

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

REBECA DÁLETY SANTOS CRUZ

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM GATOS
SUPLEMENTADOS COM MANANOPROTEÍNAS E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

ILHÉUS-BA

2018

REBECA DÁLETY SANTOS CRUZ

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM GATOS
SUPLEMENTADOS COM MANANOPROTEÍNAS E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

ILHÉUS-BA

2018

REBECA DÁLETY SANTOS CRUZ

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM GATOS
SUPLEMENTADOS COM MANANOPROTEÍNAS E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

Ilhéus – BA, 27/04/2018

Alexandre Dias Munhoz - D.Sc
UESC/DCAA
(Orientador)

Sonia Carmen Lopo Costa
Doutora em Ciência Animal

Bianca Mendes Maciel - D.Sc
UESC/DCB

**ILHÉUS – BA
2018**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro Cruz e Dilma Conceição, por todo amor e dedicação. Ao meu irmão Isaac Álef e a meu noivo Antonio Bomfim pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Dedico primeiramente, a Deus, autor e consumidor da minha fé. Agradeço pela dádiva da vida, por seu infinito amor, amizade e misericórdia e por sua real presença em todos os momentos. Sendo meu alicerce em dias difíceis.

Aos meus pais Dilma Conceição e Pedro Cruz, pelo amor, carinho e apoio desde o início. Obrigada por me incentivarem nessa jornada. Amo vocês!

Ao meu irmão Isaac Állef por tornar os dias cansativos em dias mais leves e felizes.

Ao meu noivo Antonio Bomfim pelo companheirismo, compreensão e amor. Obrigada por fazer questão em estar presente e ajudar em todos os momentos, inclusive na pesquisa.

Aos familiares, amigos e irmãos em Cristo pelas orações, injeções de ânimo e pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador professor Alexandre Dias Munhoz pelo apoio, ensinamentos, paciência, orientação e atenção nos momentos que precisei.

A todos que fazem parte da equipe do laboratório de Análises Clínicas, Ana Graziela Deiró, Uillians Volkart, Ana Paula Calazans e Lilia Alves, obrigado pelo auxílio, bom companheirismo e boas risadas.

A Gabriela Mota e Jéssica Freitas pela amizade e conselhos. Obrigada por estarem sempre disponíveis a me ouvir.

A doutoranda Luciana Lacerda com quem compartilhei essa experiência única. Obrigada pelos ensinamentos, direcionamento; pelas palavras sábias e pela ótima convivência durante a execução do projeto. Adotamos com amor e carinho 12 “filhos” e como mães tivemos preocupações e responsabilidades, mas essa tarefa se tornou mais prazerosa e proveitosa sendo compartilhada. Obrigada!

Aos alunos da Iniciação Científica Anna Luiza Braga, José Luiz Varjão e Fabiana Barbosa por toda ajuda durante o experimento, sei que não foi fácil, mas vocês sempre estavam prontos a ajudar.

A Amanda Teixeira que de forma espetacular me acolheu no Laboratório de Anaeróbicas, compartilhando comigo seus conhecimentos e experiências. Obrigada pela amizade que nasceu durante o mestrado e se expandiu.

A Aisla Nascimento e Hllytchaikra Ferraz por toda ajuda, conselhos, momentos agradáveis e apoio na reta final.

Aos amigos de turma da pós-graduação, em especial: Willian Moraes, Luana Karla Nogueira, Marjane Matos e Aline Sena. Obrigada!

Obrigada a equipe do Centro Cirúrgico da UESC, pela realização das castrações dos animais.

As professoras Katia Moema e Luci Ana Fernandes Martins, obrigada pela realização das ultrassonografias e raio x nos gatos.

A diretora do Hospital Veterinário Roueda Said por permitir a estadia dos gatos no gatil e canil. Obrigada!

Ao prof. João Luis Garcia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, pelos oocistos da cepa ME49 de *T. gondii*.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro pelas cepas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) e *Clostridium perfringens* (ATCC 13124).

A Prof.^a Bianca Mendes Maciel - Departamento de Ciências Biológicas da UESC/Ilhéus, Bahia juntamente com a doutoranda Amanda Teixeira por ter cedido a curva padrão da bactéria *Escherichia coli* (INCQS 00033) e pelos ensinamentos e confiança. Obrigada!

Aos felinos Nick, Joana, Simba, Jagua Bravo, Jagua Manso, Jagua Preto, Macho de Olivença, Blanca, Fêmea de Olivença, Michael, Cléo e Luana sem eles não seria possível a realização da pesquisa. Com eles pude apreender ainda mais sobre o amor, carinho e respeito pelos animais. Pude me apaixonar ainda mais por minha profissão de Médica Veterinária e ter certeza de que estou no caminho certo. Aprendi a amar cada um de forma única e especial.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para essa conquista. Muito obrigada.

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM GATOS
SUPLEMENTADOS COM MANANOPROTEÍNAS E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a microbiota intestinal de gatos suplementados com mananoproteínas e experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*. Para tal fim, dois grupos de 06 gatos foram formados. Grupo I: gatos negativos para *T. gondii* suplementados com mananoproteínas. Grupo II: gatos negativos para *T. gondii* e não suplementados com mananoproteínas. Denominou-se D0 o início da suplementação, e após 21 dias todos os animais foram infectados com *T. gondii*. Amostras de fezes e de sangue foram coletadas em dias pré-determinados para a avaliação das populações microbianas através da qPCR e para determinação da soroconversão, respectivamente. Os resultados entre e dentro dos grupos experimentais foram avaliados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Com relação a microbiota fecal entre os grupos experimentais, houveram maiores números de cópias de *Lactobacillus* spp. no D21 ($p=0,01$) no grupo suplementado em comparação ao não suplementado e para *E.coli* o número de cópias no D28 foi maior no grupo não suplementado. Dentro do grupo experimental houve aumento no número de cópias de *Lactobacillus* spp. no dia D21 ($p=0,02$), D28 ($p=0,01$) e D35 ($p=0,02$) comparado ao D0. Já dentro do grupo não suplementado observou-se uma diminuição no número de cópias de *Lactobacillus* spp. no D35 em relação ao D0 ($p=0,017$), D21 ($p=0,009$) e D28 ($p=0,03$). No grupo não suplementado, *C. perfringens* e *E.coli* apresentaram um menor número de cópias ($p=0,05$), ($p=0,009$) no D21 comparado ao D0, enquanto no D28 apresentaram um maior número de cópias em relação ao D0 ($p=0,01$), ($p=0,009$) e D21 ($p=0,01$), ($p=0,009$), respectivamente. Concluiu-se que mananoproteínas na concentração de 0,16% possuem efeito benéfico na modulação da microbiota de gatos, bem como esse efeito persiste mesmo após a infecção por *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Felino. Suplementação. qPCR.

**EVALUATION OF INTESTINAL MICROBIOTA IN CATS
SUPPLEMENTED WITH MANNANOPROTEINS AND
EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Toxoplasma gondii***

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the intestinal microbiota of cats supplemented with mannanoproteins and experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. For this purpose two groups of 06 cats were formed. Group I: Negative cats for *T. gondii* supplemented with mannanoproteins. Group II: Negative cats for *T. gondii* and not supplemented with mannanoproteins. The start of supplementation was denoted D0, and after 21 days all the animals were reinfected with *T. gondii*. Samples of feces and blood were collected on predetermined days for the evaluation of microbial populations through qPCR and for determination of seroconversion, respectively. Results between and within the experimental groups were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney test. Regarding the fecal microbiota between the experimental groups, there were larger numbers of copies of *Lactobacillus* spp. in D21 ($p = 0.01$) in the supplemented group compared to the unsupplemented group and for *E. coli* the number of copies in D28 were higher in the group not supplemented. Within the experimental group there was an increase in the number of copies of *Lactobacillus* spp. on day D21 ($p = 0.02$), D28 ($p = 0.01$) and D35 ($p = 0.02$) compared to D0. Within the non-supplemented group, a decrease in the number of copies of *Lactobacillus* spp. in D35 was observed in relation to D0 ($p = 0.017$), D21 ($p = 0.009$) and D28 ($p = 0.03$). In the non-supplemented group, *C. perfringens* and *E. coli* presented a lower number of copies ($p = 0.05$), ($p = 0.009$) in D21 compared to D0, while in D28 they presented a higher number of copies in relation to D0 ($p = 0.01$), ($p = 0.009$) and D21 ($p = 0.01$), ($p = 0.009$), respectively. It was concluded that mannanoproteins at a concentration of 0.16% have a beneficial effect on the modulation of the microbiota of cats, as well as this effect persists even after *T. gondii* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Feline. Supplementation. qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Ciclo de vida do <i>T.gondii</i>	18
2	Cisto de <i>T. gondii</i> visualizado em macerado de cérebro de camundongo infectado com oocistos da cepa ME-49. 1000x	30
3	Ilustração da técnica de RIFI para detecção de anticorpos anti-IgG de <i>T. gondii</i> . Reação negativa, reação positiva e Fotomicrografia dos oocistos de <i>T.gondii</i> nas fezes de um felino	35
4	Curvas de amplificação e curvas padrão de <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> pelo sistema TaqMan	36

LISTA DE TABELAS

Tabela	Pág.	
1	Iniciadores utilizados para detecção qualitativa e quantitativa dos diferentes grupos bacterianos nas amostras fecais dos gatos	33
2	Probes (sondas) utilizadas para detecção quantitativa dos diferentes grupos bacterianos nas amostras fecais dos gatos	34
3	Títulos de anticorpos (IgG) anti- <i>T.gondii</i> em felinos dos grupos experimentais (não-suplementado) e (suplementado)	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Pág.
A Protocolo da Reação de Imunofluorescência- RIFI	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivo específico.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1	Histórico do <i>Toxoplasma gondii</i>	16
3.2	Ciclo de vida do parasito.....	16
3.3	Infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i> nos gatos.....	18
3.4	Microbiota intestinal.....	19
3.5	Microbiota fecal de gatos.....	21
3.6	Bactérias alvo do estudo.....	22
3.7	Prebióticos.....	23
3.8	PCL, Mananoligossacarídeo e Mananoproteínas.....	24
3.9	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Seleção e Manutenção dos animais.....	28
4.2	Coleta e processamento das amostras dos animais selecionados.....	28
4.3	Preparação do inóculo de <i>T. gondii</i>	30
4.4	Delineamento experimental.....	30
4.5	Ensaio experimentais.....	32
4.6	Análise de dados.....	35
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório de conhecida importância zoonótica, capaz de infectar praticamente todos os animais homeotérmicos (DUBEY, 2010). Possui como hospedeiros definitivos os felídeos e é nas células epiteliais desses animais que ocorre produção e liberação de oocistos nas fezes (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FERGUSON et al., 1999).

A mucosa intestinal é a principal porta de entrada do *T.gondii* nos hospedeiros definitivos (MANTOVANI et al., 2011) e esta desempenha um papel importante no combate a infecção oral pelo parasito (BOUT et al., 1999), sendo uma barreira física formada pelos enterócitos (BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

A microbiota intestinal possui um papel crucial no metabolismo e manutenção na saúde do hospedeiro e, juntamente com o epitélio e o sistema imunológico proporcionam resistência aos patógenos entéricos (PATTERSON ; BURKHOLDER, 2003). De forma generalista a microbiota intestinal de cães e gatos apresenta semelhante padrão de colonização de microrganismos com outros mamíferos, um ecossistema altamente complexo, que compreende pelo menos várias centenas de filótipos bacterianos diferentes. Sendo Bacteroides, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp., e Enterobacteriaceae os grupos bacterianos predominantes no intestino de felinos e caninos (RITCHIE et al., 2008; FERNANDES et al, 2000; SUCHODOLSKI, 2011).

Afim de modular a microbiota intestinal e o sistema imunológico, os prebióticos vem sendo utilizados como promotores de saúde e bem-estar em cães e gatos, promovendo o crescimento de bactérias benéficas para o seu organismo (TORTORA et al., 2002; ROBERFROID, 2002; GIBSON et al., 2004; BERFROID, 2007; GOMES, 2009). Entre os prebióticos utilizados estão a parede celular de levedura (PCL), os mananligossacarídeos (MOS) e as mananoproteínas, todos derivados das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*,

considerada uma importante matéria-prima na nutrição, pela sua capacidade prebiótica e modulação da microbiota intestinal (FERNANDES et al., 2000; ALBINO et al., 2006; MARTINS, 2009; SPRING et al., 2010).

Muitos estudos já foram realizados avaliando a microbiota intestinal de diferentes espécies animais após a inclusão da PCL ou do MOS nas dietas (SWANSON et al., 2002a, GOUVEIA et al., 2010, MIDDELBOS et al., 2011; AQUINO et al., 2013). As mananoproteínas fazem parte de uma nova geração de prebióticos, que prometem melhores resultados (SPRING et al., 2015). Em animais de companhia, as mananoproteínas só foram ofertadas a cães (CHIZOTT, 2012; KROLL, 2014), não sendo encontrados na literatura trabalhos em felinos.

Diante disto, estudos avaliando a microbiota intestinal de gatos suplementados com mananoproteínas frente a infecção por *T. gondii*, se fazem necessários e irão ajudar-nos a compreender a patogênese do parasito e o comportamento dos grupos bacterianos frente a suplementação e a infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a microbiota intestinal de gatos suplementados com mananoproteínas derivadas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* infectados experimentalmente com *T. gondii*.

2.2 Objetivos específicos

Identificar e comparar as populações da microbiota intestinal em gatos suplementados e não suplementados com mananoproteínas;

Identificar e comparar populações microbianas intestinais em gatos suplementados e não suplementados com mananoproteínas e infectados com *T. gondii*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico do *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório de conhecida importância zoonótica, com distribuição geográfica ampla, capaz de infectar praticamente todos os animais homeotérmicos. Pertence ao reino Protista, filo Apicomplexa, ordem Eimeriorina e família Toxoplasmatidae (DUBEY, 2010).

A etiologia de *T. gondii* foi descrita quase simultaneamente por Nicolle e Louis Manceaux, na Tunísia em 1908, em estudos para pesquisa de leishmaniose em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) e por Splendore em São Paulo, Brasil, que identificou o parasito em coelho (FERGUSON, 2009). A princípio o parasito foi considerado como pertencente ao gênero *Leishmania sp*, e posteriormente classificado como uma nova espécie, recebendo o nome de *T. gondii* (Toxo - arco; Plasma - vida) (DUBEY, 2008; DUBEY, 2010).

3.2 Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida de *T.gondii* foi elucidado somente em 1970, através do conhecimento dos estágios sexuais do parasito no intestino delgado de gatos, denominados hospedeiros definitivos (HD) (Figura1) (DUBEY, 2010). O intestino delgado destes animais é um órgão-chave no ciclo de vida deste parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Ocorre em duas etapas distintas, uma fase assexuada, que pode ocorrer tanto nos HD como nos hospedeiros intermediários (HI) por meio do ciclo extraintestinal, e uma fase sexuada que ocorre apenas nos felídeos por meio do ciclo intestinal (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY; JONES, 2008).

Nas células epiteliais dos HD o estágio e sexual do parasito ocorre com produção e liberação de oocistos nas fezes (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FERGUSON et al., 1999). Dessa forma desempenham papel importante na epidemiologia do protozoário (DUBEY, 2008; DABRITZ; CONRAD, 2010),

pois em contato com o ambiente, os oocistos esporulam e infectam HI e também HD, completando o ciclo de vida do parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

Os HD e HI adquirem a infecção a partir dos hábitos alimentares, com o consumo de alimentos ou água contaminados com oocistos ou pela ingestão de tecidos de animais contendo cistos de *T. gondii* (DUBEY, 1996; DUBEY, 2010). Três vias primárias de infecção são relatadas por Dubey (1986): fecal-oral, carnivorismo e congênita, enfatizando o gato doméstico e os felinos selvagem como únicos HDs. Todavia, a infecção também pode ocorrer através de transplantes de órgãos e transfusão sanguínea (DEROUIN; PELLOUX, 2008), embora na natureza a infecção através da ingestão de carne e oocistos esporulados tenham maior importância (DUBEY, 1986).

Oocistos, taquizoítos e bradizoítos representam os três estágios infectantes do parasito. Os oocistos excretados no ambiente a depender das condições de temperatura e umidade, esporulam tornando-se infectantes (DUBEY, 2010). Possuem formato subsférico a esférico, medindo de 10-12 μm de diâmetro, sua parede celular é constituída de duas camadas incolores, sem grânulos polares (DUBEY, 1998). Os oocistos esporulados são a forma mais importante de infecção, devido à sua facilidade de contaminação, elevada resistência aos agentes químicos, e capacidade de infectar herbívoros, onívoros, roedores, carnívoros e o homem (VIDOTTO, 1992). Apresentam formato subsférico a elipsoidal, medindo de 11-13 μm de diâmetro e no seu interior contém dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (DUBEY, 1998).

Os taquizoítos, do grego (*tachos*= rápido), correspondem ao estágio de rápida multiplicação do *T. gondii* em qualquer célula nucleada dos hospedeiros HI ou HD (DUBEY, 1998; DUBEY, 2010). Podem medir 6 μm de comprimento por 2 μm de largura apresentando formato crescente com extremidade posterior de forma arredondada, a anterior pontiaguda e um núcleo central (DUBEY, 1998).

Os bradizoítos são encontrados dentro de cistos teciduais e representam a fase de multiplicação lenta do protozoário durante a fase crônica da infecção (DUBEY, 2010). Possuem núcleo de localização terminal, são menos

susceptíveis a quimioterapia e resistentes a digestão pela pepsina e tripsina (DUBEY, 1998). O número e localização diferem a partir do hospedeiro e do tipo de cepa de *T. gondii* (DUBEY, 2010), mas são encontrados predominantemente no sistema nervoso central e tecido muscular, onde podem residir por toda a vida do hospedeiro (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

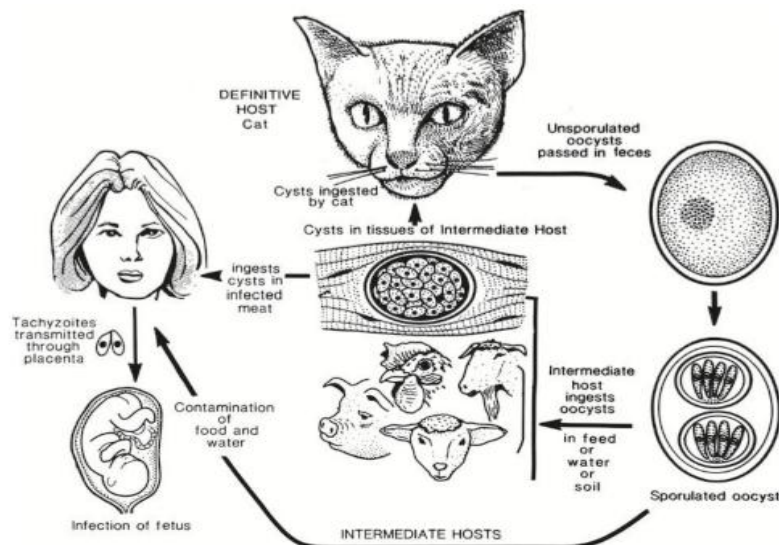


Figura 1. Ciclo de vida do *T. gondii* Fonte: (DUBEY, 2010).

3.3 Infecção pelo *Toxoplasma gondii* nos gatos

O gato doméstico (*Felis catus*) é um animal de estimação cada vez mais encontrado em residências. Geralmente seu primeiro contato com *T. gondii* acontece até os seis meses de vida, liberando oocistos por um período curto de tempo (MANTOVANI et al., 2011).

A mucosa intestinal corresponde à principal porta de entrada do *T. gondii* nos hospedeiros definitivos (MANTOVANI et al., 2011), e após a infecção, os enterócitos passam a secretar citocinas e quimiocinas capazes de orientar a resposta imune (BOUT et al., 1999), desencadeando a ativação da imunidade inata e adaptativa, resultando no estabelecimento de infecção latente ou destruindo diretamente a integridade estrutural da barreira epitelial, possibilitando dessa forma a expansão e translocação de patógenos para os

tecidos subepiteliais gerando uma resposta pró-inflamatória (COHEN; DENKERS, 2015).

A mucosa intestinal desempenha um papel importante no combate a infecção oral do *T. gondii* (BOUT et al., 1999), sendo uma barreira física formada pelos enterócitos (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Para vencer esta barreira, os parasitos desenvolveram várias estratégias de aderência e invasão dos enterócitos e disseminação além do epitélio (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; BUZONI-GATEL; WERTS, 2006).

Embora a infecção nos gatos ocorra normalmente de forma assintomática, fatores iatrogênicos ou naturais que promovem alterações no mecanismo de defesa como administração de altas doses de corticoides ou a presença de alguma doença imunossupressora, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina, podem reativar a infecção latente, resultando no desenvolvimento da sintomatologia clínica da doença. Os sinais mais frequentes da toxoplasmose em gatos incluem: febre, vômito, diarreia, icterícia, inflamação ocular, hepatite, pneumonia e doenças neurológicas (DUBEY, 1986; FILHA; OLIVEIRA, 2009).

O trabalho realizado por Silva et al. (2009) em gatos infectados com 200 cistos teciduais da cepa ME49 (tipo II) de *T. gondii*, avaliando o efeito do parasito na parede intestinal verificou que a infecção crônica levou à atrofia da túnica mucosa, parede intestinal do duodeno e túnica muscular. Induziu também o aumento na altura dos enterócitos, a redução da secreção de sialomucinas e o aumento das células de Paneth.

Por serem carnívoros, pouco se sabe em relação à sua microbiota, às mudanças que ocorrem a partir da manipulação dietética e quaisquer implicações relacionadas à saúde e à composição da dieta (LUBBS et al., 2009). Entretanto, existem perspectivas de que mudanças nos hábitos modernos da sociedade levem ao aumento do número de gatos nos lares brasileiros, nesse sentido o mercado de alimentos e aditivos para essa espécie devem passar por mudanças, buscando aumentar a longevidade associada a qualidade de vida destes animais (SANTOS, 2015).

3.4 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal possui um papel crucial no metabolismo e manutenção na saúde do hospedeiro, juntamente com o epitélio e o sistema imunológico proporcionam resistência aos patógenos entéricos. A inibição dos patógenos pela microbiota intestinal é chamada de antagonismo bacteriano, interferência bacteriana (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003). Esta eubiose (microbiota estável), age como defesa natural, como uma barreira contra a invasão de patógenos, mantendo normal a imunidade da mucosa (THUM et al., 2012).

A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é caracterizada por uma alta densidade populacional, ampla variedade e complexidade nas interações entre as espécies de microrganismos que a compõem (AQUINO, 2009). De acordo com Caliman (2010), as diferentes porções do TGI dos mamíferos possuem diferentes espécies e números de microrganismos, principalmente devido as diferenças no pH. As concentrações das populações bacterianas aumentam ao longo do comprimento do trato gastrointestinal (SUCHODOLSKI, 2011).

Inúmeros fatores, como disponibilidade de nutriente, pH luminal, presença de substâncias antibacterianas naturais (bacteriocinas) e estímulo do sistema imune, influenciam as populações de microrganismos no TGI quanto a colonização e diversidade (GOMES, 2009).

O processo de colonização da microbiota do TGI nos neonatos é importante para o estabelecimento da saúde do indivíduo ao longo da vida (FERNANDES et al., 2000). Acreditava-se que no útero, os fetos se mantinham estéreis devido à barreira placentária e que, o processo de colonização do TGI ocorra após o nascimento, no qual o intestino dos mamíferos é rapidamente colonizado por bactérias, microrganismos ambientais, orais e cutâneos da mãe transferidos para o neonato através da amamentação (CALIMAN, 2010). Existem estudos que demonstram a possibilidade de o processo de colonização bacteriana ocorrer durante a fase fetal (THUM et al., 2012; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013).

De forma generalista o TGI de cães e gatos apresentam semelhante padrão de colonização de microrganismos com outros mamíferos (FERNANDES et al., 2000; RITCHIE et al., 2008), um ecossistema altamente complexo que compreende, pelo menos, várias centenas de filótipos bacterianos diferentes (RITCHIE et al., 2008).

A microbiota do TGI atraiu pesquisadores há décadas devido ao seu potencial papel etiopatológico na saúde e doença do hospedeiro. Muitos estudos em seres humanos e outras espécies animais sugeriram que várias doenças estão associadas a alterações da microbiota do TGI (MINAMOTO et al., 2012).

3.5 Microbiota fecal de gatos

Aproximadamente 95% da microbiota intestinal de cães e gatos é constituída por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e as *Fusobactérias*, seguindo-se as *Proteobactérias* e *Actinobactérias*, que constituem tipicamente 1% a 5% de bactérias totais identificadas por sequenciamento (MIDDELBOSS et al., 2010; HANDL et al., 2011).

Firmicutes, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp., e *Enterobacteriaceae* são grupos bacterianos predominantes na microbiota de felinos (HANDL et al. 2011; SUCHODOLSKI, 2011; MINAMOTO et al., 2012; KERR et al., 2014). Kerr et al. (2014) encontraram os filos bacterianos *Firmicutes* (em maior predominância), *Proteobactérias*, *Fusobactérias*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* gêneros predominantes de *Clostridium*, *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Peptococcus* e *Fusobacterium* em amostras fecais de gatos domésticos.

Caliman (2010) relatou que as porções iniciais do intestino delgado dos mamíferos são colonizadas, principalmente, por *Lactobacillus* spp., *Streptococcus*, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e Clostrídios. De acordo com Suchodolski et al. (2011) e Johnston et al. (1993), no intestino delgado de gatos, bactérias anaeróbicas facultativas ou aeróbicas (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp.) predominam de forma abundante.

No intestino grosso de mamíferos predominam os anaeróbios restritos como os *Bacteroides* spp., Clostrídios, *Ruminococcus*spp.,*Butyrovibrios*spp., *Fusobacterium* spp.,*Eubacterium*spp.,*Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* spp.,*Atopobium*spp., e Peptococci (CALIMAN, 2010). Semelhantemente em gatos no intestino grosso ocorre maior número de bactérias anaeróbias JOHNSTON et al. (1993).

A composição geral da microbiota intestinal de gatos filhotes é relativamente semelhante à dos adultos. No entanto, algumas modificações na composição quantitativa e qualitativa ocorrem nas primeiras semanas até meses de vida (MINAMOTO, 2012). Jia et al. (2011), em um estudo realizado avaliando a microbiota fecal de gatos de 1 a 9 meses de vida, notaram diferenças significativas associadas à dieta, população bacteriana total, bactérias ácido lácticas, Desulfovibrionales, *Clostridium* e Bacteroidetes nos dois grupos experimentais.

De forma geral, as principais bactérias intestinais potencialmente patogênicas avaliadas são *E.coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* (SANTOS, 2015). *Campylobacter jejuni*, e *Clostridium perfringens* foram encontrados em gatos saudáveis e diarreicos no estudo realizado por Queen et al. (2012). Bactérias como *C. perfringens*, *Enterococcus* spp., *E. coli* e *Helicobacter* foram encontradas em estudo com cães e gatos domésticos realizado por Handl et al. (2011). Minamoto et al. (2012) sugere que nem sempre a presença desses microorganismos deve ser correlacionada com a presença de doenças intestinais.

3.6 Bactérias alvo do estudo

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbica, gram negativa, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales* e família *Clostridiaceae*; diferem em abundância ao longo do TGI e já foram relacionadas a doenças intestinais em gatos (MINAMOTO et al., 2012). Nos seres humanos está relacionada a alterações gastrointestinais (QUEEN et al., 2012). Sua patogenicidade e possível produção de diarreia em gatos permanece mal compreendida e carece de mais estudos (QUEEN et al., 2012; RITCHIE et al.,

2008). A *E. coli* é uma espécie de bactéria do gênero *Escherichia*, que contém principalmente bacilos gram-negativos, é oxidase-negativa e pertence ao filo *Proteobacteria* e a família *Enterobacteriaceae* que geralmente permanece no lúmen intestinal de forma inofensiva, entretanto, mesmo as cepas "não patogênicas" podem causar infecção em um hospedeiro debilitado ou imunossuprimido, ou quando as barreiras gastrointestinais forem violadas. São classificadas em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (NATARO; KAPER, 1998).

Lactobacillus acidophilus são organismos probióticos que fornecem excelentes benefícios terapêuticos como por exemplo aumento da imunidade intestinal contra infecções e melhoria na utilização da lactose. Estas bactérias apresentam se conectam aos enterócitos e inibem a ligação de patógenos entéricos por um processo de exclusão competitiva, iniciando eventos de sinalização que resultam na síntese de citocinas. Também produzem ácido láctico e bacteriocinas, que inibem o crescimento de agentes patogênicos e alteram o equilíbrio ecológico dos comensais entéricos (KAILASAPATHY; CHIN, 2000).

3.7 Prebióticos

Desde a sua introdução, o conceito de prebiótico atraiu e estimulou a pesquisa em muitas áreas da nutrição e ciências médicas. Estas substâncias químicas utilizadas como promotores de saúde e bem-estar para cães e gatos, ou como uma alternativa aos “promotores de crescimento” para os animais de produção, têm potencial de melhora e estabilidade de uma microflora intestinal, promovendo seletivamente o crescimento de bactérias benéficas (GIBSON; ROBERFROID, 1995; TORTORA et al., 2002; GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007; GOMES, 2009).

Inicialmente foram definidos como ingredientes alimentares não digeridos na porção proximal do TGI de monogástricos, fermentados seletivamente e que proporcionam efeito benéfico no hospedeiro, por estimular seletivamente o

crescimento e/ou o metabolismo de um limitado grupo de bactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Gibson et al. (2010) propuseram expandir o termo, redefinindo-os como compostos ou ingredientes seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal.

Gibson et al. (2004) e Roberfroid (2007) estabeleceram critérios para que um ingrediente alimentar seja classificado como prebiótico: a resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos, à absorção gastrointestinal; bem como, seja capaz de ser fermentado pela microflora intestinal, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais que contribuem para saúde e bem-estar dos animais.

Logo o sucesso dos prebióticos depende da sua não hidrolisação pelas enzimas digestivas, que permitem chegar intactos ao intestino grosso onde são digeridos (fermentados) pela flora intestinal promotora da saúde, como as bactérias de ácido láctico, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BRITO et al., 2013). Estes produtos de fermentação reduzem o pH e, juntamente com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas pela microbiota, podem inibir o crescimento de bactérias nocivas como *Clostridium* spp., *Ercherichia coli* e *Salmonella* (MATHEUS, 2016).

Estes aditivos podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou podem ser adicionados a ela através de fontes exógena (PELÍCIA et al., 2004), aumentando a biodisponibilidade e a absorção de minerais, estimulando o crescimento e/ou ativando o metabolismo de grupos bacterianos benéficas do TGI especificamente o crescimento de grupos de populações microbianas endógenas, como Bifidobactérias e Lactobacilos, benéficos para a saúde humana, dessa forma as atividades bacterianas adversas à saúde são suprimidas e as vantajosas estimuladas (BLAUT, 2002; BROWNAWELL et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais as bactérias intestinais inibem patógenos incluem: competição por locais de colonização, competição por nutrientes, produção de compostos tóxicos ou estimulação do sistema imunológico. Estes

mecanismos não são mutuamente exclusivos, e a inibição pode compreender um, vários ou todos esses mecanismos (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

3.8 Parede Celular de Levedura (PCL), Mananoligossacarídeo e Mananoproteínas

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são eucariotos unicelulares que apresentam estrutura química formada por quitina, mananoproteínas e beta-glucanos 1,3 e 1,6. Estas, historicamente, são utilizadas em processos industriais, como por exemplo na produção de bebidas, e nos últimos anos vem sendo utilizados como aditivos nas rações, utilizando os excedentes da biomassa microbiana gerando: levedura inativa íntegra, extrato de levedura, parede celular de levedura (PCL) e recentemente as mananoproteínas purificadas (OSUMI, 1998; SANTOS, 2015).

A PCL é um prebiótico utilizado em dietas de animais de produção e companhia. Sua digestão não ocorre em mamíferos, mas podem ser utilizados por determinados grupos bacterianos em detrimento de outros. Na literatura, estudos com inclusão de PCL em felinos é escassa. Aquino (2009) trabalhou com inclusões de PCL em gatos e analisou a microbiota intestinal através da técnica de plaqueamento. Este trabalho gerou outras publicações, AQUINO et al., 2010 e AQUINO et al., 2013. Santos (2015) e Matheus (2016), avaliaram os efeitos da PCL em dietas de gatos, sobre a microbiota intestinal, utilizando a técnica de qPCR.

Entre os prebióticos mais pesquisados e utilizados na nutrição de pequenos animais estão os mananoligossacarídeos (MOS), derivados da PCL (SANTOS, 2015; ALBINO et al., 2006; FERNANDES et al., 2000; SPRING et al., 2000; OSUMI, 1998). Este carboidrato complexo contendo D-manose (FERNANDES et al., 2000) encontrado principalmente na porção mais externa da PCL, contribui com 50% da fração carboidrato desta (AQUINO, 2009; SANTOS, 2008), apresentando capacidade de modulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal, ligando-se a ampla variedade de micotoxinas, preservando a

integridade da superfície de absorção intestinal (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2002).

Para Swanson et al. (2002a) o MOS apresenta influência positiva sobre a saúde intestinal de cães, melhorando as populações microbianas. Sua associação ao Frutooligossacarídeos (FOS) diminui as concentrações de compostos putrefativos nas fezes e aumenta a imunidade local e sistêmica; sendo a adição destes prebióticos às dietas indicada para cães jovens, geriátricos ou sob estresse.

O MOS também se mostrou efetivo na recuperação de cães infectados experimentalmente por *E.coli* enteropatogênica (EPEC). Neste estudo os animais que receberam o prebiótico se recuperaram mais rapidamente da infecção, comparado aos animais que não foram suplementados (GOUVEIA et al., 2010).

As mananoproteínas, fração rica em manose de segunda geração, podem ser incluídas em dietas com taxas de inclusão mais baixas que o MOS, melhorando o desempenho zootécnico sob condições desafiadoras. Tem demonstrado bloquear organismos desfavoráveis do intestino, manter a função digestiva, atividade enzimática e controlar a inflamação (SPRING, 2015). Chizzotti, (2012) e Kroll (2014) estudaram a utilização da mananoproteína em cães, entretanto apenas CHIZZOTTI, (2012) avaliou o efeito deste prebiótico na microbiota intestinal, não encontrando efeito nas concentrações de 0,3 %, 0,6 % e 0,9 %.

3.9 Uso da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para determinação e quantificação da microbiota intestinal.

Benefícios inestimáveis foram gerados através da Reação em cadeia da polimerase (PCR) nas mais diversas áreas da ciência. Uma das tecnologias resultantes da PCR, a Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), mais sensível que a PCR convencional, analisa e quantifica a sequência de interesse gerando dados quantitativos com grande acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade (HOPKINS et al., 2005).

Esta técnica apresenta um grande potencial para análise da microflora fecal (MALINEN et al., 2003; RINTTILÄ et al., 2004), sendo utilizada na

quantificação do DNA bacteriano em várias amostras, permitindo a detecção de gêneros bacterianos para melhor conhecimento da diversidade microbiana fecal (TALARICO, 2012) e atividades das comunidades microbianas gastrointestinais (MATSUKI et al., 2004). Diversos estudos têm utilizado essa técnica devido a sua eficiência e confiabilidade na microbiota fecal (LUBBS et al., 2009; SUCHODOLSKI et al., 2015; DELROISSE et al., 2008).

Ensaio de PCR quantitativos foram realizados em amostras fecais de cães que apresentavam diarreia hemorrágica aguda e doença do intestino inflamatório idiopático controlada, e cães saudáveis a fim de se analisar os grupos bacterianos *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Blautia*, *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Clostridium*. Os resultados mostraram que existiam diferenças na composição dos microbiomas fecais entre cães com diarreia aguda e crônica e cães saudáveis (SUCHODOLSKI et al., 2012).

Rossi et al. (2014) através da técnica de qPCR, compararam parâmetros histológicos, imunomoduladores e a microbiota fecal de cães com doença intestinal inflamatória idiopática e cães saudáveis. Middelbos et al. (2011) realizou um estudo com níveis crescentes de PCL na dieta em cães e sua influência na microbiota intestinal utilizando o método de plaqueamento, qPCR e DGGE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção e Manutenção dos animais

A fim de selecionar animais para participarem do estudo, realizou-se uma triagem de filhotes de gatas capturadas no Centro de Controle de Zoonoses do município de Itabuna, Bahia. Esta triagem incluiu a realização de exame físico (avaliação do estado físico, mucosas, estado nutricional e higidez), hemograma completo (4.2.1.), bioquímica sérica (4.2.2.), sorologia para detecção da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) (subitem 4.2.3), sorologia para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (subitem

4.2.4.), exame coproparasitológico (4.2.5.), ultrassonografia abdominal e radiografia torácica. Os critérios de inclusão foram animais negativos para *T. gondii* e FIV/FeLV que se mostraram hígidos nos exames realizados.

Desta forma, selecionou-se 12 gatos saudáveis (6 machos e 6 fêmeas), apresentando a mesma faixa etária média (1 a 2 meses de vida). Estes animais foram castrados e imunizados contra as principais doenças infecciosas dos felinos (Rinotraqueíte, Calicivirose e Paleucopenia felina), recebendo tratamento para controle de endoparasitas e ectoparasitas (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum*, *Uncynariastenocephala* e *Trichuris vulpis*).

Os gatos foram alojados individualmente em baias medindo 1m², recebendo água mineral comercial *ad libitum* para evitar a contaminação com *T. gondii* e ração comercial isenta de prebiótico (mananoproteína). Hemograma completo e bioquímica sérica foram realizados a cada mês; exames coproparasitológico e sorologia para *T. gondii* foram realizados a cada 15 dias. A entrada de pessoas no gatil foi controlada e os animais passaram por um período de 10 meses de quarentena antes de iniciar o experimento, aprovado pelo CEUA (024/15).

4.2 Coleta e processamento das amostras dos animais selecionados

A coleta de sangue para a triagem dos animais, foram realizadas por venopunção, através da veia jugular ou cefálica. O sangue foi armazenado em tubos à vácuo com anticoagulante (EDTA) e mantidos sob refrigeração até o seu processamento. Para obtenção do soro as amostras foram acondicionadas nos tubos sem anticoagulante, centrifugadas e mantidas em -20°C até realização dos testes (bioquímica sérica e sorologias). Para os exames coproparasitológicos, as fezes foram coletadas das bandejas de areia de cada animal e refrigeradas até processamento das amostras. Três dias antes do início do experimento foi realizado coproparasitológico de fezes nos animais. Para a realização da qPCR foram colhidas as primeiras amostras de fezes diária de cada animal e mantidas a -80 °C até processamento.

4.2.1 Hemograma

Para realização dos hemogramas foi utilizado o contador automático hematológico (ABX VET-Horiba®). Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol por cinco minutos e corados com Giemsa-Doles® durante 30 minutos para a contagem da leucometria específica e observação da morfologia das células sanguíneas.

4.2.2 Bioquímica sérica

Para a determinação da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina séricas foram utilizados kits comerciais Labtest®, sendo a leitura realizada em analisador semiautomático Bioplus 2000®.

4.2.3 Sorologia para FIV e FeLV

Para o diagnóstico da FIV e do FeLV os soros obtidos foram testados através do teste Imunoensaio Cromatográfico Alere FIV/FeLV Test Kit (Alere™) e o resultado interpretado de acordo com as recomendações do fabricante.

*4.2.4 Sorologia para *Toxoplasma gondii**

A detecção de anticorpos anti-IgG de *T. gondii* foi realizada através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de acordo com Pinto et al. (2009), utilizando o ponto de corte de 1:16. As lâminas silcadas foram sensibilizadas com taquizoítos da cepa RH e utilizou-se o conjugado anti-IgG felino Sigma (Anti-Cat IgG – F4262, Sigma-Aldrich ®) na diluição de 1:128. Os controles (positivo e negativo) foram obtidos a partir de Munhoz et al. (2017).

A leitura foi realizada em microscópio binocular com sistema de epifluorescência (OLYMPUS, BX 51) no aumento de 400x. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram 50% ou mais dos taquizoítos de cada campo com fluorescência periférica completa (PINTO et al., 2009). O protocolo da realização da RIFI encontra-se no Anexo A.

4.2.5 Coproparasitológico

As amostras foram processadas e examinadas pela técnica modificada de centrifugo-flutuação com solução de sacarose, descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynsk e Wilber (1997). Para a identificação dos oocistos eliminados, as amostras de fezes foram processadas segundo Dubey (2001) e Gondim et al. (2002).

4.3 Preparação do inóculo de *Toxoplasma gondii*

Camundongos suíços fêmeas (n=24) foram previamente infectados através de sonda gástrica, com 50 oocistos de *T. gondii* da cepa ME49, gentilmente cedido pelo prof. João Luis Garcia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Os animais foram mantidos com ração comercial própria para a espécie e água *ad libitum* e observados diariamente durante doze semanas.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Administração do prebiótico

Seis gatos (3 machos e 3 fêmeas), selecionados de forma aleatória, foram suplementados diariamente com mananoproteínas derivadas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiaena* concentração de 0,16 % (1,6g/kg de dieta), durante todo experimento. Os outros seis gatos (3 machos e 3 fêmeas) receberam celulose como placebo. Foi denominado dia zero (D0), o primeiro dia da suplementação. Desta forma, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo I: suplementados (n=6); Grupo II: não suplementados (n=6).

*4.4.2 Recebimento dos cistos de *Toxoplasma gondii**

Vinte e um dias após o início da suplementação dos gatos (D21), os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ para posterior retirada do cérebro. Amostras de cada cérebro foram avaliadas quanto à presença de cistos, e, somente após visualização e contagem dos mesmos, as amostras foram homogeneizadas e oferecidos aproximadamente 800 cistos de *T. gondii* por animal (GARCIA et al., 2007), que estavam em jejum de 24 horas (Figura 2).

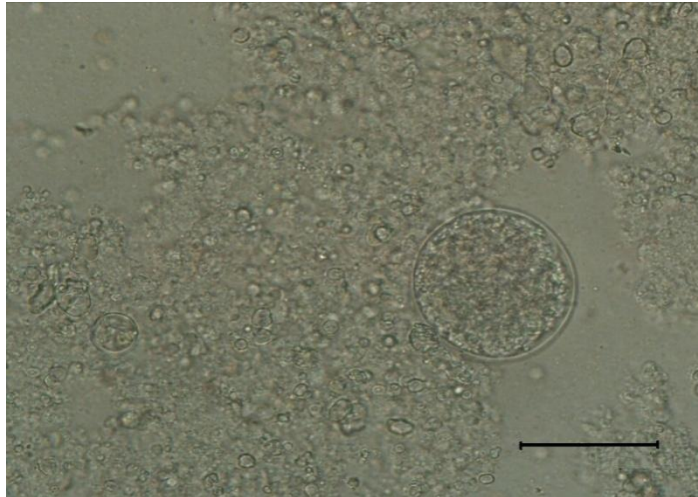


Figura 2: Cisto de *Toxoplasma gondii* visualizado em macerado de cérebro de camundongo infectado com oocistos da cepa ME-49. 1000x. Barra: 50 μ m. Fonte: arquivo pessoal.

4.4.3 Sorologia para *T. gondii*

Durante o experimento realizou-se sorologia (4.2.4.subitem) para *T. gondii* no dia D0 (início da suplementação), D21 (dia da infecção por *T. gondii*), D24, D26, D28 e D35, para todos os animais de ambos os grupos. As amostras foram diluídas em PBS, em progressão geométrica de razão dois a partir de 1:16 para determinação da titulação de cada animal.

4.4.4 Detecção de oocistos de *T. gondii* nas fezes

Todos os animais tiveram suas fezes colhidas no dia D18 até o dia D35 para detecção dos oocistos de *T. gondii*, através da técnica de centrífugo-flutuação (4.2.5. subitem).

4.5 Ensaios experimentais

4.5.1 Cepas Bacterianas e Extração de DNA das bactérias de interesse da microbiota fecal

Foram utilizadas neste estudo cepas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) e *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) obtidas da coleção de cultura microbiana do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em

Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro. As cepas foram re-hidratadas em PBS estéril e as extrações dos DNA's foram realizadas utilizando o kit de extração Easy DNA (Invitrogen® do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A purificação destes DNA's ocorreu através do kit Pure Link (Quick Gel Extraction e PCR Purification Combo Kit®), segundo as recomendações do fabricante. A curva padrão da bactéria *Escherichia coli* (INCQS 00033) foi gentilmente cedida pela Prof.^a Bianca Mendes Maciel - Departamento de Ciências Biológicas da UESC/Ilhéus, Bahia.

4.5.2 Amplificação dos genes alvos

Reações individuais de PCR convencional foram realizadas a fim de se obter a amplificação dos fragmentos dos genes alvos de cada bactéria (Tabela 1), para isso utilizou-se o DNA das cepas bacterianas como molde. As amplificações foram realizadas a partir de um volume final de 50µL, compostos por 3 µL do DNA de cada bactéria e 47 µL de uma solução formada por 0,2 mM de cada *primer*, 0,2µM de cada dNTP, (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e tampão para PCR 10X. Água ultra-pura estéril foi acrescentada às reações a fim de atingir o volume final de 50 µL.

As reações foram realizadas em termociclador Proflex PCR system (AppliedBiosystems®, Life Technologies, Carlsbad, USA), sendo para *Lactobacillus acidophilus*: um ciclo inicial (95 °C por 5 min); 30 ciclos (95 °C por 1 min, 51 °C por 1 min, 72 °C por 1 min), e uma extensão final (72 °C por 7 min); para *Clostridium perfringens*: um ciclo (94 °C por 5 min); 30 ciclos (55 °C por 1 min, 72° C por 1 min, 94° C por 1 min) e um ciclo (72°C por 10 min); para *E. coli*: um ciclo (94 °C por 5 min), 32 ciclos (94 °C por 60 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 60 seg) e um ciclo (72 °C por 10 min). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e corados com Sybr Safe (Invitrogen).

Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados com o kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) e quantificados em Nano Drop 2000 (ThermoScientific, USA).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção qualitativa e quantitativa dos diferentes grupos bacterianos nas amostras fecais dos gatos.

Grupos	Iniciadores 5' → 3'	Referência
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT C GGC CAG TTA CTA CCT CTA TCC TTC TTC	Delroisse et al. (2008)
<i>Clostridium perfringens</i>	CGC ATA ACG TTG AAA GAT GG CCT TGG TAG GCC GTT ACC C	Wise e Siragusa (2005)
<i>E. coli</i>	GGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTG CAGGGTTGGTACTGTCATTACG	Lopes (2016)

4.5.3 Produção das curvas padrão

Após a purificação das amplificações dos genes alvos de cada cepa bacteriana os mesmos foram diluídos à 20 ng/μL; os números de cópias dos genes foram determinados através da fórmula: Número de cópias = Quantidade de DNA (μg) x 6,022 x 10²³ / fragmento do DNA(pb) x 10⁶ x 650.

Diluições seriadas (10X) foram realizadas para produção dos pontos das curvas padrão, sendo: 2,94 x 10¹ a 2,94 x 10⁶ cópias do fragmento *Lactobacillus acidophilus*, 3,52 x 10¹ a 3,52 x 10⁵ cópias do gene *Clostridium perfringens* e 7,92 x 10¹ a 7,92 x 10⁵ cópias do gene *phoA* em *E. coli*.

4.5.4 Determinação da concentração de bactérias de interesse da microbiota fecal através da qPCR

Para a análise das populações microbianas pela qPCR, foi coletado o máximo de fezes possível da primeira defecação dos animais, de forma asséptica (uso de luvas estéreis), em até 30 minutos após a defecação, nos dias D0, D21, D28 e D35, armazenadas em frascos coletores estéreis e mantidas a -80 °C (DEUTER et al., 1995). No momento do processamento as fezes foram

homogeneizadas individualmente e procedeu-se a extração do DNA utilizando um kit comercial (PurelinkGenomic DNA mini kit) seguindo recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA foram avaliadas quanto à sua pureza e integridade no nanodrop, sendo estocadas a -20°C até seu uso.

A qPCR para quantificação bacteriana presente nas fezes dos grupos experimentais foi realizada de forma individual utilizando o sistema TaqMan (Life Technologies), *Primers* e sondas MGB (Tabelas 1 e 2). As amplificações ocorreram em um volume final de 20 µL, contendo 0,5 µL de *primers* específicos para a amplificação de *Clostridium perfringens*, e *E. coli*; e 0,4 µL de *primers* para a amplificação de *Lactobacillus acidophilus* (todos na concentração de 5 µM), 0,5 µL de cada sonda MGB TaqMan específica para *Clostridium perfringens* (NED), *E. coli* (NED) e 0,4 µL de sonda MGB TaqMan para *Lactobacillus acidophilus* (FAM) (na concentração de 5 µM), 10,0 µL de reagente TaqManFastAdvanced e 2,0 µL de DNA correspondente a cada ponto da curva. Água ultra-pura estéril (livre de DNase e RNase) foi acrescentada às reações a fim de atingir o volume final de 20 µL.

O protocolo dos ciclos utilizados para cada corrida sucedeu-se mediante um ciclo a 50 °C por 2 min; um ciclo a 95 °C por 20 seg; 45 ciclos de 95 °C por 3 seg, 60 °C por 30 seg.

Tabela 2. Probes (sondas) utilizadas para detecção quantitativa dos diferentes grupos bacterianos nas amostras fecais dos gatos.

Grupos	Iniciadores	Referência
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	[FAM]ATGGAGCAACGCCGC	Delroisse et al., (2008)
<i>Clostridium perfringens</i>	[NED]TCATCATTCAACCAAAGGAGCAATCC	Wise e Siragusa (2005)
<i>E. coli</i>	[NED]AAGGCGGAAAAGG	Lopes (2016)

4.6 Análise de dados

Para comparação dos resultados entre os grupos e nos grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

Todos os animais, de ambos os grupos, apresentaram títulos de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* detectáveis a partir do 5^a dia após infecção (D26) (Tabela 3). A visualização de oocistos nos grupos foi observada no 3^o dia após infecção (D24) até o 15^o dia após infecção (D35), bem como foram visualizados oocistos do parasito (Figura 3) a partir do D25 nas fezes dos dois grupos experimentais.

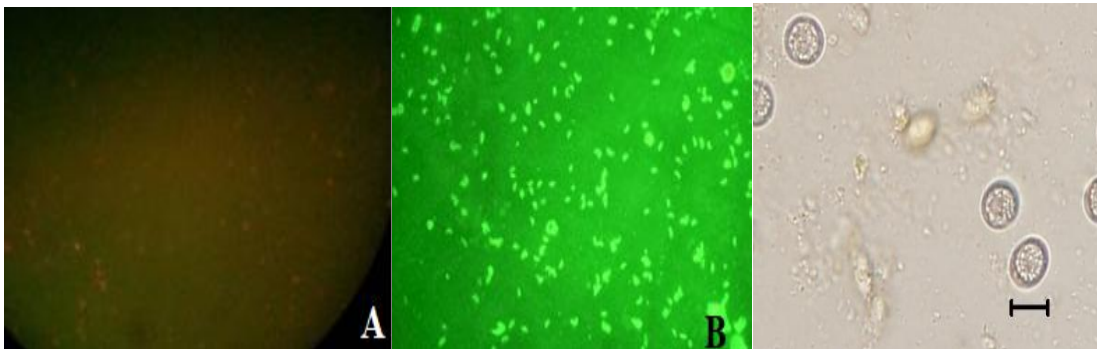


Figura 3: Ilustração da técnica de RIFI para detecção de anticorpos anti-IgG de *T. gondii*. (A) Reação negativa. (B) Reação positiva e (C) Fotomicrografia dos oocistos de *T. gondii* nas fezes de um felino. Aumento de 400x. (C) Barra: 10 μ m. Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 3: Títulos de anticorpos (IgG) anti-*T. gondii* em felinos dos grupos experimentais (não-suplementado) e (suplementado).

Grupo	Felino	DIAS DE SOROLOGIA					
		D0	D21	D24	D26	D28	D35
Não suplementado							
	1	-	-	-	1:128	1:64	1:512
	2	-	-	-	1:32	1:128	1:2048
	3	-	-	-	1:64	1:64	1:2048
	4	-	-	-	1:32	1:32	1:1024
	5	-	-	-	1:64	1:64	1:512
	6	-	-	-	1:128	1:128	1:1048
Suplementado							
	1	-	-	-	1:64	1:128	1:1024
	2	-	-	-	1:64	1:32	1:1024
	3	-	-	-	1:64	1:64	1:512
	4	-	-	-	1:64	1:32	1:1024
	5	-	-	-	1:64	1:64	1:2048
	6	-	-	-	1:64	1:64	1:512

Através do sistema TaqMan, o coeficiente de correlação linear (R^2) das curvas padrão dos três micro-organismos foram altos, tendo *Lactobacillus* $R^2=0,988$, *E. coli* $R^2= 0,999$ e *C. perfringens* $R^2= 0,987$. A curva de amplificação de *Lactobacillus* apresentou $Eff=104,97\%$, *C. perfringens* $Eff= 99,38\%$ e *E. coli* $Eff=116,68 \%$ (Figura 4).

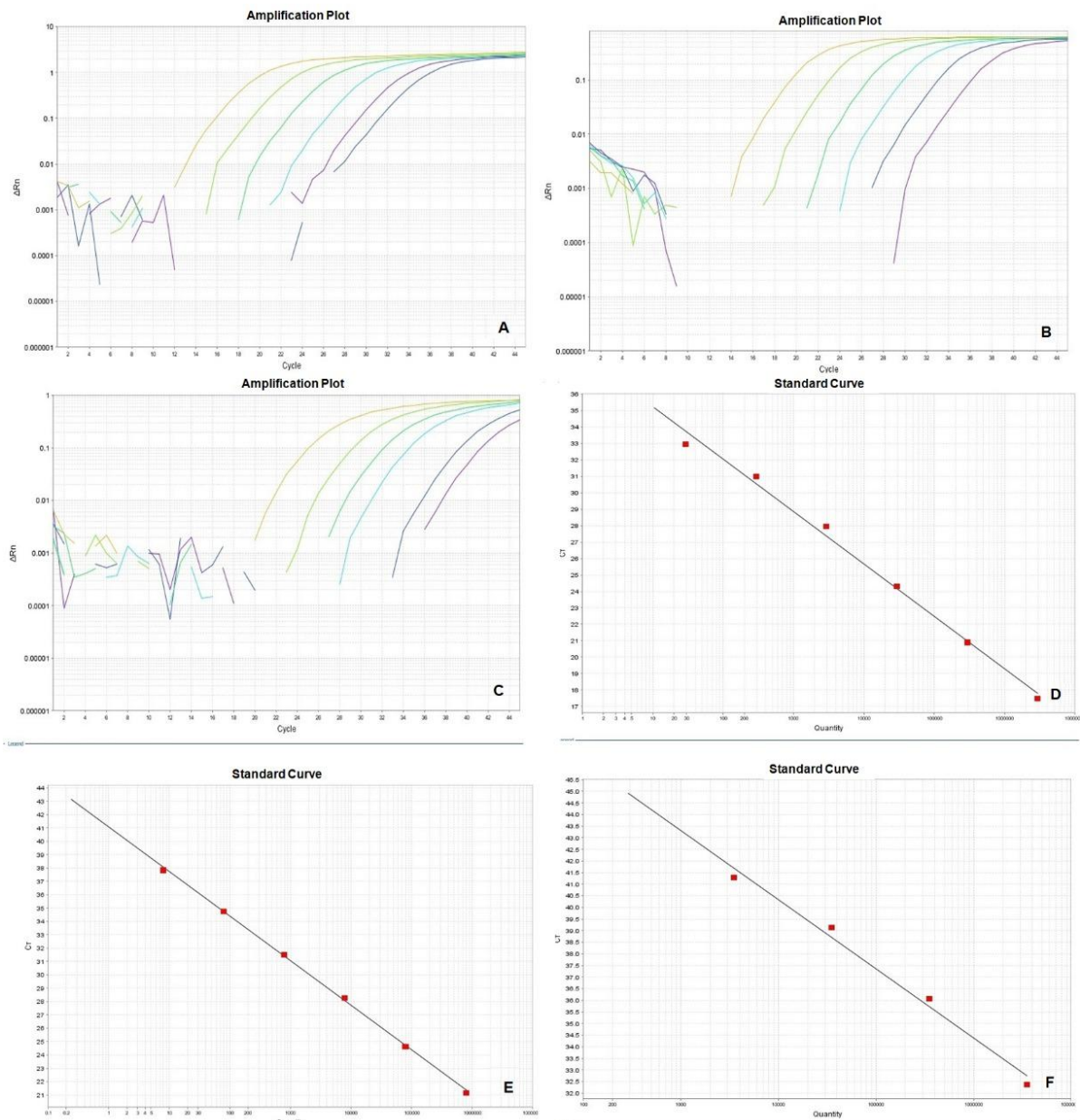


Figura 4: Curvas de amplificação e curvas padrão de: (A) *Lactobacillus* ($2,94 \times 10^1$ a $2,94 \times 10^6$), (B) *Escherichia coli* ($7,92 \times 10^1$ a $7,92 \times 10^5$), (C) *C. perfringens* ($3,52 \times 10^1$ a $3,52 \times 10^6$), (D) *Lactobacillus*, (E) *C. perfringens* e (F) *E. coli*.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Através da técnica de qPCR foi comprovada a presença das bactérias *Lactobacillus* spp., *C. perfringens* e *E. coli* na microbiota fecal dos gatos.

Avaliação da microbiota entre os grupos suplementados e não suplementados

No que tange à comparação entre os grupos experimentais no D21 o número de cópias de *Lactobacillus* spp. foi maior no grupo suplementado ($p=0,01$) em relação ao grupo não suplementado. Resultado semelhante foi observado no D35 com $p=0,007$. O número de cópias de *E. coli* no D28 foi maior no grupo não suplementado, apresentando significância estatística ($p=0,04$). Entretanto, para *C. perfringens* não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Avaliação da microbiota dentro dos grupos suplementados e não suplementados

Os resultados dentro de cada grupo experimental demonstram que *Lactobacillus* spp., *C. perfringens* e *E. coli* exibiram diferenças significativas em seus números de cópias. A análise do grupo dos animais suplementados evidencia um aumento no número de cópias de *Lactobacillus* spp. no dia D21 ($p=0,02$), D28($p=0,01$) e D35 ($p= 0,02$) comparado ao D0. Dentro do grupo não suplementado observou-se uma diminuição no número de cópias de *Lactobacillus* spp. no D35 em relação ao D0 ($p=0,017$), D21 ($p=0,009$) e D28 ($p=0,03$).

No grupo não suplementado, *Clostridium perfringens* apresentou um menor número de cópias ($p=0,05$) no D21 comparado ao D0, enquanto o D28 apresentou um maior número de cópias em relação ao D0 ($p=0,01$) e D21 ($0,01$). Quanto à *E. coli* o grupo não suplementado apresentou resultado similar com menor número de cópias ($p=0,009$) no D21 comparado ao D0 ($p=0,009$), e maior número de cópias no D28 em relação ao D0 ($p=0,009$) e D21 ($p=0,009$).

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo analisando, através da técnica de qPCR, o comportamento da microbiota fecal de felinos frente a suplementação com mananoproteínas e a infecção experimental por *T. gondii*. Estudos com adição de mananoproteínas na alimentação de cães já foram realizados (CHIZZOTTI, 2012; KROLL, 2014), porém não foram encontrados artigos utilizando mananoproteínas na suplementação de felinos, tão pouco a análise do comportamento da diversidade bacteriana frente a suplementação e a infecção com o parasito.

No presente estudo, encontramos nos dois grupos experimentais (suplementados e não-suplementados) todas as bactérias propostas na pesquisa. Outros estudos em gatos relatam a prevalência de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp. e *E. coli* na microbiota intestinal de felinos (JANECZKO et al., 2008; RITCHIE et al., 2010; SUCHODOLSKI, 2011). Com intuito de modular o crescimento bacteriano dessa microbiota outros estudos foram realizados utilizando a suplementação com PCL (fração não purificada), MOS e mananoproteínas purificadas (STRICKLING et al., 2000; SANTOS, 2015; KROLL, 2014).

Com o uso de mananoproteínas derivadas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, na dose diária de 0,16% (1,6g/kg) na dieta, observamos o aumento de *Lactobacillus* spp. no 21º dia após a suplementação, comparado ao grupo controle. A elevação de *Lactobacillus* spp. é esperada, pois as mananoproteínas presentes na PCL favorecerem a adesão e multiplicação de bactérias lácticas na mucosa intestinal, estimulando o crescimento e/ou a atividade metabólica de bactérias benéficas (SWANSON et al., 2002; GOMES, 2009; GANAN et al., 2012). Santos (2015) também relatou aumento linear no número de log/cópias em *Lactobacillus* spp. por meio da técnica de qPCR, após inclusão de 0,2%, 0,4% e 0,6 % de PCL durante 29 dias na dieta de gatos.

No entanto, Matheus(2016) ao estudar o efeito da inclusão de 0,3% e 0,6% da PCL durante 30 dias na dieta de felinos não observou alteração na concentração fecal de *Lactobacillus* spp., utilizando qPCR. O mesmo foi visto

por Aquino (2013), utilizando o MOS na inclusão de 0,2%, 0,4% e 0,6% na dieta úmida em felinos. Este autor justifica tal fato sugerindo que não houve fermentação adequada do prebiótico pela população de bactérias ácido-láticas do intestino, resultando na não diminuição do pH e conseqüentemente limitando a proliferação de bactérias desejáveis no cólon.

Mesmo após a infecção pelo *T. gondii*, o número de cópias de *Lactobacillus* spp. manteve-se superior em relação aos não suplementados (D35). Isso demonstra que diante da infecção pelo protozoário, não houve influência, deste, no grupo suplementado com diminuição da microbiota de *Lactobacillus* spp.. Infecções por *T. gondii* induzem inapropriada resposta aos comensais, competem pelo espaço luminal e nutrientes do intestino, além de induzirem doenças inflamatórias neste órgão (HEIMESAAT et al., 2006; WILHELM; YAROVINSKY, 2014). Além disso, a fração de mananoglicosacarídeos possuem propriedades imunoestimulatórias que interagem diretamente sobre o sistema imune (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999; CHIZZOTTI, 2012).

Na análise dentro do grupo dos animais suplementados evidenciou-se aumento no número de cópias de *Lactobacillus* spp. nos dias D21, D28, e D35, comparado ao D0. Sousa, (2013), descreve os benefícios observados em camundongos tratados com probióticos (*Lactobacillus* spp.) e infectados experimentalmente com cepa ME-49 de *T. gondii*, como a diminuição do parasitismo tecidual, preservação de células caliciformes no íleo e redução da taxa de óbito desses animais. Dentro do grupo não suplementado houve diminuição no número de cópias de *Lactobacillus* spp. no D35 em relação ao D0, D21 e D28, o que sugere o efeito negativo da infecção neste grupo de bactérias.

Os maiores números de cópias de *E. coli* foram encontradas no D28 (7 dias pós infecção) nos animais não suplementados, em comparação aos suplementados. Bem como nas análises do grupo não suplementado, *Clostridium perfringens* e *E. coli* tiveram um menor número de cópias no D21 comparado ao D0, enquanto o D28 apresentou um maior número de cópias em relação ao D0 e D21. Isso demonstra que a ausência de suplementação com mananoproteínas

frente a infecção com *T. gondii* aumenta as concentrações dessas bactérias na microbiota de gatos.

As mananoproteínas atuam na fase de colonização de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella*, ligando-se às fímbrias, tipo 1 manose-específicas destas, tornando-as indisponíveis para a aderência à mucosa intestinal (LEA et al., 2013; HOOGE et al., 2013). *E. coli* e *Clostridium* spp. estão correlacionados a anormalidades na arquitetura da mucosa, principalmente atrofia das vilosidades (JANECZKO et al., 2008). Em camundongos, infecção por *T. gondii* gera uma remodelação da microbiota, resultando em disbiose intestinal grave, levando a uma dominância temporária, mas significativa de Enterobacteriaceae, especialmente *E. coli* (EGAN et al., 2011, RAETZ et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa conclui-se que as mananoproteínas apresentam efeito prebiótico quanto utilizadas na suplementação de gatos, na concentração de 0,16%, evidenciada a partir do aumento de *Lactobacillus* spp.

As mananoproteínas possuem efeito benéfico na microbiota intestinal frente a infecção com *T. gondii*, observada a partir do aumento de *Lactobacillus* spp. 7 e 15 dias pós-infecção.

A infecção por *T. gondii* no grupo não suplementado leva à diminuição de *Lactobacillus* spp. e aumento de *C. Perfringens* e *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; DIONIZIO, M. A.; ROSTAGNO, H. S.; VARGAS JÚNIOR, J. G.; CARVALHO, D. C. O.; COSTA, C. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.742-749, 2006.
- AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, p.171, 2009.
- AQUINO, A. A.; SAAD, F. M. O. B.; SANTOS, J. P. F.; ALVES, M. P.; FERRAZZA, R. A.; MIRANDA, M. C. M. G. Efeitos do extrato da parede de levedura na digestibilidade, no escore fecal e na palatabilidade de dietas para gatos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.3, p.622-630, 2010.
- AQUINO, A. A.; SAAD, F. M. O. B.; SANTOS, J. P. F.; LEITE, C. A. L.; SAMPAIO, G. R.; FELICIANO, M. A. R. Efeitos da parede de levedura em dieta úmida na microbiota fecal, na produção de gás e na morfologia intestinal de gatos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1673-1680, 2013.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v.11, n.9, p.426-430, 2003.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.
- BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v.41, n.1, p.11-16, 2002.
- BOUT, D. et al. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, v.201, n.2, p.225-228, 1999.
- BRITO, J. M.; FERREIRA, A. H. C.; SANTANA JR, H. A.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B.; DUARTE, A. R.; Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes – Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.10, n.4, p.2525-2545, 2013.

BROWNAWELL, A. M.; CAERS, W.; GIBSON, G. R.; KENDALL, C. W. C.; LEWIS, K. D.; RINGEL, Y.; SLAVIN, J. L. Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals. **Journal of Clinical Nutrition**.v.142, p.962-974, 2012.

BUZONI-GATEL, D.; Werts, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**, v.22, n.10, p.448-452, 2006.

CALIMAN, M. C. W. **Estudo de vigilância bacteriológica: isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de Escherichia coli isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto**, 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2010.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **RevAssMed Brasil**, v.46, n.4, p.335-41, 2000.

CHIZZOTTI, A. F. **Níveis de mananoproteína sobre a digestibilidade, imunidade e microbiota fecal de cães adultos**. Dissertação (Mestrado em zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012.

COHEN, S. B., DENKERS, E. Y. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. **Parasite immunology**, v 37, n.3, p.108-117, 2015.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 34 - 52, 2010.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569- 588, 1998.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.1089-1091, 2008.

DELROISSE, J. -M.; BOULVIN, A. -L.; PARMENTIER, I.; DAUPHIN, R. D.; VANDENBOL, M.; PORTETELLE, D. Quantification of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* in rat fecal samples by real-time PCR. **Microbiological Research**, v.163 p.663-670, 2008.

DESAI, A. R., MUSIL, K. M., CARR, A. P., & HILL, J. E. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. **Veterinary microbiology**, v.137, n.1, p.120-128, 2009.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 189, n. 2, p. 116-170, 1986.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, n. 1-2, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Oocyst Shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**, v.87, n.1, p.215-219, 2001.

DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J. P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology** v.38, p.1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dog. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.39, p.1009-1034, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 nd ed. Beltsville: CRC Press, 2010. 313p.

EGAN, C. E., Maurer, K. J., Cohen, S. B., Mack, M., Simpson, K. W., &Denkers, E. Y. Synergy between intraepithelial lymphocytes and lamina propria T cells drives intestinal inflammation during infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 6, p. 658, 2011.

FERGUSON, D. J.; DELAUW, -C. M-F.; DUBREMETZ, J-F.; SIBLEY, L. D.; JOINER, K. A.; WRIGHT, S. The Expression and Distribution of Dense Granule Proteins in the Enteric(Coccidian) Forms of *Toxoplasma gondii* in the Small Intestine of the Cat. **Experimental Parasitology**, v.91, p.203-211, 1999.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homageto Nicolle, ManceauxandSplendore. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. **Multi-StatePoultry Meeting**, v.14, 2002.

- RODRIGUEZ, N. M.; SILVA, A. V. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.31, p.53-71, 2000.
- FÉLIX, A. P.; ZANATTA, C. P.; BRITO, C. B. M.; MURAKAMI, F. Y.; FRANÇA, M. I.; MAIORKA, A.; FLEMMING, J. S. Supplementation of mannanoligosaccharides (MOS) and aluminum silicate mixture on fecal quality of adult dogs. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.1, p.31-35, 2009.
- FILHA, E. S.; OLIVEIRA, S. M. Toxoplasmose. **Biológico**, v. 71, n.1, p.13-15, 2009.
- FRANCO, W. A. C.; BERGAMASCHI, D. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; NOUGUEIRA, Y.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, S. L. P. et al. Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.40, p.452-456, 2003.
- FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. **PLoS Biology**, v.11, n.8, 2013.
- GANAN, M., CARRASCOSA, A. V., DE PASCUAL-TERESA, S., MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Inhibition by yeast-derived mannoproteins of adherence to and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**, v.72, n.1, p. 55-59, 2009.
- GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., BIAZZONO, L., FREIRE, R. L., JUNIOR, J. D. S. G., CRYSSAFIDIS, A. L., DIAS, R. C. F. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary parasitology**, v.145, n.3-4, p.197-206, 2007.
- GHAZY, A. A.; SHAAPAN, R. M.; ABDEL-RAHMAN, E. H. Comparative serological diagnosis of toxoplasmosis in horses using locally isolated *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.31-36, 2007.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.
- GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.259-275, 2004.

GIBSON, R. G.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A.; FERRANDON, A. -D.; GAREAU, M.; MURPHY, E. F. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v.7, n. 1, p.1-19, 2010.

GOMES, M. D. O. S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães.** 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.

GOUVEIA, E. M. S.; SILVA, I. S.; VAN ONSELEM, V. J. *et al.* Use of mannanoligosaccharides as an adjuvant treatment of gastrointestinal diseases and this effects on *E. coli* inactivated in dogs. **Acta cirurgica brasileira.**, v.21, p. 23-26, 2006.

GOUVEIA, E. M. S. **Avaliação da ação dos mananoligossacarídeos fosforilados em infecções experimentais causadas pelas *Escherichia coli* enteropatogênicas de cães (DEPEC).** 2010. 90p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

HANDL, S., DOWD, S. E., GARCIA-MAZCORRO, J. F., STEINER, J. M., & SUCHODOLSKI, J. S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS microbiology ecology.**v.76, n.2p. 301–310, 2011.

HEIMESAAT, M. M., BERESWILL, S., FISCHER, A., FUCHS, D., STRUCK, D., NIEBERGALL, J., E SCHUMANN, R. R. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology.** v.177, n. 12, p 8785-8795, 2006.

HEIMESAAT, M. M., FISCHER, A., JAHN, H. K., NIEBERGALL, J., FREUDENBERG, M., BLAUT, M., E BERESWILL, S. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. **Plos one** v. 56, n. 7, p. 941-948, 2007.

HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G. T.; FURRIE, E.; FITE, A.; MACFARLANE, S. Characterization of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, n.1, p.77-85, 2005.

HOOGE, D.M.; KIERS, A.; CONNOLLY, A. Meta-Analysis Summary of Broiler Chicken Trials with Dietary Actigen® (2009-2011). **International Journal of Poultry Science**, v.12, n.1, p.01-08, 2011.

JANECZKO, S., ATWATER, D., BOGEL, E., GREITER-WILKE, A., GEROLD, A., BAUMGART, M., E SIMPSON, K. W. The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 178-193, 2008.

JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A.; MCCARTNEY, A. L. Investigation of the faecal microbiota of kittens: monitoring bacterial succession and effect of diet. **FEMS MicrobiolEcol**, v.78, p.395-404, 2011.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.80-88, 2000.

KERR, K. R.; DOWD, S. E.; SWANSON, K. S. Salmonellosis impacts the proportions of faecal microbial populations in domestic cats fed 1–3-d-old chicks. **JournalofNutritional Science**, v.3, n.30, 2014.

KROLL, F.S. **Efeitos da adição de mananoproteínas derivadas da parede celular de leveduras sobre parâmetros imunológicos de cães adultos e idosos.** Dissertação (Mestrado em clínica médica veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, 2014.

LEA, H.; SPRING, P.; TAYLOR-PICKARD, J.; BURTON, E. A natural carbohydrate fraction Actigen™ from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effects on goblet cells, gut morphology and performance of broiler chickens. **JournalofApplied Animal Nutrition**, v.1, p.1-7, 2013.

LOPES, A.T.D. **Reação em cadeia da polimerase em tempo real para quantificação simultânea de *Salmonella* spp., *Escherhichia coli* e *Saphylococcus aureus* em alimentos.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2016.

LUBBS, D. C.; VESTER, B. M.; FASTINGER, N. D.; SWANSON, K. S. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.113-121, 2009.

JOHNSTON, K. L.; LAMPORT, A.; BATT, R. M. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. **Veterinary Records**, v.132, n.14, p.362-363, 1993.

- MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **BMJ: British Medical Journal**, v. 318, 1999.
- MALINEN, E.; KASSINEN, A.; RINTTILÄ, T.; PALVA, A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. **Microbiology**, v.149, n.1, p. 269-277, 2003.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews**, v.11, 2011.
- MATHEUS, L. F. O. **Avaliação dos efeitos digestivos, fermentativos e imunológicos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativadas e enriquecidas em meio de cultura em dietas para gatos adultos.** 2016. 61p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; KADO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.167-173, 2004.
- MEIER, H.; HOLZWORTH, J.; GRIFFITHS, R. C. Toxoplasmosis in cats- Fourteen cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.131, n.9, p.395-414, 1957.
- MIDDELBOS, I. S.; BOLER, B. M. V.; QU, A.; WHITE, B. A.; SWANSON, K. S.; FAHEY JR, G. C. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. **PLoS One**, v.5, n.3, p. 9768, 2010.
- MINAMOTO, Y.; HOODA, S.; SWANSON, K. S.; SUCHODOLSKI, J. S. Feline gastrointestinal microbiota. **Animal Health Research Reviews**, v.13, p.64–77, 2012.
- MUNHOZ, A. D., HAGE, S. B., CRUZ, R. D. S., CALAZANS, A. P. F., SILVA, F. L., ALBUQUERQUE, G. R.; LACERDA, L. C. Toxoplasmosis in cats in northeastern Brazil: Frequency, associated factors and coinfection with *Neospora caninum*, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 35-38, 2017.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.

- OSUMI, M. The ultrastructure of yeast cell wall structure and formation. **Micron**, v.29, n.2-3. p.207-233, 1998.
- PATEL, B.; YOUNG, Y.; DUFFY, K.; TANNER, R. P.; JOHNSON, J.; HOLLIMAN, R. E. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. **J. Med. Microbiol.**, v.38, p.286-292, 1993.
- PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. **Poultry Science**, v.82, p.627-631, 2003.
- PELÍCIA, K.; MENDES, A. A.; SALDANHA, E. S. P. B.; PIZZOLANTE, C. C.; TAKAHASHI, S. E.; MOREIRA, J. et al. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. **Braz JourofPoultrySci**, v.6, n.3, p. 163-169, 2004.
- PINTO, L. D.; ARAUJO, F. A. P.; STOBBS, N. S.; MARQUES, M. S. T. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.39, p.2464-2469, 2009.
- QUEEN, E. V.; MARKS, S. L.; FARVER, T.B. Prevalence of Selected Bacterial and Parasitic Agents in Feces from Diarrheic and Healthy Control Cats from Northern California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, p.54-60. 2012.
- RAETZ, M., Hwang, S. H., Wilhelm, C. L., Kirkland, D., Benson, A., Sturge, C. R., e Gilpin, C. J. Parasite-induced T H 1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v.14, n. 2, p. 136, 2013.
- RINTTILÄ, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA targeted primers for quantification of pathogenic and 103 indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1166-1177, 2004.
- RITCHIE, L. E.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiol Ecology**, v.66, p.590-598, 2008.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and liver disease**, v. 34, p. 105-110, 2002.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, 2007.

ROSSI, G., PENGO, G., CALDIN, M., PICCIONELLO, A. P., STEINER, J. M., COHEN, N. D., SUCHODOLSKI, J. S. Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS One**, v.9, n.4, p. 94699, 2014.

SANTOS, T. N. S.; CASTRO, V.; SOARES, A. L.; OBA, A.; SHIMOKOMAKI, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos na nutrição dos animais. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 3, p. 573-576, 2008.

SANTOS, J. P. F. **Efeitos de níveis crescentes de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota fecal e produtos da fermentação intestinal em dietas para gatos adultos**. 2015. 91p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

SOUSA, R. O. D. **Administração oral das bactérias probióticas *Lactobacillus spp.* controla a translocação bacteriana e reduz a ileíte experimental induzida por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6**. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

STRICKLING, J. A., HARMON, D. L., DAWSON, K. A., E GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 3-4, p. 205-219, 2000.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The Effects of Dietary Mannanooligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of Salmonella-Challenged Broiler Chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 205–211, 2000.

SUCHODOLSKI, J. S. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.41, n. 2, p. 261-272, 2011.

SUCHODOLSKI, J. S.; MARKEL, M. E.; MAZCORRO, J. F. G.; UNTERER, S.; HEILMANN, R. M.; DOWD, S. E. et al. The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. **PLoS One**, v.7, n.12, 2012.

SUCHODOLSKI, J. S.; FOSTER, M. L.; SOHAIL, M. U.; LEUTENEGGER, C.; QUEEN, E. V.; STEINER, J. M. et al. The Fecal Microbiome in Cats with Diarrhea. **PLoS One**, v.10, n.5, 2015.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. H. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; CHOW, J.; WOLF, B. W.; GARLEB, K. A.; FAHEY JR, G. C.

Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* Modify Gut Microbial Populations, Total Tract Nutrient Digestibilities and Fecal Protein Catabolite Concentrations in Healthy Adult Dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p. 3721-3731, 2002a.

SWANSON, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., e Fahey, G. C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 980-989, 2002.

SWANSON, K. S.; GRIESHOP, C. H. M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L. L.; HEALY, H. P.; DAWSON, K. A.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C. JR.

Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.980-989, 2002b.

TALARICO, S. T. **Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade.** Dissertação de mestrado- Universidade de São Paulo; 2012.

THUM, C., COOKSON, A. L., OTTER, D. E., MCNABB, W. C., HODGKINSON, A. J., DYER, J., ROY, N. C. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? **Journal of Nutrition**, v.142, p.1921-1928, 2012.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciência Agrária**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

WILHELM, C. L., & YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite immunology**, v. 36, n. 9, p. 409-420, 2014.

WISE, M. G.; SIRAGUSA, G. R. Quantitative Detection of *Clostridium perfringens* in the Broiler Fowl Gastrointestinal Tract by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3911-3916, 2005.

ZANUTTO, M. D. S. **Dinâmica da infecção toxoplásmica em felinos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

ANEXOS

Anexo A- Protocolo da Reação de Imunofluorescência– RIFI

Procedimentos para contagem de taquizoítos:

1. Preencher a câmara de *Neubauer* com os taquizoítos.
2. Realizar contagem em cinco dos 25 quadrantes centrais.
3. Multiplicar o resultado por 50, o que corresponde à quantidade de taquizoítos por μL . O número ideal é de 1.500 – 2.000 taquizoítos/ μL para preparo do antígeno.
4. Diluir o material ressuspenso para uma concentração de 1.500 a 2.000 taquizoítos por μL .

Preparo das Lâminas:

1. Adicionar 10 μL do antígeno em cada poço da lâmina.
2. Secar em estufa a 37°C por aproximadamente 30 minutos.
3. Fixar em metanol por cinco minutos
4. Acondicionar em lenço de papel e papel alumínio, armazenando a -20°C, até o momento do uso.

Execução da técnica de RIFI:

1. Lavar as lâminas em PBS por 5 minutos.
2. Secar as lâminas em temperatura ambiente ou estufa a 37°C (tempo = até secar).
3. Diluir o soro, segundo seu ponto de corte (1:16 para *T. gondii*)
4. Adicionar 10 μL da diluição das amostras de soro.
5. Adicionar 10 μL dos soros controles positivo e negativo.
6. Incubar a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.

7. Lavar as lâminas duas vezes com PBS por 5 minutos.
8. Secar as lâminas a temperatura ambiente.
9. Diluir o conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) em solução de PBS-Azul de Evans (0,5%), de acordo com o título determinado no Laboratório.
10. Adicionar 10 μ L do conjugado diluído em cada poço e proteger da luz.
11. Incubar a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida, sempre protegendo da luz.
12. Lavar as lâminas duas vezes com PBS por 5 minutos (protegendo da luz).
13. Secar as lâminas a temperatura ambiente.
14. Adicionar uma gota de glicerina entre os poços e cobrir com lamínula.
15. Fazer a leitura em objetiva de 40x no microscópio com lâmpada de mercúrio de alta pressão USH102 e filtro de seleção de comprimento de onda de 450 nm.