

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

TATIANE SUELI COUTINHO

**Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre  
*Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**

Lorena – SP  
2008

TATIANE SUELI COUTINHO

**Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre  
*Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**

Dissertação apresentada a Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada  
Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Lorena – SP  
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Universitária  
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Coutinho, Tatiane Sueli

Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos / Tatiane Sueli Coutinho ; orientador Ismael Maciel de Mancilha. --Lorena, 2008  
63 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Microbiologia Aplicada 2. Probióticos 3. *Lactobacillus* 4. *Cryptosporidium parvum*. I. Título.

579.6 - CDU

## **DEDICATÓRIA**

A minha família, principalmente meus pais, pelo incentivo e amor dado sempre. Com admiração e muito carinho, este título é em homenagem a vocês meus exemplos de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a DEUS por mais essa conquista em minha vida. Tenho certeza que foi graças à força, que o SENHOR me deu, que venci mais essa batalha.

Aos meus pais, irmãos, cunhados e sobrinhos que me estimularam nos momentos de dificuldades, dando apoio sempre e, principalmente muito amor e carinho.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha pela orientação, paciência e, principalmente pelo apoio e confiança em meu trabalho. Adorei ter você como “chefinho”.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Júlia pelos ensinamentos, conselhos e principalmente pela amizade adquirida durante esta caminhada.

Ao Davi pela paciência, companheirismo e amor dado constantemente.

À minha fiel escudeira, Heloísa, que foi uma grande companheira, dando-me um ombro amigo e força nos momentos de dificuldades. Você é muito especial para mim.

A todos meus amigos do DEBIQ, em especial, aos amigos do Laboratório de Probióticos, Luiz Carlos, Taís e Márcio pela compreensão e por tornar meu ambiente de trabalho ainda melhor.

Aos meus amigos que não são do DEBIQ, em especial Luciane, Kariana, Roberta, Juliana, Juliana Torres, Marcela, Antônio Carlos, Gessana, Mara, Raquel (a rainha do biotério...rs) e Débora (uma doutora linda...Sinto sua falta!).

A todos os funcionários e professores do DEBIQ que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

À Faculdades Integradas Teresa D'Ávila, FATEA, por ter cedido o biotério para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

## RESUMO

COUTINHO, T. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos.** 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

Os probióticos são produtos ou preparações que contém microrganismos viáveis, com concentrações definidas, capazes de alterar a microbiota intestinal do hospedeiro, exercendo efeitos benéficos a sua saúde. Os microrganismos mais usados para esta finalidade são as bactérias lácticas, destacando-se espécies de *Lactobacillus*. Apesar do avanço científico nesta área, poucos estudos são encontrados a respeito da ação probiótica sobre protozoários, como *Cryptosporidium parvum*, um parasito intestinal importante por causar uma das principais infecções oportunistas em indivíduos imunodebilitados, como aidéticos e transplantados. Os produtos probióticos podem ser uma alternativa para o tratamento da criptosporidiose, uma vez que, ainda, não há um tratamento eficaz contra esta parasitose. Sendo assim, o presente estudo visou avaliar a ação de cepas de *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* e *L. delbruekii*, na forma de *pool*, sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos imunossuprimidos. Os experimentos foram desenvolvidos utilizando-se 42 animais divididos em seis grupos: **Controle** - não imunossuprimidos, não infectados e não tratados; **Imuno** - imunossuprimidos, não infectados e não tratados; **Não tratado** - imunossuprimidos, infectados e não tratado; **NTZ** - imunossuprimidos, infectados e tratados com o antiprotozoário nitazoxanida (150mg/kg); **PRO** - imunossuprimidos, infectados e tratados com a preparação probiótica ( $3 \times 10^{12}$  UFC/mL); e, **Preventivo** - imunossuprimidos, tratados com a preparação probiótica e posteriormente infectados. Após 12 dias de imunossupressão os animais foram infectados com  $1,6 \times 10^6$  oocistos e, os respectivos tratamentos iniciados após cinco dias da inoculação dos oocistos. A infecção foi analisada pela contagem de oocistos nas fezes, purificados pela técnica de sedimentação de formol-éter. A colonização intestinal pelos lactobacilos foi analisada pela técnica de "pour plate" em ágar MRS com antibiótico Rifampicina. O desempenho nutricional dos camundongos foi analisado por meio da conversão alimentar, uma relação entre a quantidade de ração consumida e o ganho de peso dos animais. Os resultados demonstraram que os animais que receberam o tratamento preventivo com os probióticos apresentaram uma eliminação de oocistos significativamente menor ( $P \leq 0,05$ ) que os demais grupos infectados. O tratamento com a preparação probiótica, pós-infecção, também se mostrou eficaz, pois todos os animais eliminaram a infecção. Estes resultados podem ser explicados por meio do mecanismo de ação conhecido como exclusão competitiva, devido a colonização do trato gastrointestinal ou, pela produção de substância antimicrobiana, produzida por *Lactobacillus*, que apresentou ação sobre os oocistos. Observou-se, também, que os animais tratados com probióticos tiveram um melhor desempenho nutricional. Estes resultados confirmam a hipótese que microrganismos com propriedades probióticas representam uma forma alternativa, e promissora, na prevenção e tratamento da criptosporidiose.

**Palavras-chave:** Probióticos. *Lactobacillus*. *Cryptosporidium parvum*.

## ABSTRACT

COUTINHO, T. S. **Evaluation of the effect of probiotics microorganisms on *Cryptosporidium parvum* in immunodeficient C57BL/6 mice.** 2008. 63f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

The probiotics are products or preparation containing viable microorganisms, in defined concentrations, capable of change the host's *microbiota*, exerting beneficial effects on the host's health. The most important microorganisms which present these properties belong to the group of lactic acid bacterium, mainly species of *Lactobacillus*. Even though technological advances in this area, few studies are found concerning the action probiotics on protozoan, as *Cryptosporidium parvum*, an important intestinal parasite which causes one of the main opportunist infection in immunodeficient individuals, such as AIDS and transplanted patients. The probiotics products can be an alternative to treatment against cryptosporidiosis, since, so far an effective treatment against this infection has not been found. Therefore, the present study aimed to evaluate the action of strains of *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* and *L. delbruekii*, as a pool, on *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed mice. The experiments were developed using 42 animals separated in six groups: **Control** - the mice were not immunosuppressed, no infected and no treated; **Immuno** - immunosuppressed, no infected and no treated; **No treated** - immunosuppressed, infected and no treated; **NTZ** - immunosuppressed, infected and treated with a Nitazoxanide antimicrobial (150mg/kg); **PRO** - immunosuppressed, infected and treated with a preparation probiotic ( $3 \times 10^{12}$ UFC/mL); and, **Preventive** - immunosuppressed, treated with the probiotic preparation and then infected. After 12 days of immunosuppression procedure the animals were infected with  $1,6 \times 10^6$  oocysts and, the respective treatments were started after five days of the inoculation of the oocysts. The infection was analyzed by counting of purified oocysts by tecnic of formol ether sedimentation of the feces. The intestinal colonization by lactobacilli was analyzed by pour plate technique on MRS agar containing Rifampicin antibiotic. The nutritional performance of the animals was calculated based on the rate of feed conversion, which is a relation between the amount of food consumed and the body weight gained by each animal. The results showed that the animals that received a preventive treatment with the probiotic preparation presented an elimination of oocysts lower than ( $P \leq 0,05$ ) the other infected groups. The treatment with the probiotic preparation, post-infection also showed to be effective, once all the animals eliminated the infection. These results can be explained by competitive exclusion due to the colonization of gastrointestinal tract of the animals or by production of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus*, which presented somehow any action on oocysts. It was also observed that the treated animals with the probiotic preparation presented better nutritional performance. These results confirm the hypothesis that the microorganisms which present probiotic properties represent an alternative way and promising, in the preventing and treatment of cryptosporidiosis.

**Key-words:** Probiotics. *Lactobacillus*. *Cryptosporidium parvum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	21
Figura 2 – Etapas do experimento com manuseio dos animais.....	25
Figura 3 – Eliminação de oocistos nas fezes dos camundongos infectados por <i>C. parvum</i> .....	34
Figura 4 – Porcentagem de linfócitos e neutrófilos do sangue dos animais.....	37



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – População de <i>Lactobacillus</i> resistentes à Rifampicina nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (log 10 UFC/g de fezes).....	30
Tabela 2 – População de <i>Lactobacillus</i> totais nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (log 10 UFC/g de fezes).....	32
Tabela 3 – Contagem de oocistos de <i>C. parvum</i> eliminados nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (Log 10 OoPG).....	33
Tabela 4 – Desempenho Nutricional dos Animais Submetidos a Diferentes Tratamentos.....	40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Probióticos.....	13
2.2. <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Microrganismos.....	22
3.1.1. Obtenção e cultivo das cepas probióticas.....	22
3.1.2. Obtenção da forma infectante de <i>C. parvum</i> .....	23
3.2. Delineamento experimental.....	23
3.3. Quantificação de <i>Lactobacillus</i> nas fezes dos camundongos.....	25
3.4. Quantificação de oocistos nas fezes dos camundongos.....	26
3.5. Leucograma.....	26
3.6. Determinação do peso dos animais e do consumo de ração.....	27
3.7. Aspectos Éticos.....	27
3.8. Análise dos Resultados.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Colonização do Trato Gastrointestinal dos Camundongos pelas Cepas de <i>Lactobacillus</i> .....	29
4.2. Efeito da Preparação Probiótica sobre a Infecção por <i>C. Parvum</i> .....	32
4.3. Leucograma.....	36
4.4. Desempenho Nutricional dos Animais.....	40
5. CONCLUSÕES.....	43

<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A saúde preventiva vem sendo cada vez mais discutida no meio médico-científico e enfatizada junto à população. Com essa crescente preocupação, observa-se um aumento da demanda por alimentos mais saudáveis, destacando-se dentre esses, aqueles que contêm microrganismos probióticos.

Os probióticos são produtos que contêm microrganismos vivos que favorecem a saúde do hospedeiro após seu consumo. Um dos efeitos benéficos dos probióticos é manter em equilíbrio a microbiota intestinal. Esse equilíbrio se deve a competição por sítios de ligação na mucosa e por nutrientes, pela produção de compostos antimicrobianos ou pela redução do pH intestinal com a produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos de cadeia curta, fator que também pode proporcionar uma redução na incidência de patógenos. Sua ação ainda pode ser diretamente sobre o metabolismo do hospedeiro, como a estimulação o sistema imunológico, a atividade anticarcinogênica e seu efeito hipocolesterolêmico.

Diversos estudos realizados em animais e *in vitro* têm demonstrado a ação antagônica dos probióticos sobre diversas espécies de enterobactérias patogênicas. Apesar do grande avanço científico nesta área, poucos estudos são encontrados a respeito da ação probiótica sobre protozoários, como *Cryptosporidium parvum*, que é um parasito intestinal de grande importância médica por causar uma das principais infecções oportunistas que afetam indivíduos imunodebilitados, como aidéticos e transplantados. Esse protozoário é causador de disfunções intestinais, como diarreia, podendo causar desidratação e desnutrição, e em casos mais graves pode levar ao óbito. Os produtos probióticos podem ser uma excelente alternativa para o tratamento e prevenção da criptosporidiose, uma vez que não há um tratamento eficaz contra esta.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma forma alternativa para o tratamento e prevenção à

Criptosporidiose por meio da utilização de espécies de microrganismos que apresentam propriedades probióticas. Especificamente avaliou-se a ação de cepas de *Lactobacillus* na prevenção de infecções causadas por *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos, bem como o efeito destas espécies sobre a resposta imune celular de camundongos imunossuprimidos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Probióticos

O termo 'probiótico', de origem grega, significa 'para a vida', e tem sido empregado de diversas maneiras ao longo dos anos. Este termo foi inicialmente proposto para descrever compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (LILLY; STILLWELL, 1965). Posteriormente, Fuller (1989) definiu probióticos como suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal.

Salminen et al. (1999) definem probióticos como preparados de microrganismos, ou seus componentes, que apresentam efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro. Schrezenmeir e De Vrese (2001) consideram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contenham microrganismos viáveis, definidos e em quantidade adequada, os quais alterem a microbiota própria das mucosas por colonização, produzindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Independentemente do conceito utilizado, o que se sabe atualmente é que os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas, sendo considerado um potencial substituto dos antimicrobianos (GILL; GUARNER, 2004; NEPOMUCENO; ANDREATTI, 2000).

#### ***Benefícios Relacionados aos Probióticos***

Os principais microrganismos utilizados em produtos probióticos são as bactérias ácido lácticas, principalmente, dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, e leveduras como *Saccharomyces boulardii* e

*Saccharomyces cerevisiae* (AMORES et al., 2004; SILVI et al., 2003; AGARWAL, et al., 2000; GIBSON; FULLER, 2000).

Estas espécies de microrganismos proporcionam vários benefícios à saúde de seu hospedeiro após sua ingestão. Um dos efeitos benéficos dos probióticos, que iniciou os estudos científico destes dessas bactérias, é manter em equilíbrio a flora intestinal. Esse equilíbrio se deve a competição por sítios de ligação na mucosa e por nutrientes, pela produção de compostos antimicrobianos ou pela redução do pH intestinal com a produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos de cadeia curta, fator que também pode proporcionar uma redução na incidência de patógenos (RASTALL, 2004; NICOLI; VIEIRA, 2000; LAMBERT; CHAMURATI, 1996). Dentre outros benefícios relacionados aos probióticos destacam-se o aumento da tolerância e digestibilidade da lactose, uma vez que as bactérias lácticas utilizam a lactose como substrato para fermentação produzindo ácido láctico e disponibilizando mais lactase intestinal (DE VRESE et al., 2001; CONWAY, 1996; NESTEL, 1996).

No tocante à estimulação do sistema imunológico tem-se observado que certos probióticos intervêm nas reações de hipersensibilidade retardada, produção de anticorpos, ativação dos macrófagos e da produção de algumas citocinas como interferon gama, interleucina 12 e interleucina 10 (SAXELIN et al., 2005; DRAKES, BLANCHARD, CZINN, 2004; CHUKEATIROTE, 2003). Quanto a atividade anticarcinogênica, o feito está relacionado à ação direta de bactérias lácticas na supressão de carcinógenos e/ou procarcinógenos intestinais ou à inibição de bactérias que direta ou indiretamente convertem procarcinógenos em carcinógenos. A prevenção do câncer intestinal pode se dar também em consequência da ativação do sistema imune e da alteração da motilidade, reduzindo o tempo de trânsito de metabólitos no trato gastrointestinal - GIT (ROWLAND, 1999; MCINTOSH, 1996).

No que se refere ao tratamento da diarreia e outros males intestinais observa-se que este benefício está associado à produção de substâncias antimicrobianas que inibem

o crescimento de bactérias patogênicas (CASBURG-JONES; FARTHING, 2004; REID et al., 2003; KATELARIS, 1996). Um outro mecanismo de ação é a redução da aderência ao muco intestinal e a translocação bacteriana, fatores importantes para reduzir a patogênese de doenças inflamatórias intestinais, prevenindo colite, gastrites, enterocolites, etc. Os alimentos funcionais podem também aliviar alguns sintomas de alergias, pois contribuem para a integridade intestinal, limitando a translocação de alérgenos, comuns em processos inflamatórios (GHOSH; VAN HEEL; PLAYFORD, 2006; CORSETTI; SETTANNI; VAN SIDE REN, 2004; SALMINEM; ISOLAURI; SALMINEM, 1996). O efeito de regulação da motilidade intestinal consiste em se evitar a constipação intestinal e auxilia na digestão devido a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e à secreção de enzimas que contribuem para digestão de proteínas, carboidratos, lipídeos e, também, melhoram a absorção e a síntese de vitaminas do complexo B, D e K (GOMES; MALCATA, 1999; MOROTOMI, 1996).

No tocante a redução do nível de colesterol, foi relatado por Gill e Guarner (2004), que este efeito está relacionado à degradação dos sais biliares pelas hidrolases sintetizadas pelos microrganismos, reduzindo a reabsorção do colesterol no intestino. A assimilação do colesterol pelas bactérias lácticas e a inibição da síntese e redistribuição do colesterol hepático também pode contribuir para esse efeito.

### ***Ação dos Probióticos Sobre Bactérias Patogênicas***

Diversos estudos realizados em animais e *in vitro* têm demonstrado que microrganismos probióticos exercem ação protetora contra a aderência, a colonização, a reprodução e a ação maléfica de espécies de enterobactérias patogênicas por meio de vários mecanismos de ação (SERVIN; COCONNIER, 2003; FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999).



Em 2002, Hopkins e Macfarlane, analisaram a microbiota intestinal de pessoas contaminadas com *Clostridium difficile* e comprovaram que a população dessa bactéria no trato gastrointestinal, principalmente intestino, é inversamente proporcional à população de *Bifidobacterium*, bactéria láctica com grande potencial probiótico, sugerindo a competição interespecífica entre estas espécies. Em 2004, Plummer et al. publicaram resultados positivos quanto ao tratamento de pessoas infectadas com *C. difficile* com o uso de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

Martins et al. (2005) demonstraram que camundongos infectados com *Salmonella typhimurium*, quando tratado com *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram taxa de sobrevivência 40% maior que os não tratados.

Poppi (2005) demonstrou, em estudo *in vitro*, o efeito inibitório de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 comprovando o efeito antagônico dos probióticos.

Chaveerach, Lipman e Van Knapen (2004) demonstraram que a cepa de *Lactobacillus* P93 apresenta propriedades de inibição sobre espécies de *Campylobacter*, sugerindo que este efeito antagônico se deve à combinação da produção de ácidos orgânicos e de peptídeos que apresentam ação antimicrobiana.

Glück e Gebbers (2003), comprovaram a redução da colonização do trato respiratório de humanos por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e outros streptococci hemolíticos, com a ingestão de probióticos.

Espécies de microrganismos enteropatogênicos, como *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori* e rotavírus, também tiveram sua infecção diminuída quando em antagonismos com probióticos (NOMOTO, 2005; CHATEAU; CASTELLANOS; DESCHAMPS, 2003; MARTEAU et al., 2001).

### **Ação dos Probióticos Sobre Protozoários**

Estudos recentes vêm demonstrando a ação de probióticos sobre protozoários patogênicos. Em 2005, Dalloul et al. avaliaram o efeito de um produto probiótico comercial, contendo *Lactobacillus* sobre *Eimeria acervulina* constatando uma redução no número de oocistos liberados nas fezes de frangos. Este efeito positivo foi justificado por tais pesquisadores pela estimulação do sistema imunológico destes animais, verificando-se um aumento dos níveis plasmáticos de Interferon- $\gamma$  e IL-2, assim como um aumento de interferon- $\gamma$  na mucosa intestinal.

Benyacoub et al. (2005) demonstraram uma diminuição da infecção de camundongos por *Giardia intestinalis* quando esses foram tratados previamente com *Enterococcus faecium* SF68. Essa redução ocorreu devido a um aumento da resposta imune desses animais, indicando que os probióticos podem ser uma forma alternativa e eficiente de prevenir enteroparasitoses. Prevenção semelhante foi observada por Bautista-Garfias et al. (2005), que demonstraram que *Lactobacillus casei* reduziu a infecção de camundongos por *Babesia microti*.

Foster et al. (2003) realizando estudos *in vitro* demonstraram uma redução de 81% da viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum* quando estes foram colocados em contato com sobrenadantes de culturas de *Lactobacillus*, e uma redução de 10-37% quando em contato com *Bifidobacterium*. Resultados semelhantes foram observados por Glass et al. (2004) que demonstraram que oocistos de *Cryptosporidium* tiveram sua viabilidade e infectividade reduzidas por compostos presentes no sobrenadante de culturas de *Lactobacillus*. Ambos estudos sugeriram a produção de um composto antimicrobiano pelas bactérias probióticas o qual foi efetivo contra o protozoário *C. parvum*.

Alak et al. (1999) realizando estudos com camundongos C57BL/6 imunossuprimidos observaram uma redução da infecção por *C. parvum* quando tratados por 14 dias com suspensões de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus acidophilus*. Porém, Guitard et al.

(2006) não observaram diferença significativa da infecção de *C. parvum* em ratos neonatais tratados dois dias antes da inoculação com um *pool* de oito cepas de *Lactobacillus casei*. Tais autores concluíram que tais resultados se deve ao curto período de administração dos probióticos aos animais.

## **2.2. *Cryptosporidium parvum***

Espécies de *Cryptosporidium*, que são parasitos intracelulares obrigatórios, colonizam as células epiteliais do trato respiratório e digestivo de muitos animais, inclusive do homem (CURRENT; GARCIA, 1991).

Este gênero foi descrito pela primeira vez em 1907, pelo parasitologista Tyzzer, porém os primeiros casos de infecção em humanos só foram diagnosticados em 1976, e o aumento da incidência ocorreu a partir da década de 80 com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (COELHO, 2004).

*Cryptosporidium* spp são reconhecidos como patógenos oportunistas que acometem, principalmente, crianças, idosos e indivíduos imunodebilitados como pacientes submetidos a quimioterapia, transplantados e portadores do vírus HIV (ZALI, 2004; BUYUKBABA et al., 2004; HUNTER; NICHOLS, 2002; TZIPORI; WARD, 2002). A criptosporidiose, doença causada por este protozoário é caracterizada por diarreia crônica e severa, acompanhada de desnutrição e desidratação, podendo levar ao óbito (MOHANDAS et al., 2003). A prevalência de infecções por *C. parvum* na população em geral tem sido de 2,2~8,5% (SURL; KIM, 2006).

Segundo estudos realizados na Coréia do Sul, no período de 1995 a 2003, 31,5% dos pacientes aidéticos apresentaram infecções parasitárias, sendo 10,5% causadas por *C. parvum*, considerado o protozoário de incidência mais frequente (GUK et al., 2005). Uma porcentagem ainda maior foi encontrada em estudo realizado nos Estados Unidos,

no período de 1986 a 1996, sendo reportado que 33,8% dos indivíduos aidéticos se encontravam infectados com *C. parvum* (ROSSI et al., 1998).

No Paquistão, no período de março a setembro de 1996, observou-se que 49% das crianças com menos de cinco anos estavam infectadas com *C. parvum*, apresentando o quadro clínico de diarreia, enquanto 5% destas crianças não apresentaram diarreia. O estudo considerou *C. parvum* relativamente endêmico em crianças na faixa etária de 0 a 5 anos na área de Rawalpind e que este protozoário é um importante patógeno associado à diarreia (IQBAL; MUNIR; KHAN, 1999).

*C. parvum* é considerado um dos principais parasitas intestinais da América do Norte. No Canadá, a incidência de Criptosporidiose é de aproximadamente 6% ao ano (LAUPAND; CHRUCH, 2005; KUCIK et al., 2004).

*Cryptosporidium parvum* provoca quadros de enterite em 15~50% dos pacientes acometidos com AIDS (VITORIA, 2006). Estudos realizados no Brasil demonstraram incidências variando de 4,0 a 19,1%, sendo considerado um potencial parasito causador de diarreia em aidéticos. (ARAUJO et al., 2007; SILVA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2004; CIMERMAM; CIMERMAN; LEWI, 1999; WUHIB et al., 1994).

Segundo *Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas*, em seu guia prático: *La infección por el VIH*, a alta incidência de criptosporidiose na população aidética, assim como outras infecções oportunistas, pode ser explicada pela baixa concentração de linfócitos T CD4, um dos principais mecanismos de defesa envolvido nesta infecção (BRANTLEY et al. 2003). Além do mecanismo de defesa mediado pela imunidade adquirida (linfócitos T CD4, principalmente) envolvido na criptosporidiose, estudos relatam a importância de um mecanismo independente de linfócitos T, no qual os macrófagos ativados induzem a secreção de interferon gama, pelas células NK (*Natural Killer*) do sistema imune inato e Interleucina-12 (ALVES; BRITTO; GUARALDO, 2004; ABREU et al., 2003; HUNTER; NICHOLS, 2002).

### **Ciclo de Vida**

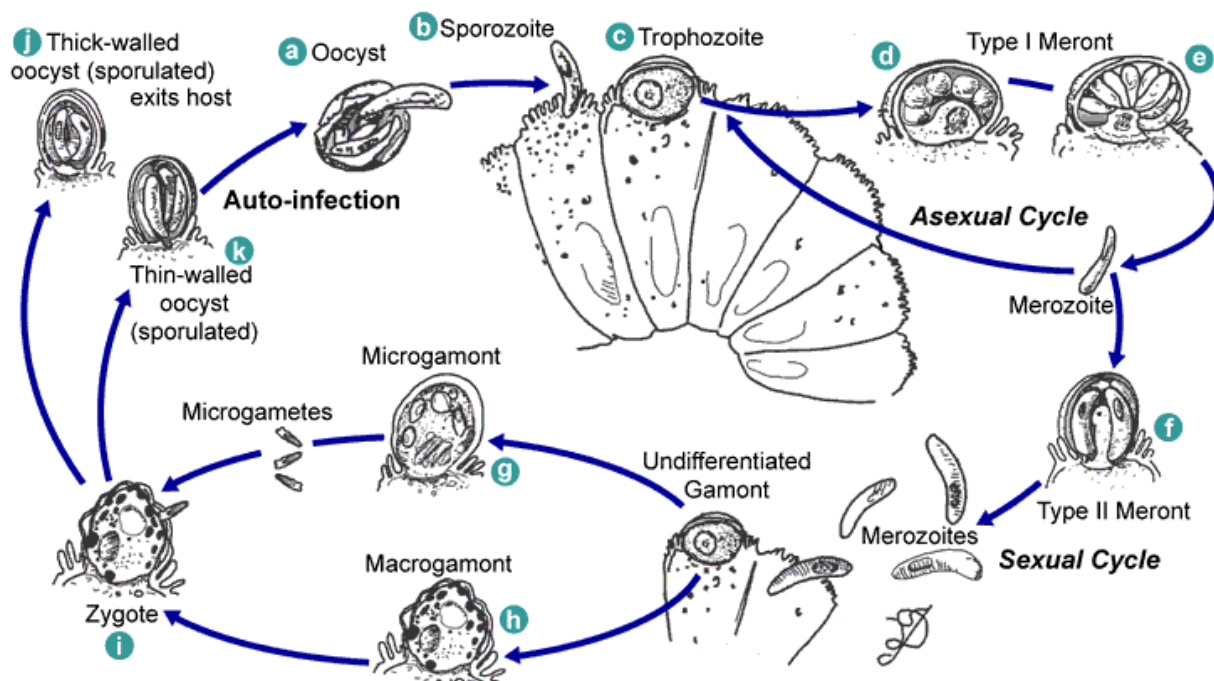
A criptosporidiose é transmitida por via fecal-oral, principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados com as formas infectantes do patógeno (oocistos) e pelo contato pessoa-a-pessoa. É uma doença de fácil disseminação por bastar pequena quantidade das formas infectantes para ocasionar a infecção do hospedeiro, aproximadamente 30 oocistos de *Cryptosporidium parvum* (RIMHANEN-FINNE, 2006; MORGAN-RYAN et al., 2002).

Os oocistos são resistentes à cloração e ao sistema de filtração da água devido a seu pequeno tamanho, podendo ser encontrado mesmo em água tratada o que proporciona um aumento em sua incidência (PROCTOR; BLAIR; DAVIS, 1998).

Após a ingestão do oocisto, no intestino delgado, há a excitação desse com a liberação de quatro esporozoítos, que penetram nas células epiteliais, desenvolvendo-se num vacúolo parasitóforo intracelular e extracitoplasmático. No vacúolo, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que se desenvolvem em dois tipos diferentes de merontes.

Os merontes tipo I contêm de seis a oito núcleos formando de seis a oito merozoítos, os quais invadem os enterócitos adjacentes transformando-se em merontes tipo I, mantendo assim a auto-infecção (reprodução assexuada).

Os merontes tipo II se diferenciam em macrogamontes ou microgamontes, que liberam macrogametas e microgametas, respectivamente, como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum*  
 Fonte: CDC - Public Health Image Library.

### Tratamento

A criptosporidiose apresenta letalidade elevada devido à ausência de tratamento específico ou de uma forma eficaz de prevenção (PETRI-JUNIOR, 2003). Em novembro de 2002, o composto nitazoxanida foi aprovado pelo FDA para o tratamento de diarreia causada por *Cryptosporidium* em crianças, porém essa droga apresenta uma eficácia que varia de 56 a 81%, o que tem estimulado a busca por um tratamento alternativo para esta infecção (PARASHAR; ARAYA, 2005). O tratamento de indivíduos imunocomprometidos é feito por meio de terapia anti-retroviral (CIMERMAM et al., 2002; CDC – Centers for Disease Control and Prevention).

Medicamentos contendo o princípio ativo a base de paromomicina e azitromicina também são utilizadas como agente terapêutico, mas, assim como a nitazoxanida, não são recomendados universalmente, uma vez que somente reduzem os sintomas não levando a cura definitiva bem como não previne reincidências (KAYSER et al., 2002; UPCROFT; UPCROFT, 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Probióticos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, EEL-USP e no Biotério da Faculdades Integradas Teresa D'Ávila, FATEA- Lorena-SP.

#### 3.1. Microrganismos

##### 3.1.1. Obtenção e cultivo das cepas probióticas

No presente trabalho foram avaliadas três cepas de *Lactobacillus*, na forma de um "pool", constituído por *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4536 e *L. delbrueckii* UFV-H2B20, sendo as duas primeiras cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo Di Biasi - Volta Redonda/RJ; e a outra pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

As respectivas cepas foram mantidas, a 4°C, em ágar MRS composto por: peptona (10g/L), extrato de carne (8g/L), extrato de levedura (4g/L), glicose (20 g/L), fosfato dipotássio (2g/L), acetato de sódio trihidratado (5g/L), citrato triamoniacal (2g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2g/L), sulfato de manganês (0,05g/L), ágar (15g/L), Tween 80 (1ml/L).

Para o desenvolvimento dos ensaios estas cepas foram reativadas por repiques sucessivos em caldo MRS, pH 6,2, esterilizado a 121° C por 15 min, e incubadas a 37° C por 24h. A preparação probiótica, foi obtida a partir de um "pool" dessas bactérias, contendo 10<sup>12</sup> UFC/mL de cada cepa. A confirmação da identidade das culturas foi realizada periodicamente por coloração Gram e teste de catalase.

Para o estudo relativo à colonização do trato gastrointestinal, as respectivas cepas foram previamente selecionadas quanto a resistência ao antibiótico Rifampicina, conforme proposto por D'Aimmo, Modesto e Biavati (2007). A resistência à Rifampicina foi obtida

por meio de repiques sucessivos em caldo MRS contendo 100µg/mL do antibiótico e plaqueados em ágar MRS contendo a mesma concentração do antibiótico de acordo com a metodologia descrita por Frece et al., (2005). Após verificada a resistência antimicrobiana, as cepas foram repicadas em caldo MRS, e quantificadas, após 24h de crescimento, pela técnica de “pour plate” e empregadas para a confecção da preparação probiótica.

### **3.1.2. Obtenção da forma infectante de *C. parvum***

Os oocistos de *C. parvum* foram adquiridos do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba/MG, originalmente obtidos de fezes de bezerros recém-nascidos, previamente infectados. Os oocistos foram armazenados em tampão PBS (0,01M pH 7,2) contendo os antibióticos Penicilina e estreptomicina e, 0,01% de Tween 20, mantidos a 4 °C. Para a preparação do inóculo utilizado para infectar os animais procedeu-se a uma contagem dos respectivos oocistos em câmara de Neubauer com vistas a ajustar a concentração dos mesmos para 10<sup>6</sup> oocistos/mL, conforme descrito por Surl (2006).

## **3.2. Delineamento Experimental**

Para a realização do presente trabalho foram utilizados quarenta e dois camundongos da linhagem C57/BL6, machos, de 3-4 semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os camundongos foram mantidos, durante 33 dias, em gaiolas individuais com alimento e água, *ad libitum*, previamente autoclavados a 121°C por 30min. A distribuição dos animais foi realizada em duas salas separadas sendo uma com animais infectados e outra com animais sem infecção, da seguinte maneira:



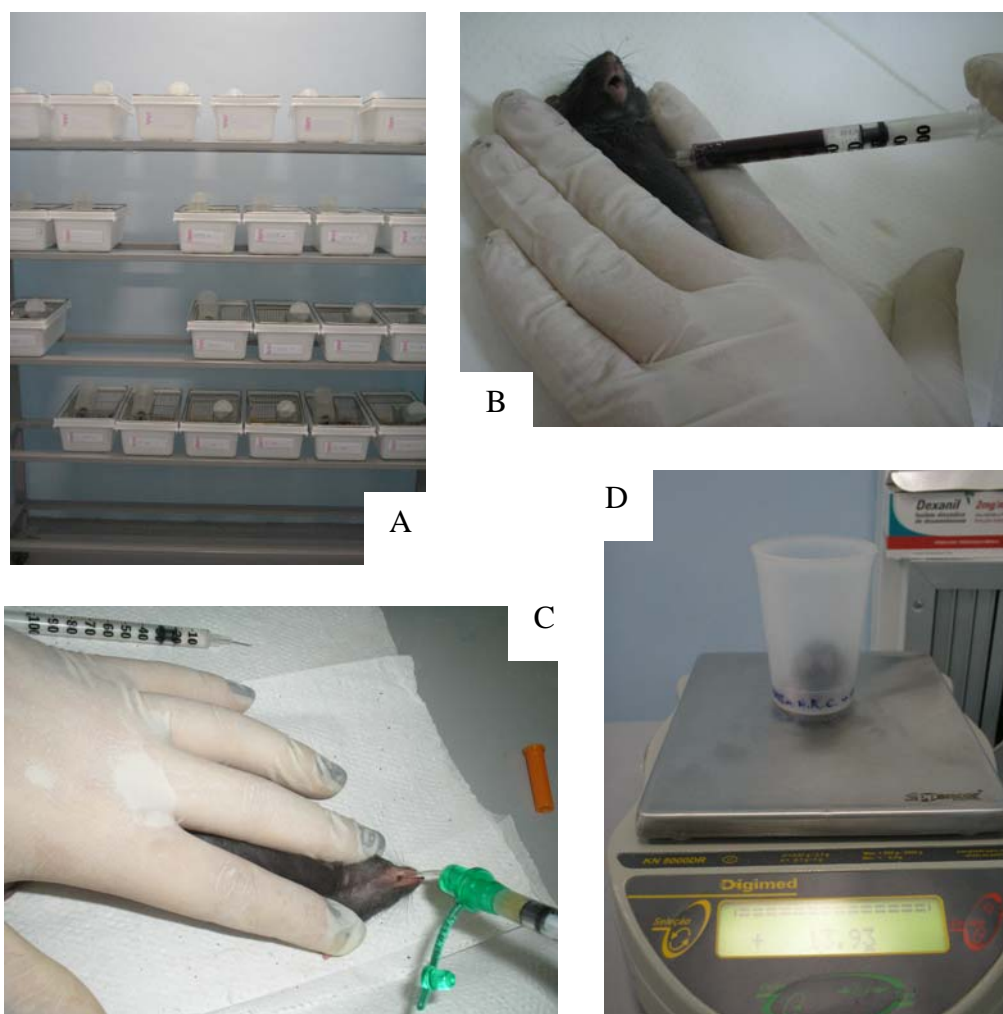
- ✓ Grupo Controle: 7 animais – não imunossuprimidos, não infectados e não tratados;
- ✓ Grupo Imuno: 7 animais – imunossuprimidos, não infectados e não tratados;
- ✓ Grupo Não Tratado: 7 animais – imunossuprimidos, infectados e não tratados;
- ✓ Grupo NTZ: 7 animais – imunossuprimidos, infectados e tratados com o antiprozotoário;
- ✓ Grupo PRO: 7 animais – imunossuprimidos, infectados e tratados com a preparação probiótica;
- ✓ Grupo Preventivo: 7 animais – imunossuprimidos, tratados com a preparação probiótica e posteriormente infectados.

A imunossupressão foi estabelecida por meio da administração do glicocorticóide Dexametasona, aplicado, diariamente, na concentração de 0,4mg, por via subcutânea na base da cauda até o final dos experimentos, conforme descrito por Coelho (2004). Uma vez estabelecida a imunossupressão, os animais foram infectados no 12º dia de experimento por meio de uma sonda, via intragástrica (Figura 2C), com  $1,6 \times 10^6$  oocistos diluídos em 0,1mL de tampão PBS 0,01M (pH 7,2) em dose única.

Após cinco dias da infecção (17º dia do experimento), iniciou-se os tratamentos relativos aos grupos NTZ e PRO. Para o tratamento do grupo NTZ foi utilizado o antimicrobiano nitazoxanida (NTZ), na dosagem de 150mg/Kg do peso corporal, em dose única, durante seis dias consecutivos conforme proposto por Blagburn et al. (1998).

O tratamento com probióticos (grupo PRO) consistiu na administração de uma dose única de 0,1 mL, diariamente, por 10 dias consecutivos da respectiva preparação probiótica contendo  $10^{12}$  UFC/mL de cada cepa de *Lactobacillus*.

No tratamento relativo ao grupo preventivo, os animais foram primeiramente tratados com a respectiva preparação probiótica desde o início dos experimentos. Após o 12º dia estes animais foram inoculados com  $1,6 \times 10^6$  oocistos de *C. parvum* e continuaram recebendo a preparação probiótica até o final dos tratamentos (27º dia).



**Figura 2.** Procedimentos de manuseio dos animais: **A** – Acomodação dos animais em gaiolas individuais; **B** – Punção cardíaca; **C** – Gavagem dos camundongos utilizada para tratamento e infecção; **D** – Pesagem dos animais.

### 3.3. Quantificação de *Lactobacillus* nas fezes dos camundongos

Para se avaliar o efeito da colonização do trato gastrointestinal dos animais pelas cepas de *Lactobacillus*, ensaios foram realizados a cada três dias quando se determinou a contagem (UFC/g) de lactobacilos liberados nas fezes. Para tanto, foi pesado um grama de fezes de cada grupo, que foi devidamente macerado e homogeneizado em 10mL de água peptonada (0,1% g/v), seguida de diluições sucessivas. A contagem de *Lactobacillus* foi realizada pela técnica de “pour plate” em ágar MRS e, em ágar MRS contendo

100µg/mL de Rifampicina, cujas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A colonização do trato gastrointestinal dos animais foi avaliada pela da contagem de lactobacilos das placas com e sem antibiótico, por meio da qual se estimou a quantidade de lactobacilos da preparação probiótica eliminada.

### **3.4. Quantificação de oocistos nas fezes dos camundongos**

O número estimado de oocistos nas fezes dos camundongos foi empregado como parâmetro para se avaliar o efeito dos lactobacilos sobre a infecção por *Cryptosporidium*.

Para a realização deste procedimento, a coleta das fezes foi realizada, diariamente, após o 4° dia de infecção (16° dia do experimento). A recuperação e concentração de oocistos das fezes, foi realizada logo após a coleta, pela técnica de centrifugo-sedimentação em formalina éter descrita como técnica de Ritchie (1948), modificada por Allen e Ridley (1970) e adaptada para este estudo nas seguintes condições: 1g de fezes de cada animal foi ressuspensa em 2mL de solução de formol a 10%, seguido de agitação vigorosa e deixado em repouso durante 3 minutos. Transcorrido este período, a suspensão foi homogeneizada e filtrada através de gases em duas camadas. Após filtração adicionou-se à suspensão éter etílico na proporção de 1:1, e esta foi centrifugada por 20 minutos a 2200 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensa com PBS (0,01M, pH 7,2), ajustando-se o volume de acordo com a concentração de oocistos ao longo do experimento.

A quantificação dos oocistos na referida suspensão foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se como contraste verde malaquita a 0,17%. O número estimado de oocistos, expresso em OoPG – número de oocistos liberados por g de fezes, de cada amostra foi calculado, multiplicando-se: o número de oocistos lido ao microscópio x o fator de diluição x conversão da Neubauer.

### **3.5. Leucograma**

Para a obtenção do leucograma, um animal de cada grupo, selecionado ao acaso, foi submetido a punção cardíaca nas seguintes etapas do experimento: Dia 0 – início do experimento; 12° Dia – inoculação dos animais com oocistos de *C. parvum*; 17° Dia – início do tratamento dos animais dos grupos NTZ e PRO; 23° Dia – final do tratamento do grupo NTZ; 27° Dia – final do tratamento dos grupos PRO e Preventivo.

Para a realização da punção cardíaca os animais foram anestesiados com vapor de éter etílico antes da coleta do sangue em conformidade com a Resolução N° 714 de 20/07/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (COBEA 1996). O sangue foi colhido com auxílio de uma seringa de insulina contendo 50 µL do anticoagulante EDTA (Fig. 2B), e enviado para análise no Laboratório de Análises Clínicas Biocentro – Cruzeiro – SP.

### **3.6. Determinação do peso dos animais e do consumo de ração**

Visando avaliar o desempenho dos animais, os mesmos foram pesados individualmente a cada dois dias conforme demonstrado na Figura 2C. Neste período determinou-se também o consumo de ração que foi calculado pela diferença entre a quantidade de ração colocada inicialmente e a ração residual existente nos comedouros. Estes resultados permitiram calcular as respectivas taxas de conversão alimentar, que consiste na relação entre a quantidade (g) de ração consumida e o ganho de peso (g) dos animais.

### **3.7. Aspectos Éticos**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Taubaté, Taubaté-SP. Protocolo número 0021/06.

### **3.8. Análise dos Resultados**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste de Tukey-Kramer, utilizando o programa Statistics ao nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Colonização do Trato Gastrointestinal dos Camundongos pelas Cepas de *Lactobacillus*

A capacidade de colonizar o trato gastrointestinal é um importante pré-requisito para seleção de cepas probióticas, pois promove o equilíbrio do ecossistema digestivo, proporcionando benefícios à saúde do hospedeiro (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

No presente trabalho, a colonização do intestino dos animais pelas bactérias probióticas foi verificada por meio da marcação das respectivas cepas quanto a sua resistência ao antibiótico Rifampicina (item 4.1.1), e posterior contagem seletiva de *Lactobacillus* nas fezes dos camundongos. Para tanto, as bactérias foram testadas em dois grupos experimentais distintos (Preventivo e PRO), sendo que o grupo Preventivo recebeu desde o início dos ensaios uma dose diária contendo  $3 \times 10^{12}$  UFC/mL das cepas probióticas na forma de “pool”, enquanto o grupo PRO recebeu a referida preparação probiótica somente a partir do 17° dia de experimento.

Os resultados apresentados na Tabela 1, revelam que a colonização do trato gastrointestinal pelas bactérias probióticas se mostrou efetiva, uma vez que somente parte das bactérias ingeridas foram eliminadas nas fezes e o restante permaneceu no trato gastrointestinal (TGI) dos animais.

Desconsiderando perdas durante a passagem pelo trato gastrointestinal e a multiplicação celular, pode-se verificar uma permanência aproximada de 46% dos lactobacilos no ecossistema digestivo dos animais do grupo Preventivo nos primeiros três dias de tratamento. Observa-se ainda, a partir do 6° dia de tratamento recebendo a referida preparação probiótica, um aumento da eliminação dos *Lactobacillus* pelos animais do grupo Preventivo, provavelmente devido a indisponibilidade de sítios de adesão nos enterócitos (ALAK et al., 1997).

A colonização do TGI dos animais do grupo PRO também foi efetiva, observando-se uma permanência de aproximadamente 57% das bactérias ingeridas, apresentando uma eliminação menor e mais lenta, destacando-se baixa eliminação mesmo após 6 dias recebendo a preparação probiótica (23° Dia). Supõe-se que esta menor eliminação se deve ao fato dos animais se apresentarem acometidos com criptosporidiose, a qual altera a histologia intestinal e se faz necessária uma colonização mais intensa (ROTKIEWIEZ et al., 2001; ALAK et al., 1997).

**Tabela 1. População de *Lactobacillus* resistentes à Rifampicina nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (log 10 UFC/g de fezes)\***

Tempo de experimento (dias)	Controle <sup>1</sup>	Imuno <sup>2</sup>	Não tratado <sup>3</sup>	NTZ <sup>4</sup>	PRO <sup>5</sup>	Preventivo <sup>6</sup>
0 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	6,72 ± 0,04
6	ND	ND	ND	ND	ND	8,64 ± 0,12
9	ND	ND	ND	ND	ND	9,94 ± 0,04
12 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	9,20 ± 0,20
15	ND	ND	ND	ND	ND	10,42 ± 0,13
17 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	9,66 ± 0,12
20	ND	ND	ND	ND	5,64 ± 0,06	8,86 ± 0,04
23	ND	ND	ND	ND	5,89 ± 0,07	8,70 ± 0,11
27 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	8,60 ± 0,11	7,56 ± 0,18
30	ND	ND	ND	ND	5,62 ± 0,19	4,63 ± 0,15
33	ND	ND	ND	ND	4,65 ± 0,07	4,53 ± 0,09

ND = Não detectado; \*Valores médios de triplicata ± desvio padrão; <sup>1</sup>Animais não imunossuprimidos, não infectados e não tratados; <sup>2</sup>Animais imunossuprimidos, não infectados e não tratados; <sup>3</sup>Animais imunossuprimidos, infectados e não tratados; <sup>4</sup>Animais imunossuprimidos, infectados e tratados com antiprotozoário; <sup>5</sup>Animais imunossuprimidos, infectados e tratados com probióticos; <sup>6</sup>Animais imunossuprimidos, tratados com probióticos e posteriormente infectados. <sup>a</sup>início do tratamento do grupo Preventivo; <sup>b</sup>Infecção dos animais com oocistos de *C. parvum*; <sup>c</sup>início do tratamento do grupo PRO; <sup>d</sup>final de tratamento dos grupos PRO e Preventivo.

Estes resultados demonstram ainda a importância de uma ingestão contínua de preparações probióticas, pois a colonização das cepas embora efetiva não se mostrou permanente, uma vez que se observou uma diminuição da população das respectivas cepas na microbiota intestinal dos animais após o término do tratamento (27° Dia).

Alak et al. (1997) reportaram resultados semelhantes quanto a colonização do TGI de camundongos imunossuprimidos por *L. reuteri* e infectados por *C. parvum*. Os autores observaram que no início do tratamento houve uma eliminação baixa de lactobacilos nas fezes, a qual se acentuou ao longo do experimento. A colonização intestinal dos animais foi inversamente proporcional a eliminação de oocistos nas fezes, ou seja a colonização por lactobacilos é mais intensa na presença da infecção.

Frece et al. (2005) relataram resultados semelhantes em estudo envolvendo lactobacilos resistentes à Rifampicina, no qual os autores observaram a sobrevivência de cepas de *Lactobacillus* durante a passagem pelo trato gastrointestinal, utilizando-se da técnica de plaqueamento. Estes pesquisadores observaram ainda que tal colonização do TGI, promoveu um aumento da concentração plasmática dos anticorpos IgA, IgG e IgM de camundongos tratados com probióticos.

No presente trabalho determinou-se também a população total de *Lactobacillus* nas fezes dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, cujos resultados encontram-se demonstrados na Tabela 2. Observa-se um aumento aproximado de 51% da população de lactobacilos da microbiota dos animais imunossuprimidos. Estudos relatam alteração da microbiota intestinal de animais imunossuprimidos ou alteração nesta microbiota ocasionada por tratamento com corticóides (como a dexametasona), porém o mecanismo envolvido neste processo ainda não foi esclarecido (SHEIL et al., 2006; NOMOTO, 2005).

A análise dos resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, que se referem à contagem de lactobacilos resistentes e totais nas fezes dos animais, revela que ocorreu um aumento na eliminação das cepas probióticas, porém esse aumento não é proporcional ao aumento da população de lactobacilos totais da microbiota intestinal. Este resultado sugere que há uma substituição parcial de *Lactobacillus* nativos pelos exógenos, tendo uma população nativa residual que pode se restabelcer na ausência de bactérias probióticas administradas.



**Tabela 2. População de *Lactobacillus* totais nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (log 10 UFC/g de fezes)<sup>1</sup>**

Tempo de Experimento (dias)	Controle	Imuno	Não tratado	NTZ	PRO	Preventivo
0 <sup>a</sup>	6,13 ± 0,19	6,56 ± 0,14	6,88 ± 0,11	6,25 ± 0,61	7,98 ± 0,18	7,18 ± 0,17
3	7,32 ± 0,12	7,46 ± 0,05	7,85 ± 0,09	7,84 ± 0,09	9,21 ± 0,05	10,19 ± 0,09
6	7,69 ± 0,05	10,34 ± 0,02	8,61 ± 0,02	8,66 ± 0,04	10,27 ± 0,02	11,10 ± 0,11
9	7,37 ± 0,09	9,86 ± 0,04	8,21 ± 0,04	8,24 ± 0,01	9,83 ± 0,03	10,67 ± 0,11
12 <sup>b</sup>	7,49 ± 0,11	9,99 ± 0,01	8,33 ± 0,02	8,37 ± 0,02	9,95 ± 0,04	10,80 ± 0,40
15	7,54 ± 0,12	10,11 ± 0,05	8,42 ± 0,01	8,46 ± 0,12	10,06 ± 0,00	10,89 ± 0,05
17 <sup>c</sup>	7,47 ± 0,13	10,00 ± 0,03	8,33 ± 0,02	8,36 ± 0,20	9,96 ± 0,10	10,80 ± 0,17
20	6,48 ± 0,23	11,56 ± 0,07	10,80 ± 0,15	9,04 ± 0,04	11,73 ± 0,21	10,75 ± 0,20
23 <sup>d</sup>	7,35 ± 0,08	11,11 ± 0,14	10,33 ± 0,06	8,73 ± 0,13	11,27 ± 0,35	10,82 ± 0,11
27 <sup>e</sup>	7,27 ± 0,13	11,23 ± 0,08	10,45 ± 0,14	8,79 ± 0,16	11,38 ± 0,07	10,79 ± 0,19
30	7,17 ± 0,15	11,35 ± 0,19	10,58 ± 0,10	8,88 ± 0,14	11,51 ± 0,05	10,79 ± 0,17
33	7,27 ± 0,10	11,24 ± 0,11	10,46 ± 0,09	8,81 ± 0,04	11,40 ± 0,14	10,80 ± 0,42

<sup>1</sup> Valores médios de triplicata ± desvio padrão; <sup>a</sup> início do tratamento do grupo Preventivo; <sup>b</sup> Infecção dos animais com oocistos de *C. parvum*; <sup>c</sup> início do tratamento dos grupos PRO e NTZ; <sup>e</sup> final de tratamento do grupo NTZ; <sup>f</sup> final de tratamento dos grupos PRO e Preventivo.

#### 4.2. Efeito da Preparação Probiótica sobre a Infecção por *C. Parvum*

Para se estudar o efeito das cepas de *Lactobacillus*, que compõem a preparação probiótica em análise sobre a infecção por *C. parvum*, os animais de quatro grupos experimentais (Não Tratado, NTZ, PRO e Preventivo) foram infectados no 12º dia de experimento com  $1,6 \times 10^6$  oocistos. O referido efeito foi verificado por meio da contagem da forma infectante de *C. parvum* nas fezes dos animais cinco dias após a inoculação dos oocistos (17º dia de experimento). A coleta e análise de fezes foram realizadas, diariamente, a partir do 16º dia de experimento, e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.

Observa-se que não foram detectados oocistos nas fezes dos animais dos grupos Controle e Imuno (controle negativo para criptosporidiose), porém a infecção foi estabelecida, pois os animais dos demais grupos, que foram infectados, liberaram oocistos nas fezes após 4 dias da administração dos oocistos (16º Dia). Observa-se ainda

que a preparação probiótica fez com que os animais do grupo Preventivo apresentassem uma resposta menos intensa à infecção por *Cryptosporidium* quando comparados com os demais grupos infectados, possivelmente devido a colonização do trato gastrointestinal por *Lactobacillus*.

**Tabela 3. Contagem de oocistos de *C. parvum* eliminados nas fezes dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos (Log<sub>10</sub> de OoPG)<sup>1</sup>**

Tempo de experimento (dia)	Controle	Imuno	Não tratado	NTZ	PRO	Preventivo
0 - 12	-	IM	IM	IM	IM	IM
12	-	-	I	I	I	I
12 - 16	-	-	EI	EI	EI	EI
16	ND	ND	6,47 ± 0,39	6,55 ± 0,17	6,59 ± 0,13	4,89 ± 0,14
17 *	ND	ND	7,56 ± 0,11	7,47 ± 0,19	7,49 ± 0,13	4,67 ± 0,19
18	ND	ND	7,52 ± 0,10	6,98 ± 0,09	7,35 ± 1,75	3,80 ± 0,08
19	ND	ND	6,81 ± 0,10	4,56 ± 0,21	6,19 ± 0,16	3,15 ± 0,05
20	ND	ND	6,93 ± 0,08	3,56 ± 0,05	6,00 ± 0,25	3,15 ± 0,09
21	ND	ND	6,33 ± 0,14	2,87 ± 0,05	4,60 ± 0,21	2,70 ± 0,08
22	ND	ND	5,31 ± 0,08	1,88 ± 0,32	3,71 ± 0,01	1,08 ± 0,80
23**	ND	ND	4,88 ± 0,14	0,60 ± 0,58	3,03 ± 0,07	0
24	ND	ND	3,73 ± 0,12	0	2,61 ± 1,17	0
25	ND	ND	3,57 ± 0,11	0	1,78 ± 0,95	0
26	ND	ND	3,39 ± 0,09	0	0	0
27 ***	ND	ND	3,21 ± 0,05	0	0	0

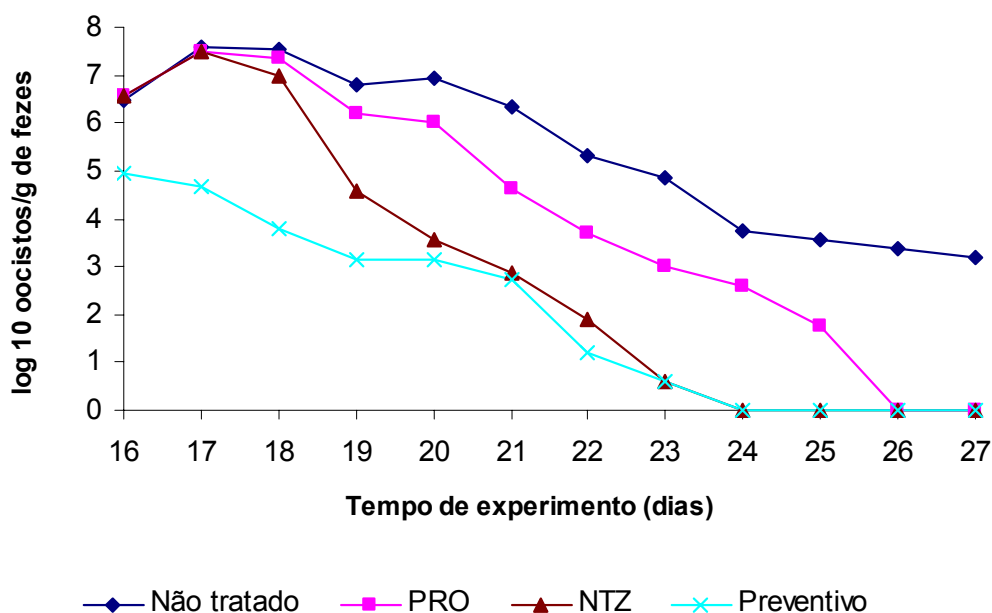
IM = Imunossupressão; I = Infecção; EI = Estabelecimento da Infecção; ND = Não detectado;

<sup>1</sup> log<sub>10</sub> do valor médio do grupo ± desvio padrão; \* Início dos tratamentos dos grupos NTZ e PRO;

\*\* Término do tratamento do grupo NTZ; \*\*\* Término dos tratamentos dos grupos PRO e Preventivo.

A análise estatística dos resultados pelo Teste Tukey-Kramer demonstrou que, no início do tratamento (16º dia), do valor de OoPG dos grupos NTZ e PRO não apresentaram diferença significativa quando comparado com o valor do grupo Não Tratado (P>0,05). Entretanto, os resultados relativos ao grupo Preventivo foram significativamente diferente (P≤0,01) quando comparados com os demais infectados. Esta análise, também, permite verificar que todos tratamentos testados mostraram-se eficaz es sobre a infecção causada por *C. parvum*, uma vez que os respectivos resultados foram estatisticamente diferentes (P≤0,01) do resultado obtido no grupo Não Tratado.

Os resultados referentes à eliminação de oocistos nas fezes dos animais, permitem sugerir como tratamento mais eficaz para prevenir infecções intestinais a ingestão constante de microrganismos probióticos. Esta sugestão encontra-se afirmada nas curvas de eliminação de oocistos reportadas na Figura 3. Observa-se que os animais do grupo Preventivo apresentaram uma curva de eliminação de oocistos constantemente abaixo dos demais grupos, cujos animais foram infectados.



**Figura 3.** Eliminação de oocistos nas fezes dos camundongos infectados por *C. parvum*

Verifica-se ainda, que o tratamento dos animais com a respectiva preparação probiótica após a infecção, também foi eficaz, uma vez que se observou uma eliminação nula de oocistos nas fezes após 9 dias do início da administração da preparação probiótica em estudo (26° dia de experimento). Apesar de se mostrar um tratamento mais lento quando comparado com o tratamento com o antiprotozoário Nitazoxanida, a administração de preparações probióticas é um tratamento mais recomendado por não provocar resistência a microrganismos patogênicos (DOGI; PERDIGÓN, 2006).

Resultados semelhantes foram observados por Alak et al. (1999) que demonstraram uma redução significativa da infecção de camundongos por *C. parvum* quando tratados por 14 dias com suspensões contendo células de *L. reuteri* ou *L. acidophilus*, sendo a redução da infecção proporcionada por *L. acidophilus* mais significativa. Segundo os autores, estas observações são resultantes da imunestimulação ocasionada pelas respectivas preparações probióticas, principalmente sobre a resposta imune celular.

Estudos recentes têm demonstrado a eficácia do uso de preparações probióticas na prevenção de doenças intestinais. Rayes et al. (2002) avaliando o potencial probiótico de *L. plantarum*, observaram que dos pacientes transplantados, que receberam diariamente  $10^9$  UFC/mL desta cepa, somente 13% apresentaram incidência de doenças infecciosas contra um nível de 48% para o grupo controle. Segundo estes autores, o mecanismo de ação envolvido nesta prevenção ainda não foi completamente elucidado, sendo atribuída a estimulação do sistema imune do paciente ou devido a produção, pelas bactérias probióticas, de compostos que apresentam efeito antimicrobiano.

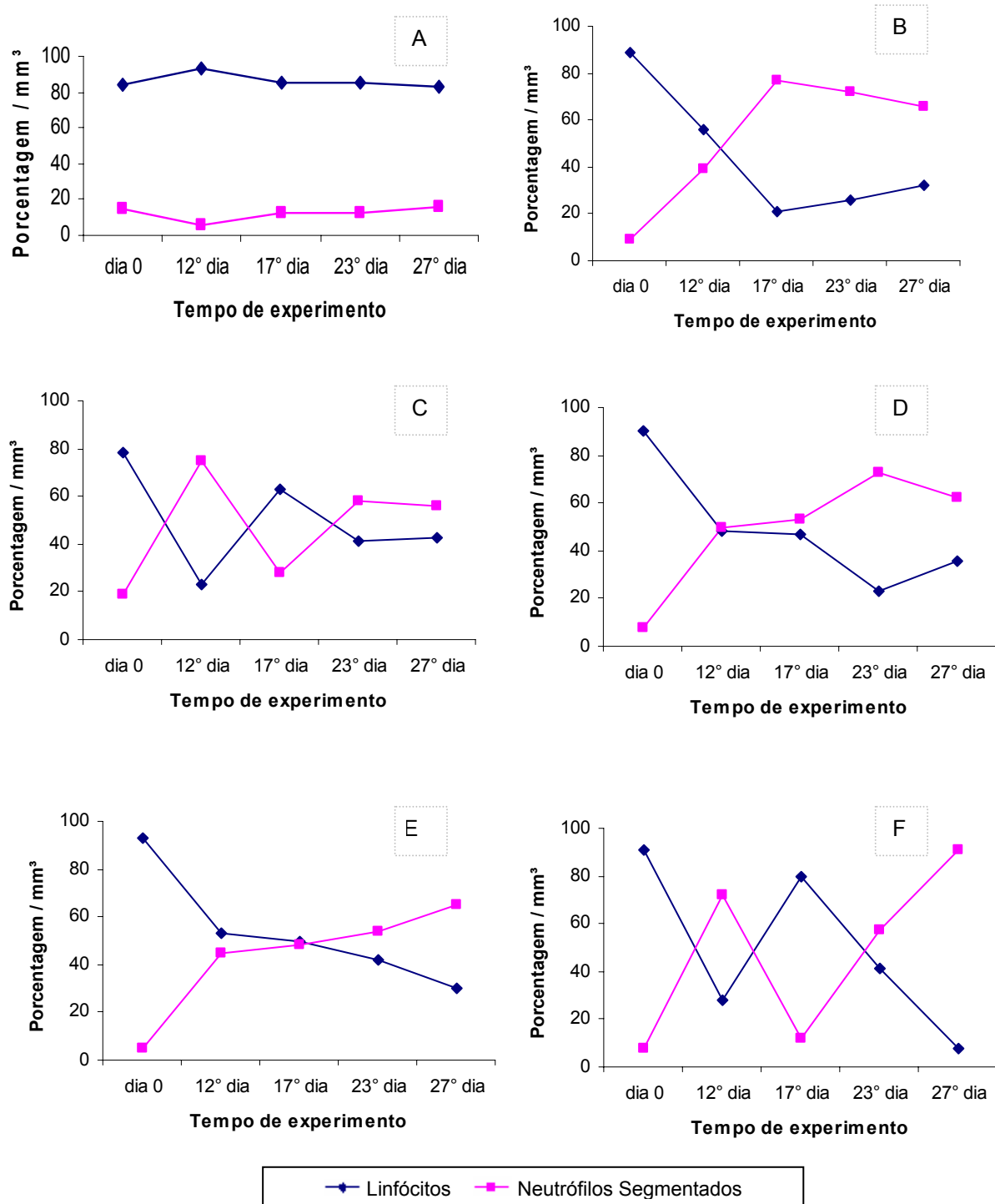
O tratamento referente à administração da preparação probiótica aos animais a partir do 5º dia de infecção (grupo PRO), também se mostrou eficaz quanto à eliminação de oocistos do trato gastrointestinal tendo em vista que após 9 dias de tratamento não se observou a presença de oocisto de *C. parvum* nas fezes dos animais. A eliminação da infecção por *C. parvum* pode ser devido à competição por sítios de adesão ao epitélio intestinal entre os oocistos e as células de *Lactobacillus*, uma vez que *Cryptosporidium* são parasitos intracelulares que necessitam se aderir às células epiteliais para invadi-las e se reproduzir assexuadamente (CURRENT; GARCIA, 1991). A ocupação dos sítios da mucosa pelos lactobacilos impede que o processo de autoinfecção aconteça resultando numa diminuição da infecção.

Estudos *in vitro* realizados por Glass et al. (2004) e Foster et al. (2003), sugerem que a produção de compostos que apresentam efeitos antimicrobianos produzidos por espécies de *Lactobacillus*, promovem a perda da viabilidade e infectividade de oocistos de

*C. parvum*, contribuindo desta forma para explicar os resultados obtidos no presente trabalho.

### **4.3. Leucograma**

O leucograma é uma importante análise que permite a caracterização dos diferentes constituintes presentes no sangue, destacando-se as contagens total e específica de leucócitos, que são células do sistema imune que permitem a identificação e evolução de patologias (PEREIRA, 2007). Sendo assim, no presente trabalho um animal de cada grupo foi sacrificado em diferentes etapas do experimento: Dia 0 – início do experimento; 12° Dia – inoculação dos animais com oocistos de *C. parvum*; 17° Dia – início do tratamento dos animais dos grupos NTZ e PRO; 23° Dia – final do tratamento do grupo NTZ; 27° Dia – final do tratamento dos grupos PRO e Preventivo. As amostras de sangue foram devidamente analisadas, cujos resultados mais expressivos encontraram-se representados na Figura 4.



**Figura 4.** Porcentagem de linfócitos e neutrófilos no sangue dos animais: A – Controle; B – Imuno; C – Não Tratado; D – NTZ; E – PRO; F – Preventivo.

Verifica-se que o sistema imune dos animais de todos os grupos, no início do experimento, foi considerado dentro dos padrões de referências, ou seja, normal, tendo alta quantidade de linfócitos e baixa porcentagem de neutrófilos (HARKNESS; WAGNER, 1993). O grupo Controle, representado na Figura 4A, apresentou pequenas variações na porcentagem das células leucocitárias em análise, indicando que os animais deste grupo permaneceram dentro da normalidade, durante todo o experimento.

A Figura 4B, apresenta a variação das concentrações das respectivas células sanguíneas dos animais do grupo Imuno, na qual observa-se, após 12 dias de experimento, um aumento na porcentagem de neutrófilos segmentados, assim como uma queda dos linfócitos, ocasionada pela administração de dexametasona, indicando que a imunossupressão foi estabelecida. Nota-se ainda que nos dias posteriores (17°, 23° e 27° dias), o efeito da imunossupressão se manteve praticamente estável, sendo este grupo utilizado como controle da imunossupressão. Assim como o grupo Imuno, os demais grupos, cujos animais foram imunossuprimidos, apresentaram uma queda de linfócitos após 12 dias de imunossupressão, indicando que esta foi estabelecida, fato que permite a infecção dos animais por *C. parvum*.

A Figura 4C retrata a porcentagem de linfócitos e neutrófilos do grupo Não Tratado. Pôde-se observar que, diferentemente do grupo Imuno, houve um aumento na porcentagem linfocitária no 17° dia, que pode ter sido ocasionada pelo estabelecimento da infecção por *Cryptosporidium*, pois estas células do sistema imunológico são efetivas no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, como o *C. parvum*. Nos dias 23° e 27°, observou-se uma pequena redução na concentração de linfócitos no sangue, devido a uma diminuição da infecção, conforme demonstrado na Figura 3.

No tocante ao leucograma dos animais do grupo NTZ (Fig. 4D), observou-se, no 17° dia, uma queda muito pequena na quantidade de linfócitos após o estabelecimento da imunossupressão (12° dia), comprovando que estabelecida a infecção há um aumento na concentração linfocitária sanguínea. No 23° dia de experimento, observa-se, novamente,

uma queda acentuada na porcentagem de linfócitos e um aumento na de neutrófilos. Este resultado se deve por este grupo apresentar uma infecção muito baixa, voltando a estabelecer o quadro de imunossupressão ( $\uparrow$  neutrófilos  $\downarrow$  linfócitos).

Os resultados relativos ao grupo PRO, reportado na Figura 4E, demonstram, uma queda acentuada do número de linfócitos, assim como um aumento na porcentagem de neutrófilos durante os primeiros 12 dias de imunossupressão. Este mesmo comportamento citológico foi observado nos dias posteriores em uma intensidade bastante reduzida até o final do experimento. A atenuidade da redução de linfócitos após o 12º dia se deve, provavelmente, ao estímulo do sistema imunológico promovido pelos microrganismos que compõem a preparação probiótica em estudo, com vistas a eliminar a infecção por *C. parvum*.

No que se refere ao grupo Preventivo (Fig. 4F), cujos animais receberam a referida preparação probiótica diariamente durante todo o experimento, observa-se maior porcentagem de linfócitos no 17º dia de experimento. Esta observação demonstra que a preparação trouxe benefícios à saúde dos animais por meio do estímulo do sistema imunológico. Nota-se ainda que no 23º dia ocorreu 100% de eliminação da infecção (Figura 3), voltando, portanto, a apresentar leucograma característico do estado de imunossupressão, à semelhança do grupo Imuno.

Estudos realizados por Vinderola; Medice; Perdígón (2004) apresentaram resultados semelhantes, pois microrganismos probióticos apresentaram ação na imunomodulação de camundongos. Estudos relatam que alguns gêneros de bactérias intestinais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune por meio da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T, aumento do número de neutrófilos e monócitos, produção de Interferon, Interleucina-2 (IL-2) e outros metabólitos (SHEIL et al., 2006; BUDINO et al., 2004; SCHIFFRIN et al., 1997).



Segundo Shu, Qu e Gill (2001) leitões tratadas com *Bifidobacterium lactis* HN010 apresentam um aumento na concentração sanguínea de anticorpos, assim como um aumento da quantidade de neutrófilos e da resposta proliferativa dos linfócitos T, levando uma diminuição da incidência de diarreia associada com o Rotavírus e *E. coli*.

Alak et al. (1999) observaram uma imunoestimulação, restauração parcial do sistema imunológico de camundongos imunossuprimidos, quando estes foram tratados com *L. acidophilus* e *L. reuteri*. Segundo autores, o aumento da produção de interleucina-4 (IL-4) pode ter ocasionado uma menor colonização do epitélio intestinal por *C. parvum*.

Diante do exposto, sugere-se que o efeito de imunoestimulação tenha sido um dos mecanismos de ação apresentado pelas cepas probióticas em estudo, o que resultou na eliminação da infecção causada por *C. parvum*.

#### 4.4. Desempenho Nutricional dos Animais

A determinação da taxa de conversão alimentar tem como objetivo permitir a avaliação do desempenho nutricional dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, por meio do consumo médio de ração e o respectivo ganho de peso corpóreo contribuindo, desta forma, para se verificar as possíveis alterações no metabolismo dos animais. Os resultados relativos ao desempenho dos animais encontram-se apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Desempenho dos Animais Submetidos a Diferentes Tratamentos**

Grupos	Consumo de ração g/animal/dia	Ganho de peso g/animal/dia	Conversão alimentar g/g
Controle	4,788	0,189	25,33
Imuno	4,284	0,096	44,63
Não Tratado	4,333	0,078	55,55
NTZ	4,328	0,086	50,33
PRO	4,342	0,085	51,08
Preventivo	4,286	0,098	43,73

A análise estatística dos resultados (Teste t) demonstrou que não houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) no consumo de ração entre os grupos experimentais. Por outro lado, a análise dos resultados referentes ao ganho de peso revela um aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) da massa corpórea dos animais do grupo Controle quando comparado com os demais grupos constituídos por animais imunossuprimidos. Desta forma, estes resultados refletem nas respectivas taxas de conversão alimentar, destacando-se o grupo Controle que apresentou maior eficiência na conversão de ração em ganho de peso corpóreo. Estes resultados indicam ainda que a imunossupressão causou alterações metabólicas que afetaram o desempenho nutricional dos animais. Estudos realizados com aidéticos, demonstram que a imunossupressão diminui o ganho de peso dos pacientes, porém não se sabe ao certo o que ocasiona tal perda de peso, podendo esta redução estar associada com o tratamento utilizado em tal doença (SCHIEFERSTEIN; BUHK, 2006).

Verifica-se ainda diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) no tocante à taxa de conversão alimentar entre o grupo Imuno e os grupos Não tratado, NTZ e PRO, resultado que não foi observado entre o grupo Imuno e Preventivo. Estes resultados demonstram que além do efeito da imunossupressão, a infecção dos animais com oocistos de *C. parvum* também alterou o metabolismo dos animais. Observa-se também que a preparação probiótica administrada aos animais mostrou-se eficaz no que se refere a redução dos efeitos provocados pela infecção. Estas observações se devem provavelmente ao bom equilíbrio da microbiota intestinal dos animais, que interfere positivamente na digestibilidade dos alimentos, levando à maior utilização de nutrientes (AMORES et al., 2004).

Resultados semelhantes têm sido demonstrados em estudos recentes. Huaynate et al. (2006) ao analisarem o desempenho zootécnico de suínos que receberam probióticos em suas dietas observaram uma melhor conversão alimentar nos animais alimentados com probiótico, permitindo desta forma demonstrar o efeito probiótico como promotor de crescimento, relatado por sua ação preventiva a diarréias. Canibe e Jensen (2003)

também avaliaram a ação de bactérias lácticas em suínos em fase de crescimento. Estes autores mostraram que os animais apresentaram aumento no ganho de peso e uma diminuição na concentração de enterobactérias no intestino.

Segundo Vandelle, Teller e Focant (1990) o uso de probióticos em dietas de bezerros recém-nascidos resulta em aumentos médios de 4,5% no ganho de peso vivo e 2,5% na conversão alimentar, em sistemas de criação nos quais os animais são submetidos à condições de estresse. Alves et al. (2000) trabalhando com bezerros alimentados com leite adicionado de microrganismos probióticos encontraram aumentos médios de 6,2% de peso vivo ao abate, de 5,6% no ganho médio diário de peso vivo e de 8,5% na conversão alimentar, em relação aos animais alimentados com dietas sem a adição de probióticos.

Côrrea (2003) avaliou um preparado poliprobótico constituído por *L. acidophilus*, *L. casei*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *B. toyoi* e *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho zootécnico e rendimento de carcaça de frangos de corte. Os resultados revelaram que as aves tratadas com o preparado poliprobótico apresentaram melhor conversão alimentar quando comparadas ao grupo controle.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- A preparação probiótica avaliada mostrou ser efetiva no tratamento de criptosporidiose, promovendo a eliminação total de oocistos de *Cryptosporidium parvum* nas fezes de camundongos imunossuprimidos.
- Os lactobacilos quando administrados aos animais antes da inoculação com oocistos de *C. parvum* não impediram o estabelecimento da infecção, mas a tornou mais branda.
- Os lactobacilos constituintes da preparação probiótica em estudo foram capazes de colonizar o trato gastrointestinal dos camundongos.
- Animais que receberam a preparação probiótica diariamente apresentaram conversão alimentar superior aos demais.
- A imunossupressão interferiu negativamente no desempenho nutricional dos animais.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem sugerir a realização de experimentos visando o desenvolvimento de novos produtos contendo as cepas de lactobacilos avaliadas. Posteriormente, estes produtos teriam sua eficácia avaliada sobre infecções intestinais em indivíduos imunossuprimidos e sistema imunológico destes.

## REFERÊNCIAS

ABREU, V. J. S. et al. Avaliação da eficácia do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 191 – 198, 2003. (Supl.)

AGARWAL, N. et al. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 270 - 273, 2000.

ALAK, J. I. et al. Effect of *Lactobacillus reuteri* on resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in murine model of acquired immunodeficiency syndrome. **Journal Infections Diseases**, v. 175, p. 218 – 221, 1997.

ALAK, J. I.; et al. Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *Lactobacillus acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunodeficient C57BL/6 mice. **Cellular and Molecular Biology**, v. 45, n. 06, p. 855 – 863, 1999.

ALLEN, A. V. H.; RIDLEY, D. S. Further observations on the formol ether concentration technique for faecal parasites. **J. Clin. Pathol.**, v. 23, p. 545 – 546, 1970.

ALVES, D. P.; BRITTO, M. H. S. S.; GUARALDO, A. M. A. Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, p. 55 – 60, 2004.

ALVES, P. A. Uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de vitelos bovinos: efeitos sobre o desempenho e qualidade da carne. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 25 – 34, 2000.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J.R.; MARTINEZ-HERNANDEZ, D. Probióticos. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v. 17, p. 131 – 139, 2004.

ARAUJO, A. J. U. S. et al. Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. **Ver. Panam. Infectol.**, v. 9, n. 2, p. 38 – 40, 2007.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R. et al. The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. **Parasitol. Res.**, v. 97, p 472 – 477, 2005.

BENYACOUB, J. et al. *Enterococcus faecium* SF68 Enhances the Immune Response to *Giardia intestinalis* in Mice. **J. Nutr.**, v. 135, p. 1171 – 1176, 2005.

BLAGBURN, B. L.. et al. Comparative Efficacy Evaluation of Dicationic Carbazole Compounds, Nitazoxanide, and Paromomycin against *Cryptosporidium parvum* Infections in a Neonatal Mouse Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2877 – 2882, 1998.

BRANTLEY, R.K. et al. AIDS-Associated Diarrhea and Wasting in Northeast Brazil is Associated With Subtherapeutic Plasma Levels of Antiretroviral Medications and With Both Bovine and Human Subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 16 – 22, 2003.

BUDINO, F. E. L. et al. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 529 – 536, 2004.

BUYUKBABA, B.O. et al. Investigation of intestinal parasites in AIDS patients. **Mikrobiyol. Bul.**, v. 38, p. 121 – 128, 2004.

CANIBE, N.; JENSEN, B. B. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. **Journal Animal Science**, v. 81, n. 8, p. 2019 – 2031, 2003.

CASBURN-JONES, A. C.; FARTHING, M. J. G. Management of infectious diarrhea. **Gut**, v. 53, p. 296 – 305, 2004.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMPS, A. M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 36 - 40, 2003.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>.>  
Acesso: 30 de março de 2006.

CHAVEERACH, P.; LIPMAN, L. J. A; VAN KNAPEN, F. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. **International Journal of food Microbiology**, v. 90, p. 43 - 50, 2004.

CHUKEATIROTE, E. Potential use of probiotics. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, v. 25, n. 02, p. 275 - 282, 2003.

CIMERMAN, S. et al. Perfil das enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo, Brasil. **Parasitol. latinoam.**, v. 57, n. 3-4, p.111-119, 2002.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 3, n. 4, p 203 – 206, 1999.

COÊLHO, M. D. G. ***Cryptosporidium parvum*: estabelecimento de modelo experimental em camundongos imunossuprimido com dexametasona.** 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CONWAY, L. P. Selection criteria for probiotic microorganisms. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 1, p. 10 -14, 1996.

CORRÊA, G. S. S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frango de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 1 – 9, 2003.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L.; VAN SINDE REN, D. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 521 – 534, 2004.

CURRENT WL; GARCIA LS. Cryptosporidiosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 325 - 58, 1991.



D'AIMMO, M.R.; MODESTO, M; BIAVATI B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 115. p. 35 - 42, 2007.

DALLOUL, R. A. et al. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.28, p. 351 – 361, 2005.

DOGI, C.A.; PERDIGÓN, G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 357 – 366, 2006.

DRAKES, M.; BLANCHARD, T.; CZINN, S. Bacterial Probiotic Modulation of Dendritic Cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3299–3309, 2004.

DE VRESE, M. et al. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 421 – 429, 2001. (Supl. 2)

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 53 – 61, 1999.

FOSTER, J. C. et al. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Food Microbiology**, v. 20, p. 351 – 357, 2003.

FRECE, J. et al. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 285 - 292, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n.5, p.365 - 378, 1989.

GHOSH, S.; VAN HEEL, D.; PLAYFORD, R. J. Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? **Gut**, v. 53, p. 620 – 622, 2006.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutr.**, v. 130, p.391 - 395. (Supl. 2)

GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgrad. Med. J.**, v. 80, p. 516 – 526, 2004.

GLASS, M. D. et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 423 – 429, 2004.

GLÜCK, U.; GEBBERS, J. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and  $\beta$ -hemolytic streptococci. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, p. 517 – 520, 2003.

GOMES, P. M; MALCATA, X. F. A. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia alimentar**, v. 64, p.12 - 22, 1999.

GUITARD, J. et al. Experimental study of effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. **Parasitol. Res.**, v. 99, p. 522 – 527, 2006.

GUK, S. M. et al. Parasitic infections in HIV-infected patients who visited Seoul National University Hospital during the period 1995-2003. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 1 - 5, 2005.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Livraria Roca, 1993, 238p.

HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G. T. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. **Microbiol Ecology**, v. 51, p. 448 – 454, 2002.

HUAYNATE, R. A. R., et al. Uso de probiótico em dietas de suínos: incidência de diarreia, desempenho zootécnico e digestibilidade de rações. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 43, n. 05, p. 664 - 673, 2006.

HUNTER, P.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p.145 –154, 2002.

IQBAL, J.; MUNIR, M. A.; KHAN, M. A. *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 5, p. 868 – 870, 1999.

KATELARIS, P.H. Probiotic control of diarrhoeal disease. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, p. 39 - 43, 1996.

KAYSER, O. et al. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* activity of benzindazole-4,9-quinones against *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 975 – 980, 2002.

KUCIK, C. J.; MARTIN, G. L.; SORTOR, B. V. Common intestinal parasites, **Am. Fam. Physician**, v. 69, p. 1161 - 1168, 2004.

LAUPLAND, K.B.; CHURCH, D. L. Population-based laboratory surveillance for *Giardia* sp. And *Cryptosporidium* sp. infections in a large Canadian health region. **BMC. Infectious Diseases**, v. 5, n. 72, p. 1 – 9, 2005.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**. v. 147, p. 747 – 748, 1965.

MARTEAU, P. R. et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of Probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 430 – 436, 2001. (Supl.)

MARTINS, F. S. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 83 – 92, 2005.

MCINTOSH, H. G. Probiotics and colon cancer prevention. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, p. 48 - 52, 1996.

MOHANDAS, K. et al. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 55, p. 83 – 84, 2002.

MORGAN-RYAN U.M. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433 – 440, 2002.

MOROTOMI, M. Properties of *Lactobacillus casei shirota* strain as probiotics. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 1, p.35 - 43, 1996.

NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA 2., 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2000, v.1, p. 45 - 55.

NESTEL, P. Intestinal flora and human health. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 1, p. 1 - 2, 1996.

NICOLI, R. J.; VIEIRA, Q. L. Moduladores do ecossistema digestivo: probióticos, prebióticos e simbióticos. **Ciências Hoje**, v. 28, n. 163, p. 34 - 38, 2000.

NOMOTO, K. Prevention of infectiond by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 583 – 592, 2005.

PARASHAR, A.; ARYA, R. Drug therapy, **Indian Pediatrics**, v. 42, p. 1161 – 1165, 2005.

PEREIRA, C.A.S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Eimeria spp* em *Rattus norvegicus***. 76f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

PETRI-JUNIOR, W. A. Therapy of intestinal protozoa. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 523 – 526, 2003.

PLUMMER, S. et al. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiótico supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. **International Microbiology**, v. 7, p. 59 – 62, 2004.

POPPI, L.B. **Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes***. 113f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

POTHOULAKIS, G.; KELLY, C. P.; JOSHI, M. A. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* Toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 1108 – 1115, 1993.

PROCTOR, M.E., BLAIR, K.A.; DAVIS, J.P. Surveillance data for waterborne illness detection: an assessment following a massive waterborne outbreak of *Cryptosporidium* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 120, p. 43 – 54, 1998.

RASTALL, R. A. Bacteria in the gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. **J. Nutr.** v. 134, p. 2022 – 2026, 2004. (Supl.)

RAYES et al. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. **Transplantation**, v. 72, p. 123 – 127, 2002.

REID, G. et al. Potential uses of probiotics in clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 658 – 672, 2003.

RIBEIRO, P.A. et al. Cryptosporidiosis occurrence in HIV+ patients attended in a hospital, Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 469 – 470, 2004.

RIMHANEN-FINNE, R. ***Cryptosporidium* and *Giardia*: detection in environmental and faecal samples**. Dissertação Acadêmica - Department of Food and Environmental Hygiene - Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, 2006.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull. U.S. Army Med. Dept.**, v. 8, p. 326, 1948.

ROSSI, P. et al. Gastric involvement in AIDS associated cryptosporidiosis. **Gut**, v. 43, p. 476 – 477, 1998.

ROTKIEWIEZ, T. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. on the course of *Cryptosporidium parvum* invasion in new-born piglets. **Bulletin Veterinary Pulawy**, v. 45, p. 181 – 195, 2001.

ROWLAND, I. Probiotics and benefits to human health--the evidence in favour. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 375 - 376, 1999.

SALMINEM, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEM, E. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 1, p.53 - 56, 1996.

SALMINEN, S. et al. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p.107 - 110, 1999.

SAXELIN, M. et al. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in Biotechnology**. v. 16, p. 1 - 8, 2005.

SCHIEFERSTEIN, C.; BUHK, T. **Controle dos efeitos secundários.** Disponível em : <[http://hivmedicine.aidsportugal.com/06\\_Side\\_Effects.php](http://hivmedicine.aidsportugal.com/06_Side_Effects.php)> Acesso: 24 de outubro de 2007

SCHIFFRIN, E. J. et al. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 66, p. 515 – 520, 1997.(Supl.)

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

SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. H. Adhesion of probiotics strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 741 – 754, 2003.

SHEIL, B. et al. Role of interleukin (IL- 10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL- 10 knock-out mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 144, p. 273 – 280, 2006.

SHU, Q.; QU, F.; GILL, H. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Eschechiria coli* infection in a piglet model. **Journal Pediatric Gastroenterological Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 171 – 177, 2001.

SILVA, C.V. et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 37, n. 3, p. 211 – 215, 2005.

SILVI, S. et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 195 - 200, 2003.

Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. Guía práctica: **La infección por el VIH**. 2ª Edición. Disponível em: <<http://saei.org/hemero/libros/LIBRO%20SIDA.pdf>> Acesso: 15 de dezembro 2007.

SURL, C.; KIM, H. Concurrent response to challenge infection with *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed C57BL/6N mice. **J. Vet. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 47 – 51, 2006.

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

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes Infect**, v. 4, p. 1047 – 1058, 2002.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1810 – 1814, 2001.

VANDELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition : a review. **Archives of Animal Nutrition**, v. 40, n. 7, p. 543 – 567, 1990.

VINDEROLA, C.G.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G. Relationship between interacion sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 230 – 243, 2004.

VITÓRIA, M. A. Parasitoses intestinais em pacientes com infecção pelo HIV/AIDS, 2006.

Disponível em:

<[http://www.hiv.org.br/internas\\_materia.asp?cod\\_secao=atualiza&cod\\_materia=329](http://www.hiv.org.br/internas_materia.asp?cod_secao=atualiza&cod_materia=329)>

Acesso: 14 de maio de 2006.

WUHIB, T. et al. Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 2, p. 494 – 497, 1994.

ZALI, M.R. et al. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-Positive individuals in Iran. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 268 – 270, 2004.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A. BIOGRAFIA

Tatiane Sueli Coutinho nasceu no dia 30 de junho de 1983, na cidade de Cruzeiro/SP, onde reside atualmente. Em 2001, aos 17 anos, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, *campus* de Assis/SP. Neste período teve a oportunidade de realizar estágio no Laboratório de Imunologia, trabalhando especificamente com o protozoário *Leshmania*. Posteriormente, por um período de dois anos e meio, desenvolveu atividades em nível de iniciação científica no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica daquela Universidade, iniciando suas pesquisas no campo dos probióticos e prebióticos.

Em 2005 iniciou seus estudos de pós-graduação, em nível de mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial – Departamento de Biotecnologia, da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL, atualmente, Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP. Nesta oportunidade, deu continuidade à sua formação profissional avaliando propriedades probióticas de cepas de *Lactobacillus*.

APÊNDICE B. Peso em gramas dos camundongos C57BL/6 durante os ensaios experimentais<sup>1</sup>

Tempo de experimento	Controle <sup>a</sup>	Imuno <sup>b</sup>	Não Tratado <sup>c</sup>	NTZ <sup>d</sup>	PRO <sup>e</sup>	Preventivo <sup>f</sup>
Dia 0	10,85 ± 0,53	10,48 ± 1,12	10,46 ± 1,00	10,39 ± 0,93	11,36 ± 0,61	9,91 ± 0,74
2° Dia	13,82 ± 0,58	12,22 ± 2,10	12,26 ± 0,68	11,98 ± 1,10	12,57 ± 1,03	11,59 ± 0,92
4° Dia	14,03 ± 0,44	12,89 ± 1,11	12,81 ± 0,58	12,28 ± 1,05	12,72 ± 1,08	12,30 ± 0,40
6° Dia	14,45 ± 0,23	12,82 ± 1,65	12,89 ± 0,75	12,51 ± 0,87	12,93 ± 1,03	12,41 ± 0,62
8° Dia	14,39 ± 1,03	12,91 ± 1,06	13,18 ± 1,06	12,53 ± 1,18	12,87 ± 1,26	12,31 ± 0,66
10° Dia	15,36 ± 0,34	13,23 ± 1,03	13,15 ± 0,91	12,84 ± 0,72	13,05 ± 1,19	12,43 ± 0,70
12° Dia	15,44 ± 0,81	13,40 ± 0,80	12,93 ± 1,08	12,59 ± 0,81	13,61 ± 0,61	12,07 ± 0,52
14° Dia	15,86 ± 0,64	13,42 ± 0,99	13,37 ± 1,01	12,95 ± 0,88	13,73 ± 0,67	12,60 ± 0,39
16° Dia	15,60 ± 0,57	13,16 ± 1,07	13,25 ± 1,26	12,98 ± 0,71	13,74 ± 0,54	12,85 ± 0,40
18° Dia	15,44 ± 0,77	12,80 ± 0,79	12,90 ± 1,14	12,68 ± 0,82	13,10 ± 0,69	12,30 ± 0,49
20° Dia	16,27 ± 0,66	13,57 ± 0,54	13,61 ± 1,07	13,28 ± 0,79	14,00 ± 0,45	12,95 ± 0,51
22° Dia	16,38 ± 0,90	13,59 ± 0,63	13,40 ± 1,19	13,40 ± 0,75	13,78 ± 0,62	12,89 ± 0,35
24° Dia	16,26 ± 1,05	13,66 ± 0,43	13,58 ± 1,21	13,39 ± 0,96	13,90 ± 0,59	12,97 ± 0,64
26° Dia	16,36 ± 0,67	13,83 ± 0,66	13,43 ± 1,41	12,89 ± 1,00	13,81 ± 0,54	12,57 ± 0,68
28° Dia	16,56 ± 0,71	13,77 ± 0,41	13,01 ± 1,11	13,10 ± 1,02	14,02 ± 0,57	12,63 ± 0,59
30° Dia	17,07 ± 0,89	13,56 ± 0,54	12,97 ± 1,03	12,99 ± 0,81	14,03 ± 0,61	13,07 ± 0,39
33° Dia	17,10 ± 0,66	13,65 ± 0,61	13,03 ± 0,97	13,23 ± 0,77	14,17 ± 0,59	13,14 ± 0,58

<sup>1</sup> Peso médio dos animais ± desvio padrão;

<sup>a</sup> Animais não imunossuprimidos, não infectados e não tratados;

<sup>b</sup> Animais imunossuprimidos, não infectados e não tratados;

<sup>c</sup> Animais imunossuprimidos, infectados e não tratados;

<sup>d</sup> Animais imunossuprimidos, infectados e tratados com antiprotozoário;

<sup>e</sup> Animais imunossuprimidos, infectados e tratados com probióticos;

<sup>f</sup> Animais imunossuprimidos, tratados com probióticos e posteriormente infectados.

APÊNDICE C. Consumo individual de ração (g) pelos camundongos<sup>1</sup>

<b>Tempo de experimento</b>	<b>Controle</b>	<b>Imuno</b>	<b>Não Tratado</b>	<b>NTZ</b>	<b>PRO</b>	<b>Preventivo</b>
2° Dia	9,09 ± 0,59	8,95 ± 1,52	8,59 ± 0,83	8,47 ± 0,99	8,79 ± 0,87	8,57 ± 0,66
4° Dia	8,37 ± ,088	8,19 ± 0,57	8,47 ± 0,57	8,27 ± 0,69	8,40 ± 1,00	8,76 ± 0,76
6° Dia	8,42 ± 0,41	7,13 ± 1,07	7,09 ± 0,56	7,40 ± 0,68	7,44 ± 0,54	7,24 ± 0,57
8° Dia	7,18 ± 1,48	7,38 ± 0,55	7,85 ± 1,24	7,24 ± 0,74	7,84 ± 1,06	7,72 ± 1,24
10° Dia	9,18 ± 0,76	7,78 ± 0,43	7,74 ± 0,69	8,08 ± 0,44	7,34 ± 1,03	8,03 ± 0,43
12° Dia	9,01 ± 1,04	8,60 ± 0,29	8,04 ± 0,64	8,41 ± 0,89	7,14 ± 0,41	8,07 ± 0,81
14° Dia	9,83 ± 0,95	7,48 ± 0,43	8,69 ± 0,93	8,23 ± 0,80	7,53 ± 0,85	7,31 ± 1,25
16° Dia	9,03 ± 0,53	7,90 ± 0,93	7,16 ± 0,36	7,65 ± 0,57	8,00 ± 0,79	7,97 ± 0,43
18° Dia	9,41 ± 0,41	8,62 ± 0,45	8,29 ± 1,21	8,43 ± 0,22	8,90 ± 0,66	8,42 ± 0,28
20° Dia	8,16 ± 0,87	7,06 ± 0,47	8,15 ± 1,30	7,60 ± ,050	8,20 ± 0,22	7,74 ± 0,48
22° Dia	9,59 ± 0,93	8,65 ± 0,50	9,29 ± 1,40	8,90 ± 0,38	8,37 ± 1,89	9,21 ± 0,79
24° Dia	10,21 ± 0,14	10,93 ± 0,98	10,10 ± 1,67	10,80 ± 0,58	9,20 ± 0,88	10,62 ± 0,63
26° Dia	11,37 ± 0,67	8,11 ± 1,22	9,70 ± 0,98	8,59 ± 0,63	9,91 ± 0,78	8,29 ± 0,87
28° Dia	12,81 ± 0,99	11,17 ± 0,35	11,14 ± 0,88	11,98 ± 0,47	12,25 ± 0,66	10,05 ± 0,91
30° Dia	13,88 ± 0,65	12,25 ± 0,63	11,17 ± 0,56	11,92 ± 0,78	12,31 ± 0,38	11,85 ± 0,48
33° Dia	12,47 ± 0,43	11,18 ± 0,87	11,51 ± 0,64	10,85 ± 0,81	11,68 ± 1,21	11,60 ± 0,56

<sup>1</sup> Consumo médio de ração ± desvio padrão

APÊNDICE D. População de *Lactobacillus* resistentes à Rifampicina nas fezes dos animais (log 10 UFC/g de fezes)

Tempo de experimento	Controle	Imuno	Não tratado	NTZ	PRO	Preventivo	
0 DIA	NÃO DETECTADO						
3° DIA	NÃO DETECTADO					6,68	6,76
						6,71	
<b>Média</b>						<b>6,72</b>	
6° DIA	NÃO DETECTADO					8,61	8,84
						8,81	
<b>Média</b>						<b>8,64</b>	
9° DIA	NÃO DETECTADO					9,95	9,97
						9,90	
<b>Média</b>						<b>9,94</b>	
12° DIA <sup>1</sup>	NÃO DETECTADO					9,40	9,02
						9,08	
<b>Média</b>						<b>9,20</b>	
15° DIA	NÃO DETECTADO					10,36	10,55
						10,29	
<b>Média</b>						<b>10,42</b>	
17° DIA <sup>2</sup>	NÃO DETECTADO					9,52	9,76
						9,66	
<b>Média</b>						<b>9,66</b>	
20° DIA	NÃO DETECTADO				5,65	8,90	
					5,57	8,81	
					5,68	8,88	
<b>Média</b>					<b>5,64</b>	<b>8,86</b>	
23° DIA <sup>3</sup>	NÃO DETECTADO				5,95	8,81	
					5,89	8,65	
					5,82	8,61	
<b>Média</b>					<b>5,89</b>	<b>8,70</b>	
27° DIA <sup>4</sup>	NÃO DETECTADO				8,48	7,74	
					8,70	7,49	
					8,60	7,38	
<b>Média</b>					<b>8,60</b>	<b>7,56</b>	
30° DIA	NÃO DETECTADO				5,65	4,63	
					5,38	4,45	
					5,75	4,75	
<b>Média</b>					<b>5,62</b>	<b>4,63</b>	
33° DIA	NÃO DETECTADO				4,61	4,49	
					4,72	4,45	
					4,59	4,62	
<b>Média</b>					<b>4,65</b>	<b>4,53</b>	

\* log 10 da média de três repetições; <sup>1</sup> Infecção dos animais; <sup>2</sup> Início do tratamento dos grupos PRO e NTZ; <sup>3</sup> Final de tratamento do grupo NTZ; <sup>4</sup> Final do tratamento do grupo PRO

APÊNDICE E. População de *Lactobacillus* nas fezes dos camundongos (log 10 UFC/g de fezes)

Tempo de experimento	Controle	Imuno	Não tratado	NTZ	PRO	Preventivo
0 DIA	6,15	6,36	6,71	6,90	7,70	7,30
	6,28	6,51	6,91	6,18	8,04	7,00
	6,00	6,64	6,88	6,70	7,95	7,29
<b>Média*</b>	<b>6,16</b>	<b>6,52</b>	<b>6,84</b>	<b>6,68</b>	<b>7,92</b>	<b>7,22</b>
3° DIA	7,20	7,51	7,90	7,92	9,26	10,08
	7,43	7,45	7,74	7,84	9,18	10,21
	7,28	7,41	7,88	7,73	9,20	10,26
<b>Média</b>	<b>7,32</b>	<b>7,46</b>	<b>7,85</b>	<b>7,84</b>	<b>9,21</b>	<b>10,19</b>
6° DIA	7,64	10,34	8,60	8,67	10,25	11,10
	7,75	10,36	8,60	8,68	10,27	11,19
	7,67	10,32	8,64	8,61	10,29	10,97
<b>Média</b>	<b>7,69</b>	<b>10,34</b>	<b>8,61</b>	<b>8,66</b>	<b>10,27</b>	<b>11,10</b>
9° DIA	7,00	9,39	8,41	9,10	10,31	11,36
	7,11	9,40	8,38	9,09	10,26	11,28
	7,18	9,46	8,47	9,08	10,29	11,15
<b>Média</b>	<b>7,10</b>	<b>9,42</b>	<b>8,42</b>	<b>9,09</b>	<b>10,28</b>	<b>11,27</b>
12° DIA <sup>1</sup>	7,08	11,16	9,07	10,45	11,74	9,70
	7,30	11,17	9,03	10,46	11,76	9,70
	7,23	11,16	9,06	10,49	11,69	9,00
<b>Média</b>	<b>7,21</b>	<b>11,16</b>	<b>9,05</b>	<b>10,47</b>	<b>11,73</b>	<b>9,56</b>
15° DIA	7,12	12,70	10,86	12,20	14,07	13,12
	7,00	12,76	10,85	12,08	14,08	13,10
	6,88	12,66	10,84	11,95	14,08	13,20
<b>Média</b>	<b>7,01</b>	<b>12,71</b>	<b>10,85</b>	<b>12,09</b>	<b>14,07</b>	<b>13,14</b>
17° DIA <sup>2</sup>	7,70	12,65	11,34	12,00	12,48	11,30
	7,95	12,63	11,32	11,60	12,48	11,00
	7,85	12,68	11,37	11,78	12,30	11,00
<b>Média</b>	<b>7,85</b>	<b>12,65</b>	<b>11,34</b>	<b>11,82</b>	<b>12,43</b>	<b>11,12</b>
20° DIA	6,30	11,48	10,70	9,08	11,90	10,95
	6,30	11,60	10,95	9,04	11,70	10,60
	6,70	11,60	10,70	9,00	11,48	10,60
<b>Média</b>	<b>6,48</b>	<b>11,56</b>	<b>10,80</b>	<b>9,04</b>	<b>11,73</b>	<b>10,75</b>
23° DIA <sup>3</sup>	7,00	11,08	11,08	8,98	13,74	11,04
	6,90	11,08	11,20	9,18	13,30	10,90
	6,85	10,85	11,11	8,94	13,05	11,11
<b>Média</b>	<b>6,92</b>	<b>11,01</b>	<b>11,14</b>	<b>9,05</b>	<b>13,46</b>	<b>11,03</b>
27° DIA <sup>4</sup>	6,48	11,53	11,43	9,08	13,89	11,04
	6,70	11,60	11,69	9,23	13,94	11,08
	6,48	11,45	11,63	9,40	13,81	11,38
<b>Média</b>	<b>6,56</b>	<b>11,53</b>	<b>11,60</b>	<b>9,26</b>	<b>13,89</b>	<b>11,19</b>
30° DIA	6,48	10,70	10,70	9,23	13,99	10,32
	6,30	11,00	10,78	8,99	13,92	10,11
	6,60	11,04	10,90	9,00	14,00	9,99
<b>Média</b>	<b>6,48</b>	<b>10,94</b>	<b>10,80</b>	<b>9,09</b>	<b>13,97</b>	<b>10,16</b>
33° DIA	6,52	10,36	10,40	9,89	11,74	10,32
	6,71	10,49	10,51	9,83	11,49	11,04
	6,67	10,28	10,32	9,90	11,72	11,04
<b>Média</b>	<b>6,64</b>	<b>10,39</b>	<b>10,41</b>	<b>9,88</b>	<b>11,66</b>	<b>10,90</b>

\* log 10 da média de três repetições; <sup>1</sup>Infeção dos animais; <sup>2</sup>Início do tratamento dos grupos PRO e NTZ; <sup>3</sup>Final de tratamento do grupo NTZ; <sup>4</sup>Final do tratamento do grupo PRO.

APÊNDICE F. Contagem de oocistos de *C. parvum* nas fezes de camundongos infectados no 12º dia de experimento (log 10 OoPG)

Grupos	Tempo de Experimento											
	16º Dia	17º Dia*	18º Dia	19º Dia	20º Dia	21º Dia	22º Dia	23º Dia**	24º Dia	25º Dia	26º Dia	27º Dia***
Não tratado 1	6,60	7,68	7,60	6,81	6,98	6,41	5,34	5,00	3,73	3,43	3,29	3,18
Não tratado 2	6,65	7,63	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Não tratado 3	6,60	7,35	7,48	6,90	7,02	6,15	5,30	4,78	3,84	3,62	3,42	x
Não tratado 4	6,74	7,51	7,44	6,70	6,88	6,20	5,26	†	†	†	†	†
Não tratado 5	5,70	7,54	7,40	6,70	6,93	6,48	5,20	4,70	3,61	3,62	3,46	3,24
Não tratado 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Não tratado 7	6,54	7,60	7,63	6,88	6,81	6,34	5,41	4,95	x	x	x	x
NTZ 1	6,60	7,48	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NTZ 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NTZ 3	6,65	7,24	6,88	4,30	3,62	2,94	2,00	1,30	1,30	0	0	0
NTZ 4	6,40	7,54	7,10	4,60	3,54	2,83	2,15	0	0	0	0	x
NTZ 5	6,54	7,63	7,00	4,78	3,56	2,88	1,78	0	0	0	0	0
NTZ 6	6,30	7,18	6,88	4,60	3,58	2,86	1,78	0	0	0	0	0
NTZ 7	6,78	7,57	7,00	4,30	3,50	2,83	1,30	0	x	x	x	x
PRO 1	6,54	7,51	7,44	6,20	6,00	4,85	3,71	2,99	0	0	0	x
PRO 2	6,74	7,44	7,51	6,20	6,20	4,70	3,71	3,02	2,68	1,60	0	0
PRO 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PRO 4	6,70	7,40	7,30	6,30	5,78	4,48	3,73	3,14	2,72	2,08	0	0
PRO 5	6,40	7,60	7,57	6,26	6,15	4,30	3,71	2,98	2,79	1,90	0	0
PRO 6	6,48	7,30	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PRO 7	6,65	7,63	7,00	5,90	5,60	4,48	3,70	2,97	x	x	x	x
Preventivo 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Preventivo 2	4,90	4,60	3,78	3,13	3,06	2,66	0	0	0	0	0	x
Preventivo 3	4,70	4,30	3,70	3,13	3,28	2,68	1,30	0	0	0	0	0
Preventivo 4	5,00	4,78	3,83	3,21	3,17	2,73	0	0	0	0	0	0
Preventivo 5	4,78	4,78	3,73	3,08	3,09	2,58	0	0	x	x	x	x
Preventivo 6	4,90	4,60	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Preventivo 7	5,08	4,78	3,91	3,12	3,12	2,79	1,60	0	0	0	0	0

x – animal sacrificado para análise de sangue; † - animal encontrado morto; \* Início do tratamento dos grupo NTZ e PRO; \*\* Final de tratamento do grupo NTZ; \*\*\* Final de tratamento do grupo PRO.

APÊNDICIE G. Leucograma dos animais

		Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	%							Plaquetas (Mil/mm <sup>3</sup> )		
		Blastos	Promielócitos	Mielócitos	Metamielócitos	Bastonetes	Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos	
DIA 0	Controle	-	-	-	-	-	15	-	-	84	1	-
	Imuno	-	-	-	-	-	9	-	-	89	2	-
	Não tratado	-	-	-	-	-	19	-	-	78	2	-
DIA 12°	NTZ	-	-	-	-	-	8	-	-	90	1	-
	PRO	-	-	-	-	-	5	-	-	93	2	-
	Preventivo	-	-	-	-	-	8	-	-	91	1	-
DIA 17°	Controle	4200	-	-	-	-	6	-	-	93	1	792
	Imuno	3100	-	-	-	-	39	-	-	56	5	855
	Não tratado	5500	-	-	-	-	75	1	-	23	1	608
DIA 23°	NTZ	3600	-	-	-	-	50	-	-	48	2	666
	PRO	4500	-	-	-	-	45	-	-	53	2	651
	Preventivo	2400	-	-	-	-	72	-	-	28	0	907
DIA 27°	Controle	6300	-	-	-	-	12	-	-	85	3	610
	Imuno	1900	-	-	-	-	77	-	-	21	2	830
	Não tratado	1700	-	-	-	-	38	1	-	53	8	417
DIA 27°	NTZ	300	-	-	-	-	47	-	-	53	-	70
	PRO	2600	-	-	-	-	43	-	-	55	2	783
	Preventivo	3100	-	-	-	-	12	-	-	80	8	514
DIA 27°	Controle	6300	-	-	-	-	12	-	-	85	3	610
	Imuno	900	-	-	-	-	72	-	-	26	2	609
	Não tratado	2900	-	-	-	-	58	1	-	41	-	523
DIA 27°	NTZ	3800	-	-	-	-	2 57	-	-	41	2	720
	PRO	1300	-	-	-	-	54	-	-	42	4	542
	Preventivo	3400	-	-	-	-	73	-	-	23	2	1108
DIA 27°	Controle	4600	-	-	-	-	16	-	-	83	1	886
	Imuno	2900	-	-	-	-	66	-	-	32	2	806
	Não tratado	2900	-	-	-	-	56	-	-	43	1	910
DIA 27°	NTZ	3000	-	-	-	-	62	-	-	36	2	845
	PRO	3400	-	-	-	-	65	-	-	30	5	855
	Preventivo	24800	-	-	-	-	91	-	-	8	1	737