *L. rhamnosus* foi capaz de induzir produção detectável de IL-1 β e de IL-4;
- d) Todas as suspensões de *L. rhamnosus* (bactéria viva, morta ou seus produtos) induziram significativa produção de IL-10 em relação ao controle, embora inferior ao induzido por LPS.

8 REFERÊNCIAS*

Aldinucci C, Bellussi L, Monciatti G, Passali GC, Salerni L, Passali D, Bocci V. Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *Euro J Clinic Nut.* 2002;56(12):55-61.

Aly SM, Ahmed YA, Ahlam Abdel-Aziz, Ghareeb, Mohamed GF. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 2008;25(1-2):128-36.

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;1110:661–69.

Arenas SE, Reis LS, Fazatti-Gallina NM, Fugimura SH, Bremen-Neto H, Messas AC, et al. Probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine. *Arch Zootec.* 2005;58(224):733-36.

Arenas, S.E, Reis LS, Frazatti-Gallina NM, Giuffrida R, Pardo PE. Efeito do probiótico proenzime® no ganho de peso em bovinos. *Arch. Zootecnia.* 2007;56(213):75-8.

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 [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 ago; citado em 26 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Borges FM, Salgarello RM, Gurian TM. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. Disciplina de Nutrição Animal da Univ. Fed. De Pelotas [Home Page UFPel]. [Atualização 2011; Acesso 04/10/2011]. Disponível em: http://wp.ufpel.edu.br/nutricaoanimal/files/2011/03/Avan%C3%A7os_cães_gatos.pdf.

Burr G, Gatlin III D, Ricke S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *J World Aqua Sock*. 2007;36(4): 425-36.

Castillo K, Rojas-Rivera D, Lisbona F, Caballero B, Nassif M, Court FA, et al. BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 α branch of the unfolded protein response. *EMBO J*. 2011;30(21):4465-78.

Ciszek-Lenda M, Nowak B, Sróttek M, Gamian A, Marcinkiewicz J. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Inter J of Exper Pathol*. 2011;92(6):382–91.

Christensen HR, Freakier H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immuno*. 2002;168(6):171-78.

Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol*. 2001;1(5):891–901.

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

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

D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine*. 2009;48(3):254–59.

Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin Exp Immunol*. 2011;161(2):378–88.

Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):378–88.

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;25(3):44

FrancaVilla R, Fontana C, Cristofori F. Letter: identification of probiotics by specific strain name. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(7):852–9

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

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365–78.

Gianotti L, Morelli L, Galbiati F, Rocchetti S, Coppola S, Beneduce A, Gilardini C, Zonenschain D, Nespoli A, Braga M. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2008;16(2):167–75.

Habil N, Murrani WA, 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):283–293.

Havenaar R, Brink BT, HuisInt`Veld JHJ. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall;1992.p,209-24.

Haukioja A, Loimaranta V, Tenovuo J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(4):336–43.

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.

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

Jain S , Yadav H , Sinha PR , Kapila S , Naito Y , Marotta F . Anti-allergic effects of probiotic Dahi through modulation of the gut immune system. Turk. J Gastroenterol. 2010;21(3):244-250.

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;4(3):150-6.

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.

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.

LeBlanc AM, Valdez J, Perdigon G. Inflammatory immune response. Eur J Inflamm. 2004;2:21–31.

LeBlanc AM, Perdigon G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell*. 2005;29(1):15–24.

Lee K, Jang S, Kim MJ, Kim JH, Chung MJ, Kim KJ, Ha NJ. Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2008;8:310

Lilley DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965;147(3659):747-48.

Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*. 2000;18(23):2613-23.

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;15;146(2):185-9

Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakamae AEM. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis*. 2012;18(6):260–4.

Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain shirota on immunoglobulin e production in mice. *J Dairy Sci*. 1998;81(1):48-53.

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.

Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(8):2880-85.

Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 2010;29(1):2-14.

Nicodemo MLF. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. Documentos 106. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; 2001;54.

Nogueira JCR, Gonçalves MCR. Probiotics in allergic rhinitis. *Braz J Otorhinol.* 2011;77(1):129-34.

Nowak B, Ciszek-Lenda M, Sróttek M, Gamian A, Kontny E, Górska-Fraczek 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.* 2012;60(3):211–20.

Oliveira LT, Batista SMM. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. SKL Functional Nutrition [home page na internet]. [Atualização em 2010; Acesso em 14/07/2010]. Disponível em: http://www.sklpharma.com.br/pdf/at_preb_20061002.pdf.

Parker RB. Probiotics the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health.* 1974;29:4-8.

Penna FJ, Filho LAP, Calçado AC, Junior HR et al. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. *J Pediatr (Rio J).* 2000;76:209-17.

Perdigon G, Holgado APR. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller R, Perdigon G. *Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics.* Dordrecht: Kluwer Academic; 2000.p.213-33.

Perdigon G, Galeano CM, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(4):6-21.

Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, et al. *Lactobacillus GG* effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004:130-6.

Queiroz, SL., Batista, AA.. Funções biológicas do óxido nítrico. Química Nova, 1999;22(4),584-590. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000400017&lng=en&tlng=pt.

Romeo J, Nova E, Wärnberg J, Martínez SG, Ligia LED, Marcos A. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. Nutr Hosp. 2010;25(3):341-9.

Santos AL, Jorge AOC, Santos SSF, Silva CRG, Leão MVP. Influence of probiotics on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity. Braz J Microbiol. 2009;40:960-4.

Schrezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. Am J Clin Nutr. 2011;73(2):361-4.

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.

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):997-03.

Shida K, Nanno M, Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria. Gut Microbes. 2011;2(2):109-14.

Silva CA, Souza MZ, Luciano E, Chingui LJ. Interleucina 6 participa dos ajustes metabólicos desencadeados na fase aguda da imobilização articular - estudo em ratos. Rev Port Fisio Desporto. 2007;3(2).

Souza CVA, Junior RH, Uzeda M, Weyne SC. Efeitos do consumo diário de probiótico sobre a microbiota cariogênica. Rev. Bras. Odontol (Rio J). 2012;68(1):128-31.

Takahashi N, Kitazawa H, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao J, 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.

Takeda S, Takeshita M, Kikuchi Y, Dashnyam B, Satoshi Kawahara S, et al Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(12):1976-83

Taylor AL, Hale J, Wiltschut J, Lehmann H, Dunstan JA, Prescott SL. Effects of probiotic supplementation for the first 6 months of life on allergen- and vaccine-specific immune responses. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(10):1227-35

Teanpaisan R, Piwat S, Dahle´n G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus against* oral pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(4):452-59.

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.

Trois L. Uso de probióticos em crianças HIV positivas: um ensaio clinico randomizado duplo cego (controlado). [dissertação]. Local: Univ Fed do Rio G do Sul; 2005.

Twetman S, Stecksén-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. *Adv Dent Res*. 2008;24(2):98-102

Varavallo MA, Thomé JN, Teshima N. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciênc Biol Saúde*. 2008;29(1):83-104.

Vitiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M, Budeguer MV, Perdigón G. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell*. 2000;24(3):223-32.

Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee DI, et al. Modulation of th1/th2 balance by *Lactobacillus* strains isolated from kimchi via stimulation of macrophage cell line j774a.1 in vitro. J Food Sci. 2011;76(2):55-61.

Yasuda E, Serata M, Sako T. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. Appl Environ Microbiol. 2008;74(15):4746-55.