

DANIELE FERREIRA DA SILVA

**EFEITO DE PREBIÓTICOS ADICIONADOS EM DIETAS ENTERAIS NA  
TRANSLOCAÇÃO DE *Klebsiella* sp. EM CAMUNDONGOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e  
2004

Silva, Daniele Ferreira da, 1978-

Efeito de prebióticos adicionados em dietas enterais na translocação de *Klebsiella* sp. em camundongos / Daniele Ferreira da Silva. – Viçosa : UFV, 2004.  
x, 46f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Mário da Silveira Mezencio.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-45

1. Prebióticos - Efeito da translocação. 2. Nutrição enteral - Efeito de prebióticos. 3. *Klebsiella*. 4. Infecção hospitalar. 5. Camundongos - Imunologia. 5. Fígado - Histopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 20.ed. 616.01

DANIELE FERREIRA DA SILVA

**EFEITO DE PREBIÓTICOS ADICIONADOS EM DIETAS ENTERAIS NA  
TRANSLOCAÇÃO DE *Klebsiella* sp. EM CAMUNDONGOS**

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

APROVADA: 11 de fevereiro de 2004.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Prof. Paulo Roberto Cecon

---

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta

---

Prof. José Mário da Silveira Mezencio  
(Orientador)

A Deus, pela luz na caminhada.

Ao Vinícius, que é motivação de tudo que faço.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nos estudos,  
trabalho, estando ao meu lado em todas as etapas da  
minha vida.

Ao meu avô Vicente, pelo amor.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor José Mário da Silveira Mezencio, pela orientação e especialmente, pela amizade.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pelas suas valiosas contribuições, conselhos e estímulos.

À professora Elza Fernandes de Araújo pela contribuição para realização deste trabalho.

Ao professor Paulo Roberto Cecon pelo importante auxílio e prestabilidade.

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta, do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio na realização das análises histopatológicas.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, Francisco Balbino, Jorge, Elaine, Adriana, Ellen Cristina e Dyana pela amizade e apoio.

Aos funcionários Paulo, José Carlos, Cesário, Danilo, Laura, Aparecida e Nilcéa pela amizade, respeito, dedicação e eficiência.

A todos amigos e estagiários, pelo auxílio que sempre precisei, em especial à Larissa, Mateus, Leandro, Nívea, Valéria, Anderson, Rodolfo, Ana Carolina, Andréa e Adriana.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Genética de Microrganismos, pelo bom relacionamento, ajudas e incentivo.

Ao Adão, funcionário do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio e confiança no trabalho realizado.

Aos meus amigos Márcio e Douglas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa pela ajuda na execução dos experimentos.

Ao Carlos Lásaro e Tânia, pela amizade, apoio e incentivos no decorrer deste trabalho.

Aos meus irmãos e meus queridos pais, Antonio Alberto e Tereza, pelo amor e torcida para que eu atingisse esse objetivo importante.

## **BIOGRAFIA**

DANIELE FERREIRA DA SILVA, filha de Antonio Alberto da Silva e Tereza Maria Lopes da Silva, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, no dia 15 de abril de 1978.

Em março de 1997, ingressou na Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde, em maio de 2002, graduou-se em Nutrição.

Em março de 1998, ingressou no PET Nutrição, obtendo apoio financeiro da CAPES até julho de 2000.

No período de agosto de 2000 a julho de 2001, foi bolsista do PIBIC/CNPq sob orientação do professor José Mário da Silveira Mezencio.

Em abril de 2002, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1. O Microrganismo .....	16
3.2. Preparo das Dietas Enterais .....	16
3.3. Delineamento Experimental .....	17
3.4. Determinação da Massa Cecal .....	18
3.5. Determinação da Translocação de <i>Klebsiella</i> sp. para os Diferentes Órgãos .....	18
3.6. Análise do Perfil Genético de <i>Klebsiella</i> sp. nos Órgãos Analisados .....	18
3.7. Análises Histológicas dos Tecidos dos Animais .....	19
3.8. Análises Estatísticas .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1. Massa Corporal e Massa Cecal .....	21
4.2. Detecção de Colônias Típicas de <i>Klebsiella</i> sp. em Diferentes Órgãos .....	25
4.3. Análise do Perfil Genético de <i>Klebsiella</i> sp. nos Órgãos Analisados .....	32
4.4. Análises Histológicas dos Tecidos dos Animais .....	33
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
APÊNDICE A .....	46

## RESUMO

SILVA, Daniele Ferreira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Efeito de prebióticos adicionados em dietas enterais na translocação de *Klebsiella* sp. em camundongos.** Orientador: José Mário da Silveira Mezencio. Conselheiras: Maria Cristina Dantas Vanetti e Elza Fernandes Araújo.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da administração de frutooligossacarídeos (FOS) e inulina adicionados a dietas enterais na translocação de *Klebsiella* em camundongos. Foram utilizados camundongos albinos suíços, com 5 a 6 semanas de vida, divididos em nove tratamentos, contendo diferentes combinações entre FOS, inulina, antibiótico e corticóide, e ausência ou presença de *Klebsiella*. Nos períodos equivalentes a 1, 2, 4, 6 e 8 dias após a administração da dieta contaminada com *Klebsiella* via oral, os animais foram sacrificados e seus órgãos: baço, coração, fígado, pulmão e rins, foram coletados, pesados e armazenados em sacos plásticos estéreis, a 4 °C por 24 horas para análise da presença de colônias típicas de *Klebsiella*. Fragmentos desses órgãos foram mantidos em solução fixadora para estudos histológicos. Com o objetivo de identificar a translocação do intestino para os órgãos analisados, foi feita comparação, com base em marcadores moleculares RAPD, entre a estirpe de *Klebsiella* inoculada na dieta e aquelas isoladas dos órgãos. Os resultados indicaram que os animais dos tratamentos

III, V, VII e VIII, que receberam droga imunodepressora associada ou não com a dieta contaminada apresentaram estabilização ou perda de peso; enquanto aqueles que receberam a dieta com ou sem prebióticos, sem medicação imunodepressora ou presença de *Klebsiella* na mesma, apresentaram ganho de peso, assim como o grupo controle, alimentado com dieta AIN-93G. A adição de FOS e inulina na dieta, na concentração de 15,3 mg 100 g<sup>-1</sup> por dia) resultou em translocação por um período menor de tempo quando comparado aos animais que não receberam prebióticos na dieta. No entanto, essa dose de prebióticos não resultou em aumento do peso do ceco desses animais. Análise do perfil genético das colônias isoladas dos órgãos, demonstraram translocação da *Klebsiella* endógena do animal. Análises histológicas demonstraram características mais intensas de inflamação nos animais imunodeprimidos que receberam a dieta contaminada sem prebióticos, onde foi detectada maior contagem de UFC g<sup>-1</sup> típicas de *Klebsiella* em relação aos animais imunodeprimidos que receberam dieta enteral contaminada com prebióticos.

## ABSTRACT

SILVA, Daniele Ferreira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February, 2004.  
**Effect of prebiotics addition in enteral diets in *Klebsiella* sp. translocation.** Adviser: José Mário da Silveira Mezencio. Committee Members: Maria Cristina Dantas Vanetti and Elza Fernandes de Araújo.

This work aimed to study the effect of the fructooligosaccharide addition (FOS) and inulin in enteral diets in the *Klebsiella* translocation in mice. Alb swiss mice was used, with 4 to 6 weeks, divided in nine treatments contening different combinations among FOS, inulin, antibiotic and corticoid, and contaminant lack or presence. In the period equivalent to 1, 2, 4, 6, and 8 days after the oral administration of *Klebsiella*, the animals were sacrificed and its organs: spleen, heart, liver, lung and kidneys were collected, heavy and stored in sterile plastic bags at 4 °C during 24 hours for presence of typical colonies of *Klebsiella* analysis. Small fragments of those organs were maintained in fixed solution for histologic studies. Aiming to identify which the isolated ones that translocated from the intestine to the analyzed organs, it was made comparison, based in molecular markers RAPD, between the inoculated *Klebsiella* strain and those ones isolated. The results indicated that the animals that received immunosuppressive chemotherapeutic agent, associated or not with contaminated diet (treatments II, V, VII and VIII), presented stabilization or weight loss. Those animals that received the diet with or without prebiotics,

without immunosuppressive agent or contaminat presence, presented weight gain, as well as the control group, food with AIN-93G diet. The FOS and inulina addition in the diet (15,3 mg 100 g<sup>-1</sup> a day) resulted in translocation for a smaller period of time when compared to the animals that didn't receive prebiotics in the diet. However, that prebiotics dose didn't result in increase of the weight of the animals' caecum. Analysis of the isolated colonies genetic profile of the tissues suggests *Klebsiella* endogenous translocation in the animal. Histologic analyses demonstrated more intense characteristic of inflammation in the immunodepressed animals that received the diet without prebiotics and contaminated, in relation to the immunodepressed animals that received contaminated diet and with prebiotics.

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-negativas pertencentes à microbiota intestinal como *Klebsiella pneumoniae*, um patógeno oportunista, são freqüentemente isoladas e consideradas como causa de infecções hospitalares. *Klebsiella* é também uma das bactérias mais freqüentemente encontradas contaminando dietas enterais, representando possível fonte de infecção em indivíduos imunodeprimidos.

A capacidade desse microrganismo translocar do trato intestinal para outros órgãos do corpo é reconhecida, e a *Klebsiella* está entre as enterobactérias que mais translocam. A translocação parece ocorrer mais facilmente em pacientes imunodeprimidos, que fazem uso de antibióticos e, ou apresentem alguma injúria epitelial intestinal. Estudos experimentais sugerem que a translocação pode ser reduzida por um suprimento enteral de nutrientes destinados ao cólon, como por exemplo, fibras fermentáveis. Inulina e frutooligosacarídeos (FOS) são considerados ingredientes prebióticos, por produzirem efeito benéfico no hospedeiro ao estimular crescimento seletivo e, ou a atividade metabólica de um número limitado de bactérias no cólon. Fibras como inulina e FOS não são absorvidas por enterócitos e alcançam o intestino grosso intactas. No cólon, as bifidobactérias fermentam as fibras e produzem uma série de nutrientes, incluindo ácidos graxos de cadeia curta tais como acetato, propionato e butirato, que estimulam o crescimento da mucosa, e as

bifidobactérias por sua vez, reduzem a translocação bacteriana, e estimulam a defesa imune intestinal.

Considerando a possibilidade da ocorrência de estirpes virulentas de *Klebsiella* em dietas enterais, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar “*in vivo*” o efeito da adição de prebióticos em dieta enteral na translocação de *Klebsiella* para diferentes órgãos em um modelo animal, bem como detectar possíveis alterações na massa corporal e cecal e, avaliar histopatologicamente os principais órgãos colonizados por esse microrganismo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O estudo epidemiológico multicêntrico-IBRANUTRI (Estudo Nacional Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar), realizado no Brasil no ano de 1996, assistiu 4.000 pacientes hospitalizados atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 25 hospitais, de doze estados brasileiros (WAITZBERG et al., 2001a). Este estudo demonstrou que, desses pacientes, 48,1% apresentavam desnutrição. O tempo de internação igual ou superior a 15 dias conferiu três vezes mais chances dos pacientes se tornarem desnutridos, mesmo que outros fatores contribuíssem para isso. Pacientes com Índices de Massa Corporal (IMCs) menores de  $18 \text{ kg m}^{-2}$  também apresentaram maior tempo de internação quando comparados com aqueles de IMCs maiores de  $18 \text{ kg m}^{-2}$ . Da população internada, 36% apresentavam mais de 60 anos e a maior prevalência de desnutrição estava associada à população idosa (52,8%). Pacientes com infecções apresentavam taxas elevadas de desnutrição (61,4%). A nutrição enteral foi indicada em 6,1% dos casos e, dos 48,1% de pacientes desnutridos, 10,1% receberam nutrição enteral. A desnutrição hospitalar progride à medida que aumenta o período de internação: 31,8% dos pacientes já estão desnutridos nas primeiras 48 horas de internação (WAITZBERG et al., 2001a; WAITZBERG et al., 2001c).

Assumindo que doença comum é aquela com prevalência superior a 10%, a desnutrição é uma das doenças mais frequentes em hospitais. Assim sendo, há que se avaliar a relação entre custo com o tratamento nutricional de

pacientes hospitalizados e os benefícios da nutrição enteral (WAITZBERG et al., 2001b).

De acordo com a Resolução nº 63, de 6 de julho de 2.000 da ANVISA/MS (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Alimentos para Nutrição Enteral), nutrição enteral é aquela usada para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializada, utilizada exclusiva ou parcialmente, para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas .

A alimentação enteral apresenta vantagens em relação à parenteral por estimular as funções e estrutura do intestino e a microbiota intestinal (IDENO, 1993). A nutrição enteral é usada comumente em ambientes hospitalares como terapia nutricional (MITNE et al., 2001) e, no Brasil, sua utilização teve início na década de 1960 e consideráveis avanços foram constatados nos meados da década de 1970 (COPPINI & VASCONCELOS, 2001). É principalmente usada para prover nutrição efetiva em pacientes incapazes de se alimentar por via oral e, ainda que a terapia seja segura e salve vidas, a alimentação por sonda enteral está associada a diversas complicações, dentre elas a possibilidade de contaminação microbiana (ANDERTON, 1986). A administração de dietas eventualmente contaminadas pode comprometer o estado geral dos pacientes, principalmente dos imunodeprimidos (ANDERTON, 1986; COPPINI & VASCONCELOS, 2001).

Essa situação é de grande preocupação para os médicos pelo fato dessas dietas serem oferecidas a pacientes de risco para infecção incluindo neonatos, pacientes transplantados, com injúrias encefálicas, câncer, AIDS, etc. Fontes de contaminação associadas com dietas em pó reconstituídas incluem os ingredientes da dieta, liquidificadores e os líquidos utilizados em hospitais (OLIVIERA et al., 2000). Pode ainda originar-se de contaminação cruzada de equipamentos, utensílios e superfície de trabalho higienizados inadequadamente; de ingredientes ou outros aditivos utilizados na preparação

ou modificação da fórmula; de armazenamento e transporte em condições inadequadas de manipuladores, equipos e sistemas de administração (CARVALHO et al., 1999).

Procedimentos normais para administração de dietas aos pacientes resultam no preparo dessas de acordo com instruções do fabricante. Porém, algumas dietas são preparadas com antecedência e são armazenadas no hospital, em temperatura ambiente ou refrigeradas, em alguns casos, por mais de 24 horas. A manutenção das dietas em temperatura ambiente, seja durante administração ou durante estocagem e transporte por períodos prolongados, representa riscos potenciais para crescimento microbiano, caso haja contaminantes (ANDERTON, 1986). O limite microbiológico aceito de contagem em placas de aeróbios mesofílicos em nutrição enteral antes da administração, deveria ser  $< 10^1$  UFC mL<sup>-1</sup> e contagens  $> 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> ou grama deveriam ser consideradas impróprias para consumo (OLIVIERA et al., 2000). No entanto, as diretrizes publicadas pelo “*United States Food and Drug Administration*” para alimentos médicos estabelecem que essa ação deve ser tomada quando a contagem em placa de aeróbicos exceda  $10^3$  organismos por grama (OLIVIERA et al., 2000).

Vários estudos comprovam que dietas enterais podem estar contaminadas com microrganismos patogênicos. FREEDLAND et al. (1989) reportaram uma taxa de 30% a 90% de contaminação em sistemas de alimentação enteral. Bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, além de leveduras foram isoladas de dietas enterais por CAMPBELL (1995). SULLIVAN et al. (2001) coletaram amostras de dietas enterais em hospitais para análise da presença de coliformes, no momento de preparo e após 1, 2 e 4 horas de elaboração destas que foram mantidas à temperatura ambiente (26 a 31 °C). Os resultados demonstraram presença de  $7,4 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>,  $2,1 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> e maior do que  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>, nos tempos 0, 2 e 4 horas, respectivamente. MEHALL et al., (2002) acompanharam 50 neonatos que receberam dieta enteral por um período médio de 17,6 dias, representando 125 dietas por paciente neste período. Eles observaram que 71 das 125 dietas estavam contaminadas ( $>10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>), com média de  $9,1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> e três tipos

de bactérias diferentes, das quais *Salmonella epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* foram os freqüentemente encontrados. Enterocolite necrosante se desenvolveu em sete pacientes, todos alimentados com nutrição enteral contaminada com bactérias Gram-negativas numa contagem superior a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Além disso, as fórmulas enterais constituem-se em excelente meio de cultura para numerosas espécies de microrganismos patogênicos ou não, em razão da alta concentração de nutrientes, atividade de água (aw) elevada, pH em torno de 7,0 e fórmulas isomolares (OLIVEIRA & WAITZBERG, 2001).

*Klebsiella pneumoniae* é uma das causas mais comuns de sepse causada por Gram-negativos, precedida somente de *Escherichia coli* (MONTGOMERIE, 1984; KORVICK et al., 1992). Infecções por *Klebsiella* estão associadas com alta morbidade e mortalidade (KORVICK et al., 1992). A emergência de  $\beta$ -lactamases em amplo espectro nessas espécies e sua disseminação tem complicado muito a quimioterapia e surtos de  $\beta$ -lactâmicas resistentes têm sido relatados em vários países (VERNET et al., 1995). De acordo com estes autores, os isolados de *K. pneumoniae* podem apresentar múltiplos fatores de virulência. Os mais importantes parecem ser a natureza da cápsula de polissacarídeo que protege a bactéria da fagocitose e morte pelos fagócitos; o lipopolissacarídeo que oferece proteção contra o efeito bactericida do soro; a aderência mediada por pili; o sistema de aerobactina e, finalmente, o fenótipo mucóide. Alguns desses elementos são geneticamente determinados por um plasmídeo grande, de 180 kb, e a presença deste plasmídeo aumenta a virulência de *K. pneumoniae* em ratos (VERNET et al., 1995).

Apesar dos recentes avanços na medicina, infecções do trato respiratório inferior ainda são as causas mais freqüentes de mortalidade por infecções no mundo. GALES et al. (2002) determinaram a freqüência de ocorrência e a susceptibilidade antimicrobiana de isolados bacterianos coletados de pacientes hospitalizados com pneumonia em centros médicos na América Latina. *Klebsiella pneumoniae* foi a terceira espécie mais freqüentemente isolada (10,2%) e, apesar do amplo espectro demonstrado por cefalosporinas de excelente atividade *in vitro* contra estes isolados (MIC<sub>50</sub>S,  $\leq$  0,12 a 0,25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), taxas elevadas de resistência (46,3% a 58,5%), foram observadas. Ainda neste estudo, GALES et al. (2002), verificaram que

aproximadamente 44% dos isolados de *K. pneumoniae* foram considerados ESBL (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) produtores baseados nos critérios do *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

A contaminação bacteriana de dietas enterais oferecidas a pacientes pode levar a complicações tais como diarreia, bacteremia, septicemia, pneumonia e colonização do trato gastrointestinal. Desordens intestinais, especialmente diarreia, ocorrem freqüentemente em pacientes que recebem antibióticos. Elas resultam do decréscimo em duas propriedades fisiológicas fundamentais da microbiota endógena: resistência à colonização e capacidade de fermentação (MARTEAU, 2002). A adesão e invasão celular, bem como a translocação do patógeno são fatores importantes para o desenvolvimento do quadro descrito (BERG, 1995; NAKASAKI et al., 1998; INAMURA et al., 2003; WIEST & RATH, 2003). PEREIRA (2001) detectou, em amostras de fígado, pulmão e rim de camundongos imunodeprimidos com prednisona e tratados com carbenicilina de forma combinada ou não e alimentados com dietas enterais contaminadas com uma mistura de seis estirpes de *K.pneumoniae*, a presença de *Klebsiella* que havia sido administrada via dieta enteral.

De acordo com BERG & GARLINGTON (1979), a translocação bacteriana (BT) pode ser definida como a passagem de microrganismos viáveis e não viáveis e produtos microbianos, tais como endotoxina, do lúmen intestinal, através do revestimento epitelial, para os linfonodos mesentéricos (MLNs) e, possivelmente, outros órgãos. Os principais mecanismos que podem promover a translocação bacteriana são (a) alteração na microbiota gastrointestinal normal, resultando em supercrescimento bacteriano; (b) ruptura física da barreira mucosa do intestino, por exemplo, por injúria direta aos enterócitos ou por redução do fluxo sanguíneo ao intestino, e (c) enfraquecimento da defesa do hospedeiro (BERG, 1995; NAKASAKI et al., 1998; INAMURA et al., 2003; WIEST & RATH, 2003).

A translocação no intestino é mais freqüentemente detectada pela medida da presença de bactérias viáveis nos tecidos. Isso pode refletir não somente a integridade da função intrínseca da barreira da mucosa, mas também o número e tipos de microrganismos no lúmen e a capacidade do hospedeiro em eliminar a bactéria que transloca (ALEXANDER & GENNARI, 1996). Numerosas doenças têm sido associadas com translocação em

humanos. Essas incluem pneumatoses intestinais, gangrena intestinal não oclusiva, enterocolite necrosante, resposta a drogas citotóxicas, síndrome de liberação de citosina, doença de Chron, colite ulcerativa, choque hemorrágico, trauma severo, injúria cerebral, neutropenia e câncer de cólon (ALEXANDER, 1998).

As bactérias que inicialmente colonizam o trato gastrointestinal do recém-nascido vêm da microbiota intestinal da mãe, que está presente em traços no canal de nascimento. O desenvolvimento dessa microbiota depende da suplementação alimentar nos primeiros meses de vida. Eventualmente, a microbiota bacteriana se desenvolve em grande parte autóctona e pequena parte transitória. Fatores ambientais, tais como composição da dieta e pH luminal, influenciam a parte transitória (WIEST & RATH, 2003).

A microbiota do intestino grosso é a melhor estudada, mais densa, e a parte mais complexa da microbiota intestinal. Existe uma população microbiana de mais de  $10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup>, com mais de 350 espécies diferentes – quase exclusivamente de bactérias autóctones. Anaeróbios obrigatórios formam mais de 99% das bactérias viáveis. As espécies mais comuns são aquelas dos gêneros *Bacteróides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* (ALEXANDER et al., 1990, WIEST & RATH, 2003).

As bactérias que parecem translocar mais freqüentemente são aquelas capazes de sobreviver fora das células brancas sangüíneas e que também são resistentes à morte fagocítica. No entanto, as espécies entéricas normais são facilmente mortas após fagocitose, sobrevivendo somente em certas circunstâncias nas quais a defesa do hospedeiro está enfraquecida. Somente poucos tipos de bactérias intestinais são capazes de translocar para MLNs e essas incluem *E. coli*, *K. pneumoniae*, outras Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococci e alguns streptococci (WIEST & RATH, 2003). Segundo BERG (1995) e WIEST & RATH (2003) esses tipos de bactérias são as mais freqüentemente associadas a complicações infecciosas em paciente hospitalizados (BERG, 1995; WIEST & RATH, 2003).

O supercrescimento populacional bacteriano pode ocorrer em humanos recebendo terapia de antibiótico oral, que rompe o balanço da ecologia intestinal, permitindo certas bactérias endógenas aumentar sua população no trato

gastrointestinal. Outras situações clínicas tais como administração de dietas elementares líquidas ou alimentação parenteral também podem levar ao supercrescimento populacional bacteriano e promover a translocação do trato gastrointestinal (BERG, 1995; MAcFIE, 2000).

A defesa do hospedeiro contra invasão de microrganismos do intestino consiste de vários fatores locais, tais como muco, ácido gástrico, enzimas pancreáticas, lisozima secretada pelas células de Paneth, bile, barreira celular epitelial com suas junções intercelulares, e motilidade intestinal. Mucinas, secretadas por células caliciformes, criam um gel de proteção viscoso que dificulta a penetração bacteriana. O muco também age como lubrificante que reduz a abrasão física da mucosa e participa na proteção desta contra danos induzidos por ácido e outras toxinas luminiais (WIEST & RATH, 2003). Transporte ativo de cloreto pelas células epiteliais promove fluxo de fluido intraluminal que elimina os agentes danosos. Secreções da mucosa são ricas em IgA que se ligam e agregam bactérias, impedindo aderência na mucosa e colonização. A ausência de bile no intestino vem sendo descrita como facilitadora da translocação bacteriana (WIEST & RATH, 2003). A imunidade mediada por células (macrófagos e células T) na lâmina própria e em órgãos linfóides, tais como MLNs, gera uma segunda linha de defesa do hospedeiro contra a translocação. Por outro lado, a injeção de agentes imunodepressores, tais como a ciclofosfamida ou prednisona, em camundongos promove a translocação de bactérias endógenas para MLNs, baço, fígado e rins (BERG, 1995).

O trato intestinal é um órgão imune ativo, contendo essencialmente todo tipo de leucócitos envolvidos na resposta imune. O sistema imune local antígeno-específico, denominado tecido linfático associado ao intestino (GALT), é o maior órgão imunológico do corpo, correspondendo a mais de 25% da massa celular mucosa. O GALT compreende mais da metade das células linfóides do corpo e possui numerosas células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos, células Paneth e células M especializadas que assumem papel fundamental no controle da translocação (WIEST & RATH, 2003). Embora diferentes dos linfonodos ou do baço no aspecto externo, os tecidos linfóides mucosos são similares em sua histologia e em sua função de aprisionar patógenos. As diferenças estão principalmente na via de entrada do patógeno e nos padrões de migração de seus linfócitos (PARHAM, 2001). Os patógenos

chegam aos tecidos linfóides associados à mucosa por penetração direta, através da mucosa, mediada por células especializadas do epitélio mucoso denominadas células M. Os linfócitos primeiramente penetram no tecido linfóide mucoso a partir do sangue e, se não ativados, saem através dos linfáticos que conectam o tecido linfóide mucoso aos linfonodos de drenagem. Os linfócitos ativados no tecido mucoso tendem a permanecer no sistema linfóide mucoso, movendo-se para fora do tecido linfóide em direção à lâmina própria e ao revestimento epitelial, onde realizam suas funções efetoras (PARHAM, 2001).

A tensão de oxigênio no topo da vilosidade intestinal é muito menor do que no sangue arterial, mesmo sob condições normais e, conseqüentemente, a susceptibilidade do epitélio à injúria hipóxica está aumentada. Qualquer redução no fluxo sangüíneo agrava essa condição, e a injúria celular epitelial pode rapidamente se desenvolver quando a oxigenação dos tecidos é diminuída. Durante isquemia intestinal verifica-se forte correlação entre o grau de acidose da mucosa e o grau de hiperpermeabilidade na mucosa ileal (SALZMAN et al., 1994). Por outro lado, a acidose da mucosa induzida por aumento na tensão de dióxido de carbono arterial provoca um aumento significativo na permeabilidade epitelial, mesmo na ausência de isquemia da mucosa (SALZMAN et al., 1994). Isso indica que a acidose por si só promove a hiperpermeabilidade intestinal, o que pode ser atribuído ao estresse oxidativo. Oxidantes tais como peróxido de hidrogênio ou radical superóxido, rompem o citoesqueleto e aumentam a permeabilidade intercelular (WELSH et al., 1985). Além disso, metabólitos reativos de oxigênio podem levar a depleção de ATP, uma condição que é bem conhecida por aumentar a permeabilidade epitelial (WILSON et al., 1990). Na injúria térmica, bem como em choques hemorrágicos e cardiogênicos, ocorre diminuição do fluxo sangüíneo para a mucosa e submucosa do jejuno, íleo e cólon, uma vez que o fluxo para outros órgãos é preservado. Portanto, a isquemia induzida pela injúria epitelial no intestino é uma via comum para choques, traumas e injúria térmica e, essa via pode levar à disfunção na barreira intestinal e causar BT (WIEST & RATH, 2003).

A BT ocorre no hospedeiro normal, como tem sido demonstrado pela recuperação de bactérias intestinais viáveis em MLNs, em pequena proporção, em animais saudáveis (BERG, 1983; BROOKS et al., 1983; SEDMAN et al.,

1994). Além disso, bactérias mortas também podem translocar como processo biológico normal. Depois de serem produzidas, células apresentadoras de antígenos e células imunes virgens do GALT deixam o trato intestinal, participam da imunidade sistêmica e retornam à mucosa intestinal como células B e T maduras. Assim, é concebível considerar a BT como processo essencial e normal, regulando a imunidade local e sistêmica e a tolerância a diversos antígenos que fazem contato com o epitélio intestinal.

Existem múltiplas rotas possíveis pelas quais um organismo pode translocar do intestino para sítios extra-luminais. Estudos experimentais têm demonstrado que ele pode ocorrer tanto pela rota transcelular como paracelular. A migração transcelular de bactéria ou outras partículas ocorre pela fagocitose inicial pela região apical do enterócito seguida de internalização da bactéria em um vacúolo de membrana plasmática, e migração bacteriana transcelular pelo citoplasma do enterócito. A via paracelular envolve a abertura das junções do enterócito e subsequente penetração paracelular entre os enterócitos. A abertura dessas junções também pode permitir o englobamento bacteriano na membrana lateral do enterócito, com subsequente migração transcelular (MAcFIE, 2000). Uma vez na lâmina própria, a bactéria pode seguir a rota linfática para os linfonodos. Na rota linfática, a translocação de partículas inertes sugere que partículas não viáveis podem translocar através do epitélio intestinal, possivelmente dentro de fagócitos móveis ao contrário de vítimas dentro da circulação linfática. Tem sido sugerido que o macrófago intestinal possa assumir uma função chave no processo de BT. Células de *E.coli* marcadas foram capazes de translocar para a lâmina própria, por trânsito direto através dos enterócitos, e então serem fagocitadas por macrófagos do tecido (ALEXANDER et al, 1990). Esses macrófagos transportam as bactérias para os MLNs e as liberam se a atividade bactericida do macrófago estiver deprimida (WELLS et al., 1987). Se o epitélio intestinal ou as junções celulares estão injuriadas, a bactéria endógena pode passar através das áreas ulceradas da mucosa epitelial. Nesses modelos de choque nos quais ocorre um dano físico à barreira mucosa, a translocação da bactéria endógena pode ocorrer via sangue diretamente para o fígado e então espalhar-se sistemicamente (BERG, 1995).

Em camundongos que foram tratados com combinação oral de antibiótico, tal como clindamicina, juntamente com agente imunodepressor, tal

como prednisona, a translocação da bactéria endógena pode ser detectada progressivamente nos linfonodos, fígado, baço, rim, cavidade peritoneal e, finalmente, na corrente sanguínea (BERG, 1988). Segundo esses autores, o número de bactérias nesses sítios aumentou com o tempo e, por 14 dias, todos os camundongos tinham morrido de sepse letal devido à translocação de bactérias endógenas.

Estudos experimentais têm sugerido que a translocação bacteriana pode ser diminuída por um suprimento enteral de fibras fermentáveis destinadas ao cólon (RAYES et al., 2002; NESTLÉ, 2003; KAPKAC et al., 2003). Fibras tais como a pectina e a inulina não são absorvidas pelas células da mucosa e alcançam o intestino grosso praticamente intactas (RAYES et al., 2002; NESTLÉ, 2003).

De acordo com GIBSON & ROBERFROID (1995), prebiótico é um ingrediente alimentício não digerível capaz de produzir efeito benéfico no hospedeiro ao estimular o crescimento seletivo e, ou a atividade metabólica de um número limitado de bactérias no cólon; como por exemplo os frutooligosacarídeos (FOS) e a inulina, que são fibras fermentáveis. O principal grupo bacteriano que fermenta os FOS é o das bifidobactérias, exceto *Bifidobacterium bifidum*. Algumas espécies de lactobacilos como *L. acidophilus* e *L. casei* também podem utilizá-los como substrato (KAPLAN & HUTKINS, 2000). Existem evidências de que *Bacteróides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *Clostridium* spp (principalmente *C. butyricum*) também poderiam fermentar esses prebióticos, embora em pequena escala (O'SULLIVAN, 1996; ROBERFROID et al., 1998; HAVERNAAR et al., 1999). CAETANO (2003) não detectou, "in vitro", o aumento na velocidade de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em dietas enterais acrescidas de FOS e inulina quando comparado a dietas enterais sem adição de prebióticos. No cólon, como resultado da fermentação dos FOS, as bactérias probióticas degradam a fibra e produzem uma série de nutrientes incluindo ácidos graxos de cadeia curta tais como acetato, butirato e propionato, os quais estimulam o crescimento da mucosa, e as bifidobactérias por sua vez, reduzem a translocação e estimulam a defesa intestinal imune (OTHA et al., 1994; GIBSON e ROBERFROID, 1995; RAYES et al., 2002).

Na composição das fórmulas para nutrição enteral a fibra alimentar constitui-se em uma mistura de polissacarídeos de plantas e lignina e que não pode ser digerida por secreções endógenas ou por enzimas hidrolíticas do epitélio de revestimento intestinal. É parte integral da dieta diária e exerce efeitos fisiológicos diretos e indiretos no trato gastrointestinal. Esses efeitos são presumidos como influência na regulação do peso, metabolismo de lipídeo e carboidrato, e função do cólon (YUN, 1996; SOBOTKA et al., 1997). A extensão da fermentação do substrato é muito dependente do tipo de fibra, mas também depende da natureza da colonização bacteriana do intestino grosso (SOBOTKA et al., 1997). Ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), especialmente butirato, é o substrato de energia preferencial para os colonócitos. Eles aumentam o fluxo sanguíneo colônico e podem também ter função em prevenir certos tipos de colites. Perfusão de AGCCs diretamente no ceco reverte a secreção fluida no cólon ascendente durante a nutrição enteral, o que poderia ter implicações da fibra no controle da diarreia relacionada com nutrição enteral. Além disso, existem alguns dados de que a fibra dietética mantém a barreira funcional do intestino e reduz a translocação bacteriana durante doenças críticas (SOBOTKA et al., 1997; RAYES et al., 2002).

SPAETH et al. (1995) avaliaram o efeito de seis dietas enterais na barreira intestinal de camundongos e observaram que somente a nutrição enteral acrescida de fibra resultou num grau de translocação similar àquele do grupo controle. Observaram que em todos os grupos onde houve translocação havia número significativamente maior de bactérias aeróbicas no ceco, principalmente Gram-negativas, e concluíram que dietas enterais livres de fibras não protegem a barreira intestinal antimicrobiana. KAPKACK et al. (2002) avaliaram o efeito de dietas enriquecidas com fibras na enteropatia induzida por radiação. Neste estudo, MLNs foram avaliados para BT, e segmentos de jejuno e cólon foram coletados para análises microscópicas. Os ratos dos grupos alimentados com fibras perderam significativamente menos peso do que aqueles alimentados sem fibra. A estrutura intestinal foi pior no grupo alimentado sem fibra, intermediária no grupo alimentado com dieta enriquecida de fibras solúveis e a melhor no grupo enriquecido com fibras insolúveis que apresentou medidas significativamente maiores de comprimento das vilosidades e de espessura da mucosa jejunal.

A inulina é resistente à hidrólise por enzimas digestivas humanas. Quando alcança o cólon, tanto a oligofrutose como a inulina exercem efeito estimulatório preferencial no número de bactérias dos gêneros benéficos como *Bifidobacterium*, enquanto mantém a população de patógenos potenciais (*E. coli*, *Clostridium*) em níveis relativamente baixos. Portanto, a inulina e os FOS poderiam ser boa fonte de fibra dietética em nutrição enteral; são facilmente solúveis, apresentam efeito trófico na mucosa cecal em estudos com animais e não aumentam muito a viscosidade de uma dieta líquida (SOBOTKA et al., 1997).

Experimentos “*in vitro*” mostraram que tanto FOS quanto inulina são rápida e completamente metabolizadas pela microbiota intestinal (ROBERFROID et al., 1998). A fermentação de FOS e inulina necessita de enzimas específicas. Bifidobactérias possuem 2,1- $\beta$ -D-fructono-fructanohidrolase intracelular e produzem  $\beta$ -fructosidase para a fermentação de FOS, enquanto é necessário a síntese de inulinases para a degradação da inulina. As enzimas que atuam sobre a inulina são hidrolases (endo e exo inulinases,  $\beta$ -fructofuranosidase) ou transferases (ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999).

O efeito mais aceito de inulina e oligofrutose sobre a microbiota colônica é o aumento do número e proporção de bifidobactérias fecais. Os experimentos são consistentes em mostrar aumento na quantidade de bifidobactérias associado ou não com aumento de lactobacilos, quando há suplementação com prebióticos (MITSUOKA, 1992; ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999).

Não existe um acordo geral sobre a dosagem de fibra na nutrição enteral (RAYES et al., 2002). A ingestão de diferentes doses (2,5; 5; 10 ou 20 g) diárias de FOS por voluntários saudáveis, durante 7 dias foi pesquisada (BOUHNİK et al., 1999). Nenhuma das doses alterou a contagem de anaeróbios totais, porém a contagem de bifidobactérias no 8<sup>o</sup> dia foi maior nos grupos com consumo de 10 g e 20 g diários, observando-se uma correlação significativa entre a dose de FOS ingerida e a contagem de bifidobactérias fecal. Devido ao fato do consumo de 20 g levar a maiores desconfortos entre os indivíduos, os autores sugeriram que a dose ótima e melhor tolerada de FOS, que aumenta de forma significativa as bifidobactérias fecais em

voluntários saudáveis com dieta normal, é de 10 g dia<sup>-1</sup> (BOUHNİK et al., 1999).

Avaliando o resultado de diversos trabalhos que comparavam o efeito de diferentes doses de frutanos sobre o aumento das bifidobactérias, ROBERFROID et al. (1998) concluíram que não existiria correlação entre as variáveis, mas que o número inicial de bifidobactérias fecais, independente da dose do prebiótico, seria mais importante para a obtenção dos aumentos verificados nas contagens desse grupo bacteriano.

Considerando que a identificação da desnutrição ou de fatores de risco para o seu desenvolvimento, em conjunto com a prescrição de terapia nutricional representam benefícios importantes no cuidado de pacientes e diminuição imediata nos custos, estudar a translocação de bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella*, presentes nesse tipo de alimento é fundamental para estabelecer mecanismos que possam diminuir os riscos de infecção, diminuir o tempo de internação hospitalar e os custos imediatos para o governo, além de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos que necessitam da TNE (Terapia de Nutrição Enteral).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. O Microrganismo

O experimento foi conduzido com a estirpe P15 de *Klebsiella pneumoniae*, isolada por PEREIRA et al. (2001) de dieta enteral proveniente de uma unidade hospitalar da Zona da Mata Norte (MG).

O isolado foi ativado em TSB 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<sup>-1</sup>.

#### 3.2. Preparo das Dietas Enterais

A dieta utilizada foi a Soya Diet sem Sacarose (Support<sup>®</sup>). 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 100 g<sup>-1</sup> peso corporal por dia de FOS e 15,3 mg 100 g<sup>-1</sup> 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.

### 3.3. 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 10 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.

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

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

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

A imunodepressão foi feita do início ao fim do experimento com prednisona (10 mg kg<sup>-1</sup>), bem como foi administrado carbenicilina (200 mg kg<sup>-1</sup>) por via oral a aos 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 10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *Klebsiella* aos animais dos tratamentos IV, V, VIII e IX.

### **3.4. Determinação da Massa Cecal**

Após 1, 2, 4, 6 e 8 dias de administração da dieta contaminada, foram sacrificados dois animais por dia e o ceco desses animais foi retirado e pesado a fresco em balança analítica com precisão de 0,0001 g.

### **3.5. Determinação da Translocação de *Klebsiella* sp. para os Diferentes Órgãos**

Após 1, 2, 4, 6 e 8 dias de administração da dieta contaminada, foram sacrificados dois animais por dia e órgãos como: coração, fígado, baço, rins e pulmão foram coletados, pesados e armazenados a 4 °C, por 24 horas, em sacos plásticos estéreis de polietileno (Whirl-Pak, Millipore).

Para contagem de colônias típicas de *Klebsiella*, os órgãos foram macerados (MACÍAZ et al., 1992) e diluições de 1/10 foram preparadas e plaqueadas em agar seletivo MacConkey (BAGLEY & SEIDLER, 1978). O resultado foi expresso em UFC de *Klebsiella* por grama do órgão e considerou-se significativa, somente as placas com número de colônias acima de 25.

### **3.6. Análise do Perfil Genético de *Klebsiella* sp. nos Órgãos Analisados**

Com o objetivo de identificar se o isolado, administrado por via oral, e a *Klebsiella* endógena do trato digestório do animal translocaram do intestino para os órgãos analisados, foi feita comparação, com base no marcador molecular RAPD, entre a *Klebsiella pneumoniae* que foi inoculada e aquelas isoladas dos órgãos. Foram selecionadas de três a cinco colônias típicas de *Klebsiella* sp. no fígado, rim ou baço dos animais, nas placas onde a contagem de colônias foi maior; sendo escolhida uma placa para cada tratamento. O DNA total do isolado de *Klebsiella pneumoniae* administrado aos animais e dos isolados dos órgãos foi extraído de acordo com a metodologia descrita por BINGEN et al. (1991).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram OPI18, OPD18 e OPD20. Reações de amplificação foram conduzidas de acordo com WILLIAMS et al. (1990), num volume total de 25 µL de Tris-HCl (pH8,0) 10 mM num tampão contendo KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM; cada deoxinucleosídeo

trifosfatado 0,1 mM; oligonucleotídeos iniciadores 0,4  $\mu$ M; 25 ng de DNA; e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega). As reações de amplificação em cadeia foram conduzidas em termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc., Waterton, Massachussets) programado para 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C; 30 segundos a 35 °C e 1 minuto a 72 °C. Após o último ciclo, uma etapa de 7 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e evidenciados com brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com câmara Polaroid MP4 e digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II- Stratagene).

### **3.7. Análises Histológicas dos Tecidos dos Animais**

Para análises histológicas, foram coletados fragmentos de pulmões, rins, fígado, baço e coração, fixados em paraformaldeído a 4% tamponado por 24 horas. A seguir, a solução fixadora foi substituída por solução tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4, sendo os frascos armazenados a 4 °C. Os fragmentos foram desidratados em série alcoólica crescente, incluídos em glicolmetacrilato (Historesin ®, Leica) e seccionados na espessura de 3  $\mu$ m em micrótomo rotativo, utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinados em microscópio de luz. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se filme ProImage 100 (Kodac) em fotomicroscópio Olympus AX 70.

As preparações e análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, do Departamento de Biologia Geral da UFV. As fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do departamento de Biologia Vegetal da UFV.

### **3.8. Análises Estatísticas**

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e regressão. Para o fator qualitativo, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo, os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de

regressão, utilizando-se o teste “t” adotando-se o nível de até 10% de probabilidade, no coeficiente de determinação e no fenômeno em estudo.

Independentemente da interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma devido ao interesse do estudo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Massa Corporal e Massa Cecal

As variações de massa corporal e cecal dos animais estão demonstradas na Tabela 2. Observou-se que os animais do tratamento I, II e VI (animais saudáveis e que receberam dieta não contaminada) apresentaram ganho de peso no decorrer do experimento. Os animais do tratamento III, V, VII e VIII não apresentaram nenhum ganho de peso, e naqueles do tratamento IV, verificou-se perda de peso. Nos animais do tratamento IX, observou-se ganho de peso até 10,5 dias e depois, perda de peso até o décimo terceiro dia. Nenhum aumento na massa cecal ao longo dos dias foi verificado nos tratamentos contendo prebióticos (II, III, IV e V). Ao alcançar o ceco, onde é metabolizado por microrganismos, o FOS aumenta o peso do ceco. Este aumento seria devido ao aumento de peso das mucosas cecal (OHTA et al., 1998), resultando em maior peso da parede cecal (CAMPBELL et al. 1997; LE BLAY et al., 1999) devido a uma hipertrofia da das células cecais (YOUNES et al., 1996). Este aumento na massa cecal vem sendo observado na literatura em animais alimentados com Raftilose<sup>®</sup> P95 (FOS) na proporção de 5% na dieta (OHTA et al., 1995 a,b; OHTA et al., 1998 a,b, MOROHASHI et al., 1998, TESHIMA, 2001).

Tabela 2 - Equações ajustadas das variáveis peso do animal (PA) e peso do ceco (PC) em função dos dias de avaliações (D) para os respectivos tratamentos e coeficientes de determinação

Tratamento	Variável	Equações Ajustadas	$r^2/R^2$
T I	PA	$\hat{Y} = 15,9743+1,0144^{**}D$	0,5235
	PC	$\hat{Y} = 0,2684$	
T II	PA	$\hat{Y} = 17,4338+0,4887^{***}D$	0,4061
	PC	$\hat{Y} = 0,1847$	
T III	PA	$\hat{Y} = 26,07$	
	PC	$\hat{Y} = 0,2904$	
T IV	PA	$\hat{Y} = 28,1187-0,831158^{**}D$	0,6226
	PC	$\hat{Y} = 0,2116$	
T V	PA	$\hat{Y} = 19,10$	
	PC	$\hat{Y} = 0,2544$	
T VI	PA	$\hat{Y} = 14,4567+0,693293^{*}D$	0,5701
	PC	$\hat{Y} = 0,2076$	
T VII	PA	$\hat{Y} = 21,83$	
	PC	$\hat{Y} = 0,2685$	
T VIII	PA	$\hat{Y} = 22,04$	
	PC	$\hat{Y} = 0,1844$	
T IX	PA	$\hat{Y} = -0,712748+4,02033^{NS}D-0,191385^{***}D^2$	0,5342
	PC	$\hat{Y} = 0,46705 - 0,0198442^{**}D$	

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

NS não-significativo a 10% de probabilidade pelo teste "t".

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste "t".

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste "t".

\*\*\* significativo a 10% de probabilidade pelo teste "t".

No entanto, YBARRA (2003), alimentando ratos com dietas acrescidas de 3 a 5% de FOS, observou presença de diarreia. A ingestão diária de 10 g de FOS, por seres humanos, apresenta efeitos bifidogênicos, sem levar aos problemas colaterais verificados com doses superiores (BOUNIK et al., 1999). Embora os pesquisadores não tenham fornecido o peso médio dos indivíduos analisados, tomando-se como base 65 kg, ter-se-ia uma dose de 15,3 mg FOS 100g<sup>-1</sup> peso corporal. Esta foi a dose administrada aos animais neste experimento.

O ganho de peso observado nos animais do grupo controle (tratamento I), alimentados com dieta AIN-93G (Figura 1) é considerado como um padrão, pois a dieta é estabelecida para suprir todas as necessidades para o crescimento destes animais. Aumento de peso também foi constatado nos animais dos grupos II e VI, alimentados com dieta enteral com prebióticos e sem prebióticos, respectivamente, mas não contaminada com *Klebsiella* (Figura 1). Entretanto, naqueles tratamentos onde se administrou dieta contaminada com cerca de 10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *Klebsiella* (tratamentos IV, V, VIII) observou-se manutenção da perda de peso do animal (Figura 1), com exceção do tratamento IX onde a perda de peso foi detectada a partir de 10,5 dias.

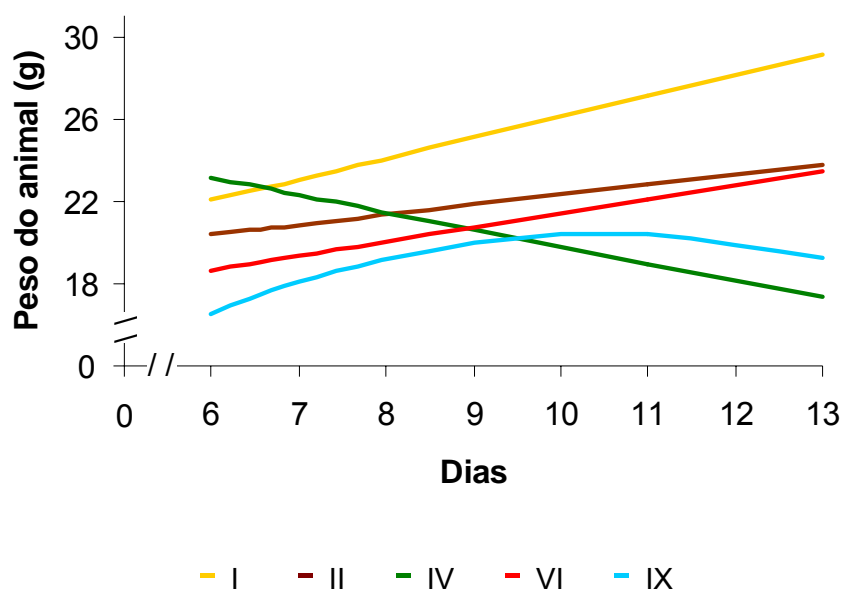


Figura 1 - Estimativa do peso do animal em função dos dias de avaliação para os tratamentos I, II, IV, VI e IX.

A estabilização ou a perda de peso dos animais nos tratamentos IV, V e VII, bem como a perda de peso dos animais do tratamento IX a partir de 10,5 dias de avaliação, pode ser justificada pelo fato de que nesses tratamentos foram simuladas situações de imunodepressão com presença ou ausência de risco de infecção. Situações como esta em humanos pode levar a perda de peso e desnutrição (WAITZBERG et al., 2001a).

Os valores médios de massa corporal do animal em função dos dias para os diferentes tratamentos está demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios de massa corporal (g) do animal (PA) em função dos dias de avaliações (D) para os diferentes tratamentos

Tratamento	D=6	D=7	D=9	D=11	D=13
I	23,25 a	23,48 a	24,55 a	22,85 ab	32,40 a
II	21,55 ab	21,40 ab	19,70 a	21,47 ab	25,62 bc
III	26,60 a	24,07 a	25,72 a	25,43 a	28,53 ab
IV	21,50 ab	23,71 a	22,51 a	16,70 b	17,93 e
V	20,15 ab	15,61 b	19,95 a	20,94 ab	18,87 de
VI	20,08 ab	19,05 a	19,55 a	20,00 ab	25,48 bcd
VII	21,03 ab	24,11 a	23,55 a	20,41 ab	20,07 cde
VIII	20,31 ab	25,11 a	20,65 a	21,73 ab	22,41bcde
IX	15,05 ab	20,28 ab	19,67 a	19,36 ab	19,72 cde

TI=Dieta controle (AIN-93G) e animais saudáveis; TII= Dieta enteral com prebióticos não contaminada e animais saudáveis; T III= Dieta enteral com prebióticos e animais imunodeprimidos; TIV= Dieta enteral com prebióticos contaminada e animais saudáveis; TV=Dieta enteral contaminada com prebióticos e animais imunodeprimidos; TVI= Dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais saudáveis; T VII= Dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos; TVIII= Dieta enteral contaminada sem prebióticos; e animais saudáveis; TIX= Dieta enteral contaminada sem prebióticos e animais imunodeprimidos.

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

Ao final do experimento a massa corporal dos animais dos tratamentos que receberam dieta sem prebiótico (VI, VII, VIII e IX) e dos animais do tratamento V (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos) não diferiram entre si. Além disso, a massa corporal dos animais do tratamento V não diferiu do tratamento IV (dieta enteral com prebióticos contaminada), que por sua vez não diferiu do VII (dieta enteral sem prebióticos

e animais imunodeprimidos), do VIII (dieta enteral sem prebióticos contaminada) e do IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos). No último dia de experimento, observou-se que a massa corporal dos animais do tratamento III (dieta enteral com prebióticos e animais imunodeprimidos) não diferiu do tratamento I (dieta AIN-93G), os quais corresponderam aos maiores valores de massa.

Para a massa cecal dos animais não verificou-se diferença entre os tratamentos a partir do 9º dia de experimento (Tabela 4). No sexto dia o PC do tratamento III diferiu do VIII, e no sétimo dia, o PC do tratamento II diferiu do IX.

Tabela 4 - Valores médios da massa cecal (g) de camundongos (PC) em função dos dias de avaliações (D) para os diferentes tratamentos

Tratamento	D=6	D=7	D=9	D=11	D=13
I	0,2225 ab	0,2900 ab	0,2550 a	0,2250 a	0,3469 a
II	0,2900 ab	0,1103 b	0,1144 a	0,1743 a	0,2344 a
III	0,3937 a	0,2526 ab	0,3054 a	0,2336 a	0,2664 a
IV	0,2602 ab	0,2384 ab	0,1804 a	0,1330 a	0,2462 a
V	0,2760 ab	0,2541 ab	0,2476 a	0,2912 a	0,2033 a
VI	0,2208 ab	0,2221 ab	0,1537 a	0,1555 a	0,2862 a
VII	0,2393 ab	0,2889 ab	0,2530 a	0,2563 a	0,3051 a
VIII	0,1749 b	0,2034 ab	0,1820 a	0,1849 a	0,1770 a
IX	0,3323 ab	0,3582 a	0,2723 a	0,2458 a	0,2138 a

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

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

#### 4.2. Detecção de Colônias Típicas de *Klebsiella* sp. em Diferentes Órgãos

No fígado, baço, coração, rim e pulmão dos animais dos tratamentos I, II e VI não se observou presença de colônias típicas de *Klebsiella* sp. em meio seletivo McConkey-Inositol-Carbenicilina. Esses resultados sugerem que, em

hospedeiro com sistema imunológico apto, que não receberam o inóculo bacteriano e quando não submetidos ao tratamento com medicação imunodepressora, *Klebsiella* endógena do trato digestório dos animais, não foi capaz de translocar para os órgãos analisados.

Nos animais do tratamento III (dieta enteral com prebióticos não contaminada e imunodepressão) constatou-se cerca de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> típicas de *Klebsiella* sp. no sexto dia no fígado, bem como no sétimo dia no rim, fígado e baço (Figura 2).

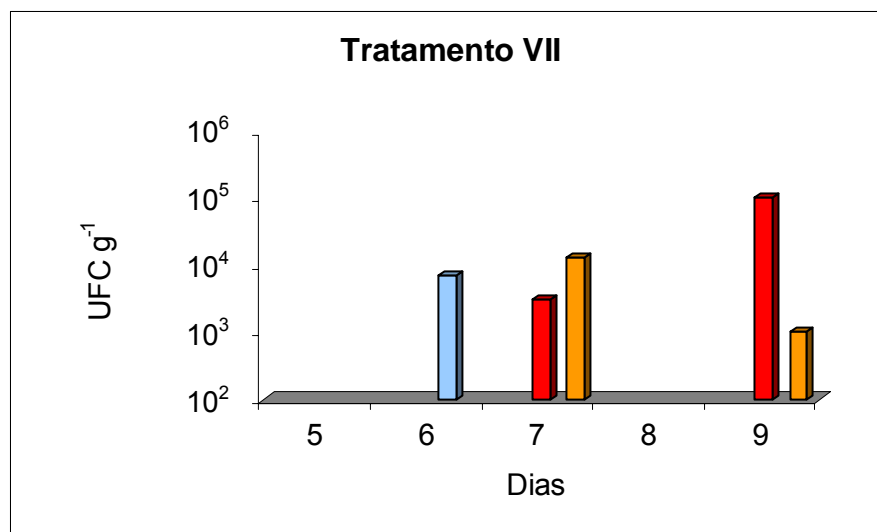
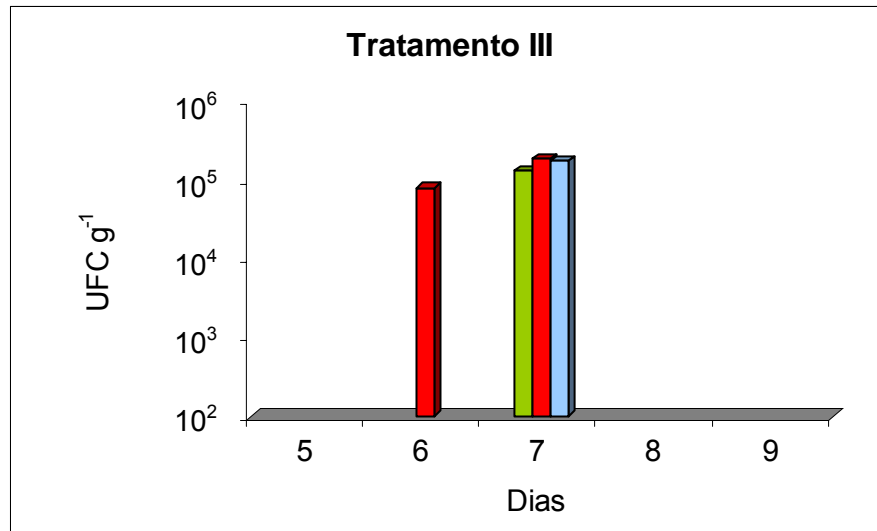
No tratamento VII (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e presença de imunodepressão) observou-se  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> típicas de *Klebsiella* sp. no sexto dia no baço e, no sétimo dia, no fígado. Ainda no sétimo dia, detectou-se contagem no pulmão em torno  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup>. No nono dia a contagem no fígado foi  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> e, no pulmão  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> (Figura 2).

No pulmão dos animais saudáveis do tratamento IV (dieta enteral com prebiótico contaminada) foi observada presença de colônias típicas de *Klebsiella* sp. no sétimo dia de experimento, com contagem de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> (Figura 3).

Nos animais também saudáveis do tratamento VIII (dieta enteral contaminada sem prebiótico) foi encontrada a presença de cerca de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> típicas de *Klebsiella* sp. no sexto dia no rim e fígado, bem como no sétimo dia no coração, e cerca de  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> no pulmão, pelo nono dia (Figura 3).

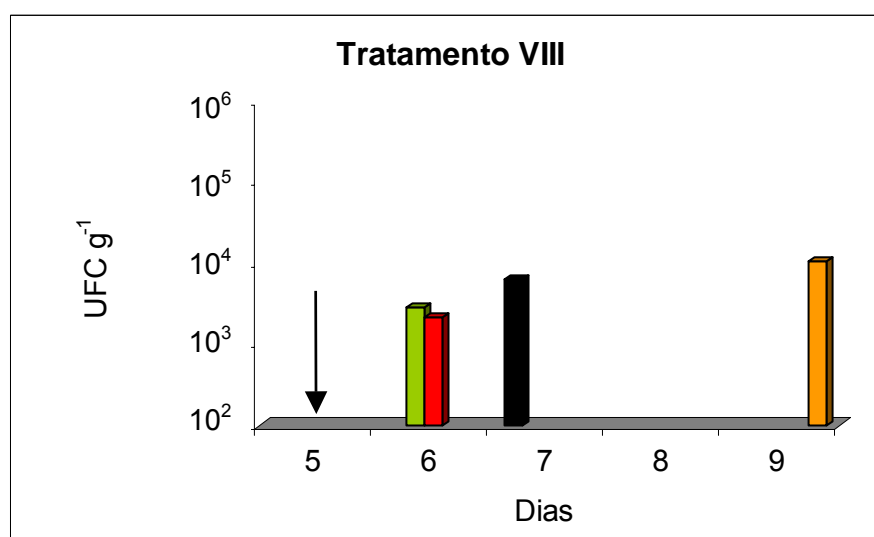
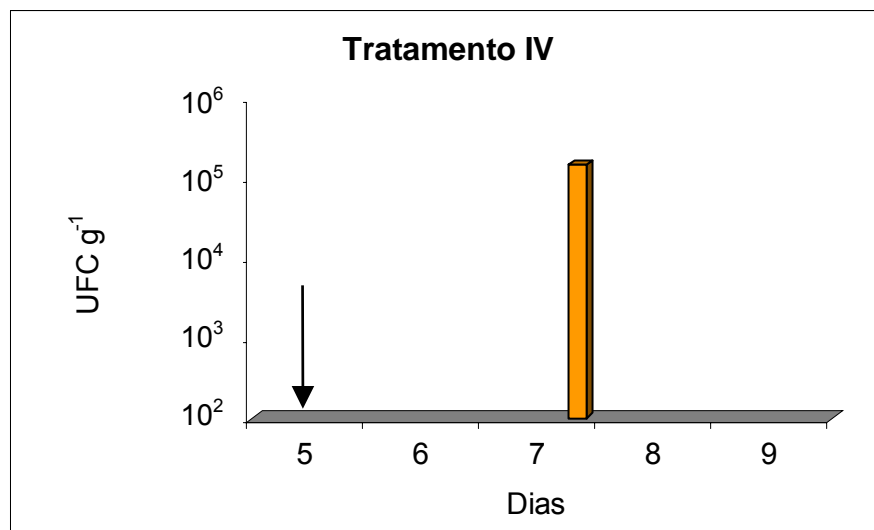
Nos animais do tratamento V (dieta enteral com prebióticos contaminada e imunodepressão), observou-se contagem de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> no sexto dia do experimento para os rins e baço, bem como contagem de  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> no fígado. No sétimo dia também foi observada contagem de  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> para fígado e baço destes animais (Figura 4).

Para o tratamento IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e imunodepressão), foi observada a translocação por um período maior de tempo, até o nono dia de experimento, assim como observado no tratamento VIII (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais saudáveis). No sexto dia, foi detectado cerca de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> no coração, e  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> no rim, fígado e baço. No nono dia foi observada translocação de *Klebsiella* sp. para o rim do animal atingindo contagem de  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> (Figura 4).



■ Coração ■ Rim ■ Fígado ■ Baço ■ Pulmão

Figura 2 - Contagem de *Klebsiella* sp. em órgãos de camundongos submetidos aos tratamentos III (dieta enteral com prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos) e VII (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos) em diferentes dias de avaliação.



■ Coração ■ Rim ■ Fígado ■ Baço ■ Pulmão

Figura 3 - Contagem de *Klebsiella* sp. em órgãos de camundongos submetidos aos tratamentos IV (dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais saudáveis) e VIII (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais saudáveis) em diferentes dias de avaliação. A seta indica o dia do fornecimento da dieta contaminada.

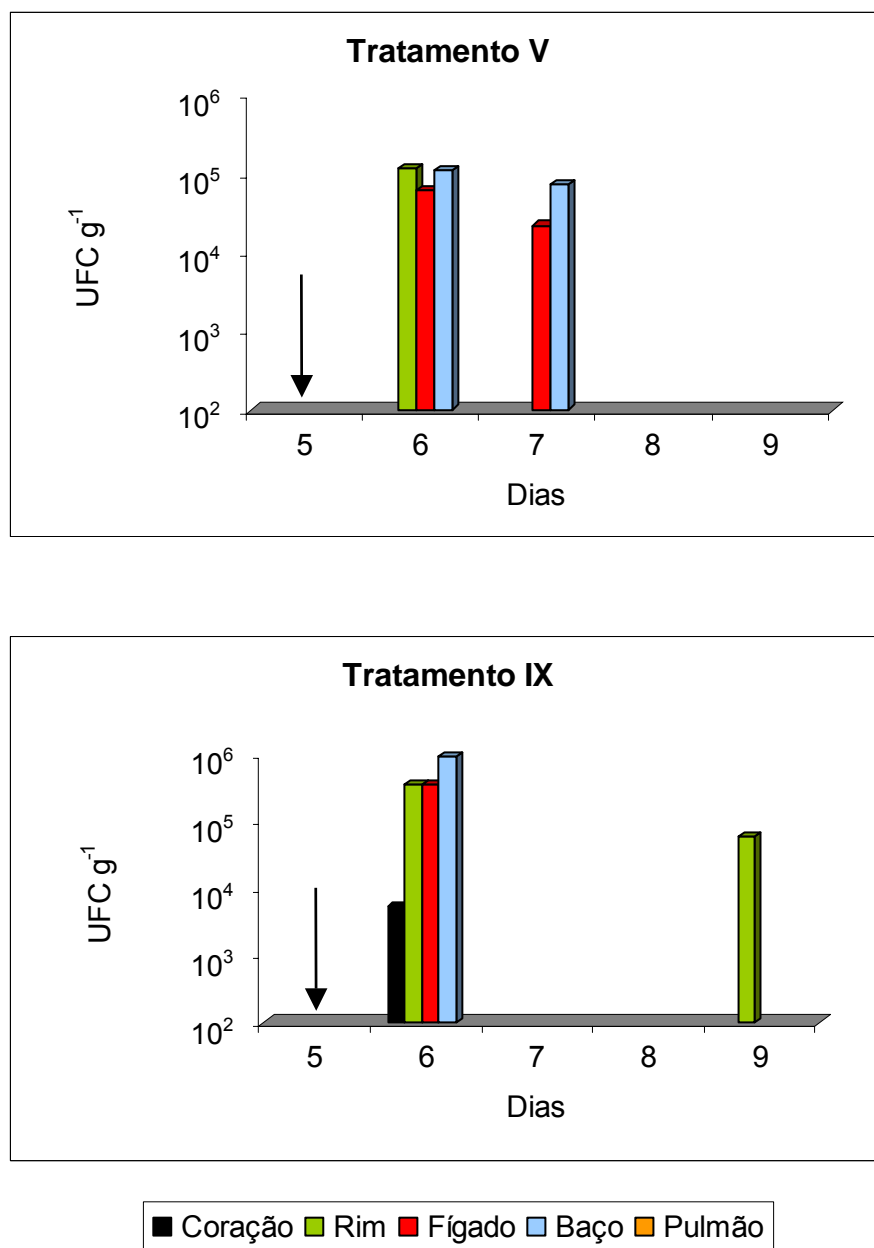


Figura 4 - Contagem de *Klebsiella* sp. em órgãos de camundongos submetidos aos tratamentos V (dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos) e IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos) em diferentes dias de avaliação. A seta indica o dia do fornecimento da dieta contaminada.

A translocação de *Klebsiella* sp. observada nos diferentes órgãos analisados reforça a constatação de BERG et al. (1983) de que *K. pneumoniae* constitui uma das espécies bacterianas que mais translocam a partir do trato intestinal, em camundongos submetidos ao tratamento com prednisona e outros compostos imunodepressores.

A constatação do fígado ser o órgão que apresentou mais frequentemente contaminantes típicos de *Klebsiella* sp. (Figuras 2, 3 e 4) pode ser atribuído ao grande número de bactérias que passa da mucosa intestinal para o sistema porta, transitando, necessariamente, pelos seios hepáticos antes de alcançar a circulação sistêmica (BERG, 1995). PEREIRA (2001) também observou que a estirpe P15 de *K. pneumoniae* translocou para o fígado de animais imunodeprimidos mais frequentemente, bem como para outros órgãos.

A presença de bactérias endógenas em resposta a uma alteração imunológica, como verificada nos tratamentos III (dieta enteral com prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos) e VII (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos), foi também observada por GIANOTTI et al. (1996) e por PEREIRA (2001). GIANOTTI et al. sugeriram que a terapia com prednisona pode modular a função de barreira do intestino, defesa do hospedeiro e diminuir a sobrevivência nos camundongos injuriados e que há maior translocação de bactérias entéricas exógenas e endógenas para órgãos vitais. De acordo com ALVERDY et al. (1992) o tratamento com corticosteróides reduz significativamente o nível de IgA secretória no intestino. JONES et al. (1993) relacionaram a elevação do nível de corticóides em camundongos com a presença prolongada de bactérias endógenas e exógenas nos tecidos. Observaram também que a prednisona é capaz de aumentar a aderência dessas bactérias às células intestinais, facilitando sua translocação e reduzir a capacidade do hospedeiro em eliminar a bactéria translocada, permitindo sua sobrevivência. Tal fato pode ser bem ilustrado na Figura 5, quando compara-se os tratamentos VII (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos) com VI (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais saudáveis). Esses resultados demonstram o papel significativo que a imunodepressão e os antimicrobianos exercem na translocação bacteriana. Portanto, a translocação observada nos tratamentos III e VII foi facilitada

quando medicamentos imunodepressor e antimicrobiano foram utilizados (Figura 2 e 5).

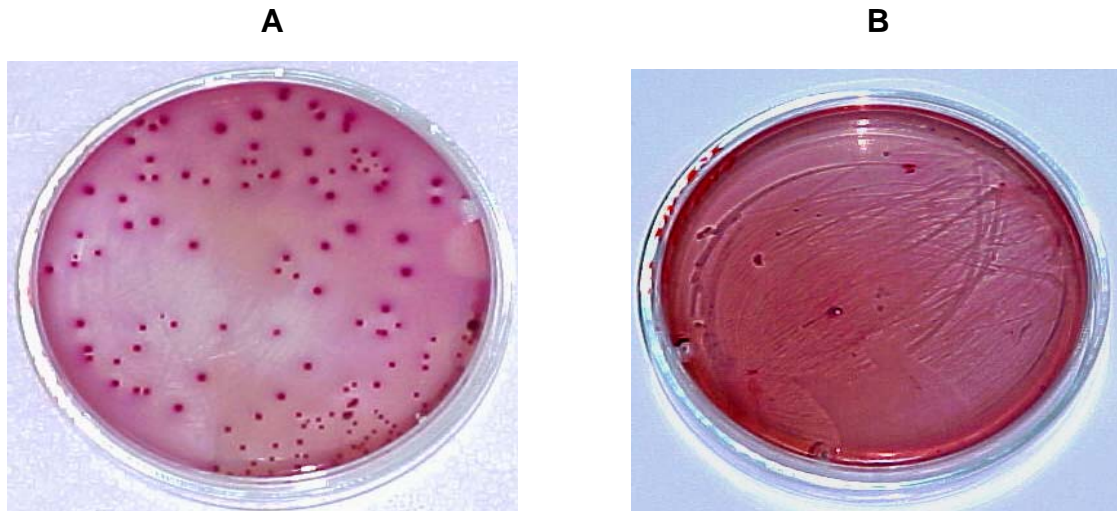


Figura 5 - Colônias típicas de *Klebsiella* sp. em agar MacConkey-Carbenicilina-Inositol em amostras de pulmão de camundongos submetidos ao tratamento VII (A- animais recebendo dieta enteral sem prebióticos não contaminada, tratamento com prednisona e carbenicilina) e VI (B- animais saudáveis recebendo dieta enteral sem prebióticos não contaminada, ausência de corticóide e antimicrobiano). Amostras coletadas no sétimo dia de experimento.

A imunodepressão e o tratamento antimicrobiano associado à ingestão de dieta enteral contaminada promove o aumento do processo de translocação bacteriana, como pode ser constatado nos resultados obtidos com os animais dos tratamentos IV (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais saudáveis) e V (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais tratados com prednisona e carbenicilina), e entre VIII (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais saudáveis) e IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais tratados com prednisona e carbenicilina). Os resultados estão de acordo com dados da literatura que citam aumento na taxa de translocação quando há combinação de dois ou dos três mecanismos responsáveis pela translocação (BERG 1995; WIEST & RATH, 2003).

A presença de prebióticos na dieta parece interferir reduzindo mais o período de translocação do que reduzindo o número de células translocadas.

Além disso, o hospedeiro com sistema imune ativo que recebeu dieta enteral contaminada apresentou taxas menores de translocação de *Klebsiella* sp. para os órgãos analisados quando os prebióticos estavam acrescentados à dieta do que quando comparados aos animais que, além disso, foram imunodeprimidos e receberam tratamento antibacteriano.

#### **4.3. Análise do Perfil Genético de *Klebsiella* sp. nos Órgãos Analisados**

A análise do perfil genético, pela técnica de RAPD, da *Klebsiella* sp. encontrada no fígado dos animais dos tratamentos III (dieta enteral com prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos) e VII (dieta enteral sem prebióticos não contaminada e animais imunodeprimidos), não detectou similaridade com os padrões de bandas de DNA da estirpe de *Klebsiella pneumoniae* administrada oralmente aos animais. Este resultado indica que estirpes da microbiota autóctone intestinal foram capazes de translocar quando houve depressão do sistema imunológico e sugere uma ação seletiva promovida pelo antibiótico. Nos animais dos tratamentos IV (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais saudáveis), V (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos), VIII (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais saudáveis) e IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos), também não foi possível indentificar, no fígado, rim e baço, a presença da estirpe de *Klebsiella pneumoniae* administrada aos animais. Detectando-se, portanto, translocação da microbiota endógena de *Klebsiella* do animal. Isso pode ser atribuído ao fato de se analisar um número insuficiente de colônias isoladas desses tratamentos, pois num total aproximado de  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de colônias típicas de *Klebsiella* sp., foram selecionadas apenas 30 colônias para análise do perfil genético, correspondendo apenas a 0,003% do total de colônias. PEREIRA (2001) detectou que a mesma estirpe de *Klebsiella* utilizada neste trabalho foi capaz de translocar em camundongos imunodeprimidos. No entanto, as condições utilizadas neste experimento não foram as mesmas utilizadas por PEREIRA (2001) e a porcentagem de amostragem selecionada para realização do *fingerprinting* por PEREIRA (2001) foi de aproximadamente 4% do total de colônias, bem maior do que o realizado no presente estudo. O resultado encontrado neste trabalho

pode ser também consequência de um tratamento imunodepressor mais prolongado nos animais (13 dias) em relação ao tratamento apresentado por PEREIRA (2001), que imunodeprimiu os animais por quatro dias, bem como à modificação da composição dieta enteral. Portanto, de acordo com os resultados encontrados não se pode afirmar que o microrganismo exógeno não translocou, mas provar que microbiota endógena do animal foi capaz de translocar nas condições utilizadas nesse experimento.

#### **4.4. Análises Histológicas dos Tecidos dos Animais**

O fígado foi escolhido como órgão preferencial para elaboração dos cortes histológicos, tendo em vista que contagens elevadas de colônias típicas de *Klebsiella* foram encontradas, neste órgão, na maioria dos tratamentos.

Para obtenção dos cortes histológicos foi selecionado o fígado dos animais sacrificados no dia em que o maior número de colônias típicas de *Klebsiella* foram detectadas nos diferentes tratamentos.

A estrutura normal do fígado é demonstrada na Figura 6 A e B. No fígado dos animais dos tratamentos V (dieta enteral com prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos) e IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos) algumas alterações podem ser observadas no tecido hepático. O pequeno acúmulo de gotículas de gordura hepática em torno da veia centro lobular e a discreta dilatação dos capilares sinusóides observado nos animais do tratamento V pode ser devido à presença de prebióticos na dieta (Figura 6 C). Por outro lado, animais que não receberam dieta com prebióticos (tratamento IX) apresentaram aumento considerável das gotículas de gordura hepática combinado com sinusóides e veias centro lobulares mais dilatadas e, geralmente, repletos de sangue (Figura 6 D). Os resultados se relacionam com os de contagem de UFC g<sup>-1</sup> de colônias típicas de *Klebsiella* encontradas no fígado no sexto dia de experimento (6,2x10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> no tratamento V; 3,68x10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> no tratamento IX).

O acentuado acúmulo de gordura hepática observado na Figura 6 D, pode ter sido indiretamente causado por uma inflamação no tecido hepático. De acordo com COTTRAN et al. (1999) a inflamação do tecido hepático pode causar acúmulos de gordura em hepatócitos próximos à região centro lobular.

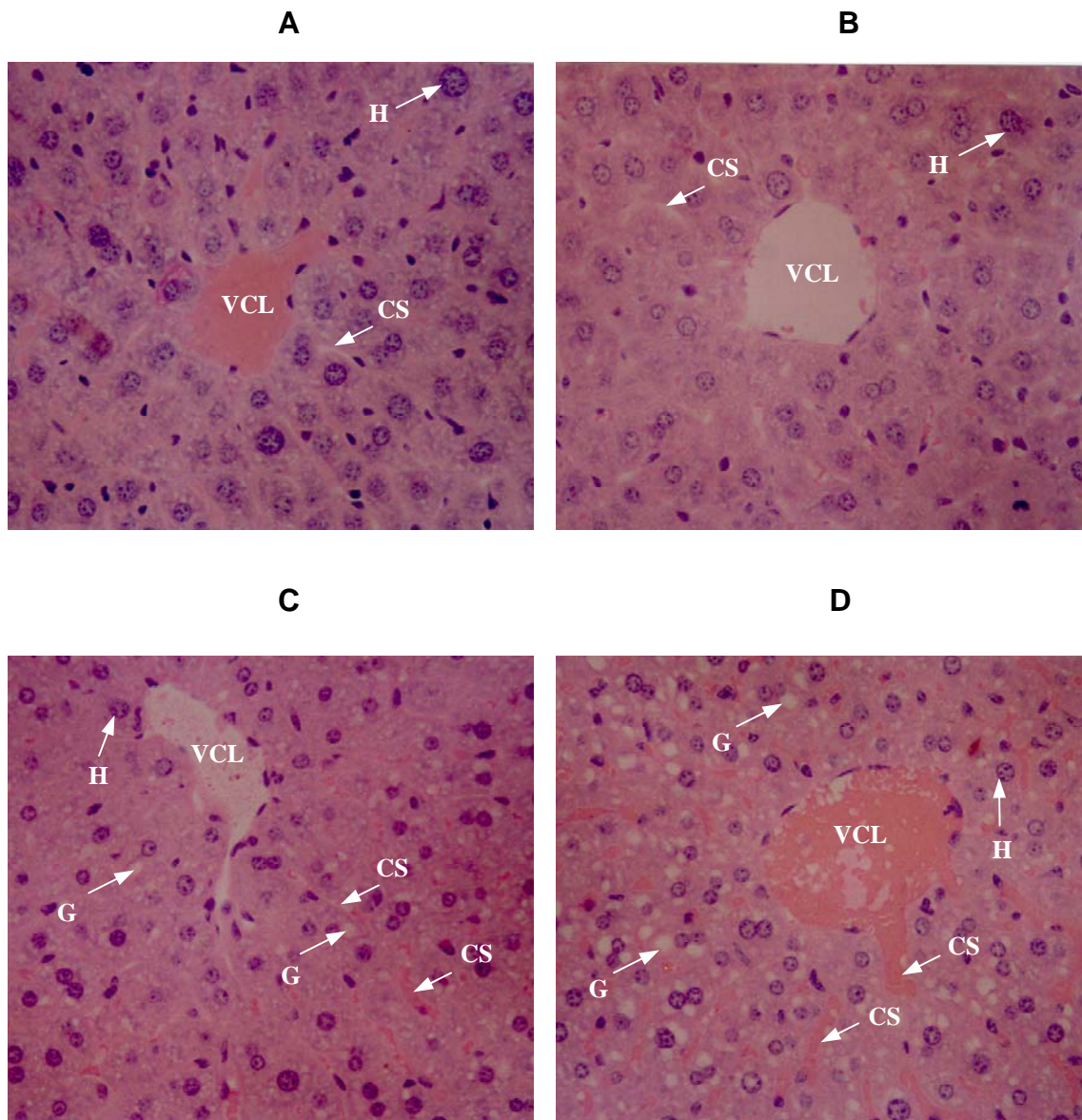


Figura 6 - Secção de fígado de camundongos dos tratamentos I (A), II (B), V (C) e IX (D), na região central de um lóbulo hepático. Veia centro lobular (VCL), cordões de hepatócitos (H), capilares sinusóides (CS) e gotículas de gordura (G). Aumento: 416 X.

Células em hipóxia aumentam a liberação de nucleotídeos (ADP e AMP), dos quais principalmente o ADP é o vasodilatador arteriolar e aumenta o fluxo de sangue para a região atingida (PEREIRA et al., 1993; SALZMAN et al., 1994; COTTRAN et al., 1999). E a hipóxia também está presente nos tecidos inflamados, aumentando a excreção de catabólitos, como ADP e  $H^+$ , o que aumenta ainda mais a vasodilatação e abertura dos capilares, aumentando a hiperemia, como observado nas Figuras 7 B e C. A lesão endotelial pela hipóxia favorece o acúmulo de triglicérides no fígado, pois este gera a maior parte de sua energia através do metabolismo oxidativo dos ácidos graxos. A síntese de lipoproteínas e o seu transporte são dependentes do metabolismo oxidativo, e a hipóxia dos hepatócitos leva ao acúmulo de triglicérides (COTTRAN et al., 1999).

Características peculiares observadas mais freqüentemente e intensamente no tratamento IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos), estão demonstradas nas Figuras 6 D e 7 B, C e D. Características como acentuada hiperemia, sinusóides muito dilatados e presença de infiltrados celulares podem ser observadas.

As alterações observadas no tecido hepático dos animais dos tratamentos V e IX, demonstram características inflamatórias. A inflamação pode ocorrer em resposta à infecção causada pela translocação de microrganismos presentes no lúmen intestinal através da mucosa do intestino para outros órgãos (PARHAM, 2001; WIEST & RATH, 2003). A resposta imune inata induz a inflamação nos sítios de infecção. A inflamação descreve o acúmulo local de líquido, acompanhado de edema, de eritema e de dor. Esses efeitos provêm das alterações induzidas nos capilares locais, que levam a um aumento no seu diâmetro, a uma redução na velocidade do fluxo sangüíneo e a uma permeabilidade aumentada da parede do vaso (PEREIRA et al., 1993; PARHAM, 2001). Os leucócitos da corrente sangüínea passam a ocupar a periferia da corrente sangüínea; em seguida, se aderem ao endotélio e finalmente passam por entre as células endoteliais. Podem migrar ativamente polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, constituindo o infiltrado leucocitário, como pode ser observado na Figura 7 D. O suprimento aumentado de sangue para a região, causa vermelhidão e calor local associados à inflamação (PARHAM, 2001). Essas alterações podem ser bem observadas nas Figuras 6 C e D, bem como nas Figuras 7 A, B, C e D.

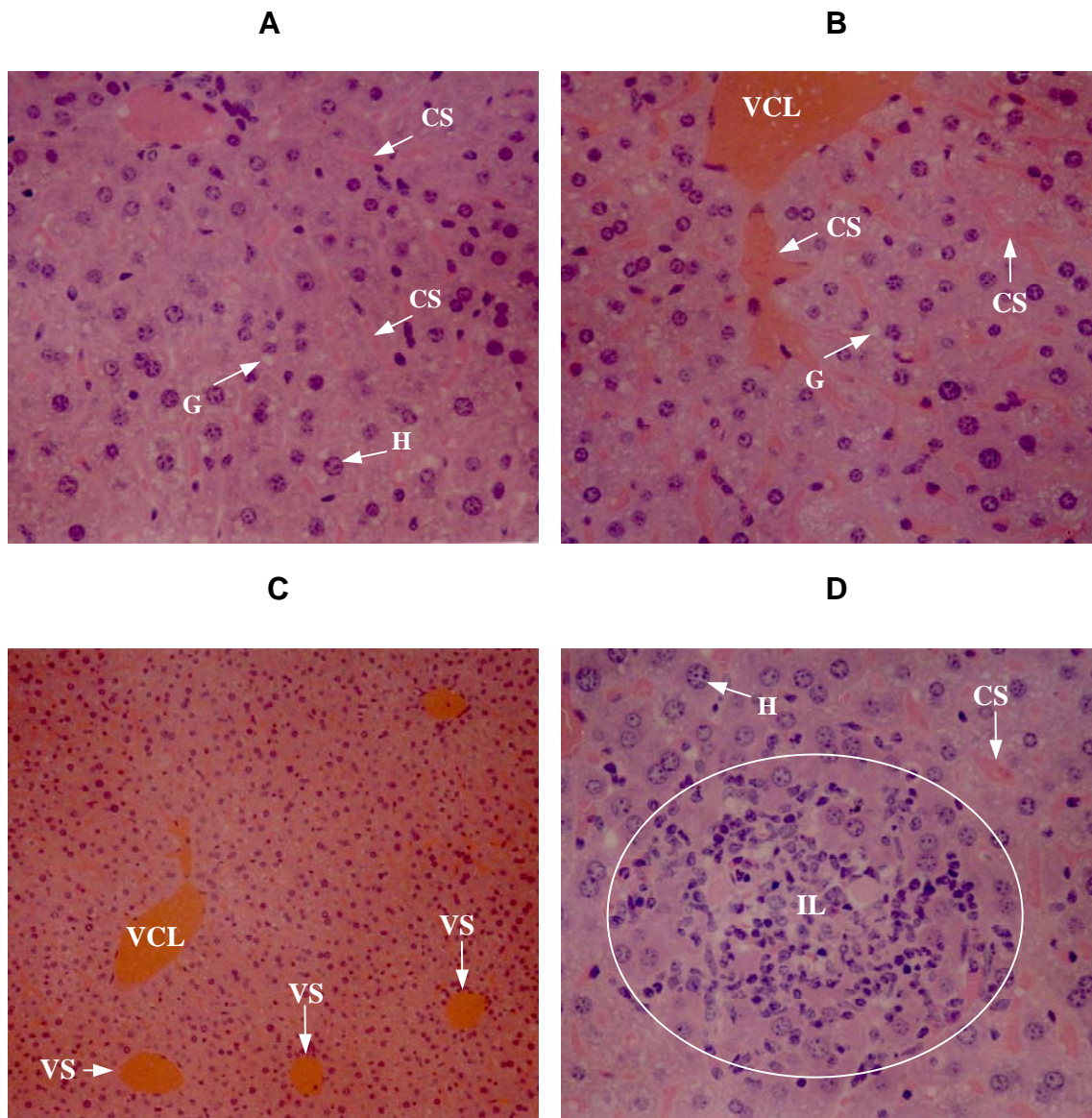


Figura 7 - Secção de fígado de camundongos dos tratamentos V (A) e IX (B, C e D). Veia centro lobular (VCL), cordões de hepatócitos (H), capilares sinusóides (CS), gotículas de gordura (G), vaso sanguíneo (VS) e infiltrado leucocitário (IL). Aumento: 416 X (A, B e D) e 312 X (C).

Os fenômenos vasculares da inflamação são representados pelas modificações hemodinâmicas da microcirculação, como por exemplo, as características observadas na Figura 7, comandadas pelos mediadores químicos liberados durante os fenômenos irritativos e, menos freqüentemente, por ação direta do agente flogógeno.

Portanto, as características encontradas no tratamento IX (dieta enteral sem prebióticos contaminada e animais imunodeprimidos) demonstram características inflamatórias mais intensas e freqüentes no fígado do que as observadas nos demais tratamentos.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Considerando a importância da ocorrência de estirpes virulentas de *Klebsiella* em dietas enterais, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar “*in vivo*” o efeito da modificação de dietas enterais com adição de prebióticos na redução do potencial de translocação de *Klebsiella* para diferentes órgãos em um modelo animal, bem como detectar possíveis alterações na massa corporal e cecal e, avaliar histopatologicamente os principais órgãos colonizados por esse microrganismo.

Para se alcançar esta meta, foram utilizados camundongos albinos suíços, com 4 a 6 semanas de vida, que foram divididos em tratamentos contendo diferentes combinações entre FOS, inulina, antibiótico e corticóide, e ausência ou presença de contaminante. No período equivalente a 1, 2, 4, 6 e 8 dias após a administração de *Klebsiella* via oral, foram sacrificados dois animais por dia e órgãos como: baço, coração, fígado, pulmão e rins, foram coletados, pesados e armazenados em sacos plásticos estéreis para análise da presença de colônias típicas de *Klebsiella* e estudos histopatológicos. Com o objetivo de identificar a translocação do intestino para os órgãos analisados, foi feita comparação, com base em marcadores moleculares RAPD, entre a estirpe de *Klebsiella* inoculada e aquelas isoladas dos órgãos.

Os resultados indicaram que os animais dos tratamentos III, V, VII e VIII, que receberam droga imunodepressora associada ou não com dieta contaminada apresentaram estabilização ou perda de massa corporal; enquanto

aqueles que receberam a dieta com ou sem prebióticos, sem medicação imunodepressora ou presença de *Klebsiella* na mesma, apresentaram ganho de massa corporal, assim como o grupo controle, alimentado com dieta AIN-93G. A adição de FOS e inulina na dieta, na concentração de 15,3 mg 100 g<sup>-1</sup> por dia, resultou em translocação por um período menor de tempo quando comparado aos animais que não receberam prebióticos na dieta. No entanto, essa dose de prebióticos não resultou em aumento da massa cecal desses animais. Análise do perfil genético das colônias isoladas dos tecidos, demonstraram translocação da *Klebsiella* endógena do animal. Análises histológicas demonstraram características mais intensas de inflamação nos animais imunodeprimidos que receberam a dieta contaminada sem prebióticos, onde foi detectada maior contagem de UFC g<sup>-1</sup> típicas de *Klebsiella* em relação aos animais imunodeprimidos, que receberam dieta enteral contaminada com prebióticos.

Portanto, a adição de FOS e inulina a dietas enterais na dose de 15,3 mg 100 g<sup>-1</sup> por dia resultou na diminuição de translocação de *Klebsiella* para baço, coração, fígado, pulmão e rins de camundongos que receberam a dieta contaminada associada ou não com droga imunodepressora e antibiótico, bem como ocasionaram pouca ou nenhuma alteração no tecido hepático desses animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. W., BOYCE, S. T.; BABCOCK, G. F. et al. The process of microbial translocation. **Annals of Surgery**, v. 212, p. 496-510, 1990.

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

ALEXANDER, J. M.; GENNARI, R. Translocation as it applies to metabolism. In: **Nutrition and metabolism in the surgical patient**. 2.ed. Boston: JE Fischer, 1996. p. 459-476.

ALVERDY, J.; AOYS, E. The effect of glucocorticoid administration on bacteria translocation. **American Surgery**, v. 214, p. 719-723, 1991.

ANDERTON, A. Microbiological quality of products used in enteral feeds. **Journal of Hospital Infection**, v. 7, p. 68-73, 1986.

BAGLEY, S. T.; SEIDLER. Primary *Klebsiella* identification with MacConkey-inositol-carbenicilina agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 536-538, 1978.

BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**, v. 23, p. 403-411, 1979.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. **Current Microbiology**, v. 8, p. 879-882, 1983.

BERG, R. D., WOMMACK, E., DEITCH, E. A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. **Archives of Surgery**, v. 132, p. 1359-1369, 1988.

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

BIGEN, E.; DENAMUR, E.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. et al. DNA restriction fragment-length polymorphism differentiates crossed from independent infections in nosocomial *Xanthomonas maltophilia* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1348-1350, 1991.

BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L. et al. Short-chain fructooligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 113-116, 1999.

BROOKS, S. G., MAY, J., SEDMAN, P. et al. Translocation of enteric bacteria in humans. **British Journal of Surgery**, v. 80, p. 901-902, 1993.

CAETANO, R. C. P. S. **Crescimento de *Klebsiella* em dieta enteral**. 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

CAMPBELL, S. M. Preventing microbial contamination of enteral formulas and delivery systems. **Colombus, OhioRoss Laboratories**, v. 1, p.1-18, 1995.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 136-140, 1997.

CARVALHO, M. L. R.; MORAIS, T. B.; SIGULEM, D. M. Pontos críticos no controle da manipulação de dietas enterais no Município de São Paulo. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 14, p. 145-155, 1999.

COPPINI, L. Z.; VASCONCELOS, M. I. L. Preparo da nutrição enteral industrializada. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 641-648.

COTTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. et al. **Robbins pathologic basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. 1425 p.

FREEDLAND, C. P.; ROLLER, R. D.; WOLFE, B. M. et al. Microbial contamination of enteral nutrition systems during prolonged intermittent use. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.13, p. 23-25, 1989.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. 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. 3010-3111, 2002.

GIANOTTI, L.; ALEXANDER, J. W.; FURUSHIMA, R. et al. Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense, and survival in thermally injured mice. **Journal of Surgery Research**, v. 62, p. 53-58, 1996.

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

IDENO, K. T. Enteral nutrition. In: Gottschlich, M. M.; Matarese, L. E. (Eds.) **Nutrition support dietetics**, 2.ed. Silver Spring, USA: American Society of Parenteral and Enteral Nutrition. 1993. p. 71-104.

INAMURA, T.; MIURA, S.; TSUZUKI, Y. et al. Alteration of intestinal lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. **Immunology Letters**, v. 90, p. 3-11, 2003.

JONES, W.; BARBER, A. E.; KAPUR, S. et al. Pathophysilologic glucocorticoid levels and survival of translocating bacteria. **Archives of Surgery**, v. 126, p. 50-55, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **A histologia e seus métodos de estudo**. 8.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1995, p. 1-18.

HAVENAAR, R.; BONNIN-MAROL, S.; VAN DOKKUM et al. Inulin: fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. **Food Review International**, v. 15, p. 109-120, 1999.

KAPKAC, M.; ERIKOGLU, M.; TUNCYUREK, P. et al. Fiber enriched diets and radiation induced injury of the gut. **Nutrition Research**, v. 23, p. 77-83, 2003.

KAPLAN, H. ; HUTKINS, R. W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2682-2684, 2000.

KORVICK, J. A.; BRYAN, C. S.; FARBER, B. et al. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combination versus monotherapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 36, p. 2639-2644, 1992.

LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIERE, H. M. et al. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 2231-2235, 1999.

MACÍAZ, M. E. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N.C. et al. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lac. acidophilus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 407-411, 1992.

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

MÄKINEN, K. K. Latest dental studies on xilitol and mechanism of action limitation. In: Grenby, T. H. (Ed.) **Progress in sweeteners**. London: Elsevier, 2000. p. 331-362.

- MARTEAU, P. Probiotics in clinical conditions. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 22, p. 255-273, 2002.
- MEHALL, J. R.; KITE, C. A.; SALTZMAN, D. A. et al. Prospective study of incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, p. 1177-1182, 2002.
- MITNE, C.; SIMÕES, A. M. G.; WOKAMOTO, D. et al. Análise das dietas enterais artesanais. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16, p. 100-109, 2001.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Review**, v. 50, p. 438-446, 1992.
- MONTGOMERIC, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. **Review of Infectious Disease**, v. 1, p. 736-753, 1984.
- MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A. et al. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1815-1818, 1998.
- NAKASAKI, H.; MITOMI, T.; TAJIMA, T. et al. Gut bacterial during total parenteral nutrition in experimental rats and its countermeasure. **The American Journal of Surgery**, v. 175, p. 38-53, 1998.
- NESTLÉ. **Fibras em nutrição enteral, 2003**. Disponível em: <<http://nutricaoclinica.nestle.com.br/publicacoes/fibrasnutricaoenteral/index.htm>>. Acesso em: 18 jan 2003.
- OLIVEIRA, G. P. C.; WAITZBERG, D. L. Contaminação microbiológica em nutrição enteral. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na Prática Clínica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 649-658.
- OLIVIERA, M. H.; BONELLI, R.; AIDOO, K. E. et al. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. **Nutrition**, v. 16, p. 729-733, 2000.
- O'SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – na overview. In: Oligosaccharides and probiotic bacteria. **Bulletin of International Dairy Fed**, p. 23-29, 1996.
- OTHA, A.; OHTUKI, M.; TAKIZAWA, T. et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. **International Journal of Vitaminology Nutrition Research**, v. 64, p. 316-323, 1994.
- OTHA, A.; OHTUKI, M.; BABA, S. et al. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2417-2424, 1995a.

- OTHA, A.; OHTUKI, M.; BABA, S. et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **Journal of Nutrition Science of Vitaminology**, v. 41, p. 281-291, 1995b.
- OTHA, A.; MOTOHASHI, Y.; SAKAY, K. et al. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9K in the large intestine of gastrectomized rats. *Scand. Journal of Gastroenterology*, v. 33, p. 1062-1068, 1998a.
- OTHA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M. et al. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9K differently in the mucosa of the small intestine of rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 934-939, 1998b.
- PARHAM, P. Elementos do sistema imune e seu papel na defesa. In: **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 1-30.
- PEREIRA, S. C. L. **Patogenicidade de *Klebsiella* spp. isolada de dietas enterais**. 2001. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- RAYES, N.; HANSEN, S.; SEEHOFER, D. et al. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. **Nutrition**, v. 18, p. 609-615, 2002.
- ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A. E.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 11-19, 1998.
- PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. A. M. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, A.; PEREIRA, F. E. L.; PITTELLA, J. E. H. et al. **Bogliolo: patologia geral**. Belo Horizonte: Guanabara Koogan S. A., 1993. p. 89-143.
- SALZMAN, A. L., WANG, H., WOLLERT, P. S. et al. Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 633-646, 1994.
- TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota por meio do uso de probiótico, prebiótico e simbiótico**. 2001. 113 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SAPETH, G; GOTTWALD, T.; HIRNER, A. Fibre is an essential ingredient of enteral diets to limit bacterial translocation in rats. **The European Journal of Surgery**, v. 7, p. 513-518, 1995.
- SEDMAN, P. C., MACFIE, J., SAGAR, P. et al. The prevalence of gut translocation in humans. **Gastroenterology**, v. 107, p. 643-649, 1994.
- SOBOTKA, L.; BRÁTOVA, M.; SLEMROVÁ, J. M. et al. Inulin as the soluble fiber in liquid enteral nutrition. **Nutrition**, v. 13, p. 21-25, 1997.

SULLIVAN, M. M.; SORREDA-ESGUERRA, P.; SANTOS, E. E. et al. Bacterial contamination of blenderized whole food and commercial enteral tube feeding in the Philippines. **Journal of Hospital Infection**, v. 49, p. 268-273, 2001.

VERNET, V.; PHILIPPON, A.; MADOULET, C. et al. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 51-57, 1995.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W.; CORREIA, I. T. D. Hospital malnutrition: the brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, p. 573-580, 2001a.

WAITZBERG, D. L.; FADUL, R. A.; VAN AANHOLT, D. P. H. et al. Indicações e técnicas de ministração em nutrição enteral. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001b. p. 561-572.

WAITZBERG, D. L.; RODRIGUES, J. G.; CORREIA, M. I. T. Desnutrição hospitalar no Brasil. In: Waitzberg, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001c. p. 385-398.

WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; SIMMONS, R. L. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. **Archives of Surgery**, v. 122, p. 48-53, 1987.

WELSH, M. J., SHASBY, D. M.; HUSTED, R.M. Oxidants increase paracellular permeability in a cultured epithelial cell line. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 1155-1168, 1985.

WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 397-425, 2003.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBLELIK, A. R.; LIVAR; K. J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, J., WINTER, M.; SHASBY, D. M. Oxidants, ATP depletion, and endothelial permeability to macromolecules. **Blood**, v. 76, p. 2578-2582, 1990.

YBARRA, L. M. **Influência de prebiótico e sulfato ferroso na modulação da microbiota intestinal humana e murina e do prebiótico associado ao cálcio na biodisponibilidade de minerais**. 2003. 245 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.

## APÊNDICE A

Tabela 1A - Resumo da análise de variância das variáveis peso do animal (PA) e peso do ceco (PC) de camundongos

FV	GL	QM	
		PA	PC
Tratamento (T)	8	61,8264**	0,017922**
Resíduo a	9	3,5514	0,003397
Dias (D)	4	17,6846**	0,010407*
D x T	32	11,7104**	0,004749 <sup>NS</sup>
Resíduo b	36	4,4043	0,003696
CV (%) parcela		8,63	24,34
CV (%) subparcela		9,61	25,39

\*\* F significativo a 1% de probabilidade.

\* F significativo a 5% de probabilidade.

<sup>NS</sup> F não-significativo a 5% de probabilidade.