

Avaliação da capacidade probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* da microbiota fecal de seres humanos contra *Clostridium perfringens*

Flávio Henrique Ferreira Barbosa¹, Larissa Paula Jardim de Lima Barbosa² e Jacques Robert Nicoli³

1 UNIFAP, Brasil. Biólogo, Professor Doutor Adjunto I, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP. Área: Microbiologia.

2 UFMG, Brasil. Bióloga, Especialista em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

3 UFMG, Brasil. Biólogo, Professor Titular, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

RESUMO: Probióticos são microrganismos utilizados com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro, seja na prevenção ou tratamento de doenças. Este trabalho teve como objetivo avaliar uma cultura de *Ruminococcus gnavus* quanto ao seu efeito probiótico frente a um alvo patogênico *in vivo* por meio de avaliação histopatológica e perfil de hidrofobicidade da parede celular. A linhagem de *R. gnavus* foi isolada da microbiota fecal dominante de um adulto sadio. Uma amostra padrão de *Clostridium perfringens* foi utilizada como patógeno para o desafio por via oral de camundongos previamente monoassociados com *R. gnavus*. Camundongos suíços NIH isentos de germes foram usados como modelo animal. Nos resultados dos testes de adesão da superfície celular do microrganismo estudado, ficou constatado que a espécie *R. gnavus* possui uma parede celular mais hidrofóbica e ácida, sinalizando boa probabilidade de adesão ao epitélio intestinal. A análise histológica demonstrou que a monoassociação com *R. gnavus* não promoveu nenhuma alteração morfológica dos órgãos analisados (intestinos, baço e fígado), e apresentou efeito protetor, constatado no ceco e no fígado de camundongos gnotobióticos. Em suma, os resultados reforçam que *R. gnavus* possui características protetoras desejáveis no que tange a elaboração de futuros probióticos.

Palavras-chave: *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium perfringens*, probiótico, microbiota.

ABSTRACT: Evaluation of probiotic capacity of a *Ruminococcus gnavus* strain from fecal microbiota against *Clostridium perfringens*. Probiotics are microorganisms that possess beneficial effect with the intention to benefit the health of the host and to prevent or to treat illnesses. This work had as objective to evaluate a culture of *Ruminococcus gnavus* how much a probiotic effect against a pathogenic target by histological evaluation and profile of hydrophobicity. *R. gnavus* was isolated from the dominant fecal

microbiota of a healthy adult. A reference strain of *Clostridium perfringens* type A was used as pathogenic indicator strain in the intra-gastric challenge. Swiss germfree mice NIH had been used as animal model. In the results of the tests of adhesion of the cellular surface of the studied microorganism, he was evidenced that species *R. gnavus* demonstrated a hydrophobic and acid cellular wall, signaling good probability of adhesion to the intestinal epithelium. The histological analysis demonstrated that the monoassociation with *R. gnavus* did not promote morphologic alteration of intestines, spleen and liver, and protected against *C. perfringens* challenge as evidenced by histological examination of cecum and liver of gnotobiotic mice. Concluding, the results showed that *R. gnavus* possesss desirable protective characteristics, being necessary other assays aiming at the elaboration of future probiotics.

Keywords: *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium perfringens*, probiotic, microbiota.

1 Introdução

1.1 A microbiota normal

A formação da microbiota normal, com a qual o homem convive por toda a vida, tem início no momento do nascimento, pois, ao passar pelo canal do parto, ele recebe os primeiros componentes de sua microbiota. A microbiota normal distribui-se pelas partes do corpo que estão em contato com o meio externo, isto é, pele e mucosas. Todavia, tanto no que se refere à quantidade como à qualidade, a microbiota não é uniforme. Na verdade, cada uma das regiões habitadas possui uma microbiota com características próprias (TANNOCK, 1995).

Com especial atenção à microbiota intestinal, sabe-se, que o número de bactérias neste sítio é dez vezes maior que o número de células que formam os nossos órgãos e tecidos, isto é, 10^{14} bactérias para 10^{13} células humanas. A microbiota intestinal desempenha inúmeras funções, muitas das quais somente agora começam a ser

desvendadas. Por muitos anos, vários pesquisadores acreditavam que a microbiota intestinal não tinha nenhuma importância para a saúde do hospedeiro. Hoje, já se sabe que a microbiota normal é um complexo e dinâmico ecossistema que oferece várias funções de interesse para o hospedeiro, incluindo contribuição nutricional, imunomodulação e a proteção ecológica contra microrganismos patogênicos (SAVAGE, 1977, ZOETENDAL et al., 2001; NICOLI; VIEIRA, 2004; KAPER; SPERANDIO, 2005).

Esta microbiota associada tem uma complexidade espacial e temporal que difere por nicho ecológico, idade, localização geográfica, estado de saúde, dieta e espécie animal do hospedeiro. A relação entre a composição da microbiota e as funções resultantes é muito pouco conhecida, o que dificulta entender como os fatores perturbadores podem interferir sobre a atuação da microbiota em relação à saúde do hospedeiro (MACKIE et al., 1999; DUNE, 2001; GUARNER;

MALAGELADA, 2003; KAPER; SPERANDIO, 2005).

A colonização do trato gastrointestinal por cerca de 700-1000 espécies diferentes torna difícil distinguir as contribuições específicas por espécies individuais às relações hospedeiro-microbiota e entre os próprios microrganismos. A maioria das espécies indígenas é anaeróbia estrita e é difícil de cultivar, identificar e quantificar (SIMON; GORBACH, 1984; NICOLI, 1995; MACKIE et al., 1999; MCFARLAND, 2000; SAARELA et al., 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003; NICOLI; VIEIRA, 2004).

1.2 Probióticos

A microbiota normal possui microrganismos com efeitos benéficos (*Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*) e microrganismos com efeitos deletérios (*Clostridium* e *Veillonella*) para o hospedeiro (ROBERFROID, 2001). Nos últimos anos vem aumentando o interesse no uso de microrganismos que possuem os efeitos benéficos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças. Esses organismos recebem o nome genérico de probióticos e, vêm sendo propostos como medicamentos para prevenção ou tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais.

O termo probiótico foi criado como um antônimo ao termo antibiótico, e originalmente foi proposto por Lilley e Stillwell (1965), significando aquele que favorece o crescimento de microrganismos. Mais de 20 anos depois, Fuller (1989) definiu probióticos como “um suplemento

microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal” (“*tradução nossa*”) embora, hoje, os probióticos já tenham também aplicações em outros ecossistemas (BENGMARK, 1998; REID, 2000). Esta definição pode ser estendida ao hospedeiro humano como “microrganismos não-patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na saúde ou fisiologia do hospedeiro” (MARTEAU et al., 2001) ou, como “uma preparação ou produto contendo microrganismos viáveis em números suficientes, que alteram a microbiota em um compartimento do hospedeiro ou que exercem efeitos benéficos no hospedeiro” (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001). Esta definição enfatiza que outros compartimentos do corpo podem ser alvos dos probióticos, além do intestino, onde uma alteração da microbiota pode exercer um efeito benéfico. Existem alguns trabalhos mostrando a eficácia dos probióticos nas infecções do trato urogenital (ASAHARA et al., 2001; HALLEN et al., 1992; HILTON et al., 1992; PARENT et al., 1996; REID; BRUCE, 1995; REID, 2001; REID et al., 2001), infecções causadas pelo *Helicobacter pylori* (KABIR et al., 1997), infecções na boca e dentes (BAYONA GONZALES et al., 1990; BUSSCHER et al., 1999), infecções do trato respiratório (CANGEMI DE GUTIERREZ et al., 2000; GRANGETTE et al., 2001) e infecções diversas (BAUTISTA-GARFIAS et al., 1999).

Apesar da definição de probióticos focar a importância de sua viabilidade,

alguns trabalhos sugerem que microrganismos probióticos não-viáveis podem exercer algum efeito benéfico (OUWEHAND; SALMINEN, 1998). Kaila et al. (1995), utilizando microrganismos não-viáveis, observaram uma diminuição na duração de diarreia por rotavírus, Vesa et al. (2000) observaram uma melhor tolerância à lactose.

O conceito de probiótico implica que o microrganismo empregado seja viável, ou tenha condições de ser reativado, para que ele possa ser eficaz no combate à diarreia. Esta exigência reduz o número de microrganismos que podem atuar como medicamento, já que o intestino humano apresenta uma microbiota extremamente competitiva que funciona como uma barreira física e química conhecida como “barreira intestinal”, possuindo mecanismos poderosos de combate a microrganismos não autóctones (CHANDAN, 1994; SAAVEDRA, 1995). Embora não sejam mencionados números específicos na definição de probióticos, considera-se que pelo menos 10^9 UFC/dia devam ser ingeridos (OUWEHAND et al. 2002).

Entre os probióticos mais estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, estão as bactérias e as leveduras. Alguns já são comercializados, sendo vendidos sob a forma de suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um ou vários microrganismos. Entre os principais probióticos estão as bactérias do ácido láctico (BAL), que incluem os lactobacilos (*Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L.*

reuteri, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*), *Enterococcus faecium* SF68 e *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* e espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Além das BAL, temos também as bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Escherichia coli* EMO e Nissle, *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi*, e as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*. Esta última, geralmente, utilizada apenas na medicina veterinária.

1.3 O gênero *Ruminococcus*

As espécies do gênero *Ruminococcus* são cocos Gram-positivo, anaeróbios, de tamanho e forma variáveis, encontrados no trato gastrointestinal e que fazem parte da microbiota indígena do homem e de animais não-humanos, principalmente ruminantes. Possuem forma esférica ou ovóide, com 0,5-1,2 μm de diâmetro, são imóveis e não esporulam; têm como temperatura ótima de crescimento 37°C. Apesar da maior complexidade da classificação taxonômica da maioria das bactérias nestes últimos anos, a dos cocos anaeróbios foi simplificada. Obtêm seus nutrientes quebrando a celulose que vem através do sistema digestivo do organismo do hospedeiro. Estes organismos são também capazes de fermentar a glicose e a xilose. São encontrados vários estudos de microrganismos do gênero *Ruminococcus* como habitantes do rúmen do gado, dos carneiros, e das cabras. São encontrados também em cavalos, porcos e mamíferos selvagens (MURDOCH, 1998; KRAUSE et al.,

1998; GOMEZ et al., 2002a; GOMEZ et al., 2002b; MARCILLE et al., 2002; BEAUD et al., 2005).

Alguns microrganismos deste gênero possuem a capacidade de produzir substâncias antagonistas e bacteriocinas, algumas inclusive já caracterizadas. Esta produção já foi documentada extensivamente nos últimos anos. Determinou-se uma classificação específica não só ao gênero *Ruminococcus*, mas também, a outros microrganismos produtores de bacteriocina.

Neste sentido, objetivou-se avaliar neste trabalho a capacidade probiótica de *Ruminococcus gnavus* de origem intestinal humano, isolado por Nicoli e Raibaud (1990), quanto à sua capacidade em se aderir ao epitélio intestinal e de proteger este sítio do hospedeiro sendo esta constatada por meio de avaliação histopatológica contra o patógeno *Clostridium perfringens*, responsável por quadros de intoxicação e diarreias.

2 Material e métodos

2.1 Animais

Animais Isentos de Germes (IG)

Foram usados camundongos isentos de germes (NIH) de 21 dias de idade, de ambos os sexos, derivados de um núcleo de reprodução de camundongos provenientes da *Taconic* (Germantown, USA), propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, mantidos em isoladores flexíveis do tipo *Trexler* (*Standard Safety Equipment Company*, McHenry, USA) e manuseados de acordo com técnicas

já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Para os experimentos, os animais foram mantidos em microisoladores (*UNO Roestvaststaal BV*, Zevenaar, Netherland) e receberam “ad libitum”, ração “Nuvilab” comercializada pela *Nuvital* (Curitiba, PR) e água esterilizados por calor úmido. A manutenção, e o manejo dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando-se o “Guide for the care and use of laboratory animals” – National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C., National Academy Press, 1996, documento que formaliza métodos de manejo e criação adequados à experimentação animal. É importante destacar que este trabalho foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) para ensaio com os animais gnotobióticos, tendo sido aprovado com protocolo n° 113/04.

2.2 Microrganismos

Para a realização do trabalho, foi utilizada a linhagem bacteriana de *Ruminococcus gnavus*, coco Gram-positivo, anaeróbio estrito, sendo anteriormente catalogada como *Peptostreptococcus* A₂ (NICOLI; RAIBAUD, 1990). Esta linhagem foi isolada de fezes de um ser humano adulto saudável tendo sido, gentilmente, cedida pelo professor Pierre Raibaud do Laboratoire d'Ecologie Microbienne INRA, Jouy-n-Josas, França. Este microrganismo foi submetido à análise da sequência de rDNA 16S, realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –

EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo), em Sete Lagoas, Minas Gerais. Como desafio para o teste *in vivo*, foi utilizada a linhagem bacteriana de *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), gentilmente cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As linhagens bacterianas (*Ruminococcus gnavus* e *Clostridium perfringens*) foram conservadas em 0,2 mL de glicerina, esterilizada por calor seco, com 1 mL da cultura de 24-48 horas a 37 °C crescidas em caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (*DIFCO*, Detroit, USA), suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina e 0,1% de menadiona – BHI-S (HOLDMAN et al., 1977).

2.3 Tratamento e desafio

Quando tratados com o *R. gnavus*, os animais gnotobióticos do grupo experimental receberam um inóculo único de 0,1 ml de cultura (contendo 10^9 UFC/mL), e os do grupo controle receberam 0,1 ml de salina tamponada estéril, por via intra-gástrica, 5 dias antes do desafio com o *C. perfringens*. Os animais foram desafiados 5 dias após a monoassociação com o *R. gnavus* recebendo 0,1 ml de cultura de *C. perfringens* (contendo 10^6 UFC/mL). As duas culturas foram preparadas a partir de culturas crescidas em caldo BHI-S durante 24-48 horas, a 37 °C, em câmara anaeróbica (*Forma Scientific Company*, Marietta, USA – N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%). A técnica das diluições sucessivas foi utilizada para quantificar os microrganismos

presentes na cultura. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas em superfície, com auxílio de uma alça de Drigalski, em ágar BHI-S e incubado por 48 horas, a 37 °C. A quantidade de bactérias presentes na cultura inicial foi determinada pelo número de colônias desenvolvidas nas placas (expresso em Unidades Formadoras de Colônia por mililitro – UFC/mL) multiplicadas pelo fator de diluição.

2.4 Teste de adesão a solventes da superfície celular do *Ruminococcus gnavus*

O método foi realizado em duplicata, de acordo com as técnicas descritas por Rosenberg et al. (1983), Pelletier et al. (1997) e Pérez et al. (1998), com modificações. O microrganismo foi ativado em caldo BHI-S, incubado sob anaerobiose, a 37 °C, durante 24 horas. Após três ativações, os cultivos foram centrifugados a 1.100-1.500 g, por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão KH₂PO₄-Na₂HPO₄ (50 mM, pH 7,0) e, posteriormente, as mesmas foram suspensas em solução de KNO₃ (0,1 M, pH 6,2). Em tubos de vidro, 4 mL de cada suspensão bacteriana obtida foram adicionados de 1 mL dos seguintes solventes: xilol (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido) e acetato de etila (solvente básico). Após repouso por 5 minutos, as fases foram misturadas por agitação em vórtex por 2 minutos. Então, os tubos foram mantidos em repouso por 30-60 minutos, aproximadamente, para que as fases se separassem completamente. Após esse período, foi feita a leitura de absorbância da fase aquosa a 600 nanômetros em espectrofotômetro.

Branco = 5 mL de solução de KNO_3

$\text{DO}_A \Rightarrow$ Amostra = 5 mL de solução de KNO_3 + Células

$\text{DO}_B \Rightarrow$ Amostra = 4 mL de suspensão celular em solução de KNO_3 + 1 mL dos solventes em cada tubo

A porcentagem de adesão bacteriana ao solvente foi obtida de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ adesão} = \frac{(\text{DO}_A - \text{DO}_B) \times 100}{\text{DO}_A}$$

2.5 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica foi realizada no intestino delgado, cólon, ceco, fígado e baço. Estes órgãos foram fixados em solução aquosa de formalina tamponada 4% e processados rotineiramente para inclusão em parafina e confecção de cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE). Todos os segmentos foram examinados, sem conhecimento prévio do grupo de origem do material, pela patologista Prof^a Denise Carmona Cara Machado, Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A decodificação dos grupos foi feita somente após liberação do laudo.

3 Resultados e discussão

Sabe-se que a aderência das bactérias à mucosa intestinal, sejam patogênicas ou não, envolve a participação de receptores específicos e inespecíficos. A interação entre esses elementos promove a fixação da bactéria à mucosa (aderência) o que impede sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e pelas correntes de fluidos que tendem levá-las para o exterior do organismo. A capacidade de aderir às células

derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa, já foi demonstrada, para a maioria das cepas utilizadas como probióticos (TRABULSI; SAMPAIO, 2000). A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial e reversível é mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que não são consideradas específicas, mas propriedades importantes (PELLETIER, 1997).

O efeito protetor da microbiota intestinal tem sido estudado por muitos grupos no mundo inteiro e tem sido relacionado com antagonismo bacteriano, interferência bacteriana, efeito barreira, resistência à colonização ou exclusão competitiva (FULLER, 1995). O mecanismo que preserva o balanço entre os diversos microrganismos intestinais e impede que uma determinada bactéria se torne dominante, também previne a invasão por bactérias exógenas (incluindo patogênicas) e o seu estabelecimento no ecossistema intestinal. A propriedade de exclusão ou redução da aderência de enteropatógenos já foi demonstrada para vários probióticos, provavelmente sendo consequência do bloqueio de receptores que seriam utilizados pelos mesmos. A importância dessa propriedade é óbvia, pois ela contribui para o efeito protetor contra infecções intestinais (WALKER, 1998).

Com relação à persistência e multiplicação, são propriedades importantes, porque sem elas não poderia ocorrer a implantação do microrganismo, essencial para que a microbiota seja estabilizada em sua composição ou atividade. Alguns

estudos têm demonstrado o envolvimento de fatores físico-químicos, como a hidrofobicidade, e não somente fatores específicos, na capacidade de microrganismos se aderirem ao epitélio intestinal. Segundo Pelletier (1997), numerosos estudos físico-químicos de superfícies celulares microbianas têm demonstrado relações entre cargas superficiais, hidrofobicidade e a composição elementar da superfície celular.

Ao se verificar os resultados dos testes de adesão da superfície celular do microrganismo estudado (ver Gráfico 1), ficou constatado que a espécie *R. gnavus* possui uma parede celular mais hidrofóbica e ácida. Pôde-se perceber que os valores individuais mais altos de porcentagem de adesão foram obtidos com o solvente ácido clorofórmio. Portanto, baseando-se nas características de superfície externa do *R. gnavus*, a sua capacidade de adesão a estruturas presentes no meio exterior seriam favorecidas por interações em pH ácido.

Observou-se também, que a amostra de *R. gnavus*, cultivada em caldo BHI-S, apresentou o valor numérico de porcentagem de adesão mediano quando o solvente apolar xilol foi utilizado. Como a adesão de bactérias à mucosa do TGI é determinada por interações hidrofóbicas (MACARI; FURLAM, 2005), esta amostra do gênero *Ruminococcus* apresenta potencial para a elaboração de futuros probióticos, pois podemos perceber que a superfície externa celular desta bactéria apresenta estrutura levemente hidrofóbica, ou seja, possui um perfil superficial lipídico mais acentuado. Desta forma, talvez não fosse prudente

excluir uma amostra de microrganismo na elaboração de um probiótico, baseando-se apenas na sua potencial capacidade de adesão. Se tal microrganismo possuir outras propriedades probióticas, o mesmo pode ser continuamente administrado para garantir seus efeitos benéficos ao hospedeiro.

Sabe-se também, segundo Trabulsi e Sampaio (2000), que os subprodutos do metabolismo bacteriano ajudam a criar um ambiente intraluminal restritivo ao crescimento bacteriano. Entre esses subprodutos, estão os ácidos graxos de cadeia curta, como ácidos acético, butírico e propiônico. Esses ácidos são produzidos principalmente por bactérias anaeróbias e em menor escala por facultativos. Esses metabólitos acabam por modificar o pH do meio, fazendo com que o potencial de óxido-redução se torne negativo, favorecendo o crescimento de bactérias com perfil de parede celular ácido como o *R. gnavus*, devido às cargas provenientes de dissociação dos ácidos localizados nessa região.

A microbiota aderida ao epitélio tem grande importância, pois confere proteção física ao hospedeiro e possui efeito de modulação imunológica. Microrganismos que permanecem livres no lúmen podem ter a desvantagem de terem que ser constantemente inoculados caso a velocidade de trânsito intestinal seja superior à velocidade de multiplicação do microrganismo. Entretanto, há questionamentos sobre a importância da adesão às células do TGI, uma vez que em situações normais, praticamente todos os receptores estão ocupados por microrganismos que já se

estabeleceram há mais tempo (TANNOCK, 2003). No caso de microrganismos que não se aderem, estes precisam se multiplicar rapidamente para compensar a eliminação causada pelo peristaltismo intestinal (MACARI; FURLAM, 2005).

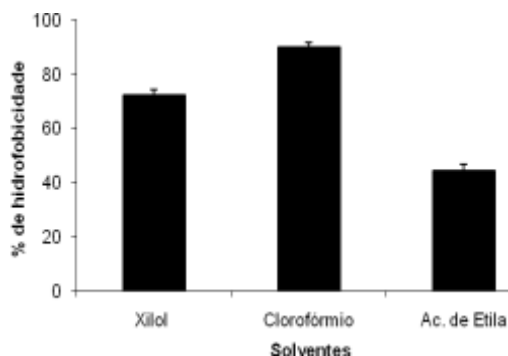


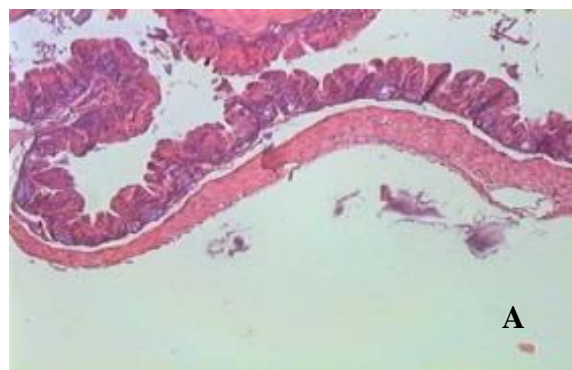
Figura 1. Porcentagem de hidrofobicidade da parede celular de *R. gnavus* cultivado em BHI-S, a solventes apolar, ácido e básico.

A avaliação histopatológica foi realizada no intestino delgado, cólon, ceco, fígado e baço. A análise histológica demonstrou que a monoassociação com *R. gnavus* não promoveu nenhuma alteração morfológica dos órgãos analisados (intestinos, baço e fígado). O aspecto histológico do cólon e do ceco de camundongos gnotobióticos, onde se observou maior predominância do microrganismo, apresentou características normais.

No caso do grupo não tratado (Figura 2 - A) com *R. gnavus* e desafiado com *C. perfringens*, notou-se a redução do tamanho e interdigitações das vilosidades do ceco dos animais. A mucosa se apresenta íntegra, mas reduzida, sugerindo intenso estímulo lesivo. No grupo tratado com *R.*

gnavus, verificou-se aspecto normal no ceco de animais inoculados. Neste grupo tratado, encontra-se arquitetura mais preservada sugerindo menor estímulo lesivo (Figura 2 - B). No fígado, nota-se presença de foco inflamatório (seta) e áreas degeneradas nos animais desafiados com *C. perfringens* (Figura 3 - A). Aspecto normal foi observado no grupo de animais tratados com *R. gnavus* (Figura 3 - B). Pode-se ver, também, presença intensa de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos (seta) circundando áreas degeneradas no fígado de camundongos gnotobióticos inoculados com *Clostridium perfringens* e não tratados com *R. gnavus* na Figura 4.

Não foram observadas alterações histopatológicas no restante dos órgãos examinados. Mesmo com o *C. perfringens*, causando diarreia grave nos animais desafiados, a ausência de lesões teciduais pode decorrer do fato de o experimento ser realizado em um período curto (10 dias) para se evitar possíveis contaminações decorrentes de manipulação e reposição de alimentos e camas nos microisoladores. Isso faria com que alterações mais graves fossem notadas somente em períodos mais longos do que estes que foram trabalhados.



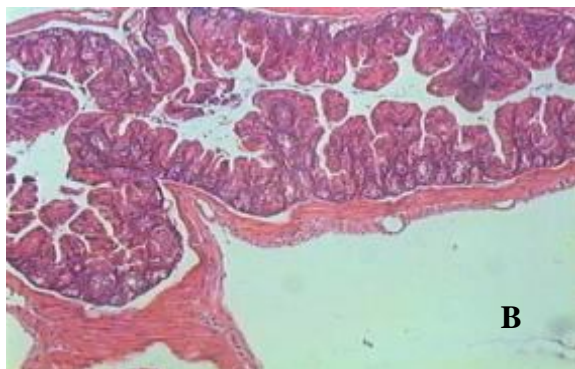


Figura 2. Ceco de animal gnotobiótico inoculado com *Clostridium perfringens*, não tratado (A) e tratado com *Ruminococcus gnavus* (B). Aumento de 100x.

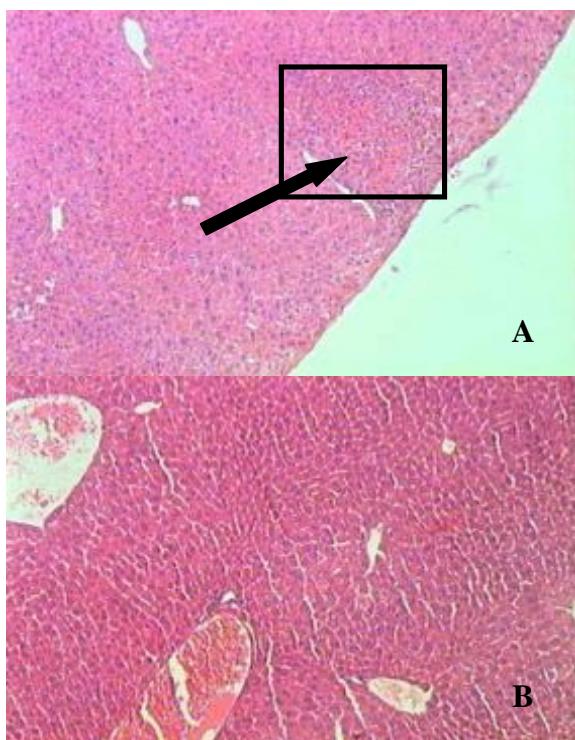


Figura 3. Fígado de camundongos gnotobióticos inoculados com *Clostridium perfringens*, não tratado (A) e tratado com *Ruminococcus gnavus* (B). Aumento de 100 x. Área em destaque ilustrada na Figura 4.

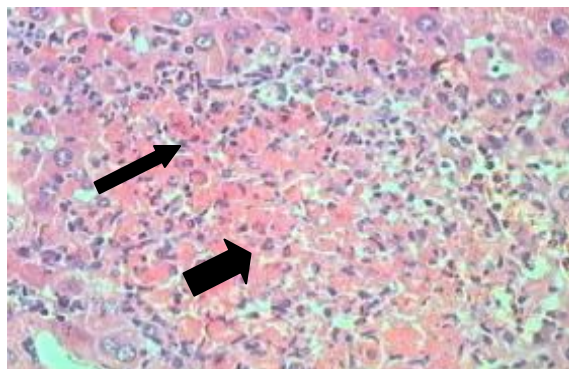


Figura 4. Fígado de camundongo gnotobiótico inoculado com *Clostridium perfringens*. Aumento de 400 x da área em destaque ilustrada na Figura 3 - A.

4 Conclusões

Pelos resultados obtidos e nas condições em que foram realizados os testes, promoveu-se a avaliação probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* quanto à sua capacidade em se aderir ao epitélio intestinal e de proteger este sítio do hospedeiro sendo esta constatada por meio de avaliação histopatológica contra o patógeno *Clostridium perfringens*, responsável por quadros de intoxicação e diarreias. *R. gnavus*, cultivado em BHI-S, apresenta boa probabilidade em se aderir às células do TGI, já que possui uma parede celular mais hidrofóbica e ácida, sendo visto, então, como tendo bom potencial para a elaboração de futuros probióticos. As análises histopatológicas, demonstraram a capacidade protetora resultante do antagonismo contra o *C. perfringens* tipo A em camundongos gnotoxênicos. Foi demonstrado que a monoassociação com *R. gnavus* não promoveu nenhuma alteração morfológica dos órgãos analisados (intestinos, baço e fígado), e apresentou efeito protetor, constatado no ceco e no fígado de camundongos gnotobióticos.

Referências bibliográficas

- ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; WATANUKI, M.; YOKOKURA, T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1751-1760, 2001.
- BAUTISTA-GARFIAS, C.R.; IXTA, O.; ORDUNA, M.; MARTINEZ, F.; AGUILAR, B.; CORTES, A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: effect on *Trichinella spiralis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 251-260, 1999.
- BAYONA GONZALES, A.; LOPEZ CAMARA, V.; GOMEZ CASTELLANOS, A. Prevención de caries por lactobacilos (resultados finales de un ensayo clínico sobre caries dental con lactobacilos muertos [estreptococos y lactobacilos] por via oral). (Prevention of caries with lactobacillus (final results of a clinical trial on dental caries with killed lactobacillus [streptococcus and lactobacillus] given orally)). **Practice Odontology**, v. 11, p. 37-39, 1990.
- BEAUD, D.; TAILLIEZ, P.; ANBA-MONDOLONI, J. Genetic characterization of the beta-glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. **Microbiology**, v. 151, p. 2323-2330, 2005.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, p. 2-7, 1998.
- BUSSCHER, H.J.; MULDER, A.F.; VAN DER MEI, H.C. *In vitro* adhesion to enamel and *in vivo* colonization of tooth surfaces by Lactobacilli from a bio-yoghurt. **Caries Research**, v. 33, p. 403-404, 1999.
- CANGEMI DE GUTIERREZ, R.C.; SANTOS DE ARAOZ, V.S.; NADER-MACIAS, M.E. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* on the respiratory tract of mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 973-978, 2000.
- CHANDAN, R.C. Enhancing market value of milk by adding cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2245-2256, 1999. *Apud* GIBSON, S.A.W., ed. **Human Health, the Contribution of Microorganisms**. Springer-Verlag, New York, NY, 1994.
- DUNNE, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 7, p. 136-145, 2001.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. Probiotics: their development and use. **In: OLD HERBORN UNIVERSITY SEMINAR MONOGRAPH**, 1995, Herborn-Dill. **Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections**. Herborn-Dill: Institute for Microbiology and Biochemistry, p. 01-08, 1995.
- GOMEZ, A.; LADIRE, M.; MARCILLE, F.; FONS, M. Trypsin mediates growth phase-dependent transcriptional regulation of genes involved in biosynthesis of ruminococcin A, a lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain from a human intestinal microbiota. **J. Bacteriology**, v. 184, p. 18-28, 2002a.

- GOMEZ, A.; LADIRE, M.; MARCILLE, F.; NARDI, M.; FONS, M. Characterization of ISRgn1, a novel insertion sequence of the IS3 family isolated from a bacteriocin-negative mutant of *Ruminococcus gnavus* E1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4136-4139, 2002b.
- GRANGETTE, C.; MULLER-ALOUF, H.; GOUDERCOURT, D.; GEOFFROY, M.C.; TURNEER, M.; MERCENIER, A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1547-1553, 2001.
- GUARNER, F., MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.
- HALLEN, A.; JARSTRAND, C.; PAHLSON, C. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 19, p. 146-148, 1992.
- HILTON, E.; ISENBERG, H.D.; ALPERSTEIN, P.; FRANCE, K.; BORENSTEIN, M.T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 116, p. 353-357, 1992.
- HOLDMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe Laboratory Manual**. The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory, p. 156, 1977.
- KABIR, A.M.; AIBA, Y.; TAKAGI, A.; KAMIYA, S.; MIWA, T.; KOGA, Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**, v. 41, p. 49-55, 1997.
- KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; ARVILOMMI, H.; VESIKARI, T. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. **Archives of Disease in Childhood**, v. 72, p. 51-53, 1995.
- KAPER, J.B.; SPERANDIO, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3197-3209, 2005.
- KRAUSE, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; FARR, B.I.; NORGAARD, P. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2912-2920, 1998.
- LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L. Probióticos. In: **ANAIS DA CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**. Campinas (Brasil): FACTA, v. 1, p. 53-77, 2005.
- MACFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p. 193-207, 2000.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1035-1045, 1999.
- MARCILLE, F.; GOMEZ, A.; JOUBERT, P.; LADIRE, M.; VEAU, G.; CLARA, A.; GAVINI, F.; WILLEMS, A.; FONS, M. Distribution

- of genes encoding the trypsin-dependent lantibiotic ruminococcin A among bacteria isolated from human fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3424-3431, 2002.
- MARTEAU, P.R.; VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIER. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 4305-4365, 2001.
- MURDOCH, D.A. Gram-positive anaerobic cocci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 81-120, 1998.
- NICOLI, J.R.; Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 15, p. 183-190, 1995.
- NICOLI, J.R.; RAIBAUD, P. *In vivo* and *in vitro* antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp from human intestinal flora in mice. **Microecology and Therapy**, v. 20, p. 141-146, 1990.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. (Eds.). **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, p. 1037-1047, 2004.
- OUWEHAND A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 749-758, 1998.
- OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.
- PARENT, D.; BOSSENS, M.; BAYOT, D.; KIRKPATRICK, C.; GRAF, F.; WILKINSON, F.E.; KAISER, R.R. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli acidophili* and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. **Arzneimittelforschung**, v. 46, p. 68-73, 1996.
- PELLETIER, C.; BOULEY, C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains., **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1725-1731, 1997.
- PÉREZ, P.; MINAARD, Y.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin., **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 21-26, 1998.
- PLEASANTS, J.R. Gnotobiotics. In: Melby Jr., E.C., Altmann, N.H. **Handbook of Laboratory Animal Science**, Cleveland: CRC Press, p. 119-174, 1974.
- REID, G.; BRUCE, A.W. Low vaginal pH and urinary-tract infection. **Lancet**, v. 346, p. 8991-8992, 1995.
- REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 437S-443S, 2001.
- REID, G.; BRUCE, A.W.; FRASER, N.; HEINEMANN, C.; OWEN, J.; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS**

Immunology and Medical Microbiology, v. 30, p. 49-52, 2001.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 406-409, 2001.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSEMBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29-33, 1983.

SAARELA, M.; LAHTEENMAKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILLA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 99-117, 2002.

SAAVEDRA, J.M. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 21, p. 25-29, 1995.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SILVA, M.E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais**, 1986. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Belo Horizonte, 1986.

SIMON, G.L.; GORBACH, S.L. Intestinal flora in health and disease.

Gastroenterology, v. 86, p. 174-193, 1984.

TANNOCK, G. W. More than a smell: the complexity of the normal microflora. In: TANNOCK, G. W. (Ed.). **Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body**. New Zealand: Chapman & Hall., p. 1-36, 1995.

TANNOCK, G.W. **Probiotics and prebiotics: where we are going?** Wymondham: Caister Academic Press. 54 p., 2003.

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

VESA, T.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 19, p. 165S-175S, 2000.

WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotic, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 668-675, 1998.

ZOETENDAL, E.G.; AKKERMANS, A.D.L.; AKKERMANS-VAN VLIET, W.M.; DE VISSER, J.A.G.M.; DE VOS, W.M. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 13, p. 129-134, 2001.

Artigo recebido em 24 de novembro de 2010.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2011.