

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Graduação em Nutrição

COLONIZAÇÃO INTESTINAL COM PROBIÓTICO
***LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG* EM ZEBRAFISH ADULTO**
(Danio rerio)

Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro

Porto Alegre, 2018

Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro

**COLONIZAÇÃO INTESTINAL COM PROBIÓTICO
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG EM ZEBRAFISH ADULTO
(*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valesca Dall'Alba

Porto Alegre, 2018

AGRADECIMENTOS

À dr^a prof^a Valesca Dall Alba pela oportunidade de ser seu bolsista de iniciação científica em seus trabalhos experimentais, e por ter sido minha querida orientadora deste presente trabalho. Guardo muito carinho, respeito, admiração, e principalmente aprendizado por sua postura e conhecimento.

Aos colegas de laboratório pelos muitos momentos de aprendizado, conversas e brindes. Guardo muitas lembranças com carinho das diferentes pessoas que compuseram o LEHG neste tempo em que me fiz presente.

Aos amigos e colegas de graduação. Estes anos repletos de discussões e conversas terapêuticas sobre diferentes assuntos de dentro e fora dos temas acadêmicos me fizeram crescer muito. O apoio de vocês foi imprescindível.

À família. O incentivo que tive desde sempre para o estudo foi essencial. É provável que eu não conseguisse entrar ou terminar este curso caso não fosse o apoio, carinho e estímulo que recebo da minha família. Meu amor, carinho e gratidão a quem está comigo desde sempre.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As experiências que obtive a partir da minha vivência neste espaço, com as pessoas que conheci, foram importantíssimas para me transformar em quem sou hoje, e isso me faz muito grato.

RESUMO

INTRODUÇÃO – O efeito protetor desempenhado pelos probióticos no desenvolvimento de diversas doenças hepáticas e intestinais vem sendo demonstrado em uma série de estudos tanto experimentais quanto clínicos. A presença no intestino é um pré-requisito para que o probiótico tenha sua ação efetiva. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar uma dose efetiva de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) capaz de promover colonização intestinal em modelo experimental de zebrafish *wild type* adulto.

METODOLOGIA – Os peixes foram divididos em 4 grupos (8 peixes/grupo), sendo testadas 3 diferentes doses de probiótico: 0,4 mg/animal/dia, 1 mg/animal/dia e 2 mg/animal/dia, além de um grupo controle que não recebeu probióticos. Após 14 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e coletados seus intestinos, sendo feitas as análises de PCR com *primers* específicos e avaliação microbiológica em placa.

RESULTADOS - A partir das análises com os intestinos coletados, a dose de 1 mg/animal/dia foi a que apresentou crescimento mais homogêneo quando comparado às outras doses.

CONCLUSÃO - Neste estudo foi possível testar diferentes doses do probiótico LGG no modelo experimental de zebrafish. Após todas as análises, a dose de 1 mg/animal/dia do probiótico demonstrou ser mais efetiva na colonização intestinal.

Palavras-chave: Probióticos, Microbiota, Colonização, Zebrafish.

LISTA DE SIGLAS

LGG - *Lactobacillus rhamnosus* GG

TNF – Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

DM – Diabetes Mellitus

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

CHC – Carcinoma hepatocelular

RI – Resistência à insulina

TGI – Trato Gastrointestinal

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

IFN- γ – Interferão gama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo experimental Zebrafish

Figura 2 – PCR com *primers* específicos para confirmação de cepa de LGG

Figura 3 – Avaliação microbiológica em placa para avaliação do crescimento de colônias de LGG

SUMÁRIO

Sumário

LISTA DE SIGLAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
SUMÁRIO.....	6
INTRODUÇÃO	7
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
Probióticos	9
Probiótico: Lactobacillus rhamnosus GG	10
Microbiota	10
Microbiota, Inflamação e Doença Hepática.....	12
Modelo experimental zebrafish	13
JUSTIFICATIVA	15
OBJETIVO.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
Peixes e condições experimentais	17
Alimentação	17
Local do estudo.....	17
Desenho experimental	18
Anestesia, eutanásia e coleta das amostras	18
Análises intestinais.....	18
Aspectos éticos	19
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO:.....	25
PERSPECTIVAS FUTURAS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos, que quando consumidos em quantidade suficientes, podem tornar-se benéficos ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Podem ser adicionados no preparo de diversos alimentos, produtos, suplementos dietéticos e medicamentos. As cepas de probióticos são identificadas segundo seu gênero, espécie, subespécie (se corresponder) e uma denominação alfanumérica que identifica uma cepa específica. Os probióticos alteram a comunidade bacteriana intestinal aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos, o que afeta o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa e os não-imunes através de um antagonismo e concorrência com os patogênicos potenciais. Pensa-se que esses fenômenos conduzem a efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e gravidade da diarreia, a patologia que mais se beneficia do uso de probióticos (CARUFFO et al., 2015; GUARNER; ELLEN SANDERS, 2017; JAIN; GUPTA; JAIN, 2014; WHO, 2015).

Em relação ao uso de probiótico nas doenças hepáticas, estudos têm demonstrado um efeito protetor contra o aparecimento da esteatose, uma melhora do perfil metabólico (CANO et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2014) e uma redução dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (LOGUERCIO et al., 2002; WAGNERBERGER et al., 2013). Quanto à relação entre probióticos e doenças hepáticas em um público infantil, um estudo com crianças portadoras de doença hepática pelo fator obesidade, foi submetido à suplementação de LGG por oito semanas, mostrando redução significativa de AST, quando comparado ao grupo placebo (VAJRO et al., 2011). Em relação à doença hepática alcoólica, a utilização de LGG também tem demonstrado resultados positivos. Schneider e colaboradores avaliaram a exposição de LGG a partir de um modelo com etanol, demonstrando reduções dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e esteatose hepática em zebrafish (SCHNEIDER et al., 2014).

O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) como uma bactéria Gram-positiva, pertencente ao filo *Firmicutes*, apresentando características como o crescimento preferencial anaeróbico, a produção de substâncias antibacterianas e a fermentação de xilose, trealose, sorbitol, manitol, glicose, frutose, ramnose, entre outros. O LGG também é conhecido por prevenir a disfunção da barreira intestinal causada por reações inflamatórias e reduzir a infecção intestinal e diarreia (DONATO et al., 2010).

O número de pesquisas experimentais com zebrafish (*Danio rerio*) vêm crescendo nos últimos 20 anos (AMALI et al., 2006; THAKUR et al., 2011). Também conhecido como paulistinha, é um peixe pequeno de água doce. Apresenta diversas vantagens como modelo experimental, como facilidade de manejo, reprodução e manutenção. Apresenta excelente homologia anatômica, imunológica, fisiológica e molecular com mamíferos (PARNG et al., 2002). O fígado dos peixes e dos mamíferos possuem as mesmas funções metabólicas, como no processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, formação de bile e metabolismo de composto xenobióticos (SHIMADA et al., 2015). A diferença mais significativa entre o fígado dos mamíferos e dos peixes teleosteos é a inexistência do clássico lóbulo hepático, com os respectivos espaços-porta. O peixe possui veia porta, artérias hepáticas e ductos biliares que, no entanto, estão distribuídos aleatoriamente no parênquima hepático (TAO; PENG, 2009).

A utilização do zebrafish foi padronizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE-HCPA) desde 2007 (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Outro estudo padronizou a melhor forma da coleta de sangue no zebrafish (PEDROSO et al., 2012), e ainda, foi avaliado o efeito da taurina na esteatose hepática induzida por tioacetamida (HAMMES et al., 2012).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que quando consumidos em quantidade suficientes podem tornar-se benéficos ao hospedeiro, e podem ser adicionados no preparo de diversos alimentos, produtos, suplementos dietéticos e medicamentos. Tais probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, gerando produtos metabólicos finais, como ácidos graxos de cadeia curta, e se comunicando com as células do hospedeiro através de sinais químicos. Estes mecanismos podem conduzir ao antagonismo de patógenos potenciais, a melhorar o ambiente intestinal, fortalecer a barreira intestinal, à regulação negativa da inflamação e à regulação positiva da resposta imune a desafios antigênicos. Estima-se que esses fenômenos conduzem a efeitos benéficos, inclusive redução da incidência e gravidade da diarreia, a patologia que mais se beneficia do uso de probióticos (GUARNER; ELLEN SANDERS, 2017).

De acordo com a legislação brasileira, os probióticos são definidos como suplementos alimentares microbianos vivos que afetam benéficamente o organismo pela melhora do seu balanço microbiano (ANVISA, 2003). Os probióticos estão disponíveis como suplementos alimentares, na forma de pó, cápsulas e tabletes, ou em alimentos, como iogurtes, queijos, leites fermentados e não fermentados, em sumos e bebidas de soja, ou ainda em produtos terapêuticos, onde são adicionados liofilizados (BOSSCHER et al., 2009).

As propriedades das bactérias probióticas estão relacionadas não somente com o gênero da bactéria, mas especialmente com sua cepa. Uma cepa específica produz benefícios específicos, assim o efeito de uma cepa bacteriana não pode ser extrapolado para outras do mesmo gênero (GUARNER; MALAGELADA, 2003). As cepas de probióticos são identificadas segundo seu gênero, espécie, subespécie (se corresponder) e uma denominação alfanumérica que identifica uma cepa específica, por exemplo,

Lactobacillus casei DN114001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103 (GUARNER; ELLEN SANDERS, 2017).

Probiótico: *Lactobacillus rhamnosus* GG

O *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), ATCC 53103, foi originalmente isolado a partir de amostras fecais humanas por Sherwood Gorbach e Barry Goldwin, por isso as letras GG em seu nome. Bactéria Grampositiva e anaeróbia, o LGG foi identificado como uma potencial estirpe probiótica, inicialmente devido à sua excelente resistência ao ácido biliar e boa capacidade de adesão à camada epitelial intestinal (KANKAINEN et al., 2009). A nomenclatura da espécie deriva da capacidade do LGG para metabolizar e fermentar a ramnose, uma característica bioquímica que é usada para identificar esta espécie de *Lactobacillus*.

O efeito sobre o sistema imunológico é explicado pela estimulação e produção de citocinas diferentes, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e uma proteína particular, p40, segregada por Células GG de *L. rhamnosus* que podem reduzir o estado inflamatório e a apoptose das células epiteliais intestinais (CLAES et al., 2012). Portanto, LGG é bem caracterizada e é conhecido por ter vários efeitos anti-inflamatórios (KHAILOVA et al., 2017).

Como apresenta excelente efeito de adesão à mucosa intestinal, o LGG é frequentemente selecionado como candidato a probiótico para a prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais e diarreia. Os efeitos de suplementação oral de LGG apresentam diminuição de sintomas como dor abdominal e diarreia, tanto em um público infantil quanto em adultos (SEGERS; LEBEER, 2014).

Microbiota

A microbiota intestinal tornou-se uma fonte de estudo extremamente importante para o conhecimento e tratamento de muitas patologias. Uma questão que ainda está em aberto é se o trato gastrointestinal (TGI) é um órgão estéril ao nascimento e que iria adquirindo microrganismos logo após o parto.

Mas o fato é que o microambiente do TGI pode ser modulado por uma série de fatores ambientais como a dieta, medicamentos, exercício, entre outros (BOUTER et al., 2017). Embora tenha essa característica, sabe-se que a microbiota é bastante estável e tende sempre a retornar às suas características basais.

Dentre as principais funções da microbiota, destacam-se a imunomodulação, contribuição nutricional e resistência à colonização por bactérias patogênicas, metabolização de compostos tóxicos, inibindo agentes patogênicos, além do processamento de alimentos, digestão de polissacarídeos não digeríveis complexos e síntese de vitaminas. Sofre alterações por fatores externos e internos como o meio ambiente, antibióticos, sistema imunológico, genético, probióticos, prebióticos e a dieta (PAIXÃO; CASTRO, 2016). Distúrbios da microbiota residente têm sido relacionados com uma lista cada vez maior de enfermidades (QUIGLEY, 2013). A dieta exerce importante influência sobre a microbiota nos diferentes estados de doenças e identificam vários metabólitos microbianos que orquestram os aspectos cruciais do diálogo entre microrganismo e o hospedeiro. Descobertas recentes identificaram perfis e metabólitos específicos da microbiota como preditores de risco de doença, bem como determinar as espécies microbianas que se correlacionam com a saúde e a doença (JOYCE; GAHAN, 2014).

A importância da manutenção de uma microbiota intestinal saudável tem sido reconhecida de maneira empírica há bastante tempo, porém recentemente tem se dado uma atenção específica ao potencial dos probióticos como agentes preventivos e terapêuticos. As comunidades residentes que compõem a microbiota são conhecidas como autóctones, porém, também existem comunidades transitórias, que se estabelecem apenas durante um determinado período. Entre estes microrganismos transitórios, estão os probióticos, a maioria dos quais não coloniza permanentemente o trato digestivo (GUARNER; MALAGELADA, 2003; NAVA; STAPPENBECK, 2011).

Dentre as principais bactérias que compõe a microbiota entérica estão as benéficas e/ou probióticas e as patogênicas. Como exemplo de probióticas, temos as Bifidobactérias e Lactobacilos (*Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium*

spp., *Lactobacillus spp.*), e para as nocivas podem ser citadas a *Enterobacteriaceae* e *Clostridium spp.* São encontrados também na microbiota entérica a *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Ruminococcus* (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Microbiota, Inflamação e Doença Hepática

Pela importância do órgão, as doenças do fígado compreendem muitas das mais relevantes doenças de saúde pública. Embora as doenças que afetem o fígado sejam bastante complexas, pois envolvem o papel central do fígado no metabolismo e na desintoxicação, as principais classificações de doença hepática incluem doença hepática alcoólica (DHA), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hepatites e câncer. Embora o desenvolvimento e o resultado da doença sejam ditados pela genética do hospedeiro, há influência de uma variedade de fatores ambientais, como dieta, infecção e consumo de álcool, sendo que os mecanismos pelos quais todos esses fatores afetam a suscetibilidade à doença podem ser vistos do prisma da inflamação (CHASSAING; ETIENNE-MESMIN; GEWIRTZ, 2014).

Muitas doenças do fígado estão associadas a marcadores elevados de inflamação, especialmente citocinas pró-inflamatórias, que supostamente desempenham papel no desenvolvimento de tais doenças. Os estudos apoiam a ideia de que a microbiota desempenha um importante papel na inflamação, e conseqüentemente, nas doenças hepáticas. A alteração da composição da microbiota intestinal e/ou da permeabilidade intestinal pode resultar em produtos microbianos que ativam receptores que impulsionam a expressão gênica pró-inflamatória, promovendo a doença hepática (CHASSAING; ETIENNE-MESMIN; GEWIRTZ, 2014).

Pensando em estratégias que buscam diminuir o estado inflamatório, um ponto importante a se destacar é que o antagonismo da sinalização imune inata pode resultar em maior disbiose bacteriana e conseqüentemente impulsionar a expressão gênica de alguns pró-inflamatórios em alguma proporção. Assim, pode ser mais eficaz direcionar diretamente à microbiota intestinal para restaurá-la a um estado mais saudável, o que presumivelmente

invocaria uma expressão gênica pró-inflamatória reduzida no hospedeiro. Sendo tal restauração e/ou manipulação feita a partir de probióticos, entre outros como prebióticos, antibióticos e/ou transplante de microbiota. Em ratos com DHGNA induzida a partir de frutose, o tratamento com *Lactobacillus casei Shirota* foi um fator de proteção contra o desenvolvimento da doença (WAGNERBERGER et al., 2013). Já em ratos com DHA induzida com álcool por gavagem, o tratamento com *Lactobacillus rhamnosus GG* foi associado com redução de marcadores de estresse oxidativo intestinal e hepático, inflamação e preservação da função da barreira intestinal, ou seja, um fator de proteção contra a doença em questão (FORSYTH et al., 2009).

Modelo experimental zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo (2 ~ 4 cm) de água doce que vem sendo utilizado amplamente em pesquisas científicas como modelo de vertebrados. Sua utilização se justifica devido à facilidade de manutenção, manipulação e relativo baixo custo (BRIGGS, 2002; SCHNEIDER et al., 2009). Os animais são pequenos, logo ocupam espaços físicos menores, têm curto ciclo de vida, possuem homologia anatômica, imunológica, fisiológica e molecular com mamíferos (MCGRATH; LI, 2008).



Figura 1. Modelo experimental zebrafish

O zebrafish é bastante utilizado como modelo de experimentação para o estudo de doenças hepáticas, devido ao fígado desse peixe exercer as mesmas funções metabólicas que os fígados dos mamíferos. O fígado de peixes e mamíferos é semelhante, visto que ambos são encapsulados,

apresentam sinusóides, e o suprimento sanguíneo é proveniente de ramos da artéria hepática e veia porta (GOESSLING; SADLER, 2015; WOLF; WOLFE, 2005). Entretanto, há diferenças, esse órgão, em peixes, não se arranja em espaços porta e os hepatócitos estão organizados em túbulos que vão de encontro aos ductos biliares e não em colunas, como nos mamíferos (GOESSLING; SADLER, 2015).

O fígado do zebrafish está totalmente formado em 72 horas após a fertilização (PASSERI et al., 2009). Embora haja algumas diferenças entre o fígado desses animais e o humano, de uma forma geral, há mais semelhanças do que diferenças, principalmente em relação à anatomia, fisiologia e características bioquímicas (WOLF; WOLFE, 2005).

O trato digestivo do zebrafish adulto é assim composto: boca, faringe, esôfago, intestino e ânus, não possuindo estômago. O esôfago se diferencia em intestino, consistindo em um tubo longo inicialmente largo e progressivamente mais estreito no sentido rostral-caudal. O intestino preenche a cavidade abdominal e possui três divisões funcionais: anterior, média e posterior. A porção anterior, também conhecida como bulbo intestinal, é onde se encontram as principais enzimas responsáveis pela digestão, sendo o principal local de digestão de lipídios e proteínas (MUDUMANA et al., 2004). Como o bulbo intestinal do zebrafish não possui glândulas gástricas, o pH intestinal não costuma ficar abaixo de 7,5 (NALBANT et al., 1999).

O bulbo, a porção média e o terço anterior caudal do intestino correspondem ao intestino delgado dos mamíferos, e a porção posterior corresponde ao intestino grosso, onde se acaba no ânus (WANG et al., 2010). Se comparado com o intestino dos mamíferos, o intestino do zebrafish apresenta uma arquitetura simples, mas com a região das vilosidades homóloga em estrutura e função. O segmento posterior do intestino possui maior quantidade de microrganismos do que o segmento anterior, como nos mamíferos (RAWLS; SAMUEL; GORDON, 2004).

JUSTIFICATIVA

A microbiota tem se demonstrado como uma das grandes fontes de estudo e produção científica na área da saúde nos últimos anos, pois apresenta relevância clínica em um grande espectro de doenças, explicada por sua função imune. Os resultados obtidos na utilização do probiótico como agente terapêutico em diversas doenças hepáticas e intestinais têm concretizado a sua importância para a saúde, dada sua atividade imunomoduladora e protetora junto a microbiota intestinal, além da relativa acessibilidade e segurança do produto. Por outro lado, negligenciar a importância da utilização de probióticos pode significar deixar de lado uma promissora terapia a diferentes doenças em diferentes níveis de desenvolvimento.

Como a pesquisa científica busca elucidar a realidade para analisá-la de uma forma efetiva e verdadeira, este trabalho busca encontrar uma dose efetiva de (LGG) para a colonização intestinal do modelo zebrafish, para que assim seja dado seguimento às pesquisas envolvendo tal probiótico com este promissor modelo experimental.

Vale salientar que este trabalho serve como parte de um trabalho maior, onde, uma vez estabelecida a dose efetiva, o probiótico LGG foi adicionado à ração dos animais para avaliar seu efeito protetor na esteatose induzida por etanol em um modelo de Doença Hepática Alcoólica (DHA) em zebrafish. Para isto, foi necessário determinar uma dose efetiva na colonização intestinal do probiótico (LGG) no modelo de zebrafish.

OBJETIVO

Determinar a dose efetiva do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) para promover colonização intestinal de zebrafish *wild type* adulto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Peixes e condições experimentais

Os peixes zebrafish *wild type* adultos foram adquiridos de um comerciante local em Porto Alegre, RS, Brasil. Os animais passaram por um período de adaptação (15 dias) no novo local, sendo estes aclimatados e observados. Nesse período ocorre maior mortalidade devido ao estresse do animal pelo transporte e novo ambiente, assim animais doentes podem ser detectados e retirados. O ambiente é climatizado e os aquários possuem sistemas de filtragem e aeração, termostatos e termômetros. Os peixes adultos foram mantidos em aquários com a densidade de no máximo 5 peixes/litro de água, com ciclo de luz de 14 horas, alimentados com ração específica e mantidos em temperatura entre $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Semanalmente foram verificados os parâmetros de qualidade da água dos aquários: pH, presença de nitratos e nitritos, amônia e oxigênio dissolvido.

Alimentação

Os animais foram alimentados com ração granulada na frequência de 4 vezes ao dia em 5 dias da semana, e 2 vezes ao dia em 2 dias da semana. Foi utilizado 7% do peso do peixe para cálculo da quantidade diária de ração oferecida ao animal, o que equivale a aproximadamente 51 kcal/peixe/dia. A composição do alimento foi: 60% farinha de soja, 31% farinha de milho, 5% farinha de peixe, 0,5% óleo de soja e o restando em um *mix* de vitaminas e minerais.

Local do estudo

Este projeto foi desenvolvido majoritariamente no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizando como áreas de apoio a Unidade de Experimentação Animal, Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Laboratório de Patologia Experimental e o Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana.

Desenho experimental

Foram avaliados 4 grupos e 3 doses de probiótico – 0,4 mg, 1 mg e 2 mg – por 14 dias, sendo a administração do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (Culturelle®, Amerifit, Cromwell, CT), ATCC 53103, em pó junto à alimentação, misturado com a ração em flocos. Foi utilizado n = 6 animais por grupo, somados a 20% de animais como faixa de segurança para a mortalidade, totalizando 32 peixes.

Anestesia, eutanásia e coleta das amostras

Após a realização do experimento, todos os grupos foram anestesiados por imersão em triclaína, na concentração de 400µg/ml de água, e mortos por exsanguinação. Já exsanguinados pela veia retro orbital, o intestino foi devidamente coletado e armazenado para realização das análises intestinais: avaliação microbiológica das colônias e PCR para confirmação da cepa.

Análises intestinais

A avaliação microbiológica das colônias se deu por técnica de esgotamento por estrias, 20 µl do homogeneizado intestinal de cada amostra foi dispensado em placa de Petri identificada, contendo Agar Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa, Sharp, Difco ®), preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O meio MRS é específico para *Lactobacillus*. O inóculo foi espalhado com alças esterilizadas descartáveis uniformemente na superfície da placa. As semeaduras foram realizadas em triplicata, em câmara de fluxo contínuo e as placas incubadas em ambiente de microaerofilia a 37°C por 48 horas. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre as características fenotípicas das semeaduras dos intestinos dos peixes e a semeadura processada somente com a cepa pura do LGG, como controle positivo. A quantificação das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foi realizada por contagem direta do número de colônias após 36 horas de incubação.

Também foi realizado qtPCR-RT a fim de confirmar a identificação da cepa do *Lactobacillus rhamnosus* GG no intestino com primers espécie-específicos complementares à seqüência de *L. rhamnosus* 16S ribossomal DNA (TGCATCTTGATTTAATTTTG, foward; CCGTCAATTCCTTTGAGTTT, reverso). As condições de amplificação da PCR foram as seguintes: amostras com um volume final de 50 µl contendo 5 µL de DNA, 67 mM Tris-HCl, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (w/w) Tween-20 (pH 8,8 a 25°C), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 1 pmol de cada primer e 2,5 U de enzima Super-Term. A amplificação por PCR foi realizada em termociclador. O protocolo de amplificação consistiu em incubação a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação: 40 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento (62°C nos ciclos 1 a 10, a 60°C nos ciclos 11 a 20, e a 58°C nos ciclos 21 a 30), 60 segundos de síntese a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram avaliados num gel de agarose a 2% em 0,5% de tampão de Tris - borato – EDTA.

Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) que estabelece procedimentos para o uso de animais e segue regulamentos da utilização humanitária dos animais das resoluções normativas n°12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA) e n°13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

RESULTADOS

Após 14 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e coletados seus intestinos para análises posteriores.

Foram utilizados os primers espécie-específicos complementares à seqüência de *L. rhamnosus* 16S ribossomal DNA (TGCATCTTGATTTAATTTTG, forward; CCGTCAATTCCTTTGAGTTT, reverso) para confirmação da presença do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), ATCC 53103, no intestino do zebrafish, onde a confirmação do mesmo se dá como ilustra a figura 2.

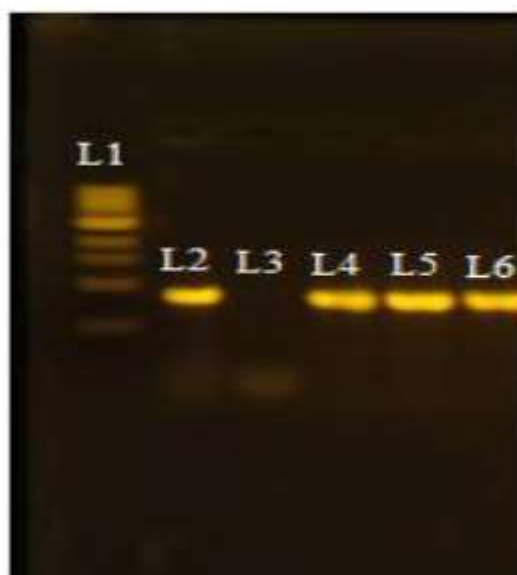


Figura 2: PCR com primers específicos para confirmação de cepa de LGG – Linha 1 (L1) – marcador de peso molecular; Linha 2 (L2) – amostra controle positivo (cepa do *Lactobacillus rhamnosus* GG); Linha 3 (L3) – amostra do grupo controle; Linha 4 (L4) – Grupo dose 0,4 mg; Linha 5 (L5) – Grupo dose 1 mg; Linha 6 (L6) – Grupo dose 2 mg.

A partir das análises de avaliação microbiológica de contagem de colônias em meio específico para *Lactobacillus* em placa foram encontrados colônias nas placas dos grupos que receberam as diferentes doses de probiótico, como ilustra a figura 3. Apesar das 3 doses conseguirem desenvolver colônias, destaca-se a dose de 1 mg/animal/dia de probiótico como uma distribuição mais homogênea e permitindo ainda uma possível contagem de colônias.

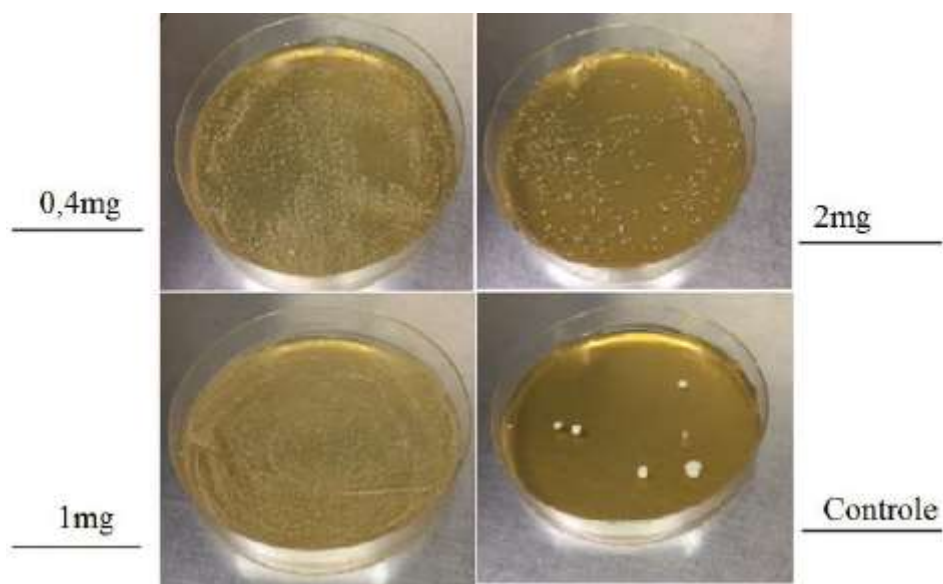


Figura 3: Avaliação microbiológica em placa para avaliação do crescimento de colônias de LGG – crescimento de colônias em meio específico para *Lactobacillus*. Foi observado um crescimento de colônias nas placas dos grupos que receberam doses de probióticos, mas destaca-se o Grupo Dose 1 mg/animal/dia, onde as colônias foram mais confluentes.

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG apresenta capacidade de colonizar o intestino do modelo experimental zebrafish.

A microbiota intestinal tornou-se uma fonte de estudo extremamente importante para o conhecimento e tratamento de determinadas patologias. O trato gastrointestinal é um órgão estéril ao nascimento, adquirindo microrganismos logo após o parto. Dentre suas principais funções, destacam-se a imunomodulação, contribuição nutricional e resistência à colonização por bactérias patogênicas. Sofre alterações por fatores externos e internos como meio ambiente, alimentação, sistema imunológico, genético, probióticos e prebióticos (PAIXÃO; CASTRO, 2016).

Como o PCR com primers espécie-específicos para LGG analisados em nosso estudo demonstraram com o resultado confirmatório, tal probiótico é capaz de colonizar o intestino do modelo de estudo em questão, o zebrafish.

A partir da avaliação microbiológica com placa para meio específico de *Lactobacillus*, a dose de 1 mg/animal/dia do probiótico LGG foi a escolhida, visto que apresentou o crescimento mais confluyente na placa, o que é interpretado como uma dose eficaz para promover colonização intestinal. Previamente Schneider e colaboradores (SCHNEIDER et al., 2014) realizaram teste de colonização com uma dose diferente de LGG também em zebrafish, entretanto não foi possível replicar os resultados por eles encontrados. Havia diferenças relacionadas ao oferecimento da ração e por consequência, do probiótico, onde os animais eram alimentados até a saciedade, diferente do padronizado no nosso.

Já existem estudos com o uso de zebrafish como modelo experimental para uso de probióticos em diferentes idades do peixe. Falcinelli e colaboradores (FALCINELLI et al., 2016) expuseram o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* diretamente na água de larvas de zebrafish, e os resultados mostraram uma regulação positiva de genes relacionados à redução do nível de glicose e concomitante redução do nível de apetite e glicose corporal, além de reforçarem a capacidade do probiótico de modular a comunidade de microbiota intestinal. Em outro estudo, Falcinelli e colaboradores (FALCINELLI

et al., 2017) explorou se o conteúdo lipídico da dieta influencia o microbioma intestinal do zebrafish adulto, enriquecendo com *Lactobacillus rhamnosus* a dieta de alguns grupos do experimento, onde foi verificado que as dietas com adição de probióticos induziram a redução transcricional de genes orexígenos, aumento de genes anorexígenos e diminuição transcricional de genes envolvidos no metabolismo de colesterol e triglicerídeos, concomitantemente com menor teor de colesterol e triglicerídeos, destacando o potencial dos probióticos para atenuar o distúrbio metabólico relacionado à dieta rica em gordura.

Tang e colaboradores (TANG et al., 2016) avaliaram a colonização de *Lactobacillus plantarum* MA2 em camundongos (modelo murino) durante 6 semanas e os resultados demonstraram colonizações no íleo, cólon e fezes, o que demonstra a sobrevivência no trato intestinal para exercer seu efeito antioxidante. Suo e colaboradores (SUO et al., 2012) investigaram em suínos recém-desmamados a colonização de *Lactobacillus plantarum* durante 60 dias e encontraram efeitos probióticos no crescimento e qualidade do suíno, sendo a hipótese para o mecanismo que a colonização inibe o crescimento de patógenos oportunistas, além de promover a altura das vilosidades. Liao e colaboradores (LIAO et al., 2015) avaliou os efeitos do *Clostridium butyricum* em 320 pintos durante 42 dias e encontrou a promoção do estado antioxidante hepático, a redução de conteúdo de colesterol no soro e na circunferência abdominal, a melhora na carne e na composição de ácidos graxos das aves no corte, concluindo-se que o aumento da concentração de ácidos graxos poli-insaturados na carne pode ser atribuído a maior atividade antioxidante no grupo suplementado com o probiótico. Caruffo e colaboradores (CARUFFO et al., 2015) investigaram as propriedades probióticas de cepas de leveduras para aplicação em aquicultura na proteção de doenças bacterianas em larvas de zebrafish, onde os resultados sugeriram que algumas leveduras intestinais do peixe podem apresentar função probiótica, se envolvendo como fator protetor contra as doenças bacterianas.

Nosso estudo apresenta uma limitação que está relacionada ao modelo experimental: como o probiótico é adicionado diretamente na água, não há como controlar se todos os peixes de um aquário ingerem exatamente as mesmas quantidades de ração e conseqüentemente de probiótico. A ração era

oferecida despejando-a lentamente pela superfície da água e os peixes nadam para o topo na busca do alimento.

A determinação da dose efetiva de LGG foi fundamental para a realização das próximas etapas, onde se pretende avaliar o efeito hepato protetor do probiótico em modelo de doença hepática alcoólica.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível testar diferentes doses do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) no modelo experimental de zebrafish *wild type* adulto. Após todas as análises, a dose de 1 mg/animal/dia do probiótico se demonstrou a mais efetiva na colonização intestinal.

A determinação da dose efetiva de LGG foi fundamental para a realização das próximas etapas, onde se pretende avaliar o efeito hepato protetor do probiótico em modelo de doença hepática alcoólica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A colonização intestinal pelo probiótico LGG é a primeira condição para que se possa verificar o seu efeito em diversos órgãos, como o fígado e intestino. Tendo em vista que a dose de 1 mg apresentou o melhor resultado na colonização intestinal do zebrafish, será possível, a partir deste trabalho, avaliar seu efeito hepatoprotetor e de preservação da barreira intestinal, apesar dos efeitos deletérios do álcool. No futuro, seria interessante avaliar seus efeitos também no microbioma intestinal, determinando alterações em relação a bactérias probióticas e patogênicas, e seus possíveis benefícios terapêuticos nas doenças hepáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAVV. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. **Fao & Who**, n. October, p. 1–34, 2001.

AMALI, A. A. et al. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. **J Biomed Sci**, v. 13, n. 2, p. 225–232, 2006.

BOSSCHER, D. et al. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. **J Physiol Pharmacol**, v. 60 Suppl 6, p. 5–11, 2009.

BOUTER, K. E. et al. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1671–1678, 2017.

BRASIL, C. C. LEI N° 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. **Constituição Federal**, p. 4–9, 2008.

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 1, p. R3–R9, 2002.

CANO, P. G. et al. Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 11, p. 2310–2321, 2013.

CARUFFO, M. et al. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1093, 2015.

CHASSAING, B.; ETIENNE-MESMIN, L.; GEWIRTZ, A. T. Microbiota-liver axis in hepatic disease. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 328–339, 2014.

CLAES, I. J. J. et al. Genetic and Biochemical Characterization of the Cell Wall Hydrolase Activity of the Major Secreted Protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31588, 2012.

DONATO, K. A. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 11, p. 3288–3297, 2010.

FALCINELLI, S. et al. Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. **Sci Rep**, v. 6, p. 18061, 2016.

FALCINELLI, S. et al. Dietary lipid content reorganizes gut microbiota and probiotic *L. rhamnosus* attenuates obesity and enhances catabolic hormonal milieu in zebrafish. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 5512, 2017.

FORSYTH, C. B. et al. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced

- intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. **Alcohol**, v. 43, n. 2, p. 163–172, 2009.
- GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361–1377, 2015.
- GUARNER, F.; ELLEN SANDERS, M. Probiotics and prebiotics. **World Gastroenterology Organization Global Guidelines**, v. 80, n. 2, p. 113–117, 2017.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512–519, 2003.
- HAMMES, T. O. et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 3, p. 675–682, 2012.
- JAIN, M.; GUPTA, K.; JAIN, P. Significance of Probiotics and Prebiotics in Health and Nutrition. **Malaya Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 181–195, 2014.
- JOYCE, S. A.; GAHAN, C. G. M. **The gut microbiota and the metabolic health of the host** *Current Opinion in Gastroenterology*, 2014.
- KANKAINEN, M. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 40, p. 17193–17198, 2009.
- KHAILOVA, L. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Clin Nutr**, v. 36, n. 6, p. 1549–1557, 2017.
- LIAO, X. et al. Effects of *Clostridium butyricum* on antioxidant properties, meat quality and fatty acid composition of broiler birds. **Lipids Health Dis**, v. 14, p. 36, 2015.
- LOGUERCIO, C. et al. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 8, p. 2144–2146, 2002.
- MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 9–10, p. 394–401, 2008.
- MUDUMANA, S. P. et al. Expression analyses of zebrafish transferrin, ifabp, and elastaseB mRNAs as differentiation markers for the three major endodermal organs: liver, intestine, and exocrine pancreas. **Dev Dyn**, v. 230, n. 1, p. 165–173, 2004.
- NALBANT, P. et al. Functional characterization of a Na⁺-phosphate cotransporter (NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. **J Physiol**, v. 520 Pt 1, p. 79–89, 1999.
- NAVA, G. M.; STAPPENBECK, T. S. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. **Gut Microbes**, v. 2, n. 2, p. 99–104, 2011.

- PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. DOS S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85–96, 2016.
- PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev Technol**, v. 1, n. 1 Pt 1, p. 41–48, 2002.
- PASSERI, M. J. et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 443–452, 2009.
- PEDROSO, G. L. et al. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. **J Vis Exp**, n. 63, p. e3865, 2012.
- QUIGLEY, E. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterol Hepatol (NY)**, v. 9, n. 9, p. 560–569, 2013.
- RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4596–4601, 2004.
- SANTOS, T.; VARAVALLO, M. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica Do Itpac**, v. 4, p. 40–49, 2011.
- SCHNEIDER, A. C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 371–378, 2014.
- SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementation of a New Experimental Animal Model - Zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009.
- SEGRS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. **Microb Cell Fact**, v. 13 Suppl 1, p. S7, 2014.
- SHIMADA, Y. et al. E2F8 promotes hepatic steatosis through FABP3 expression in diet-induced obesity in zebrafish. **Nutr Metab (Lond)**, v. 12, p. 17, 2015.
- SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. **Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas** *Ciência e Cultura* scielo/cec, , 2012.
- SUO, C. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 89, 2012.
- TANG, W. et al. Antioxidative effects in vivo and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 16, p. 7193–7202, 2016.
- TAO, T.; PENG, J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). **J Genet Genomics**, v. 36, n. 6, p. 325–334, 2009.
- THAKUR, P. C. et al. Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to

endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in cdipt-deficient zebrafish. **Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 452–462, 2011.

VAJRO, P. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 52, n. 6, p. 740–743, 2011.

WAGNERBERGER, S. et al. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 3, p. 531–538, 2013.

WANG, Z. et al. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. **BMC Genomics**, v. 11, p. 392, 2010.

WHO. **WHO | Obesity and overweight**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 1, p. 75–85, 2005.