

JAQUELINE CARLOS

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO INTESTINO
DELGADO DE CAMUNDONGOS IMUNODEPRIMIDOS SUBMETIDOS À
DIETA ENTERAL CONTENDO PREBIÓTICOS E CONTAMINADA POR
*Klebsiella pneumoniae***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS, BRASIL
2006

JAQUELINE CARLOS

**ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO INTESTINO
DELGADO DE CAMUNDONGOS IMUNODEPRIMIDOS SUBMETIDOS À
DIETA ENTERAL CONTENDO PREBIÓTICOS E CONTAMINADA POR
*Klebsiella pneumoniae***

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2006.

Prof. Dr. José Mário da Silveira
Mezencio
(Co-orientador)

Prof. Dr. Sérgio Luís Pinto da
Matta
(Co-orientador)

Prof^a Dr^a. Lycia de Brito Gitirana

Dr^a. Patrícia Barcellos Costa

Prof. Dr. Clóvis Andrade Neves
(Orientador)

A Deus, por tudo

A minha vó Rosa (i.m), a minha irmã Elenice e a minha mãe, pelo
amor, carinho e incentivo nos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Professor Clóvis Andrade Neves pela orientação, paciência e amizade.

Ao Professor Sérgio L.P. Matta pelas idéias, conselhos e pela amizade.

Ao Professor José Mário da Silveira Mezencio pela contribuição para realização deste trabalho.

Ao Professor Paulo Roberto Cecon pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliarem este trabalho.

A Professora Sílvia das Graças Pompolo (Lab. Citogenética) pelo uso do analisador de imagem.

Aos Professores do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo uso do analisador de imagem.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural, pelo bom ambiente de trabalho e auxílio em todas as horas.

Aos Professores do Curso de Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos.

A Daniele Ferreira da Silva, por participar do trabalho, pela prestatividade e pelas inúmeras sugestões.

Aos amigos de laboratório Marcos, Sirlene, Pedro, Edmilson, Vinícius, Lílian, Alex, Max, Cláudia, Rejane, Jane, Edson e Pollyanna por inúmeros auxílios técnicos, pela amizade, pelos conselhos e pela alegria que proporcionam ao laboratório.

Ao amigo Délcio, pela ilustração.

Aos demais colegas de curso que sempre me ajudaram de alguma forma.

Ao Felipe, pelo amor, carinho, companheirismo e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

BIOGRAFIA

Jaqueline Carlos, filha de Sebastião Carlos e Maria de Lourdes Carlos, nasceu em João Monlevade, Estado de Minas Gerais, no dia 11 de dezembro de 1981.

Em março de 2000, ingressou na Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde, em janeiro de 2004, graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas. Em janeiro de 2005, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas.

No período de janeiro a julho de 2002, foi bolsista de monitoria de Bioquímica.

Em agosto de 2002, ingressou no PET Ciências Biológicas, obtendo apoio financeiro da SESu/ MEC até dezembro de 2004.

Em março de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A infecção hospitalar	3
2.2. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT).....	4
2.3. O desequilíbrio do sistema imunológico e a translocação bacteriana	11
2.4. As dietas hospitalares e a translocação	15
2.5. Estratégias de controle da translocação	16
2.6. Prebióticos e probióticos como alternativa de controle	16
3. OBJETIVO	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. O Microrganismo	20
4.2. Preparo das Dietas Enterais.....	20
4.3. Delineamento Experimental	21
4.4. Coleta do material	22
4.5. Processamento do material.....	23
4.6. Coloração e Histoquímica	23
4.7. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais	24
4.8. Contagens celulares.....	25
4.9. Mitoses nas criptas.....	26
4.10. Documentação fotográfica.....	26
4.11. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	26
5.1. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais	26

5.2. Contagens celulares.....	31
5.3. Mitoses nas criptas.....	35
6. DISCUSSÃO.....	41
6.1. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais	41
6.2. Contagens celulares.....	45
6.3. Mitoses nas criptas.....	49
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

CARLOS, Jaqueline, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho, 2006.
Estudo morfológico e morfométrico do intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos à dieta enteral contendo prebióticos e contaminada por *Klebsiella pneumoniae*.
Orientador: Clóvis Andrade Neves. Co-orientadores: José Mário da Silveira Mezencio, Sérgio Luis Pinto da Matta e Paulo Roberto Cecon.

A translocação bacteriana têm sido freqüentemente relacionadas com dietas hospitalares contaminadas, sendo os indivíduos imunodeprimidos ou com algum tipo de injúria intestinal os principais acometidos. O tecido linfóide associado ao intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT) é um importante regulador do crescimento de bactérias, podendo impedir sua adesão na mucosa e diminuir a possibilidade de supercrescimento bacteriano. A mucosa em boas condições, assim como o sistema imunológico atuante, diminuem as chances de translocação. Prebiótico é um componente alimentar não digerível capaz de produzir efeito benéfico ao hospedeiro, estimulando o crescimento da mucosa, podendo ser adicionado a dietas hospitalares. O estudo de sua utilização é de grande interesse para a saúde pública. O presente estudo teve como objetivo analisar morfológica e morfometricamente o efeito de dietas enterais contaminadas com

Klebsiella pneumoniae sobre o intestino delgado de camundongos imunodeprimidos e camundongos saudáveis submetidos a dieta contendo prebióticos. Camundongos albinos suíços, com 4 a 6 semanas de vida, foram divididos em nove tratamentos contendo diferentes combinações entre frutooligosacarídeos (FOS), inulina, antibiótico e corticóide, e ausência ou presença de *K. pneumoniae*. Nos períodos equivalentes a 1, 2 e 4 dias após a administração da dieta contaminada com *K. pneumoniae* via oral, os animais foram sacrificados. Foram feitas as colorações azul de toluidina, hematoxilina plúmbica e as técnicas histoquímicas ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e alcian blue (AB). A maior altura de vilosidade foi observada no tratamento V (animais imunodeprimidos que receberam dieta enteral contendo prebióticos e contaminada), no qual também se observou aumento do número de linfócitos intraepiteliais, provavelmente, em resposta a presença de *K. pneumoniae*. A largura das vilosidades de todos os animais que receberam dieta enteral aumentou, mostrando que esta pode influenciar no formato destas vilosidades. As menores alturas de epitélio foram encontradas em TVIII (animais não imunodeprimidos, que receberam dieta enteral sem prebióticos e contaminada) e TIX (animais imunodeprimidos, que receberam dieta enteral sem prebióticos e contaminada) o que pode estar relacionado com a ausência de prebióticos. Nenhum indício de translocação pelo epitélio do íleo foi observado pelo nosso estudo. Nenhuma relação entre a dieta com fibras e o aumento do número de células caliciformes foi observada. Nenhum mastócito foi encontrado na mucosa dos animais analisados. A dieta enteral por si só, parece ter estimulado o aumento da população de células caliciformes. O número de linfócitos intraepiteliais se apresentou maior no TV, nos dia 7 e 9, sendo máximo neste último, o que coincide com dados anteriores que mostraram uma menor translocação de *K. pneumoniae* neste dia, indicando também que *K. pneumoniae* estimulou o sistema imunológico destes indivíduos. A imunodepressão pode não ter funcionado de maneira adequada, pois ela não interferiu no número de linfócitos intraepiteliais.

ABSTRACT

CARLOS, Jaqueline, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2006.
Morphological and morphometric study of small intestine of immunodepressed mice subjected to an enteral diet with prebiotics and contaminated by *Klebsiella pneumoniae*. Adviser: Clóvis Andrade Neves. Co-advisers: José Mário da Silveira Mezencio, Sérgio Luis Pinto da Matta e Paulo Roberto Cecon.

Contaminated hospital diets have been frequently related with the bacterial translocation, being immunodepressed individuals or with some sort of intestinal injury, the main affected. The Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) is an important bacterial growth regulator, able to avoid bacteria adhesion to mucosal and to decrease the possibility of its overgrowth. A mucosal in good conditions, as well as an active immune system, decrease the chances of translocation. Prebiotic is a nondigestible food component, which can be added to the hospital diet, capable of producing beneficial effects to the host, stimulating the mucosa growth. The study of its utilization is of great interest to the public health. The purpose of the present study was to analyze, morphologically and morphometrically, the treatment effect with enteral diets contaminated with *Klebsiella pneumoniae* on the small intestine of the immunodepressed and healthy mice, treated with prebiotics. Four to six weeks old Swiss albino mice were utilized, divided into nine treatments,

containing different combinations of FOS, inulin, antibiotic and corticoid, and presence or absence of *K. pneumoniae*. Mice were sacrificed at periods of 1, 2 and 4 days after oral administration of diet that was contaminated with *K. pneumoniae*. Staining with toluidine blue, plumbic hematoxin and the histochemic technics of periodic acid Schiff and alcian blue, were performed. The highest villous was found on treatment V (TV), where the number of lymphocyte could have increased as a response to *K. pneumoniae*. The villous width of all animals which received the enteral diet increased, showing that it can influence the format of these structures. The lowest epithelial height were found in TVIII and TIX, and can be related with the absence of prebiotics. No sign of translocation through the ileum epithelium was observed by our study. No relation was found between the diet with fibers and the goblet cell number increase. No mast cell was found at the mucosa of the analyzed animals. The enteral diet *per si* seen had stimulated the goblet cell number. The intraepithelial lymphocytes was higher on TV, at the days 7 and 9, being the latter the highest, what also indicates that *K. pneumoniae* stimulated the immune system of these individuals. The imunedepression may not have properly worked, since intraepthelial cells counting was not influenced.

1. INTRODUÇÃO

Cinco a quinze por cento dos pacientes internados em hospitais brasileiros contraem algum tipo de infecção hospitalar, sendo esta a mais freqüente e importante complicação aliada à internação dos indivíduos (MACHADO *et al.*, 2001). Dietas enterais podem estar contaminadas com bactérias que possuem grande capacidade de translocação (BERG, 1995; PEREIRA 2001). A contaminação de dietas pode levar a complicações tais como diarreia, bacteremia, sepse, pneumonia e colonização do trato gastrointestinal (MARTEAU & BOUTRON-RUAULT, 2002).

O tecido linfóide associado ao intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT) e a translocação bacteriana estão intimamente relacionados com a infecção hospitalar. Falhas na barreira intestinal (epitélio, barreira enzimática e imunológica) podem levar a translocação e esta, por sua vez a sepse, com posterior falência múltipla dos órgãos (SWANK & DEITCH, 1996; STEINBERG, 2003). Novas alternativas têm sido empregadas para o controle da translocação e vão desde drogas que diminuem os danos causados pela inflamação (ALEXANDER, 1998) e peptídeos que neutralizam as toxinas bacterianas (WIEST & RATH, 2003), até o uso de prebióticos e probióticos associados a dietas hospitalares. Prebióticos e probióticos atuam por

interferência microbiana e se apresentam como uma nova esperança para o controle da infecção hospitalar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A infecção hospitalar

A infecção hospitalar é um grave problema de saúde pública e de difícil controle. Várias são as suas causas, sendo uma delas a contaminação de dietas hospitalares. Dentre todas as infecções hospitalares, a pneumonia é a mais freqüente em pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) e também a responsável pelas maiores taxas de letalidade, aumento no tempo de hospitalização e de custos com a internação (CARRILHO, 1999). Os elevados gastos relacionados à infecção hospitalar ocorrem devido ao aumento da necessidade de procedimentos diagnósticos e terapêuticos, estendendo em cerca de 8 dias o período de internação (WENZEL, 1995; MACHADO *et al.*, 2001).

A identificação dos fatores que predispõem a infecção hospitalar deve ser o primeiro passo na implantação de um programa de vigilância sanitária e epidemiológica, cuja finalidade seja diminuir o número de pacientes acometidos (MACHADO *et al.*, 2001). A nutrição desbalanceada e a contaminação de dietas enterais se apresentam como fatores de risco relevantes (CARRILHO, 1999; WAITZBERG *et al.*, 2001), que se tornam mais graves com a translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003). A translocação de algumas

espécies de bactérias leva à pneumonia, como pode ser observado em pacientes imunodeprimidos, onde *Klebsiella pneumoniae* infecta o pulmão. (PORRAS, 1996).

2.2. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT)

A mucosa do trato gastrintestinal representa uma interface entre o organismo e as substâncias ingeridas; e possui particularidades do ponto de vista imunológico, pois o organismo necessita tolerar componentes de nossa dieta e ao mesmo tempo regular a passagem de substâncias ou microrganismos que sejam nocivos à saúde (SPAHN & KUCHARZIK, 2005). A tolerância parece ser mediada pela modulação da produção de citocinas anti-inflamatórias e pela interação entre linfócitos T regulatórios e células apresentadoras de antígeno (APC) (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). Em condições fisiológicas, o intestino mantém as bactérias e suas toxinas no lúmen, enquanto os nutrientes são absorvidos (SWANK & DEITCH, 1996). Algumas doenças genéticas podem levar à perda da tolerância a certos nutrientes, como é o caso da alergia alimentar na doença celíaca, onde indivíduos apresentam reações severas à ingestão de glúten (MacDONALD & MONTELEONI, 2005).

A habilidade do intestino de controlar a passagem de moléculas é conhecida como função de barreira intestinal. Nesta barreira, estão incluídos, além do epitélio, as barreiras enzimática e imunológica (SOERHOLM & PERDUE, 2001). A imunoglobulina secretada pelos plasmócitos presentes no GALT possui cadeia alfa (IgA) e representa a primeira linha de defesa contra a passagem de microrganismos pela mucosa, prevenindo a aderência e a absorção de imunógenos. Essas imunoglobulinas são secretadas na forma de uma cadeia composta por duas IgA e uma proteína de ligação (J). Após ser secretado, este complexo se acopla a um receptor presente na superfície basolateral das células epiteliais. Após o acoplamento, o complexo é internalizado e processado, recebendo um componente secretório, que protege esta imunoglobulina da ação de proteases (KERR, 1990; FALLGREEN-GEBAUER *et al.*, 1993) (Figura 1). As IgA atuam também como opsoninas

facilitando a fagocitose por macrófagos, de imunógenos que escapam para a lâmina própria (BERG, 1995; DIEBEL *et al.*, 1997).

A barreira enzimática é formada por substâncias presentes no lúmen, como o ácido gástrico, enzimas pancreáticas, bile e muco. O muco é um importante componente por formar um gel viscoso, prevenindo o acesso e adesão de microrganismos enterais ao epitélio. A produção do muco é aumentada em resposta à injúria da mucosa (WUEST & RATH, 2003). A camada de muco possui função protetora nos aspectos físicos e químicos. Alterações nesta camada refletem efeitos diretos na microbiota intestinal. A distribuição das células caliciformes e a constituição das mucinas variam espacialmente e temporalmente. Mucinas são classificadas como neutras ou ácidas. As mucinas ácidas são de dois tipos: sulfatadas e não sulfatadas. As células califormes produtoras de mucinas neutras aparecem em maioria na mucosa.. Tem sido reportado que mucinas ácidas protegem o intestino contra a translocação bacteriana porque as mucinas sulfatadas são menos degradadas pelas glicosidases das bactérias (DEPLANCKE & GASKINS, 2001). A interação da bactéria com o muco é um importante mecanismo de proteção da superfície da mucosa como observado por SHERMAN *et al.* (1987). A análise das células caliciformes se torna importante para se avaliar efeitos de diversos tipos de dietas, pois a quantidade e a qualidade das células caliciformes podem ser alteradas em função destas dietas, influenciando no processo de translocação bacteriana (FRANKEL *et al.*, 1995). Alguns microrganismos são capazes de regular a síntese e a secreção de muco pelo hospedeiro e muitos têm a capacidade de degradação deste muco (DEPLANCKE & GASKINS, 2001).

A reação de PAS é usada para identificar açúcares neutros e envolve duas etapas. Na primeira, o polissacarídeo é submetido a uma oxidação pelo ácido periódico (HIO_4). O ácido periódico oxida as hidroxilas (-OH) em carbonos vizinhos, produzindo radicais aldeídicos. A segunda etapa é caracterizada pela reação dos radicais aldeídicos com o reativo de Schiff, formando um produto insolúvel, de cor vermelha ou púrpura. Em células animais a reação do PAS é utilizada para a detecção de glicogênio, de glicoproteínas e de proteoglicanos (proteínas associadas a cadeias de carboidratos) neutros. Como vários carboidratos respondem positivamente ao

PAS, devem ser aplicados testes de controle negativo que permitam a identificação do polissacarídeo pesquisado (BANCROFT & STEVENS, 1996).

Alguns polissacarídeos presentes nos tecidos animais e de plantas são de natureza ácida, podendo ser carboxilados e ou sulfatados. O conjunto destes polissacarídeos é geralmente reconhecido como mucinas ácidas. Algumas são fortemente sulfatadas, como aquelas presentes em cartilagem e em outros tecidos conjuntivos e conhecidas como condroitin, heparan e queratan sulfato. Algumas mucinas sulfatadas são também encontradas nos epitélios, mas neste tecido é mais comum a presença das sialomucinas, que possuem radicais carboxílicos e raramente são sulfatadas. Estes componentes podem ser identificados pela técnica histoquímica AB. O AB é um grupo de corantes polivalentes básicos solúveis em água. A cor azul do corante é devido à presença de cobre na molécula, mas ainda não se conhece exatamente como se dá a especificidade da reação. O AB em solução de ácido acético a 3% (pH 2,5) cora tanto as mucinas ácidas carboxiladas, quanto sulfatadas. Em solução de ácido clorídrico 0,2M (pH 0,5) cora apenas as sulfatadas (BANCROFT & STEVENS, 1996). No presente estudo, estas técnicas foram utilizadas, para permitir a diferenciação de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e ácidas.

Um outro componente importante da barreira intestinal são as defensinas e as lisozimas secretadas pelas células de Paneth. As células de Paneth estão presentes nas criptas do intestino delgado e derivam de células-tronco epiteliais e estão relacionadas com a produção e a liberação destes componentes (OUELLETTE, 1997) (Figura 1). Alguns estudos, utilizando imuno-histoquímica, sugerem que estes peptídeos permanecem solúveis após a secreção ou que estes se difundem rapidamente para fora da cripta (OUELLETTE *et al.*, 2000). As defensinas são sintetizadas como precursores inativos e são ativadas após a remoção de um segmento peptídico aniônico. A enzima que realiza este papel é a metaloprotease matrilisina (WILSON *et al.*, 1999; GANZ, 2000). As células de Paneth de humanos produzem dois tipos de alfa-defensinas, HD-5 e HD-6; e os camundongos expressam várias isoformas conhecidas como criptidinas (OUELLETTE, 1997). Estas substâncias têm um papel importante na defesa contra patógenos ingeridos, na proteção das

células-tronco da cripta e, principalmente, limita o número e o tipo de comensais (BEVINS, 2004).

A barreira epitelial é formada por componentes celulares e não celulares (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). O epitélio prismático contínuo, com células conectadas por junções é o principal componente da barreira intestinal; sua estrutura por si só é um obstáculo à penetração de microrganismos, pois as junções de oclusão e de adesão impedem a penetração bacteriana entre as células. Nas junções de oclusão são observadas proteínas da face externa da bicamada lipídica que compõe a membrana plasmática, sendo compartilhadas pelas células contíguas numa faixa estreita (0,1-0,3 μm) em torno do perímetro apical, ao redor da trama terminal de cada célula. Estas junções são compostas por proteínas da família das claudinas, das ocludinas, proteínas da zônula de oclusão (ZO-1, ZO-2 e ZO-3), cingulinas, dentre outras e são responsáveis tanto pela regulação da passagem de moléculas entre as células quanto pela manutenção da polaridade celular (MITIC *et al.*, 2000; CEREIJIDO *et al.*, 2000). Estas junções de oclusão têm sua permeabilidade regulada por proteínas quinases A e C (KARCZEWSKY & GROOT, 2000). As junções de adesão no epitélio intestinal estão presentes em uma faixa estreita do perímetro apical, logo abaixo da zônula de oclusão e também formam cintos de adesão. Nestes cintos de adesão, as células são ligadas umas às outras através de um conjunto de proteínas, como filamentos de actina e caderinas. As caudas intracelulares das caderinas se ligam às proteínas de ancoramento, fixando-as aos filamentos de actina. Essas proteínas de ancoramento são as cateninas (α , β e γ), α -actina e a vinculina. Junto com os desmossomos, essas junções têm a função de manter as células fortemente aderidas umas com as outras (ALBERTS *et al.*, 2002). Sob certas condições, no estresse, por exemplo, estas junções se apresentam fragilizadas e a permeabilidade entre as células se mostra alterada (SOERHOLM & AND PERDUE, 2001).

O trato gastrintestinal não tem apenas a função de digestão e absorção de nutrientes. É também, um importante órgão imunológico. Grande parte das células do sistema imunológico está presente no intestino (ZARZAUR & KUDSK, 2001). O GALT é outro importante componente da barreira intestinal (WOODCOCK *et al.*, 2004). A habilidade do GALT de responder a antígenos ingeridos tem sido muito estudada. Sabe-se que o GALT impede ou limita o

acesso de bactérias à lâmina própria, que de alguma forma venceram as barreiras enzimática e epitelial (MADDAUS *et al.*, 1988).

O GALT consiste de células de defesa, como linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas, que podem formar agregados de nódulos como nas placas de Peyer, tonsilas e apêndice ou nódulos isolados. Os linfócitos intra-epiteliais e as células M também fazem parte do GALT (ABBAS & LICHTMAN, 2005) (Figura 1). As células M são caracterizadas por possuírem borda estriada e glicocálce reduzidos e uma grande habilidade de transportar ou “seqüestrar” macromoléculas e microrganismos do lúmen intestinal para a placa de Peyer, por exemplo, onde são processados e apresentados por células apresentadoras de antígeno aos linfócitos. As células M são mais numerosas no epitélio que cobre estas placas de Peyer, mas também ocorrem em outras regiões do trato gastrointestinal (JANG *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2004). As células M intestinais localizam-se entre os enterócitos, dos quais se diferenciam (AZZALI, 2003). JANG *et al.* (2004) demonstraram, com auxílio microscopia confocal, que estas células M se desenvolvem a partir da diferenciação de enterócitos, em qualquer região das vilosidades, em resposta a antígenos e/ou patógenos presentes no lúmen intestinal. Outros autores descrevem uma origem diferente para as células M. BYE *et al.* (1984) descreveram que as células M são derivadas de células indiferenciadas presentes na cripta.

Os linfócitos intraepiteliais (com ou sem hífen?) são, em sua maioria (90%), linfócitos T CD8⁺(ABBAS & LICHTMAN, 2005). Há evidências que os linfócitos intraepiteliais são células que migraram da placa de Peyer para as criptas e vilosidades, onde as células T sofrem amadurecimento extratímico (SPAHN & KUCHARZIK, 2005). Estudo recente mostrou que células provenientes do timo podem migrar para o epitélio intestinal sem uma ativação prévia ou reprogramação em tecidos linfóides periféricos(STATON *et al.*, 2006). Após chegarem a parede intestinal, estes linfócitos se diferenciam e proliferam, adquirindo o fenótipo de linfócitos intraepiteliais residentes (Figura 1). Estes linfócitos povoam o epitélio mais eficientemente do que outros tipos de linfócitos T CD8⁺ que não têm esta mesma origem.

Mastócitos estão intimamente associados com superfícies mucosas e vasos sanguíneos. Os mastócitos que contêm triptase são típicos na lâmina

própria da via gastrointestinal e da via respiratória. Estas células são ativadas pela ligação cruzada de imunoglobulinas E (IgE). Esta ativação leva à liberação de citocinas, gerando uma resposta inflamatória. Mastócitos estão também envolvidos em processos inflamatórios crônicos relacionados com infecções por bactérias, pois estes apresentam grânulos de peptídeos antimicrobianos, e também com resposta à infecção por parasitas (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.*, 2005).

As placas de Peyer estão presentes na via digestória de humanos e de diversos outros mamíferos e estão organizadas em intervalos regulares, presentes nas bordas anti-mesentéricas de duodeno, jejuno e principalmente íleo, se estendendo da mucosa até a submucosa (AZZALI, 2003). As placas de Peyer são formadas por folículos linfóides contendo centro germinativo, com macrófagos gigantes e linfócitos B virgens e áreas de tecido linfóide interfolicular timo-dependente, além de células dendríticas (SWANK & DEITCH, 1996; SPAHN & KUCHARZIK, 2005) (Figura 1).

Fagócitos, como os neutrófilos, também são importantes na defesa intestinal que, juntamente com os macrófagos, reconhecem, através de receptores de padrão de reconhecimento (pathogen recognition receptors, PRR), os padrões moleculares associados a patogenicidade (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), motivos altamente conservados nos microrganismos (MacDONALD & MONTELEONI, 2005). Um dos PAMP mais conhecidos é o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. A partir deste reconhecimento, por receptores conhecidos como Toll-like (Toll-like receptors - TLR), ocorre uma cascata de sinalização, culminando na produção de quimiocinas e citocinas e na eventual destruição do patógeno. Os TLR são os reguladores da resposta imunológica inata em mamíferos (BRANGER *et al.*, 2004).

As células apresentadoras de antígeno (APC) têm papel crucial na tolerância e na inflamação (SPAHN & KUCHARZIK, 2005). As moléculas co-estimulatórias B7 e CD28 (presentes nas células APC e nos linfócitos CD4, respectivamente) estão envolvidas neste processo. A superexpressão de B7 é responsável, por exemplo, pela inflamação intestinal na doença de Crohn e na colite ulcerativa (LIU *et al.*, 2001). As células APC quando expostas ao fator de transformação e crescimento TGF β 2 e ao antígeno, se tornam tolerogênicas.

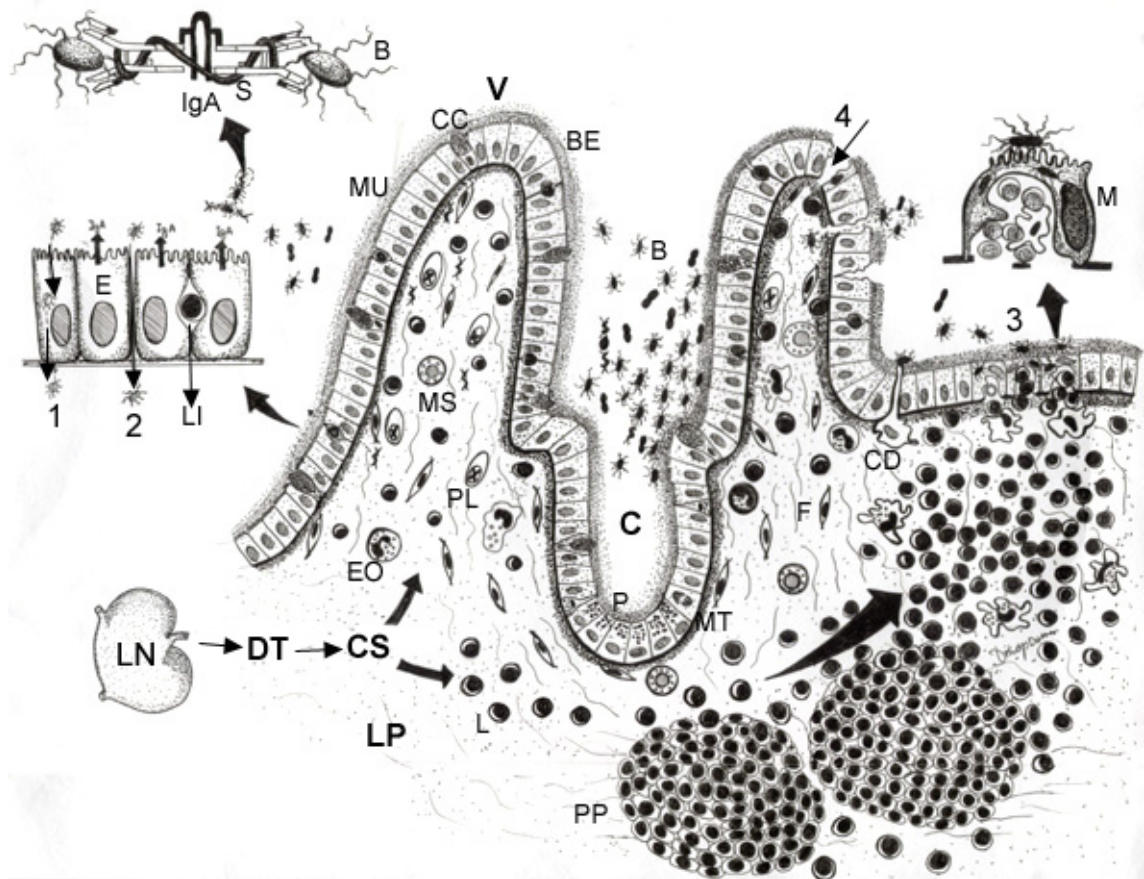


Figura 1: Esquema do intestino delgado, representando células e estruturas que compõem a barreira intestinal e as principais rotas de translocação. 1: translocação via intracelular; 2: via paracelular; 3: via células M e 4: translocação pelo epitélio danificado. A célula M e a imunoglobulina A estão em aumento no topo das figuras nos lados esquerdo e direito, respectivamente. Próximo à região apical dos enterócitos pode ser observada a camada de muco secretado pelas células caliciformes. Abreviaturas: V: vilosidade; C: cripta; LP: lâmina própria; LN: linfonodos; DT: ducto torácico; CS: corrente sanguínea; PP: Placa de Peyer; MU: camada de muco; BE: borda em escova; MT: mitose; IgA: imunoglobulina A; S: componente secretório; B: bactérias; E: enterócito; CC: célula caliciforme; P: célula de Paneth; L: linfócito; LI: linfócitos intraepiteliais; CD: célula dendrítica; F: fibroblasto; EO: eosinófilo; MS: mastócitos. Arte final da ilustração: Délcio Aparecido Durso.

Estas induzem linfócitos T regulatórios e estes suprimem a resposta imunológica via linfócitos, ocorrendo o que se conhece como tolerância antígeno-específica periférica (FAUNCE *et al.*, 2004).

A imunidade mediada por linfócitos também tem um papel importante. Experimentos demonstraram que, quando se utiliza anticorpos monoclonais que bloqueiam a ação de células CD4 e CD8, ocorre aumento da passagem de microrganismos pela barreira intestinal (BERG, 1995).

Resumindo, pode-se afirmar que uma barreira intestinal competente é fundamental para a manutenção da ecologia bacteriana, e permite a simbiose entre microrganismos e hospedeiro. Assim, a integridade da barreira depende de fatores físicos, fisiológicos e imunológicos. Alterações no ambiente intestinal, causadas, por exemplo, por dietas modificadas, podem desregular esses fatores, influenciando na permeabilidade da barreira a patógenos e como consequência a inflamação do intestino (ACHESON & LUCCIOLI, 2004; MacDONALD & MONTELEONI, 2005).

2.3. O desequilíbrio do sistema imunológico e a translocação bacteriana

A translocação bacteriana decorre através de uma falha no funcionamento da barreira intestinal. O intestino contém a maioria das células imunológicas do corpo, e, portanto, é de se imaginar que alterações nesta região levem a implicações como translocação, sepse e em seguida a falência de órgãos (STEINBERG, 2003).

Um balanço nutricional adequado é essencial para o completo desenvolvimento do sistema imunológico. Seu desenvolvimento pode ser afetado tanto pela desnutrição quanto pela supernutrição. Imunodepressão e atrofia dos órgãos linfóides com conseqüentes peritonites bacterianas, têm sido freqüentemente associadas a dietas desbalanceadas. (CUNNINGHAM-RUNDLES & LIN, 1998; CASAFONT *et al.*, 1997; MacFIE, 2000).

Muitos microrganismos desenvolveram formas de invasão sistêmica, conseguindo romper a barreira intestinal e escapar da destruição por fagócitos (ACHESON & LUCCIOLI, 2004). Nestes casos, os microorganismos chegam aos linfonodos mesentéricos e a órgãos estéreis, causando lesões ou superestimulando o sistema imunológico, resultando em resposta inflamatória

intensa (BERG, 1995; DIEBEL *et al.*, 1997). A passagem de microrganismos não viáveis e/ou seus produtos são considerados também translocação. O diagnóstico da translocação é feito pela detecção e mensuração das bactérias viáveis ou de seus produtos nos tecidos (ALEXANDER, 1998).

Um processo conhecido como “translocação fisiológica” ocorre em condições normais em indivíduos imunocompetentes e com a mucosa aparentemente intacta. Bactérias endógenas translocam continuamente em baixo número e são eliminadas nos linfonodos mesentéricos, impedindo a contaminação de outros órgãos sem que se caracterize uma condição patológica (BERG, 1995; CICALESE *et al.*, 1999; GEBBERS & LAISSUE, 2004). Técnicas de DNA plasmidial demonstraram que a translocação fisiológica de bactérias do intestino para os linfonodos ocorre também em recém-nascidos (MOY *et al.*, 1999). A presença de bactérias translocadas para os linfonodos decorre do supercrescimento destas no lúmen intestinal, mas não apenas por este fator, pois a supressão da imunidade celular também pode induzir o escape de bactérias por translocação para os linfonodos mesentéricos. Tratamento com anticorpos anti-timocíticos promovem esta translocação em sete dias. Em contrapartida, a administração de IL-2 reduz a translocação de *E. coli* em até 85% (MADDAUS *et al.*, 1988). Um outro fato a ser observado, é que alguns fatores de virulência, como polissacarídeos capsulares, podem funcionar com inibidores de fagocitose. *Klebsiella* sp. possui estes polissacarídeos, mas não se sabe bem o mecanismo envolvido nesta inibição (LIN *et al.*, 2004). Depois do contato com *Klebsiella* sp., os neutrófilos liberam citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a interleucina 1 (IL-1) (SONG *et al.*, 2004).

Macrófagos, e outras células do sistema imunológico, tentam eliminar bactérias nos linfonodos e impedir sua disseminação (BERG, 1995). Uma falha na eliminação de bactérias nos linfonodos mesentéricos pode levar ao aumento da população microbiana e a translocação destas para órgãos estéreis (WIEST & RATH, 2003). Em algumas situações, como no choque hemorrágico, a translocação e a disseminação para outros órgãos, como o fígado, é intensificada. Por outro lado, muitas espécies bacterianas são incapazes de translocar, mesmo em situações que favoreçam sua ocorrência (BERG, 1995).

Entretanto, o termo “translocação” é mais comumente utilizado para descrever este processo quando microrganismos patogênicos estão envolvidos (BERG, 1995). A translocação bacteriana e de suas endotoxinas pode ocorrer através das células M, por via paracelular (entre os enterócitos) quando ocorrem injúrias que causam rupturas nas junções de oclusão ou por via transcelular, através dos enterócitos (SPAETH *et al.*, 1995; DIEBEL *et al.*, 1997) (Figura 1). As células M presentes no epitélio das vilosidades são uma porta de entrada importante para as bactérias (JANG *et al.*, 2004). *E. coli* entero-hemorrágica e a *E. coli* enteropatogênica atravessam paracelularmente rompendo as proteínas da zônula de oclusão ZO-1 e F-actina, enquanto que uma outra cepa de *E. coli* desorganiza também a ocludina. Outros patógenos, que atravessam paracelularmente, desorganizam também a E-caderina para conseguirem romper a barreira epitelial (SEARS, 2000). *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* atravessam a mucosa transcelularmente (BERG, 1995). Nesta via, os microrganismos são internalizados pelos enterócitos (MacFIE, 2000). Estudos em animais demonstraram que a translocação ocorre geralmente no íleo e no ceco (KAPKAC *et al.*, 2003). Dentre as bactérias que translocam com grande eficiência estão *Pseudomonas aeruginosa* e as anaeróbias facultativas gram-negativas, tais como membros da família *Enterobacteriaceae*, que são os microrganismos que mais translocam (BERG, 1995; MacFIE, 2000). Nesta última se destacam *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*. *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* são causadoras de pneumonia em pacientes imunodeprimidos (PORRAS, 1996). Fungos e microrganismos anaeróbios restritos raramente são vistos translocando (MacFIE, 2000). Uma exceção a esta regra é a *Candida albicans*, que comumente transloca (ALEXANDER, 1998).

O desequilíbrio entre as espécies de microrganismos que povoam o intestino pode provocar distúrbios funcionais. Sabe-se que a eliminação de bactérias anaeróbias promove o supercrescimento de anaeróbias facultativas, que translocam com maior facilidade (WIEST & RATH, 2003). As bactérias anaeróbias agem limitando a colonização e o supercrescimento de microrganismos potencialmente invasivos, fenômeno conhecido como resistência à colonização (WELLS *et al.*, 1987). Bacilos gram-negativos

também apresentam grande crescimento com o desequilíbrio da flora bacteriana (BERG, 1999). O supercrescimento bacteriano pode levar também a uma condição conhecida como síndrome do supercrescimento bacteriano (SIBOS) no intestino delgado (BOUHNİK *et al.*, 1999) que pode afetar outros locais como a via respiratória e urinária (HOWARD *et al.*, 2003).

A translocação está relacionada com o fenômeno conhecido como sepse. A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica causada por infecção generalizada e se caracteriza por febre, taquicardia e leucocitose, podendo culminar no choque séptico (TANI *et al.* 1997; DAVID, 1998). Cerca de 75% dos casos de falência de órgãos e morte de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) estão relacionados direta ou indiretamente com este fenômeno (HOWARD *et al.*, 2003).

A falência múltipla dos órgãos (multiple organ failure, MOF) é uma das conseqüências da sepse (SWANK & DEITCH, 1996; STEINBERG, 2003). As manifestações clínicas da MOF decorrem da liberação de mediadores endógenos pelo hospedeiro em resposta aos produtos bacterianos (WIEST & RATH, 2003) e sua progressão também gera aumento da taxa de translocação, em função do comprometimento dos mecanismos que compõem a barreira intestinal (BERG, 1995). Ratos que sofreram indução experimental de sepse com *Enterobacter cloacae*, tiveram sua taxa de translocação de *E. coli* aumentada (MENCHACA DIAZ *et al.*, 2002).

Estima-se que a recuperação total de uma lesão do epitélio intestinal ocorra em cerca de 6 dias em humanos e 2 dias em ratos. Este também é o tempo estimado para a migração de células das criptas até a extremidade das vilosidades (CHIVA *et al.*, 2002; KAPKAC *et al.*, 2003; WIEST & RATH, 2003).

Procedimentos cirúrgicos, como a laparotomia e outros que levem à manipulação do intestino e que possam causar alterações na microcirculação local, podem aumentar a taxa de translocação bacteriana (ELEFTHERIADIS *et al.* 1996; CICALESE *et al.*, 1999), bem como danos à barreira proporcionados por terapias que utilizem radiação. São ainda fatores predisponentes a translocação bacteriana, a cirrose hepática, que causa danos à barreira intestinal e à capacidade absorptiva (CIRERA *et al.*, 2001; INAMURA *et al.*, 2003) e transplantes de órgãos devido ao aumento da produção de auto-anticorpos e queda da imunidade celular, pelo uso de imunossupressores

(CICALESE *et al.*, 1999; INAMURA *et al.*, 2003). Ratos transplantados apresentaram um quadro de aumento na taxa de translocação, onde fígado e cavidade peritoneal foram os alvos das bactérias translocadas (STENBACK *et al.*, 2001).

Outro fator que parece ter grande importância nos processos que levam à ocorrência da translocação é o desequilíbrio da imunidade inata. Segundo MAXSON *et al.* (1994), o declínio da produção de muco pelas células caliciformes intestinais implica em aumento da taxa de translocação bacteriana.

2.4. As dietas hospitalares e a translocação

Foi observado que a nutrição totalmente parenteral (total parental nutrition, TPN), em condições experimentais, aumentou em 60% a ocorrência de translocação. Além disto, a TPN tem sido considerada um importante indutor da morbidade séptica (SPAETH, 1995; ALEXANDER, 1998). As maiores mudanças fenotípicas e funcionais acarretadas pela TPN são em relação aos linfócitos intra-epiteliais. Estudos mostraram que estas modificações podem não estar diretamente relacionada com a composição da TPN e sim com a ausência de alimento no intestino, que pode causar atrofia do referido órgão (WILDEHABER *et al.*, 1997; NAKASAKI *et al.*, 1998; MacFIE, 2000). A nutrição parenteral também diminui a secreção de IgA, facilitando a translocação (DIEBEL, 1997).

Dietas enterais têm se mostrado superiores às parenterais na manutenção da funcionalidade da barreira intestinal (STALLMACH & ZEITZ, 1998). Um dos fatores que contribuem para esta característica é a presença de alimento no lúmen intestinal, um importante estímulo para manutenção da integridade da mucosa e que previne distrofias do GALT (MacFIE, 2000; CHEROUTRE, 2004). Entretanto, existe o risco de contaminação da dieta enteral por bactérias que podem gerar inúmeros danos aos pacientes que a consomem. *K. pneumoniae*, muitas vezes encontrada nestas preparações, facilmente pode translocar em pacientes fragilizados. Neste caso, é comum a ocorrência de cepas de *K. pneumoniae* que se apresentam resistentes a vários antibióticos, sendo necessária a aplicação de estratégias diferentes para seu controle (PEREIRA *et al.*, 2002).

2.5. Estratégias de controle da translocação

Muitas estratégias de tratamento têm sido utilizadas no intuito de diminuir ou impedir a translocação bacteriana. Algumas drogas atuam melhorando a microcirculação e agindo como fatores de crescimento de macrófagos ou do epitélio. Outras drogas podem agir diminuindo os danos causados pela inflamação (ALEXANDER, 1998). Na sepse, peptídeos que neutralizam as toxinas bacterianas têm sido utilizados (WIEST & RATH, 2003). A técnica de reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction, PCR) tem sido utilizada como ferramenta para detecção da translocação, podendo identificar DNA de microorganismos específicos no sangue (KANE *et al.*, 1996).

A suplementação com IgA também foi proposta. Coelhos recém-nascidos que receberam doses de IgA, apresentaram melhoras em sua barreira intestinal diminuindo drasticamente a translocação (DIEBEL *et al.*, 1997; WIEST & RATH, 2003).

Dietas enterais via tubo nasogástrico promovem proteção contra injúrias, mantendo a integridade intestinal e diminuindo a ocorrência de translocação bacteriana (ALEXANDER, 1998; HOWARD *et al.*, 2003). A escolha da rota enteral em relação à parenteral deve ser estimulada sempre que possível, pois como já foi visto isto diminui a permeabilidade do intestino aos microorganismos ao mesmo tempo em que mantém o GALT (MacFIE, 2000).

2.6. Prebióticos e probióticos como alternativa de controle

A resistência das bactérias aos antibióticos inspira pesquisas que buscam alternativas para o controle da translocação a partir de terapias de interferência microbiana. Muitos suplementos têm sido propostos para aumentar as respostas imunológicas nas mucosas (HANNA & KUDSK, 2000). Probióticos são suplementos alimentares, contendo microorganismos vivos, que trazem efeitos benéficos ao hospedeiro animal, melhorando seu balanço microbiológico intestinal (FULLER, 1989). Os probióticos têm potencial para a manutenção da barreira intestinal, auxiliando pacientes sujeitos a sepse. Em estudos com *Lactobacillus casei* e *Clostridium butyricum*, verificou-se aumento

da proliferação celular do intestino de ratos, devido à estimulação pelos ácidos graxos de cadeia curta produzidos por estes microrganismos (ICHIKAWA *et al.*, 1999). Eles podem produzir efeitos imunoestimulatórios e aumentar as respostas mediadas por IgA (WOODCOCK *et al.*, 2004). A utilização de microrganismos que estabilizam a flora intestinal pode auxiliar na prevenção do supercrescimento bacteriano, auxiliando nos mecanismos de defesa. *Lactobacillus johnsonii* é capaz de se aderir às células intestinais, inibindo a ligação e invasão de bactérias enterovirulentas e também de aumentar a atividade fagocítica de granulócitos. A utilização de probióticos tem apresentado resultados promissores na diminuição da translocação (CHIVA *et al.*, 2002; WIEST & RATH, 2003).

A adesão à mucosa é um pré-requisito para a colonização e é um dos critérios para a seleção de probióticos. OUWEHAND *et al.* (1999) reportaram as diferenças existentes na produção de muco em indivíduos jovens e idosos e constatou que a composição do muco era diferente, afetando na adesão de bifidobactérias.

Novas dietas enriquecidas com glutamina, arginina e ômega 3 têm sido utilizadas apresentando benefícios locais e sistêmicos. Dietas com óleo de peixe têm demonstrado preservar o fluxo sanguíneo intestinal e aumentar a resposta do hospedeiro às bactérias translocadas, por agirem na regulação da síntese de TNF (WIEST & RATH, 2003).

Os prebióticos têm se apresentado como uma nova opção no combate a translocação bacteriana. Prebiótico é um componente alimentar não digerível, capaz de produzir efeito benéfico no hospedeiro, além de estimular o crescimento seletivo e, ou a atividade metabólica de certos tipos de bactérias (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Alguns critérios podem ser utilizados para definir um alimento como prebiótico: (1) o alimento não deve ser hidrolisado ou absorvido na parte superior do intestino; (2) o alimento deve ser seletivamente fermentado por uma espécie ou por um limitado número de espécies de bactérias potencialmente benéficas; (3) o alimento deve alterar a composição da microbiota, tornando-a saudável; e (4) o alimento deve, preferencialmente, trazer benefícios para a saúde do hospedeiro. Oligossacarídeos que não podem ser digeridos, exceto pela atividade de bactérias, são prebióticos (GIBSON, 1999).

Dietas contendo fibras auxiliam a proteção de estruturas intestinais, diminuindo a translocação bacteriana. (SPAETH *et al.*, 1995; KAPKAC *et al.*, 2003). Estudos demonstram que as dietas enterais padrão causam alterações na microbiota e nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta e que estas alterações podem ser prevenidas pela adição de fibras e FOS na dieta (WHELAN *et al.*, 2005). Fibras como a inulina e o FOS (frutooligossacarídeos) possuem um tipo especial de fermentação e são consideradas prebióticos. Essas fibras são carboidratos complexos com configuração molecular que os torna resistentes à ação hidrolítica de enzimas humanas. A inulina é encontrada em mais de 36000 espécies de plantas, mas sua forma comercial é a extraída de raízes de chicória. Os FOS são obtidos a partir da hidrólise da inulina pela enzima ilunase. Industrialmente são produzidos a partir da sacarose pela ação de uma enzima fúngica obtida do *Aspergillus niger* (FLICKINGER *et al.*, 2003). Inulina e FOS são fermentados por bifidobactérias no intestino grosso produzindo substâncias com efeitos benéficos ao hospedeiro, como o lactato e ácidos graxos de cadeia curta, estimulando a defesa do organismo e o crescimento da mucosa (GIBSON, 1999). Por estimular a defesa do organismo e auxiliar no metabolismo do colesterol, estas fibras têm se mostrado como substâncias potencialmente anti-cancerígenas. A adição destas fibras à dieta tem trazido resultados promissores na prevenção de câncer colo-retal em diabéticos (JENKINS, 2003).

Muitos estudos com prebióticos estão voltados para a diminuição da colonização do intestino por microrganismos patogênicos através da adequação do pH luminal, em níveis inadequados aos microrganismos patogênicos (COLLINS & GIBSON, 1999). Assim, a adição de fibras solúveis proporciona efeitos diretos na mucosa intestinal, equilibrando a flora intestinal (WIEST & RATH, 2003). Portanto, análises experimentais sobre a influência de dietas enterais enriquecidas com prebióticos no processo de translocação podem resultar em subsídios que demonstrem os reais benefícios deste procedimento como alternativa futura para pacientes traumatizados, na tentativa de diminuir as complicações sépticas (STALLMACH & ZEITZ, 1998).

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo analisar, morfológica e morfometricamente, o efeito do tratamento com dietas enterais contendo prebióticos e contaminadas com *Klebsiella pneumoniae* sobre o intestino delgado de camundongos imunodeprimidos e camundongos não-imunodeprimidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os itens 4.1. a 4.4. foram realizados por SILVA (2004) como parte de seu trabalho de dissertação.

4.1. O Microrganismo

O experimento foi conduzido com a estirpe P15 de *Klebsiella pneumoniae*, isolada de dieta enteral proveniente de uma unidade hospitalar da Zona da Mata Norte (MG).

O isolado foi ativado em meio TSB (Tryptic Soy Broth) a 37 °C, por 24 horas e as células coletadas por centrifugação. As células foram ressuspensas em 10 mL de dieta enteral, preparada conforme recomendado pelo fabricante, em água esterilizada. O concentrado celular de *Klebsiella* foi reunido em um único recipiente e o volume completado, obtendo-se uma suspensão contendo cerca de 10^{10} UFC mL⁻¹ (SILVA, 2004).

4.2. Preparo das Dietas Enterais

A dieta utilizada foi a Soya Diet sem Sacarose (Support[®]). A dieta em pó foi dissolvida em água destilada estéril de acordo com as recomendações do

fabricante. Para os tratamentos que receberam o prebiótico, foram adicionados 15,3 mg por 100 g⁻¹ de peso corporal por dia de FOS (frutooligossacarídeo) e 15,3 mg 100 g⁻¹ peso corporal por dia de inulina, considerando-se o peso médio do animal de 24 g e um consumo médio diário de, aproximadamente, 20 mL da dieta por animal (SILVA, 2004).

4.3. Delineamento Experimental

Foram utilizados camundongos albinos suíços, com 4 a 6 semanas de idade, obtidos no Biotério Central do CCBS/UFV (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupo de 6 animais e mantidos em gaiolas desinfetadas, em temperatura ambiente de 25 °C. Esses foram pesados diariamente em balança eletrônica (AX 500) com precisão de 0,01 g. A alimentação foi feita por via oral, onde o Tratamento I recebeu dieta padrão para camundongo, e os demais, dieta enteral, como pode ser visualizado na Tabela 1 (SILVA, 2004).

O experimento foi montado segundo esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos (Tabela 1) e, nas subparcelas, os tempos de avaliação em delineamento inteiramente ao acaso.

A imunodepressão foi obtida com o uso de prednisona (10 mg Kg⁻¹); e carbenicilina (200 mg Kg⁻¹) foi utilizada para eliminar as bactérias residentes do intestino. Estes foram aplicados por via oral nos animais dos tratamentos III, V, VII e IX, durante os quatro primeiros dias do experimento. No quinto dia do experimento foi fornecida uma dose de 10¹⁰ UFC mL⁻¹ de *K. pneumoniae* aos animais dos tratamentos IV, V, VIII e IX (SILVA, 2004).

Tabela 1 - Características dos diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos

Tratamento	Características
I	Dieta AIN 93G e animais não imunodeprimidos
II	Dieta enteral com prebióticos, não contaminada, e animais não imunodeprimidos
III	Dieta enteral com prebióticos, não contaminada, e animais imunodeprimidos
IV	Dieta enteral com prebióticos, contaminada, e animais não imunodeprimidos
V	Dieta enteral com prebióticos, contaminada, e animais imunodeprimidos
VI	Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada, e animais não imunodeprimidos.
VII	Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada, e animais imunodeprimidos.
VIII	Dieta enteral sem prebióticos, contaminada, e animais não imunodeprimidos.
IX	Dieta enteral sem prebióticos, contaminada, e animais imunodeprimidos.

4.4. Coleta do material

Após 1, 2 e 4 dias de administração da dieta contaminada (dias 6, 7 e 9 de experimento), foram sacrificados dois animais por dia para cada tratamento. Fragmentos do intestino delgado (íleo) foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 24 horas. A seguir, a solução fixadora foi substituída por solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, sendo os frascos armazenados a 4 °C (SILVA, 2004).

4.5. Processamento do material

Os fragmentos intestinais foram desidratados em série etanólica crescente (70 – absoluto) e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin ®, Leica). Secções transversais e longitudinais com 2 µm de espessura foram obtidas em micrótomato rotativo (RM2155, Leica) utilizando-se navalhas de vidro.

4.6. Coloração e Histoquímica

As secções histológicas foram submetidas as seguintes técnicas:

4.6.1. Hematoxilina Plúmbica (HP) (modificado de BANCROFT & STEVENS, 1996)

Esta coloração foi utilizada para as contagens de linfócitos intraepiteliais, de células de Paneth e de mitoses.

As lâminas contendo secções histológicas de material incluído em resina foram mergulhadas por 2 horas e meia na solução de hematoxilina plúmbica. Após este período, foram lavadas em água destilada, secas em placa aquecedora e montadas em bálsamo do Canadá sintético (Vetec).

4.6.2. Azul de Toluidina / Borato de Sódio 1% (AT) (BANCROFT & STEVENS, 1996).

Esta coloração foi utilizada para as medições das vilosidades, altura de epitélio, profundidade de cripta e contagem de mastócitos. As lâminas foram mergulhadas na solução corante por 30 segundos e depois lavadas em água corrente. A seguir, as mesmas foram secas em placa aquecedora e montadas em resina Entellan ® (Merck).

4.6.3. Técnica de Alcian Blue (AB), pH 2,5 (modificado de MACMANUS & MOWRY, 1960)

Esta técnica histoquímica foi utilizada para as análises de células caliciformes, detectando mucinas ácidas e para a contagem de mastócitos. As

lâminas foram mergulhadas na solução tampão pH 2,5 por 15 minutos, e a seguir em solução de alcian blue por 1 hora e 30 minutos em estufa a 60° C. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e montadas em bálsamo do Canadá sintético (Vetec).

4.6.4. Técnica de ácido periódico + reativo de Schiff (PAS) (modificado de MACMANUS & MOWRY ,1960)

A técnica de PAS foi utilizada para as análises de células caliciformes, detectando mucinas neutras. As lâminas foram mergulhadas durante 30 minutos em solução de ácido periódico. Após esta etapa, elas foram lavadas em água destilada e incubadas (ao abrigo da luz) em reativo de Schiff por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram contracoradas com hematoxilina, lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e montadas em bálsamo do Canadá sintético (Vetec).

4.7. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais

Imagens das secções histológicas foram capturadas diretamente do microscópio de luz (Olympus BX 60) através de uma câmara de vídeo U-CMAD-2 (Olympus). As medições foram feitas utilizando-se o programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetcs) num microcomputador Pentium 1,5 MHz 256 RAM e Sistema operacional Windows 98 (Microsoft).

4.7.1. Altura das vilosidades

Apenas vilosidades com conjuntivo visível e epitélio definido, foram medidas. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 10 secções diferentes, com distância mínima de 100 µm entre elas, num total de 50 vilosidades por animal, utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 10X.

4.7.2. Largura das vilosidades

A largura das vilosidades foi medida, tomando-se a média de três pontos das mesmas vilosidade utilizadas na medida de altura, nas regiões apical, média e basal.

4.7.3. Altura do epitélio

A altura do epitélio foi medida em 5 regiões em 50 vilosidades por secção em 10 secções diferentes, com distância mínima de 100 µm entre eles, num total de 50 vilosidades por animal. As imagens utilizadas foram obtidas com objetiva de 40X.

4.7.4. Profundidade de cripta

Foram selecionadas 5 criptas por secção em 10 secções diferentes, com distância mínima de 100 µm entre elas, num total de 50 criptas por animal, utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 10X.

4.8. Contagens celulares

4.8.1. Células calciformes PAS e AB positivas

Os tipos celulares acima foram contados, utilizando-se 10 campos de 300 x 300µm, escolhidos aleatoriamente, com distância mínima de 100 µm entre eles, por animal.

Utilizou-se a contagem automática do programa Image-Pro Plus, através da ferramenta de segmentação de cores.

4.8.2. Mastócitos

Para a identificação de mastócitos (na lâmina própria e na submucosa), utilizou-se 10 campos de 300 x 300µm escolhidos aleatoriamente, com distância mínima de 100 µm entre eles, por animal, em lâminas submetidas à técnicas de AB e AT.

4.8.3. Linfócitos intraepiteliais

Para a contagem destes tipos celulares, utilizaram-se 50 campos, de área $74.025 \mu\text{m}^2$, escolhidos aleatoriamente com distância mínima de $100 \mu\text{m}$ entre eles, por animal. Utilizou-se a objetiva de 40X em secções histológicas coradas com HP.

4.8.4. Células de Paneth

Para a contagem destes tipos celulares, utilizaram-se 50 campos de área $74.025 \mu\text{m}^2$, escolhidos aleatoriamente na região das criptas, com distância mínima de $100 \mu\text{m}$ entre eles, por animal. Utilizou-se a objetiva de 40X para esta análise.

4.9. Mitoses nas criptas

Figuras de mitose foram contadas utilizando-se 50 campos de área de $74.025 \mu\text{m}^2$ escolhidos aleatoriamente na região das criptas, com distância mínima de $100 \mu\text{m}$ entre eles, por animal. Utilizou-se a objetiva de 40X para esta análise.

4.10. Documentação fotográfica

Imagens representativas das regiões analisadas foram selecionadas e fotografadas em fotomicroscópio AX-70 (Olympus).

4.11. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, utilizando-se o programa SAEG 8.0. Para o fator qualitativo, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais

5.1.1. Altura das vilosidades

As vilosidades do íleo dos camundongos analisados não apresentaram diferenças morfológicas marcantes entre os tratamentos e estavam bem preservadas (Fig. 2A). Para Tratamento, Dia e também para a interação Tratamento x Dia (T x D) não foi verificado nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) para altura de vilosidades (Quadro 1). Essa evidência foi comprovada pelo resultado obtido pelo teste de Tukey a 5% de significância. O resultado deste teste demonstrou que as médias dos tratamentos não apresentaram diferença mínima significativa entre elas (Quadro 2), embora a maior média tenha sido observada no Tratamento V (TV) (Fig. 3A). Verifica-se que não houve efeito significativo dos dias, sendo a equação ajustada apresentada no Quadro 6.

5.1.2. Largura das vilosidades

De maneira geral a largura das vilosidades variava ao longo de seu eixo (Fig. 2C). A análise de variância da largura das vilosidades apresentou efeito significativo a 5% de probabilidade para Tratamento. Entretanto, a fonte de

variação Dia, e a interação T x D, não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) (Quadro 1). Quando as medidas da fonte de variação tratamento (T) foram comparadas pelo teste de Tukey, pode-se observar que não há diferença significativa entre os tratamentos, cuja maior média encontrada foi no TVII e a menor no TI (Fig. 3B).

5.1.3. Altura do epitélio

A excelente preservação do material permitiu observar que o epitélio era regular ao longo das vilosidades. Os enterócitos apresentavam borda estriada bem evidente e núcleos ovalados localizados no terço basal dos mesmos. (Fig. 2D). A altura das células variou numericamente de aproximadamente 18 a 21 μm . A análise de variância das medidas de altura do epitélio apontou para um efeito significativo a 1% de probabilidade para Tratamento e a 5% de probabilidade para Dia. Para a interação T x D, o efeito não foi significativo ($p > 0,05$). Pela análise de regressão linear, entretanto, notou-se que não houve diferenças entre os dias (Quadro 6). A altura do epitélio do íleo dos animais da parcela TII diferiram significativamente, apenas em relação a TVIII e TIX, pelo teste de Tukey (Quadro 2). Os animais do tratamento II apresentaram um epitélio mais alto do que os outros dois citados. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças entre si (Fig. 3C).

5.1.4. Profundidade de cripta

As criptas, localizadas entre as vilosidades, foram medidas da base até seu ápice. De maneira geral, elas não diferiram morfológicamente entre os tratamentos. As células de Paneth, caliciformes e as figuras de mitose eram evidentes (Fig. 2B, 7A). As medidas de profundidade de cripta não apresentaram efeito significativo para as fontes de variação Tratamento e Dia e para a interação T x D. O teste de Tukey e a regressão linear comprovaram estes dados. No primeiro, pode-se notar que não há diferença mínima significativa nem mesmo entre a maior média (apresentada no tratamento TIV) e a menor (apresentada no tratamento TVIII) (Quadro 2, Fig. 3D).

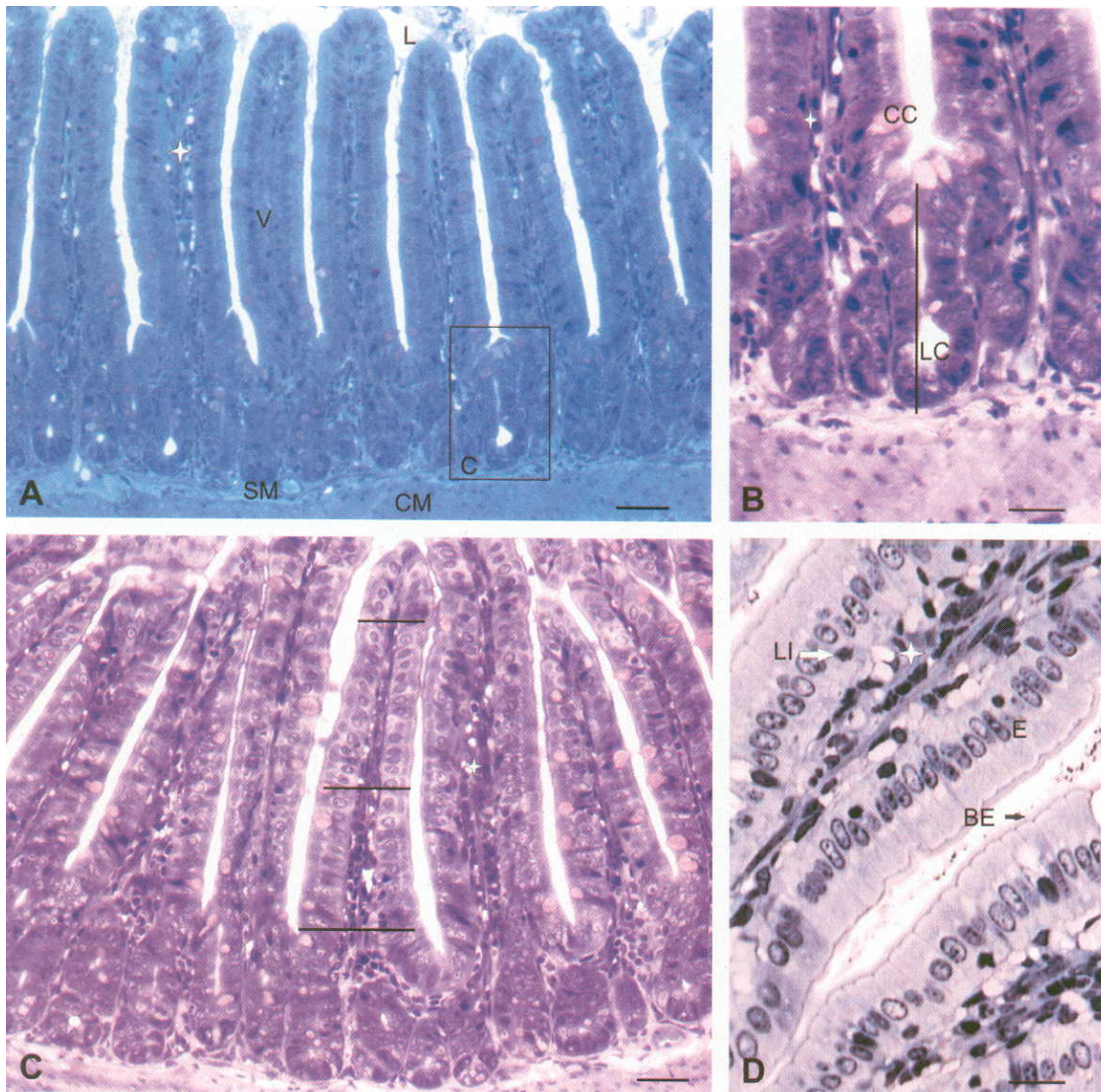


Figura 2: Fotomicrografias de secções histológicas de intestino delgado (íleo) de camundongos. A-C: secções coradas com azul de toluidina, D: secção corada com hematoxilina plúmbica. A-D: estrela indica lâmina própria. B: barra indica a profundidade da cripta. C: as 3 barras indicam as diferenças na largura da vilosidade ao longo do seu eixo (região basal, média e apical). Abreviações: BE= borda em escova, C= cripta, CC= célula caliciforme, CM= camada muscular, E= enterócito, L= luz do intestino, LI= linfócito intraepitelial, SM= camada submucosa e V= vilosidade. Escala das barras: A: 40 μ m, B: 20 μ m, D: 10 μ m e C: 30 μ m.

Quadro 1: Resumo da análise de variância dos parâmetros: altura de vilosidades (ALT), largura de vilosidades (LAR), profundidade de criptas (CPT) e altura de epitélio (EPT)

FV	GL	Quadrados médios			
		ALT	LAR	CPT	EPT
Trat (T)	8	8060,57 ^{ns}	43,92*	109,62 ^{ns}	7,94**
Resíduo (a)	9	17130,41	17,20	245,45	1,91
Dias (D)	2	25754,69 ^{ns}	13,32 ^{ns}	24,80 ^{ns}	8,89*
TxD	16	17163,06 ^{ns}	16,31 ^{ns}	70,44 ^{ns}	2,74 ^{ns}
Resíduo(b)	18	10297,03	17,75	72,83	2,08
cv (%)parcelas		35,52	6,98	16,23	7,31
cv (%)subparcelas		25,21	7,09	8,84	7,62

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

ns - F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

FV : fonte de variação

GL: grau de liberdade

Cv: coeficiente de variação

Quadro 2: Valores médios das variáveis: altura de vilosidades (ALT), largura de vilosidades (LAR), altura de epitélio (EPT) e profundidade de criptas (CPT) em função dos tratamentos, em μm

Tratamento	ALT	LAR	EPT	CPT
I	427,79a	54,79a	20,25ab	96,05a
II	391,03a	59,54a	21,26a	98,11a
III	339,58a	61,92a	18,11ab	99,88a
IV	369,64a	59,83a	18,68ab	101,57a
V	453,99a	56,52a	19,38ab	97,81a
VI	430,66a	60,02a	18,39ab	98,71a
VII	413,40a	63,98a	18,35ab	97,52a
VIII	423,74a	58,38a	17,98b	88,82a
IX	372,11a	59,61a	17,95b	90,21a
DMS	299,22	9,48	3,16	35,81

TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos. DMS= diferença mínima significativa.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

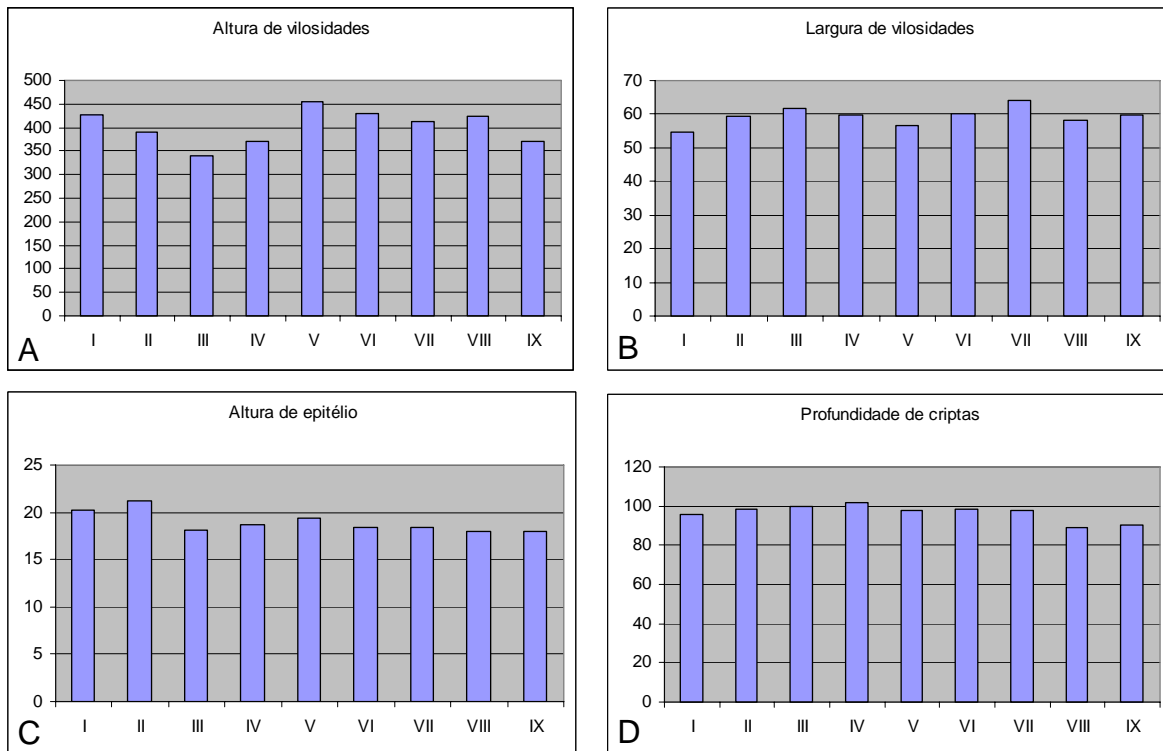


Figura 3: Valores médios, em micrômetros, de altura (A) e largura (B) das vilosidades, da altura do epitélio (C) e da profundidade das criptas (D) apresentadas pelos camundongos submetidos aos tratamentos: TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos.

5.2. Contagens celulares

5.2.1. Contagem de Células Caliciformes PAS e alcian blue (AB) positivas.

As células caliciformes PAS e as AB positivas eram abundantes tanto nas vilosidades quanto nas criptas, embora se concentrassem mais na região média das vilosidades (Fig. 4).

Na análise de variância do número de células PAS positivas, foi observado efeito significativo ($p < 0,05$) para as fontes de variação Dia (D) e Tratamento (T) de forma independente, não havendo efeito da interação D x T (Quadro 3). Quando os valores dos tratamentos foram comparados, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, observou-se que estes se comportaram de maneira homogênea, ou seja, sem diferença significativa entre eles, variando numericamente de 71 a 83 células por campo (Quadro 4, Fig. 5A). Quando se analisou a fonte de variação Dia, por regressão linear, também não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Quadro 6).

Para o parâmetro número de células caliciformes AB positivas, a análise de variância apresentou um efeito significativo a 1% para a fonte de variação Tratamento. Para Dia e para a interação T x D, o efeito não foi significativo ($p > 0,05$) (Quadro 3). Pela comparação pelo teste de Tukey, notou-se diferença entre os tratamentos. O maior número de células encontradas foi no tratamento controle (TI) e o menor número no TV. O TV diferiu significativamente também, dos tratamentos TII e TIII, onde os dois últimos apresentaram as maiores médias em relação a TV. O TIII diferiu significativamente também dos tratamentos IV, VI, VII, VIII e IX (Quadro 4, Fig. 5B). Quando analisada a fonte de variação Dia, não se obteve diferença na regressão linear. A equação ajustada pode ser visualizada no Quadro 6.

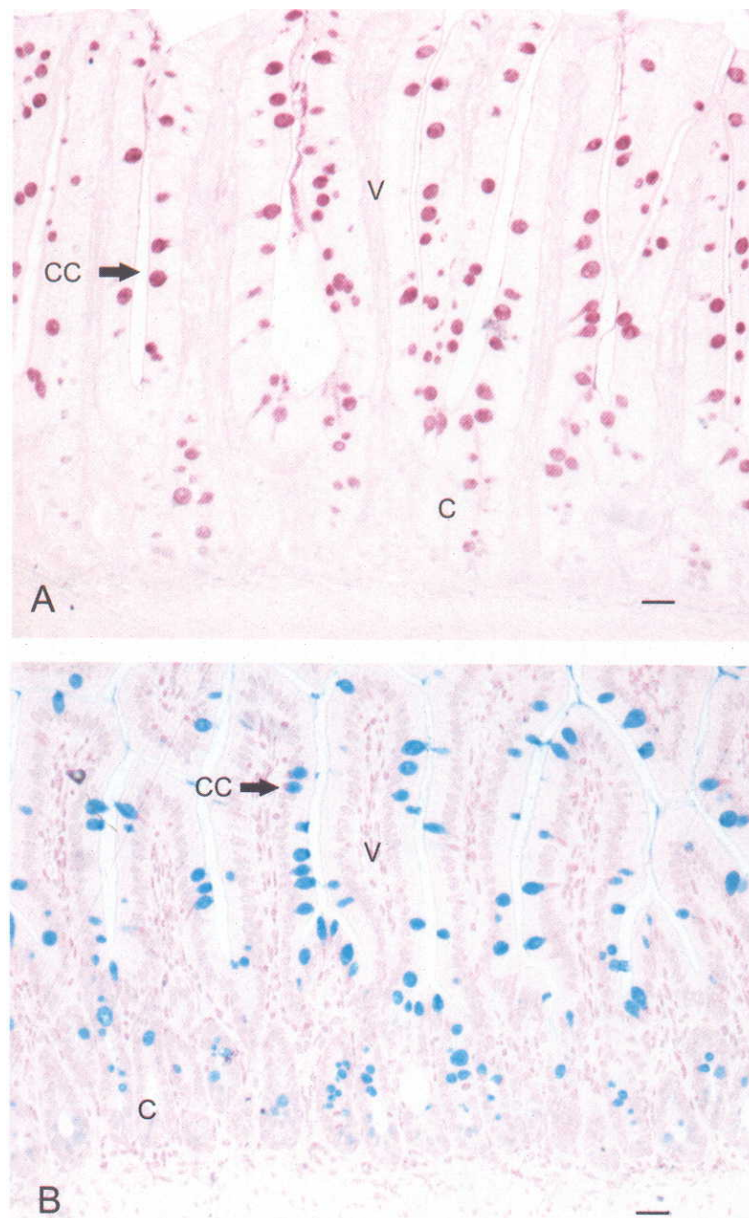


Figura 4: Fotomicrografias de secções histológicas de intestino delgado (íleo) de camundongos submetidos às técnicas histoquímicas de PAS e AB. A: células caliciformes PAS positivas. B: células caliciformes AB positivas. Abreviações: C= cripta, CC= célula caliciforme e V= vilosidade.

Escala das barras: 20 μ m.

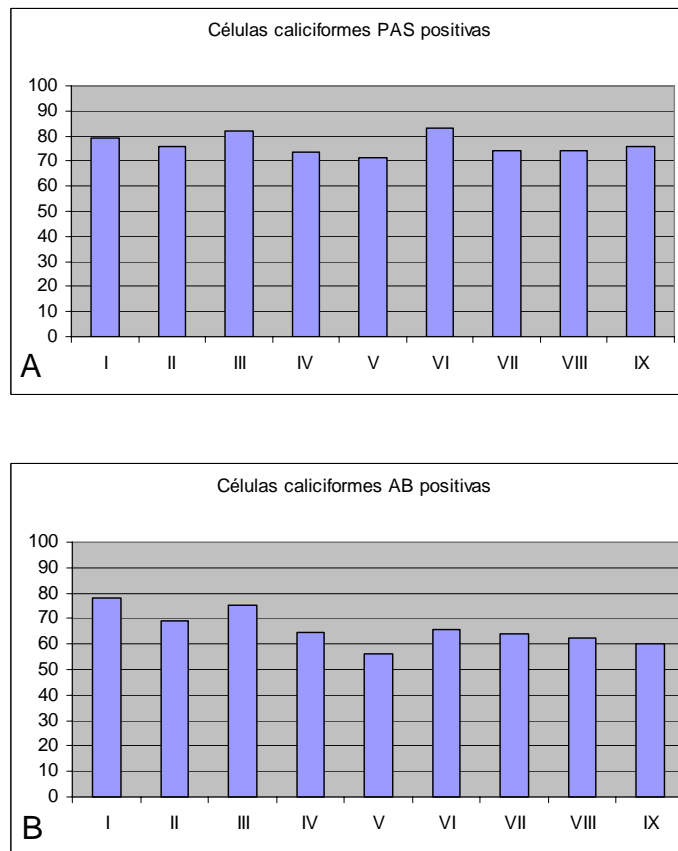


Figura 5: Número de células calciformes PAS (A) e AB (B) positivas por área de 300 x 300 μ m. TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos.

5.2.2. Contagem de Mastócitos

Nenhum mastócito foi encontrado nos campos analisados, tanto nas lâminas coradas com azul de toluidina quanto nas lâminas submetidas à técnica histoquímica por AB.

5.2.3. Contagem de Linfócitos Intraepiteliais

Os linfócitos intraepiteliais se apresentaram fortemente corados pela hematoxilina plúmbica, sendo facilmente identificados entre os enterócitos (Fig. 7B). O número de linfócitos intraepiteliais apresentou efeito significativo para T e para a interação T x D (Quadro 3). Esta interação foi estudada através do teste de Tukey. Para o dia 6, obteve-se diferença entre dois tratamentos, TI e TIX, onde o maior número de linfócitos foi encontrado no TIX. Os demais grupos não diferiram significativamente. Para o dia 7, o maior número de linfócitos intraepiteliais foi encontrado no TV. Este grupo diferiu significativamente dos tratamentos TII e TIII, que apresentaram as menores médias. Para o dia 9, o Tratamento V apresentou a maior média, diferindo significativamente dos tratamentos TII, TIII e TIV, que apresentaram as menores médias (Fig. 6, Quadro 5).

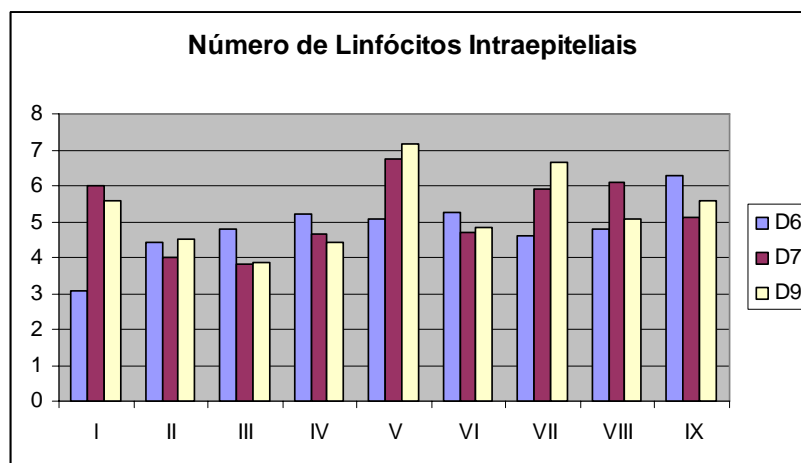


Figura 6: Número de linfócitos intraepiteliais por área de 74.025 µm² nos dias 6, 7 e 9. TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos.

5.2.4. Contagem de Células de Paneth

As células de Paneth eram facilmente visualizadas na base das criptas intestinais. Os grânulos de secreção que se coravam fortemente pela hematoxilina plúmbica, respondiam fracamente à técnica do PAS, e eram AB negativos (Fig. 7A, C e D, respectivamente).

Para o parâmetro número de Paneth por cripta, o F foi significativo apenas para a fonte de variação Tratamento, pela análise de variância. Estas células apresentaram-se em maior quantidade nas criptas dos animais TV e TVI. O menor número de células de Paneth foi encontrado no TI. Os tratamentos V e VI diferiram também de TVII e TIX (Quadro 4, Fig. 8A). Os demais tratamentos não diferiram significativamente (Quadro 4). A análise de variância demonstrou que não houve interação T x D, bem como não há influência dos dias no número de células de Paneth (Quadro 3). Este último foi comprovado pela regressão linear, cuja equação ajustada se encontra no Quadro 6.

5.3. Mitoses nas criptas

O número de figuras mitóticas (prófase, metáfase e anáfase) eram facilmente identificadas nas criptas (Fig. 7A). Seu número não apresentou F significativo para nenhuma das fontes de variação. Como pode ser observado no quadro 4, o teste de Tukey mostrou que as médias não apresentam diferença mínima significativa. As maiores médias foram observadas nos TVIII e TIX e a menor no TIII (Quadro 4, Fig. 8B).

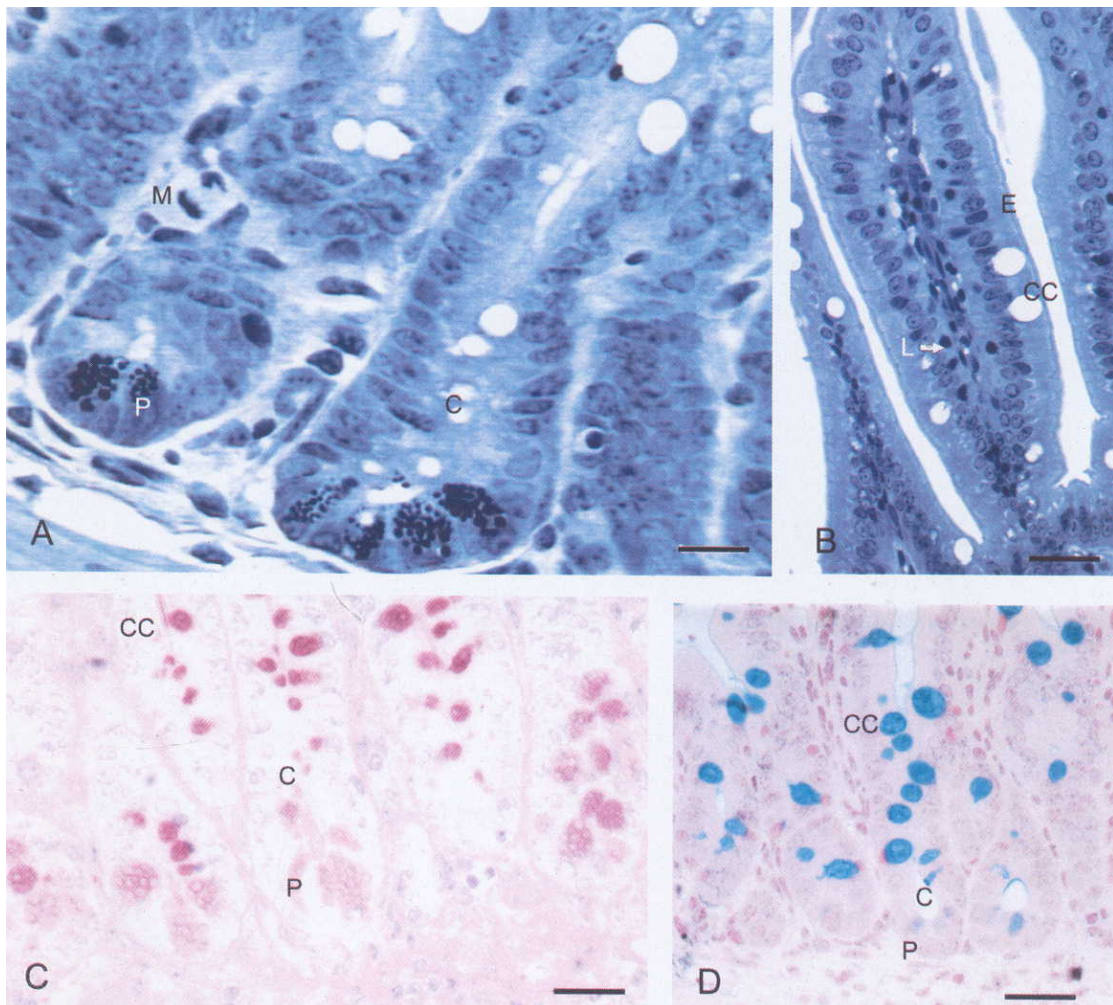


Figura 7: Fotomicrografias de secções histológicas de intestino delgado (íleo) de camundongos. A-B: secções histológicas coradas com hematoxilina plúmbica. C: secções histológicas submetidas à técnica de PAS. D: secções histológicas submetidas à técnica de AB. Abreviações: C= cripta, CC= célula caliciforme, P= célula de Paneth, M= figura mitótica, E= enterócito e L= linfócito intraepitelial. Escalas das barras: A= 20 μ m, B - D= 30 μ m.

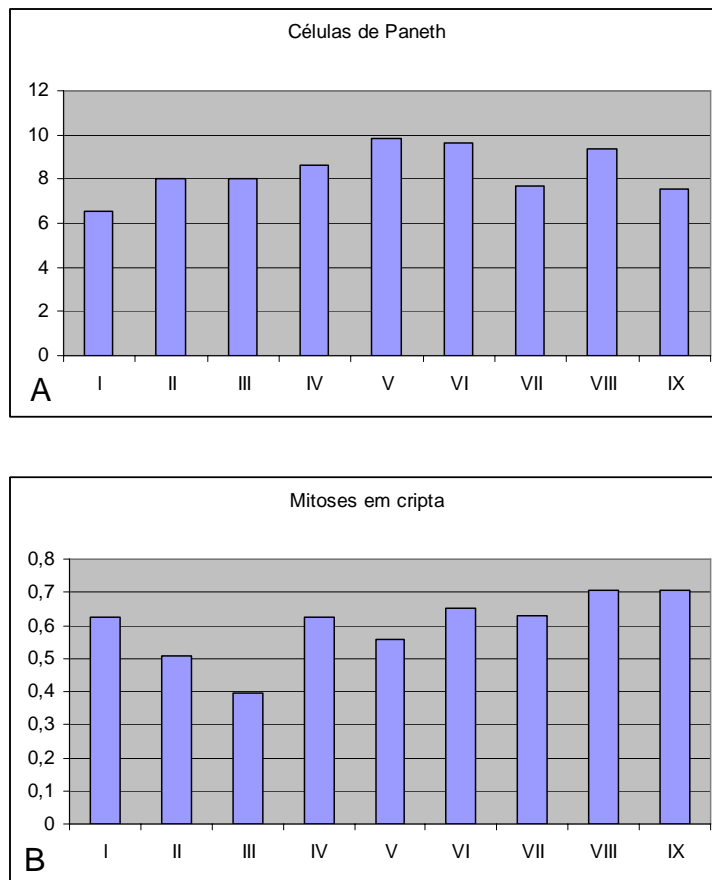


Figura 8: Número de células de Paneth (A) e de figuras mitóticas em cripta (B) por área de 74.025 μm^2 .

TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos.

Quadro 3: Resumo da análise de variância dos parâmetros: número de células caliciformes AB positivas (ABL), número de células caliciformes PAS positivas (PAS), número de células de Paneth (PAN), número de mitoses em cripta (MIT) e número de linfócitos intraepiteliais (LIN)

FV	GL	Quadrados médios				
		ABL	PAS	PAN	MIT	LIN
Trat (T)	8	298,48**	169,59*	7,20**	0,26ns	2,92**
Resíduo (a)	9	18,74	62,36	0,73	0,35	0,66
Dias (D)	2	22,68 ns	254,54*	1,09ns	0,12ns	1,11ns
TxD	16	47,91ns	76,58ns	1,22ns	0,41ns	1,41*
Resíduo(b)	18	29,54	67,33	1,75	0,51	0,47
cv (%)parcelas		6,54	10,45	10,23	93,77	15,95
cv (%)subparcelas		8,21	10,86	15,83	35,8	13,48

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

ns - F não significativo ao nível de 5% de probabilidade

FV: fonte de variação

GL: grau de liberdade

Cv: coeficiente de variação

Quadro 4: Valores médios das variáveis: número de células caliciformes AB positivas (ABL), número de células caliciformes PAS positivas (PAS), número de células de Paneth (PAN) e número de mitoses em cripta (MIT)

Tratamento	ABL	PAS	PAN	MIT
I	78,23a	79,13a	6,51c	0,62a
II	69,11abc	75,96a	8,01abc	0,51a
III	75,31ab	81,86a	8,04abc	0,39a
IV	64,88cd	73,66a	8,60ab	0,62a
V	56,13d	71,48a	9,85a	0,55a
VI	65,71bcd	83,13a	9,62a	0,65a
VII	63,98cd	74,00a	7,66bc	0,63a
VIII	62,08cd	74,38a	9,37ab	0,70a
IX	60,16cd	76,00a	7,58bc	0,70a
DMS	9,89	18,05	1,95	0,43

TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos. DMS= diferença mínima significativa.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 5: Valores médios do número de linfócitos intraepiteliais em função dos dias de avaliações (D) para os diferentes tratamentos (T)

T	D=6	D=7	D=9
I	3,07b	5,99ab	5,58abc
II	4,44ab	4,01b	4,53bc
III	4,79ab	3,81b	3,87c
IV	5,23ab	4,65ab	4,43bc
V	5,09ab	6,74a	7,14a
VI	5,25ab	4,72ab	4,85abc
VII	4,59ab	5,91ab	6,65ab
VIII	4,77ab	6,08ab	5,05abc
IX	6,27a	5,11ab	5,57abc
DMS	2,48	2,48	2,48

TI= Dieta controle (AIN-93G) e animais não imunodeprimidos; TII= Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e não imunodeprimidos; TIII= Dieta enteral com prebióticos, e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TV= Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais não imunodeprimidos; TVII= Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais não imunodeprimidos; TIX= Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos. DMS= diferença mínima significativa.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 6: Equações ajustadas das variáveis número de células calciformes AB positivas (ABL), número de células calciformes PAS positivas (PAS), número de células de Paneth (PAN), número de mitoses em cripta (MIT), altura de vilosidades (ALT), largura de vilosidades (LAR), profundidade de criptas (CPT) e altura de epitélio (EPT) em função dos dias de avaliações

Variáveis	Equações ajustadas
ABL	$\hat{Y} = 66,18$
PAS	$\hat{Y} = 75,51$
PAN	$\hat{Y} = 8,36$
MIT	$\hat{Y} = 0,63$
ALT	$\hat{Y} = 402,44$
LAR	$\hat{Y} = 59,40$
CPT	$\hat{Y} = 96,52$
EPT	$\hat{Y} = 18,93$

6. DISCUSSÃO

6.1. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais

O intestino pode ser uma importante porta de entrada de microorganismos que ao vencerem a barreira intestinal, alcançam órgãos estéreis. Portanto, para estudos de translocação, a integridade de sua mucosa deve ser analisada. A hipoproliferação celular, com conseqüente atrofia da mucosa, é comumente associada a disfunções da via digestória (KISSMEYER-NIELSEN *et al.*, 1995). Esta situação pode ser resultado de certas dietas utilizadas em pacientes hospitalizados, como a nutrição totalmente parenteral (TPN) e nutrição enteral. Ambas podem causar alterações deletérias ao intestino, como a hipoplasia da mucosa devido à baixa movimentação luminal e ainda, a modificação do tipo de mucina secretada pelas células caliciformes, o que pode favorecer a entrada de microrganismos patogênicos (CUMMINS *et al.*, 1995; FRANKEL *et al.*, 1995; ICHIKAWA *et al.*, 2002). Atrofias da mucosa do intestino podem também se originar de infecções da via gastrointestinal como observadas em ratos parasitados por *Echinostoma revolutum* (BINDSEIL & CHRISTENSEN, 1984).

A introdução na dieta de algumas substâncias está sendo utilizada no intuito de reverter a ocorrência de atrofia, como por exemplo, a utilização de glutamina na TPN (ALPERS, 2002). O mesmo foi observado por McCULLOUGH *et al.* (1998), que constataram o aumento do número de criptas e vilosidades em animais alimentados com dieta contendo fibras.

A morfometria tem sido utilizada para análise de alterações morfológicas de tecidos e órgãos, como, por exemplo, modificações na mucosa intestinal em resposta a diversos tratamentos, permitindo a análise estatística de aspectos morfológicos das estruturas em estudo (ZARZUR & KUDSK, 2001).

A integridade da mucosa intestinal é condição necessária para evitar o processo de translocação. Em nosso estudo, de maneira geral, foi verificado que a mucosa do íleo dos animais submetidos aos tratamentos não apresentou alterações morfométricas significativas quando comparada com o controle.

6.1.1. Altura das vilosidades

As vilosidades não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos no parâmetro altura. Mesmo não havendo diferença significativa, a maior altura foi observada no Tratamento V, a menor no TIII. O Tratamento V é nosso principal objeto de estudo. Neste tratamento foi utilizada uma dieta enteral, contendo prebióticos e contaminadas com *Klebsiella pneumoniae*, ministrada a camundongos imunodeprimidos. A maior altura observada nas vilosidades destes indivíduos pode ser resultado da estimulação do sistema imunológico pela *K. pneumoniae* que aumentou o número de linfócitos na lâmina própria; e pelo prebiótico, pois este, quando fermentado gera ácidos graxos de cadeia curta que são utilizados no metabolismo dos enterócitos, facilitando o crescimento das vilosidades (ROEDGER, 1982). BUDINO *et al.* (2005), estudando o efeito de prebióticos e probióticos na morfologia do intestino de suínos, observaram que os prebióticos proporcionaram um aumento na densidade de vilosidades nestes animais em relação ao grupo controle. Sendo assim é provável que a estratégia utilizada para promover a imunodepressão, não tenha interferido na ação dos linfócitos da mucosa intestinal em resposta ao desafio por *K. pneumoniae*.

No Tratamento III, apesar de ter sido ministrada uma dieta enteral com prebióticos a camundongos imunodeprimidos, não houve a contaminação por

K. pneumoniae, podendo este fato justificar a altura menor entre todos os tratamentos, pois não ocorreu estimulação do sistema imunológico. Sabe-se que bactérias comensais estimulam o desenvolvimento intestinal, regulando, por exemplo, a maturação dos enterócitos (YAH & POLK, 2004). Entretanto deve ser salientado, que estes resultados podem estar indicando uma tendência, pois os mesmos não foram significativos com $p > 0,05$.

6.1.2. Largura das vilosidades

Largura das vilosidades foi um dos parâmetros analisados neste estudo que também não apresentou diferença significativa. O valor médio mais alto para largura de vilosidade ocorreu nos animais submetidos a TVII. A largura de vilosidades encontrada nos animais do Tratamento V foi maior que a encontrada nos animais do Tratamento I e menor que todas nos outros tratamentos. Este dado demonstra que a vilosidade do Tratamento V tende a se alongar mais no eixo vertical do que no eixo horizontal em relação aos demais tratamentos, sendo a única exceção quando se compara com aqueles animais que receberam dieta não enteral, ou seja, o Tratamento I. Pode-se observar também, que todos os indivíduos que receberam dieta enteral, sofreram aumento da vilosidade no seu eixo horizontal. Não foi encontrado qualquer estudo anterior que analisasse este parâmetro. Entretanto, se um incremento da altura das vilosidades for acompanhado de uma diminuição da largura, não se pode garantir que houve um aumento no número de células da mucosa. No presente estudo, de maneira geral, observou-se que os tratamentos em aumentaram a largura das vilosidades. Entretanto, no TV onde a o aumento das vilosidades foi maior, este não foi acompanhado pelo aumento da largura. Portanto, o mais provável é que os tratamentos não tenham interferido no número de células da mucosa.

6.1.3. Altura do epitélio

Um dado morfométrico que apresentou diferença significativa foi a altura do epitélio. As menores alturas encontradas foram as nos indivíduos dos Tratamentos VIII e IX. Estes dois grupos foram os mesmos que apresentaram menor profundidade de cripta. Estes tratamentos têm em comum a ausência de prebióticos. Os animais submetidos ao Tratamento V apresentaram a altura do

epitélio muito semelhante à do Tratamento I e II numericamente, sendo estes três, os maiores valores. Estes dados podem indicar que, a alteração da altura do epitélio pode estar relacionada à presença de prebióticos. Pela excelente preservação do material podemos verificar que, não há evidências estruturais que possam indicar a ocorrência da translocação bacteriana pelo epitélio intestinal do íleo, analisados pela microscopia de luz. Evidências moleculares de translocação de *K. pneumoniae* foram reportadas por SILVA (2004) nestes mesmos tratamentos. Portanto, a translocação pode ter ocorrido em outra região do intestino, ou as alterações no epitélio do íleo ocorrerem apenas em nível ultra-estrutural. Segundo WANG *et al.* (1994), certos microrganismos alteram a permeabilidade dos enterócitos da região do íleo e colo, durante a translocação, mas estas alterações foram observadas apenas com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão.

6.1.4. Profundidade de cripta

As criptas são glândulas tubulares simples, presentes entre as vilosidades, e conhecidas, também, por glândulas intestinais ou de Lieberkuhn (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O epitélio da cripta é composto por uma camada simples de células colunares cujas superfícies apicais estão voltadas para o lúmen da cripta. Uma fina membrana basal separa as células da cripta da lâmina própria circundante (TRIER, 1963).

As menores profundidades de cripta encontradas, embora não tenha ocorrido diferença significativa, foram as dos animais dos Tratamentos VIII e IX. Ambos os tratamentos não continham prebióticos na dieta, mas estavam contaminados por *K. pneumoniae*. Dietas enterais têm sido descritas como causadoras de atrofia na mucosa e a falta de prebióticos, que são estimuladores do crescimento celular, pode ter resultado nas menores medidas para este parâmetro. Os animais do TIV apresentaram criptas mais profundas que estes dois últimos e do que TVIII e TIX e controle. EVANS *et al.* (1992) demonstraram que a ativação das células T da lâmina própria causa aumento de proliferação de células da cripta, o que pode justificar a maior profundidade encontrada nos indivíduos do TIV, pois estes eram indivíduos saudáveis, que receberam dietas contaminadas, o que pode ter estimulado o sistema imunológico, ativando as células T. Um outro fator é que estes mesmos

indivíduos receberam prebióticos, que são conhecidos como estimuladores da proliferação de células da cripta. Entretanto, deve ser salientado que a ausência de diferenças significativas na análise estatística, não nos permite corroborar tais achados.

6.2. Contagens celulares

6.2.1. Contagem de Células Caliciformes PAS positivas e AB positivas.

A secreção do muco é um fator crítico na função de barreira do intestino e sua diminuição resulta em aumento significativo da passagem de bactérias pelo íleo intacto de ratos (ALBANESE *et al.*, 1994).

Segundo SATCHITHANANDAM *et al.* (1990), muitos estudos relatam o aumento da produção de muco em resposta a dietas contendo fibras fermentáveis. Os ácidos graxos de cadeia curta estimulam a produção de muco pelas células caliciformes. Foi observado que a inulina estimula especificamente a produção de sulfomucinas (FONTAINE *et al.* 1996; apud SCHLEY & FIELD, 2002). McCULLOUGH *et al.* (1998), estudando animais que receberam dieta com fibras, observaram aumento no número de células caliciformes tanto nas criptas quanto nas vilosidades. No presente estudo, não se observou qualquer relação entre dieta com fibras e aumento de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas, pois a maior contagem foi obtida em indivíduos que receberam dieta padrão para camundongo. Vale ressaltar que, com exceção do Tratamento I, que apresentou a maior contagem, todos os demais receberam dieta enteral, o que pode ter influenciado no número de células caliciformes e no tipo de mucina secretada em função de alterações na mucosa causada pelo emprego de dietas enterais (FRANKEL *et al.*, 1995).

O menor número de células caliciformes encontradas, tanto PAS quanto AB positivas, foi visto no Tratamento V. EVANS *et al.* (1992) observaram, em experimento com cultura de órgãos que, a ativação de células T da lâmina própria, leva a uma diminuição do número de células caliciformes. Estes dados podem sugerir que, aqueles indivíduos que receberam a dieta enteral contendo prebióticos e haviam sido contaminados com *K. pneumoniae*, podem ter apresentado uma maior ativação de suas células T da lâmina própria. Isto implica na diminuição do número de células caliciformes nestes indivíduos,

conforme sugerido por EVANS *et al.* (1992). Mais uma vez, sugere-se que a estratégia utilizada para provocar a imunodepressão dos animais pode não ter surtido os efeitos esperados.

Sabe-se que as células caliciformes produtoras de mucinas neutras são maioria no intestino. Mas, em regiões de alta densidade de micróbios, as células caliciformes que secretam mucinas ácidas são predominantes, porque são mais difíceis de serem degradadas pelas bactérias (DEPLANCKE & GASKINS, 2001). No presente estudo, observou-se número menor de células caliciformes secretoras de mucinas ácidas em relação àquelas secretoras de mucina neutras.

6.2.2. Contagem de Mastócitos

A observação de mastócitos nas mucosas de camundongos normais é extremamente rara. Entretanto, são encontrados em situações patológicas como infecções por nematóides, em resposta à liberação de IL-3, aumentada neste tipo de infestação (GUY-GRAND *et al.*, 1984).

No presente estudo, nenhum mastócito foi observado na mucosa do íleo, indicando que a infecção por *K. pneumoniae* não gerou resposta mediada por este tipo celular.

6.2.3. Contagem de Linfócitos Intraepiteliais

As dietas totalmente parenterais alteram populações de células do GALT, diminuindo o número de linfócitos B e T e o número de linfócitos intraepiteliais. As dietas enterais mais complexas têm esses efeitos reduzidos (LI *et al.*, 1995). No presente estudo, o número de linfócitos intraepiteliais variou em função dos dias analisados.

No sexto dia, o maior número de linfócitos encontrados foi no TIX e o menor no TI. Os demais tratamentos se comportaram de maneira estatisticamente semelhantes. Alguns autores observaram que o número de linfócitos intraepiteliais pode estar relacionado com a estimulação do sistema imunológico pela translocação de bactérias (HULST *et al.*, 1998). Os indivíduos do Tratamento IX eram aqueles imunodeprimidos em que os prebióticos não foram administrados e que receberam dieta contaminada com *K. pneumoniae*. Estes indivíduos, estudados por SILVA (2004), apresentaram no sexto dia,

translocação para coração, rim, fígado e baço. Já no sétimo dia, foram encontradas bactérias no fígado e baço. No nono dia, nenhuma bactéria foi encontrada nestes órgãos. Esta translocação no sexto dia pode ter influenciado no número de linfócitos intraepiteliais pela estimulação do sistema imunológico por estas bactérias translocadas.

No sétimo dia, o Tratamento V foi o que apresentou maior número de linfócitos intraepiteliais. Tratamentos I, IV, VI, VII, VIII e IX não apresentaram diferença significativa entre eles. TII e TIII apresentaram os menores números de linfócitos intraepiteliais, mas este número só foi estatisticamente diferente do TV. Cabe ressaltar que, tanto o Tratamento II quanto III, não receberam contaminação por *K. pneumoniae*.

No nono dia, o maior número de linfócitos intraepiteliais também foi observado no TV. O Tratamento III apresentou o menor número. Tanto no dia 7, quanto no dia 9, o número de linfócitos apresentados pelo TIII foi menor do que o apresentado pelo TII. Este fato é contraditório se compararmos com dados de MILO *et al.* (2004), que estudaram o efeito das dietas enterais contendo fibras como estimulador do sistema imunológico. Animais infectados que consumiram a dieta controle diminuíram a capacidade migratória de seus linfócitos. Animais que consumiram dietas com fibras não sofreram redução da migração dos linfócitos, fato não observado nos tratamentos II e III do presente estudo.

A maior contagem de linfócitos nos dias 7 e 9 no Tratamento V, que simula todas as condições de nosso interesse, indica que número elevado de linfócitos pode ser resultado não só da estimulação do sistema imunológico pelas bactérias da dieta contaminada, como pelo aumento da capacidade de resposta deste pelos prebióticos. Entretanto, mesmo nestas condições, foi observado por SILVA (2004), que ocorreu translocação de *K. pneumoniae* nestes indivíduos do Tratamento V nos dias 6 e 7. No dia 9, observamos que o número de linfócitos no Tratamento V foi máximo e SILVA (2004) reportou que não foi detectada nenhuma bactéria nos órgãos analisados, indicando mais uma vez que a imunodepressão pode não ter sido efetiva.

6.2.4. Contagem de Células de Paneth

As células de Paneth estão presentes na base das criptas do intestino delgado de muitas espécies de mamíferos, tendo formato piramidal e derivam de células-tronco epiteliais. As células de Paneth contribuem também para a função da barreira intestinal pela liberação de grânulos contendo diversas substâncias antimicrobianas. A liberação de lisozima, fosfolipase A2, criptidinas pelas células de Paneth, influenciam na microflora do ambiente da cripta porque estas são potentes agentes microbianos. As alfa-defensinas são constituintes abundantes dos grânulos de células de Paneth de camundongos e humanos (OUELLETTE, 1997). Em humanos, seis defensinas já foram caracterizadas como potentes mediadores antimicrobianos, com ação equivalente ou maior que as defensinas dos neutrófilos (OUELLETTE e SELSTED, 1996; WILSON *et al.*, 1999; GANZ, 2000). As diversas isoformas de defensinas produzidas pelas células de Paneth nos camundongos são genericamente denominadas criptidinas (OUELLETTE, 1997). Experimentos de inibição de atividade destas moléculas demonstraram que anticorpos anti-criptidina neutralizam 70% da atividade bactericida dos grânulos secretados, mostrando sua importância para a proteção contra bactérias (AYABE *et al.*, 2000).

A secreção de defensinas é importante na defesa contra patógenos entéricos por não requerer inflamação significativa (JONES & BEVINS, 1992). A inoculação oral de *Salmonella enterica* diminuiu a expressão de alfa-defensinas e de lisozima em camundongos. A presença desta bactéria diminuiu a expressão de mRNA dos peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth (SALZMAN *et al.*, 2003).

Vários antígenos induzem a secreção pelas células de Paneth. Estas células possuem receptores capazes de reconhecer componentes de bactérias gram-positivas e gram-negativas através de padrões de reconhecimento, iniciando eventos de sinalização que culminam na exocitose dos grânulos contendo os peptídeos antimicrobianos. Essa resposta é seletiva, pois patógenos eucariotos não provocam a liberação destes grânulos. A liberação de criptidinas em resposta à bactérias e ao LPS é rápida e dose dependente (AYABE *et al.*, 2000). Estudos sugerem que as células de Paneth podem perceber a presença das bactérias via receptores próprios ou estímulos

oriundos de outras células da cripta através de mediadores parácrinos (GANZ, 2000).

Apesar de ter havido diferenças significativas entre os tratamentos, a única inferência possível quando se compara os resultados, é a de que a dieta enteral induziu, de alguma forma, o aumento do número de células de Paneth.

Alguns trabalhos sugerem que o epitélio da cripta pode comunicar-se e responder à estimulação pelos linfócitos T. Por exemplo, camundongos parasitados pelo nematóide *Trichinella spiralis* apresentam aumento do número de células de Paneth e células caliciformes mediadas pela ação de linfócitos T auxiliares (OUELLETTE, 1999).

McCULLOUGH *et al.* (1998), observaram redução no número de células de Paneth em indivíduos que receberam dietas com fibras. Em nosso estudo, este fato não ocorreu, pois todas as dietas contendo fibras tiveram contagem de células de Paneth superiores às contagens do Tratamento I.

6.3. Mitoses nas criptas

Apesar de não haver diferença significativa entre tratamentos, os Tratamentos VIII e IX foram os que apresentaram maior número de figuras mitóticas nas criptas. Estes mesmos tratamentos apresentaram as menores profundidades de cripta.

A integridade da barreira intestinal depende da proliferação das células epiteliais. A proliferação destas células pode responder à presença ou ausência de alimento no lume intestinal, sendo que as dietas TPN, influenciam negativamente esta proliferação (KISSMEYER-NIELSEN *et al.*, 1995). Algumas substâncias, ao contrário, são capazes de induzir tal proliferação. A adição de glutamina em dietas tem demonstrado benefícios à morfologia do intestino. Quando adicionada à nutrição totalmente parenteral (TPN), como estudada por MANDIR & GOODLAD (1999), a glutamina apresentou efeito, embora modesto, na proliferação de células da cripta. A adição de ácidos graxos de cadeia curta também aumenta a proliferação celular (ICHIKAWA *et al.*, 2002).

Embora os diferentes tratamentos não tenham apresentado efeito significativo entre eles, o valor de 0,3969 para o tratamento III e o valor de 0,7067 nos tratamentos VIII e IX, podem indicar que a presença de K.

pneumoniae pode elevar a proliferação celular na mucosa, independentemente da presença ou ausência de prebióticos ou imunodepressão.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados de nosso estudo podemos sugerir que:

- A dieta enteral interfere na morfologia das vilosidades.
- Não há evidências em nosso estudo, que possam indicar que a translocação de *Klebsiella pneumoniae* ocorreu pelo epitélio do íleo.
- Dietas contendo prebióticos não implicam em aumento do número de células caliciformes.
- A dieta enteral parece interferir negativamente no número de células caliciformes.
- A ausência de mastócitos na mucosa dos animais analisados, indica que não ocorreu resposta mediada por este tipo celular à *K. Pneumoniae*.
- A dieta enteral induziu o aumento do número de células de Paneth, mas este não parece ter sido influenciada pela presença de prebióticos ou bactérias.
- O número de linfócitos intraepiteliais se apresentou maior no TV, nos dias 7 e 9, onde neste último o número foi máximo, o que coincide com dados anteriores que mostraram uma menor translocação neste dia, o que indica também que *K. pneumoniae* pode ter estimulado o sistema imunológico destes indivíduos.

- A metodologia empregada para provocar a imunodepressão não parece ter influenciado na atividade dos linfócitos intraepiteliais.
- As dietas enterais causaram modificações na mucosa dos animais analisados quando comparados com o grupo controle.
- O objeto principal deste estudo, Tratamento V, apresentou alguns aspectos que nos leva a pensar em falhas na imunodepressão, não podendo ser feita qualquer relação entre o uso de prebióticos e diminuição da translocação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A K e Lichtman A H. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 580 p.

Acheson D W K e Luccioli S. Mucosal immune responses. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, v.18, p.387-404. 2004.

Albanese C T, Cardona M, *et al.* Role of intestinal mucus in transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. Surgery, v.116, n.1, Jul, p.76-82. 1994.

Alberts B, Johnson A, *et al.* Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre: Artmed. 2004. 1463 p.

Alexander J W. Bacterial translocation during enteral and parental nutrition. Proceedings of the Nutrition Society, v.57, p.389-393. 1998.

Alpers D H. Enteral feeding and gut atrophy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.5, n.6, Nov, p.679-83. 2002.

Ayabe T, Satchell D P, *et al.* Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nature Immunology, v.1, n.2, p.113-118. 2000.

Azzali G. Structure, lymphatic vascularization and lymphocyte migration in mucosa-associated lymphoid tissue. Immunological Reviews, v.195, p.178-189. 2003.

Bancroft J D e Stevens A. Theory and Practice of Histological techniques. Nova York: Churchill livingstone. 1996. 766 p.

Berg R D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. Trends in Microbiology, v.3, p.149-154. 1995.

_____. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. Adv Exp Med Biol, v.473, p.11-30. 1999.

Bevins C L. The Paneth cell and the innate immune response. Curr Opin Gastroenterol, v.20, n.6, Nov, p.572-80. 2004.

Bindseil E e Christensen N O. Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. Parasitology, v.88 (Pt 3), Jun, p.431-8. 1984.

Bouhnik Y, Alain S, *et al.* Bacterial populations contaminating the upper gut in patients with small intestinal bacterial overgrowth syndrome. The American J of gastroenterology, v.94, p.1327-1331. 1999.

Branger J, Knapp S, *et al.* Role of Toll-Like Receptor 4 in Gram-Positive and Gram-Negative Pneumonia in Mice. Infection and Immunity, v.72, n.2, p.788-794. 2004.

Budiño F E L, Tomaz M C, *et al.* Effect of Probiotic and Prebiotic Inclusion in Weaned Piglet Diets on Structure and Ultra-structure of Small Intestine. Brazilian Archives of Biology and technology, v.48, n.6, p.921-929. 2005.

Bye W A, Allan C H, *et al.* Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. Gastroenterology, v.86, n.5 Pt 1, May, p.789-801. 1984.

Carrilho C M D M. Risk factors associated with the development of nosocomial pneumonia in the Intensive Care Unit of the Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.32, n.4, p.455-456. 1999.

Casafont F, Sanchez E, *et al.* Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous peritonitis in experimental cirrhosis in rats. Hepatology, v.25, p.1334-1337. 1997.

Cereijido M, Shoshani L, *et al.* Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v.279, p.G477-G482. 2000.

Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. Annual Review of Immunology, v.22, p.217-246. 2004.

Chiva M, Soriano G, *et al.* Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. J. of Hepatology, v.37, n.4, p.456-462. 2002.

Cicalese L, Ploskina T M, *et al.* The role of laparotomy, gut manipulation and immunosuppression on bacterial translocation from the intestinal tract. Transplantation Proceedings, v.31, p.1922-1923. 1999.

Cirera I, Bauer T M, *et al.* Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. J. of Hepatology, v.34, p.32-37. 2001.

Collins M D e Gibson G R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr, v.69, p.1052S–1057S. 1999.

Cummings J H e Macfarlane G T. Gastrointestinal effects of prebiotics. Br J Nutr, v.87 Suppl 2, May, p.S145-51. 2002.

Cummins A, Chu G, *et al.* Malabsorption and villous atrophy in patients receiving enteral feeding. JPEN J Parenter Enteral Nutr, v.19, n.3, May-Jun, p.193-8. 1995.

Cunningham-Rundles S e Lin D H. Nutrition and immune system of the gut. Nutrition, v.14, p.573-579. 1998.

David C M N. Infection in the critically ill patient. Simpósio: Medicina intensiva: I. Infecção e choque. Medicina, v.31, p.337-348. 1998.

Deplancke B e Gaskins H R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr, v.73, p.1131S-41S. 2001.

Diebel L N, Liberati D M, *et al.* An in vitro model to assess mucosal immune function and bacterial translocation. J. of Surgical Research, v.68, p.178-182. 1997.

Eleftheriadis E, Kotzampassi K, *et al.* Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. World J. Surg, v.20, p.11-16. 1996.

Evans C M, Phillips a D, *et al.* Activation of lamina propria T cells induces crypt epithelial proliferation and goblet cell depletion in cultured human fetal colon. Gut, v.33, n.2, Feb, p.230-5. 1992.

Fallgreen-Gebauer E, Gebauer W, *et al.* The covalent linkage of secretory component to IgA. Structure of sIgA. Biol Chem Hoppe Seyler, v.374, n.11, Nov, p.1023-8. 1993.

Faunce D, Terajewicz A, *et al.* In Vitro-Generated Tolerogenic APC Induce CD8_T Regulatory Cells That Can Suppress Ongoing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology, v.172, p.1991-1995. 2004.

Flinkger E A, Loo J V, *et al.* Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A Review. Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition, v.43, n.1, p.19-60. 2003.

Fontaine N, Meslin J C, *et al.* Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: Effect of inulin in the diet. British Journal of Nutrition, v.75, n.6, p.881-892. 1996.

Frankel W, Zhang W, *et al.* Fiber: effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. World J Surg, v.19, n.1, Jan-Feb, p.144-8; discussion 148-9. 1995.

Fuller R. A review: probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol., v.66, p.365-78. 1989.

Gales a C, Sader H S, *et al.* Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and Antimicrobial susceptibility profile. Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.44, p.3010-3011. 2002.

Ganz T. Paneth cells-guardians of the gut cell hatchery. nature immunology, v.1, n.2, 2000, p.99-100. 2000.

Gebbers J O e Laissue J A. Bacterial translocation in the normal human appendix parallels the development of the local immune system. Ann N Y Acad Sci, v.1029, p.337-343. 2004.

Gibson G R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofrutose and inulin. American Society for Nutritional Sciences., p.1438S- 1441S. 1999.

Gibson G R e R. M. B. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing of prebiotics. Journal of Nutrition, v.125, p.1401-1412. 1995.

Guy-Grand D, Dy M, *et al.* Gut mucosal mast cells Origin, Traffic, and differentiation. J. Exp. MED, v.160, p.12-28. 1984.

Hanna M K e Kudsk K A. Nutritional and pharmacological enhancement of gut-associated lymphoid tissue. Can J Gastroenterol, v.14, p.145D-151D. 2000.

Howard R S, Radcliffe J, *et al.* General medical care on the neuromedical intensive care unit. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.74, p.iii10-iii15. 2001.

Hulst R R W J V D, Meyenfeldt M F V, *et al.* Gut permeability, Intestinal Morphology and Nutritional Depletion. Nutrition, v.14, n.1, p.1-6. 1998.

Ichikawa H, Kuroiwa T, *et al.* Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Digestive Diseases and Sciences, v.44, n.10, p.2119-2123. 1999.

Ichikawa H, Shineha R, *et al.* Gastric or Rectal Instillation of Short-Chain Fatty Acids Stimulates Epithelial Cell Proliferation of Small and Large Intestine in Rats. Digestive Diseases and Sciences, v.47, n.5, p.1141-1146. 2002.

Inamura T, Miura S, *et al.* Alteration of intraepithelial Lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. Immunology Letters, v.90, p.3-11. 2003.

Jang M H, Kweon M N, *et al.* Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.16, Apr 20, p.6110-5. 2004.

Jenkins D. The role of inulin, oligofructose and dietary fibre in the management of diabetes. An Orafit Newsletter, v.9, p.3-15. 2003.

Jones D E e Bevins C L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. J Biol Chem, v.267, n.32, Nov 15, p.23216-25. 1992.

Junqueira L C e Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004. 488 p.

Kane T D, Johnson S R, *et al.* Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. J. of Surgical Research, v.63, p.59-63. 1996.

Kapkac M, Erikoglu M, *et al.* Fiber enriched diets and radiation induced injury of the gut. Nutrition Reseach, v.23, p.77-83. 2003.

Karczewski J e Groot J. Molecular Physiology and Patophysiology of Tight Junctions. III. Tight junction regulation by intracellular menssengers: differences in response within and between ephitelia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v.279, p.G660-G665. 2000.

Kerr M A. The structure and function of human IgA. Biochem J, v.271, n.2, Oct 15, p.285-96. 1990.

Kissmeyer-Nielsen P, Mortensen F V, *et al.* Transmural trophic effect of short chain fatty acid infusions on atrophic, defunctioned rat colon. Dis Colon Rectum, v.38, n.9, Sep, p.946-51. 1995.

Li J, Kudsk K A, *et al.* Effects of parenteral and enteral nutrition on gut-associated lymphoid tissue. J Trauma, v.39, n.1, Jul, p.44-51; discussion 51-2. 1995.

Lin J C, Chang F Y, *et al.* High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. Microbes and infection, v.6, p.1191-1198. 2004.

Liu Z, Geboes K, *et al.* B7 Interactions with CD28 and CTLA-4 Control Tolerance or Induction of Mucosal Inflammation in Chronic Experimental Colitis. The Journal of Immunology, v.167, p.1830-1838. 2001.

Macdonald T T e Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. Science, v.307, p.1920-1925. 2005.

Macfie J. Enteral versus parental nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. Nutrition, v.16, p.606-611. 2000.

Machado A, Ferraz A A B, *et al.* Prevenção da infecção hospitalar. Sociedade Brasileira de Infectologia, p.23. 2001.

Maddaus M A, Wells C L, *et al.* Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. Ann Surg, v.207, n.4, p.387-398. 1988.

Mandir N e Goodlad R A. The effects of glutamine on intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats. Gut, v.44, n.5, May, p.608-14. 1999.

Marteau P e Boutron-Ruault M C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. Br J Nutr, v.87 Suppl 2, May, p.S153-7. 2002.

Maxson R T, Dunlap J P, *et al.* The role of the mucus gel layer in intestinal bacterial translocation. J. of Surgical Research, v.57, p.682-686. 1994.

Mccullough J S, Ratcliffe B, *et al.* Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. Gut, v.42, p.799-806. 1998.

Mckinney M M e Parkinson A. A simple, nonchromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. Immunological Methods., v.96, p.271-278. 1987.

Mcmanus J F e Mowri R W. Staining Methods - Histological and Histochemical. Nova York: Hoeber. 1960. 423 p.

Menchaca-Diaz J L, Silva R M, *et al.* Changes in bacterial translocation profile induced by sepsia. Transplantation Proceedings, v.34, p.1007-1008. 2002.

Milo L A, Correa-Matos N J, *et al.* Neutrophil and Small Intestinal Lymphocyte Migration After Salmonella typhimurium Infection: Impact of Fermentable Fiber. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, v.39, p.73-79. 2004.

Mitic L L, Itallie C M V, *et al.* Molecular Physiology and Patophysiology of Tight Junctions. I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v.279, p.G250-G254. 2000.

Morton H C, Van Egmond M, *et al.* Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). Crit Rev Immunol, v.16, n.4, p.423-40. 1996.

Moy J, Lee D J, *et al.* Confirmation of translocated gastrointestinal bacteria in a neonatal model. J. of Surgical Research, v.87, p.85-89. 1999.

Nakasaki H, Mitomi T, *et al.* Gut bacterial translocation during total parental nutrition in experimental rats and countermeasure. The American J of Sugerry, v.175, p.38-43. 1998.

Ouellette A e Selsted M E. Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. FASEBJ, v.10, p.1280-1289. 1996.

Ouellette A J. Paneth Cells and Innate Immunity in the Crypt Microenvironment. Gastroenterology, v.113, p.1779-1784. 1997.

_____. Mucosal Immunity and Inflammation IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. Am. J. Physiol, v.277, p.G257-G261. 1999.

Ouellette A J, Satchell D P, *et al.* Characterization of Luminal Paneth Cell a-Defensins in Mouse Small Intestine. The Journal of Biological Chemistry, v.275, n.43, p.33969-33973. 2000.

Ouwehand A C, Isolauri E, *et al.* Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. FEMS Microbiology Letters, v.172, p.61-64. 1999.

Pereira S C L. Caracterização molecular e de fatores de virulência de Klebsiella sp. Isoladas de dietas enterais. (DSc). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

Porras O N. Lower respiratory tract infection. Current Therapeutic Research, v.57, p.36-40. 1996.

Roediger W E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. Gastroenterology, v.83, n.2, Aug, p.424-9. 1982.

Salzman N H, Chou M M, *et al.* Enteric Salmonella Infection Inhibits Paneth Cell Antimicrobial Peptide Expression. Infection and Immunity, v.71, n.3, p.1109-1115. 2003.

Satchithanandam S, Vargofcak-Apker M, *et al.* Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. J Nutr, v.120, n.10, Oct, p.1179-84. 1990.

Schley P D e Field C J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. British Journal of Nutrition, v.87, p.S221–S230. 2002.

Sears C L. Molecular Physiology and Patophysiology of Tight Junctions. V. Assault of the tight junction by enteric pathogens. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v.279, p.G1129-G1134. 2000.

Sherman P, Fleming N, *et al.* Bacteria and the mucus blanket in experimental small bowel bacterial overgrowth. Am J Pathol, v.126, n.3, Mar, p.527-34. 1987.

Silva D F. Efeito de Prebióticos Adicionados em Dietas Enteriais na Translocação de Klebsiella sp. em Camundongos. (MSc). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

Soderholm J D e Perdue M H. Stress and the gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v.280, p.G7-G13. 2001.

Song H, Li G, *et al.* Immunomodulating effects of cefodizime on *Klebsiella pneumoniae* - stimulated neutrophils. Immunobiology., v.209, n.3, p.277-282. 2004.

Spaeth G, Gottwald T, *et al.* Fibre is an essential ingredient of enteral diets to limit bacterial translocation. Eur J Surg, v.161, p.513-518. 1995.

Spahn T W e Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system : the role of lymphotoxin and GALT organs. Gut, v.53, p.456-465. 2005.

Stallmach A e Zeitz M. The intestine as an immunological organ. Wien Klin Wochenschr, v.110, n.3, p.72-78. 1998.

Staton T L, Habtezion A, *et al.* CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium. nature immunology, v.7, n.5, p.482-488. 2006.

Steinberg S M. Bacterial translocation: what it is and what it is not. The American Journal of Sugery, v.186, p.301-305. 2003.

Stenback A, Meurling S, *et al.* A model for bacterial translocation from small bowel in the rat. Transplantation Proceedings, v.33, p.2473. 2001.

Swank G M e Deitch E A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. World J. Surg, v.20, p.411-417. 1996.

Tani T, Hanasawa K, *et al.* Bacterial translocation as a cause of septic shock in humans: a report of two cases. Surg Today, v.27, n.5, p.447-449. 1997.

Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, *et al.* Interaction of Mucosal Microbiota with the InnateImmune System. Scandinavian Journal of Immunology, v.62, p.106-113. 2005.

Trier J S. STUDIES ON SMALL INTESTINAL CRYPT EPITHELIUMI. The Fine Structure of the Crypt Epithelium of the Proximal Small Intestine of Fasting Humans. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, v.18, p.599-620. 1963.

Waitzberg D L, Caiaffa W, *et al.* Hospital malnutrition: the brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. Nutrition, v.17, p.573-580. 2001.

Wang X D, Parsson H, *et al.* Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. Br J Surg, v.81, n.4, Apr, p.579-84. 1994.

Wells C L, Maddaus M A, *et al.* Role of Anaerobic Flora in the Translocation of Aerobic and Facultatively Anaerobic Intestinal Bacteria. Infection And Immunity, v.55, n.11, p.2689-2694. 1987.

Wenzel R P. The Lowbury Lecture. The economics of nosocomial infection. J Hosp Infect, v.31, p.79-87. 1995.

Whelan K, Judd P A, *et al.* Fructooligosaccharides and fiber partially prevent the alterations in fecal microbiota and short-chain fatty acid concentrations caused by standard enteral formula in healthy humans. J Nutr, v.135, n.8, Aug, p.1896-902. 2005.

Wiest R e Rath H C. Bacterial translocation in the gut. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology., v.17, p.397-425. 2003.

Wildehaber B E, Yang H, *et al.* Adverse effects of total parental nutrition (TPN) on small intestine and immune system. Association for academic Surgery, v.Abstacts. 1997.

Wilson C L, Ouellette A J, *et al.* Regulation of Intestinal α -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host Defense. Science, v.286, p.113-117. 1999.

Woodcock N P, Mcnaught C E, *et al.* An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. Clinical Nutrition, v.23, p.1069-1073. 2004.

Yan F e Polk D B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. Curr Opin Gastroenterol, v.20, n.6, Nov, p.565-71. 2004.

Zarzaur B L e Kudsk K A. The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function, and derangements. Shock, v.15, n.6, p.411-420. 2001.