

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Noemia Cristina Gama dos Santos Cardozo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE *Lactococcus lactis* 4U EM CULTURA
FRESCA, LIOFILIZADA E SECA EM SPRAY DRYER EM MODELO MURINO DE
FEBRE TIFOIDE**

**BELO HORIZONTE
2025**

Noemia Cristina Gama dos Santos Cardozo

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE *Lactococcus lactis* 4U EM CULTURA FRESCA, LIOFILIZADA E SECA EM SPRAY DRYER EM MODELO MURINO DE FEBRE TIFOIDE

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Neumann
Coorientadora: Dra. Karen Costa

**BELO HORIZONTE
2025**

043

Cardozo, Noemia Cristina Gama dos Santos.

Avaliação do efeito protetor de *Lactococcus lactis* 4U em cultura fresca, liofilizada e seca em spray dryer em modelo murino de febre tifoide [manuscrito] / Noemia Cristina Gama dos Santos Cardozo. – 2025.

51 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Neumann. Coorientadora: Dra. Karen Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. *Salmonella typhimurium*. 4. *Lactococcus lactis*. 5. Liofilização. 6. Febre tifoide. I. Neumann, Elisabeth. II. Costa, Karen. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **NOÊMIA CRISTINA GAMA DOS SANTOS CARDOZO**

Nº REGISTRO: 2023665765

Às **14:00** horas do dia **04 de abril de 2025**, reuniu-se, remotamente pela plataforma *Microsoft Teams*, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jacques Robert Nicoli (Professor Emérito do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Leonardo Borges Acúrcio (Centro Universitário de Formiga), Profa. Dra. Elisabeth Neumann (Orientadora) e a Dra. Karen Costa (Coorientadora), para julgar o trabalho final "Avaliação do efeito protetor de *Lactococcus lactis* 4U em cultura fresca, liofilizada e seca em spray dryer em modelo murino de febre tifoide", da aluna **Noêmia Cristina Gama dos Santos Cardozo**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Elisabeth Neumann - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 04 de abril de 2025

Membros da banca:

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Prof. Dr. Leonardo Borges Acúrcio

De acordo:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann

(Orientadora)

Dra. Karen Costa

(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 07/04/2025, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacques Robert Nicoli, Professor Magistério Superior - Voluntário**, em 07/04/2025, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Borges Acurcio, Usuário Externo**, em 07/04/2025, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Costa, Usuária Externa**, em 07/04/2025, às 22:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 08/04/2025, às 08:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4025727** e o código CRC **CD243D45**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por toda a confiança em mim depositada para a execução deste lindo projeto, e que ele possa auxiliar em futuros estudos à comunidade científica!

Às minhas orientadoras Elisabeth Neumann que me acolheu grandemente em minha inesperada jornada em BH, me mostrando os caminhos para vencer os desafios, minha eterna gratidão, por todo carinho, confiança, paciência e ensinamento, e Karen Costa pela dedicação, ensinamento, paciência e conhecimento compartilhado. Foram dois anos desafiadores e vencidos. Não posso deixar de enfatizar a ajuda de Cesar, que foi essencial, em todo o trajeto da pesquisa, principalmente com sua paciência em me ajudar, e me ensinar coisas novas, abrindo portas para um caminho futuro. Meu obrigada a todos!

Aos meus pais Elisângela e Carlos que me apoiaram mesmo quando parecia impossível e por acreditar, quando nem eu acreditava. Minha irmã Mariana, e melzinha, vocês são minha base, meu tudo, onde quer que eu esteja, estamos juntos. Que toda a saudade sentida, fortaleça nossa união.

A todos os amigos e professores do laboratório H380, com quem dividi dias maravilhosos de aprendizado, trabalho e alegria, em especial a Natsumi, Gabriel pelas loucuras vividas juntos, que possamos seguir. E Samantha, pela grande ajuda nos momentos difíceis fazendo com que eles fossem mais leves.

Às agências de fomento que contribuíram para que este projeto acontecesse. Ao programa de Pós graduação em Microbiologia/UFMG, e todos os professores que tive a honra de conhecer e adquirir conhecimento. Que gerações possam usufruir do conhecimento deixado por professores!

Aos amigos e família que deixei em Alagoas, em especial Krysla que sempre me apoiou, meus avós, tia Erica, tio Ely, Everaldo e Edinei que me auxiliaram neste grande sonho. E os amigos que ganhei em Minas Gerais, Gi que me ajudou nesta jornada desde o início, Gabi com sua luz e serenidade, e Sara pelas conversas, viagens e acolhimento familiar, irmãs especiais que Deus me deu. Thawanny pelo recebimento, apoio, carinho e amizade.

Agradeço a minha mãe, a quem ofereço este trabalho *Totus tuus, Mariae!*

RESUMO

A febre tifoide causa mortalidade e morbidade em todo o mundo. Dentro desta problemática, os probióticos tem despontado como possibilidade profilática ou como auxiliares no tratamento. As bactérias ácido lácticas, amplamente utilizadas em produtos lácteos, são muito utilizadas como probióticos que são conhecidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os prováveis mecanismos de potencial ação probiótica da linhagem *Lactococcus lactis* 4U em modelo murino de infecção experimental por *Salmonella enterica* subs. *enterica* sor. Typhimurium. ATCC (14028). Para tanto, utilizou-se um modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*, que mimetiza a febre tifoide humana. Foram realizados ensaio de sobrevivência onde acompanhou-se a variação ponderal dos animais, e ensaio de verificação de mecanismos de ação protetora após desafio. Em ambos, camundongos Balb/c receberam diariamente por gavagem a linhagem *L. lactis* 4U antes e após o desafio. Também foram avaliados no segundo ensaio: translocação, lesões histopatológicas, atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias. A administração oral da linhagem *L. lactis* 4U (fresca, liofilizada ou seca em *spray dryer*) resultou em ganho de peso constante e obteve 66,67% para 4U fresca + ST, 41,67% para 4U liofilizada + ST e 75% para 4U *spray* + ST, de sobrevivência. Foi constatado translocação de *S. Typhimurium* para baço e fígado em todos os grupos experimentais, em quantidade de 10^5 UFC/g de colonização. Apresentou-se níveis histopatológicos normais, e com manutenção do íleo para os grupos controle *L. lactis* 4U e experimentais, assim como foi observado redução de microabscessos no fígado nos mesmos grupos. Níveis de MPO foram encontrados em maior quantidade no fígado, para todos os grupos exceto controle *L. lactis* 4U e o genes testados apresentaram uma regulação dos níveis de citocinas, evidenciando o processo inflamatório. Foi possível concluir que a linhagem *Lactococcus lactis* 4U, se mostrou seguro, mantendo sua viabilidade celular viável para administração de forma fresca, liofilizada e seca em *spraying*, e possibilitou maior porcentagem de sobrevivência, além de não ser capaz de translocar, e auxiliar na integridade da barreira intestinal.

Palavras-chave: Probiótico; *Salmonella Typhimurium*; *Lactococcus lactis*; *Spray Dryer*; Liofilização, Febre tifoide.

ABSTRACT

Typhoid fever causes mortality and morbidity worldwide. Within this issue, probiotics have emerged as a potential prophylactic option or as adjuvants in treatment. Lactic acid bacteria, widely used in dairy products, are commonly employed as probiotics, which are known as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host. This study aimed to evaluate the potential probiotic mechanisms of action of the *Lactococcus lactis* 4U strain in a murine model of experimental infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC (14028). For this purpose, a murine infection model of *S. Typhimurium*, which mimics human typhoid fever, was used. A survival assay was conducted to monitor the animals weight variation, along with an assay to verify protective action mechanisms after pathogen challenge. In both assays, Balb/c mice received daily oral administration of the *L. lactis* 4U strain before and after the challenge. In the second assay, additional evaluations included bacterial translocation, histopathological lesions, myeloperoxidase (MPO) enzymatic activity, and the relative expression of pro and anti-inflammatory cytokine-coding genes. Oral administration of the *L. lactis* 4U strain (fresh, lyophilized, or spray-dried) resulted in stable weight gain and survival rates of 66.67% for 4U fresh + ST, 41.67% for 4U lyophilized + ST, and 75% for 4U spray + ST. Translocation of *S. Typhimurium* to the spleen and liver was observed in all experimental groups, with a colonization of 10^5 CFU/g. Histopathological analysis showed normal levels and preservation of the ileum in the *L. lactis* 4U control and experimental groups, along with a reduction in liver microabscesses. MPO levels were higher in the liver for all groups except the *L. lactis* 4U control. The tested genes showed cytokine level regulation, highlighting the inflammatory process. It was concluded that the *Lactococcus lactis* 4U strain is safe, maintaining cell viability for administration in fresh, lyophilized, and spray-dried forms. It contributed to a higher survival rate, did not translocate, and helped preserve intestinal barrier integrity.

Keywords: Probiotic; *Salmonella* Typhimurium; *Lactococcus lactis*; Spray Drying; Lyophilization; Typhoid Fever.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**– Esquema de liofilização demonstrando os principais estágios: congelamento, fase de secagem primária e secundária 17
- Figura 2**– Esquema de *spray drying* com os três principais estágios: atomização, conversão de gotículas a partículas e coleta de partículas..... 28
- Figura 3** - Desenho esquemático sobre fatores de influência e estresses adversos sobre o crescimento de bactérias, processo de *spray drying* e armazenamento de bactérias..... 19
- Figura 4** – Esquemática de adesão, colonização e patogênese de *S. Typhimurium* que entra em contato com o epitélio intestinal, resultando na ativação do sistema de secreção do tipo III codificado dentro de sua ilha de patogenicidade 1 (T3SS-1). Proteínas efetoras são liberadas por esse sistema desencadeando respostas celulares que levam à internalização bacteriana e à produção de citocinas pró-inflamatórias..... 22
- Figura 5** – Desenho experimental do ensaio de sobrevivência com camundongos BALB/c, que receberam administração diária da linhagem *L. lactis* de acordo com o delineamento experimental. (1) primeiro dia do experimento, (10) décimo dia com desafio pelo patógeno, e (38) fim do experimento com eutanásia dos sobreviventes. (n = 12 animais/grupo) 27
- Figura 6** - Desenho experimental do ensaio de prováveis mecanismos de potencial ação probiótica, com camundongos BALB/c, que receberam administração diária da linhagem *L. lactis* de acordo com o delineamento experimental. (1) primeiro dia do experimento, (10) décimo dia com desafio pelo patógeno, e (16) décimo sexto dia do experimento com coleta de órgãos para análises de prováveis mecanismos (n = 6 animais/grupo) 28
- Figura 7** - (A) Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U em cultura liofilizada por até 160 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de sobrevivência, com utilização da amostra liofilizada há 85 dias. (II) desafio com patógeno e (III) fim do experimento de sobrevivência. (B) Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U seca em *spray dryer* por até 120 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de sobrevivência, com utilização da amostra seca em *spray dryer* há 11 dias, (II) desafio com patógeno, (III) fim do experimento de sobrevivência, (IV) início do experimento de prováveis mecanismos de ação protetora com amostra seca há 91 dias, (V) desafio com patógeno e (VI) fim do experimento com eutanásia dos animais para coleta de órgãos. Ambas amostras foram armazenadas sob refrigeração (n = 3) 32
- Figura 8** - Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U em cultura liofilizada por até 20 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de prováveis mecanismos de ação protetora, com utilização da amostra liofilizada há 1 dia. (II) desafio com patógeno e (III) fim do experimento com eutanásia dos animais para coleta de órgãos 33
- Figura 9** - Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c tratados ou não (A) grupo controle S.T e grupo cultura fresca de *L. lactis* 4U + S. T. (B) grupo controle S.T e grupo cultura liofilizada de *L. lactis* 4U + S.T, (C) grupo controle S.T e grupo com cultura de *L. lactis* 4U seca em *Spray dryer* + S.T (n = 12 animais/grupo) 35

Figura 10 – Percentual de variação de peso de camundongos BALB/c tratados ou não com (A) cultura fresca de *L. lactis* 4U + S.T, (B) cultura liofilizada de *L. lactis* 4U + S.T, (C) cultura de *L. lactis* 4U seca em *Spray dryer* + S.T (n = 12 animais/grupo) 36

Figura 11- Histopatologia do íleo de camundongos BALB/c tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*. (A) controle *L. lactis* 4U: íleo de aparência histológica normal, com áreas PAS⁺ devido a presença de mucinas (setas pretas). (B) controle ST: mucosa intestinal com apagamento marcante das vilosidades e criptas (setas pretas.) e, redução das áreas PAS⁺ (setas amarelas). (C) 4U fresca + ST, (D) 4U liofilizada + ST e (E) 4U *spray dryer* + ST, mucosa intestinal com aumento das áreas PAS⁺ (setas pretas) e manutenção da altura normal das vilosidades (setas pretas) e da profundidade das criptas (cabeças de setas), quando comparado ao grupo controle S.T. Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 50µm (n = 6 animais/grupo) 37

Figura 12 - Histopatologia do fígado de camundongos BALB/c tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*. (A) controle *L. lactis* 4U: exibindo parênquima hepático de aspecto normal. (B) controle ST: presença de vários microabscessos (setas pretas). (C) 4U fresca +ST, (D) 4U liofilizada + ST e (E) 4U *spray drying* + ST: com redução marcante do número de microabscessos (setas pretas) quando comparados ao grupo controle ST. Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 100 µm (n = 6/grupo)..... 39

Figura 13 - Atividade enzimática de mieloperoxidase em (A) amostras de íleo e (B) fígado camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão, (n = 6 animais/grupo), U. A: unidades arbitrárias 40

Figura 14 - Expressão relativa dos genes *ifny* (A) e *tgf-β* (B) em amostras de íleo de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). O resultado de cada grupo está expresso em média ± desvio padrão da quantidade relativa da expressão dos genes em relação ao grupo calibrador (controle ST), que tem nível de expressão definido como 1x 41

Figura 15 - Expressão relativa dos genes *ifny* (A) e *tgf-β* (B) em amostras de fígado de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). O resultado de cada grupo está expresso em média ± desvio padrão da quantidade relativa da expressão dos genes em relação ao grupo calibrador (controle ST), que tem nível de expressão definido como 1x 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquematização do delineamento experimental	27
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactéria ácido-láctica
BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Febre Tifoide
gDNA	DNA genômico
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ISAPP	Associação Internacional Científica de Probióticos e Prebióticos
LABAC	Laboratório de Biologia e Biotecnologia de Bactérias
LGMPP	Laboratório de Genética Molecular de Procariotos Probióticos
Log	Logaritmo
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>M</i>	<i>Microfold</i>
MPO	Mieloperoxidase
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	peso/volume
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SCV	Vacúolo contendo Salmonella
SP	Fagossomo espaçoso
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium</i>
SINAN/NET	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
SKM	Leite desnatado 10%
subsp.	Subespécie
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v/v	Volume/volume
WHO	World Health Organizatio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1. 1. Probióticos e o potencial biotecnológico de Bactérias Ácido Láticas	14
1. 2. <i>Lactococcus lactis</i>	16
1. 3. Métodos de desidratação de culturas microbianas	16
1. 3. 1. Liofilização (<i>Freeze-drying</i>)	16
1. 3. 2. <i>Spray drying</i>	18
1. 4. <i>Salmonella</i> sp.....	19
1. 5. Patogênese <i>S. Typhimurium</i>	21
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVO	23
3. 1. Objetivo geral	23
3. 2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA	24
4. 1. Local do experimento	24
4. 2. Animais.....	24
4. 3. Cultivo e preparo de alíquotas microbianas de <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. lactis</i> 4U.....	24
4. 3. 1. Armazenamento e crescimento das linhagens	24
4. 3. 2. Preparo das amostras para administração	25
4. 4. Processos de desidratação	25
4. 4. 1. Liofilização	25
4. 4. 2. Secagem em <i>Spray dryer</i>	26
4. 5. Delineamento experimental para ensaio de sobrevivência após desafio com <i>S. Typhimurium</i>	26
4. 5. 1. Verificação de variação de peso e de porcentagem de sobrevivência dos animais	28
4. 6. Ensaio de verificação de mecanismos de ação protetora após desafio com <i>S. Typhimurium</i>	28
4. 6. 1. Análise de translocação de <i>L. lactis</i> 4U e <i>S. Typhimurium</i> para fígado e baço de animais	28
4. 6. 2. Avaliação de lesões histopatológicas e análise morfométrica de íleo e fígado	29
4. 6. 3. Atividade Enzimática de Mieloperoxidase	30
4. 6. 4. Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado	30
4. 7. Análises estatísticas	31
5. RESULTADOS	31
5. 1. Concentração em de células viáveis de <i>Lactococcus lactis</i> 4U em cultura fresca, liofilizada e seca em <i>Spray Dryer</i>	31
5. 2. Ensaio de sobrevivência após desafio com <i>S. Typhimurium</i>	33
5. 3. Avaliação de mecanismos de potencial ação protetora de <i>Lactococcus lactis</i> 4U em modelo de infecção por <i>S. Typhimurium</i>	34
5. 3. 1 Translocação para fígado e baço	38
5. 3. 2 Avaliação histopatológica de íleo e fígado	38
5. 3. 3. Atividade enzimática de MPO	40
5. 3. 4. Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	46

8. PERSPECTIVAS.....	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
ANEXO.....	51

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Probióticos e o potencial biotecnológico de Bactérias Ácido lácticas

Probióticos (do latim *pro*, “para” ou “a favor de”, e do grego *bios*, “vida”) são conhecidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002; HILL et al., 2014).

Gasbarrini et al. (2016) explicaram que a história dos probióticos começa no início do século XX com os estudos pioneiros de Ilya Ilyich Mechnikov, um cientista russo que trabalhava no Instituto Pasteur em Paris, sendo o primeiro a investigar os possíveis efeitos desses microrganismos na saúde humana. Em 1907, publicou “*The Prolongation of Life*”, representando a primeira descrição científica do potencial de consumo de substâncias que alteram favoravelmente a microbiota gastrointestinal, um conceito amplamente aceito como o princípio dos probióticos (GOGINENI et al., 2013). Posteriormente, sugeriu que os lactobacilos, bactérias ácido lácticas (BAL), poderiam combater os efeitos putrefativos do metabolismo gastrointestinal, que contribuía para o desenvolvimento de doenças e para o envelhecimento (GASBARRINI et al., 2016).

Gogineni et al. (2013) citaram que, em 1962, Lilly e Stillwell expandiram a definição de probióticos para incluir bactérias anaeróbicas capazes de produzir ácido lático e estimular o crescimento de outros microrganismos e, em 1974, Parker sugeriu que o termo probiótico deveria abranger não apenas organismos microbianos, mas também outras substâncias que contribuíssem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Fuller, em 1992, definiu probióticos como um suplemento microbiano vivo que beneficia o animal hospedeiro ao melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (McFARLAND, 2015).

O Ministério da Saúde Brasileiro (2021), tratou dos probióticos de acordo com a mesma definição dada pela FAO/OMS em 2002, mas acrescenta que esses microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias quanto de leveduras. Chouraddi et al. (2023) explicaram ainda que a definição de probióticos dada pela Associação Internacional Científica de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) está restrita a fórmulas que incluam a contagem de células viáveis, uma influência favorável na saúde do hospedeiro e na sua alimentação, uma vez que para alcançar benefícios a saúde do hospedeiro, os probióticos devem estar presentes no produto em quantidades suficientes, entre 10^6 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL ou g (MATOUSKOVA et al., 2021).

A maioria dos probióticos são compostos por BAL, um grupo bacteriano amplamente estudado devido aos seus benefícios à saúde, que são frequentemente referenciadas na literatura como microrganismos com potencial probiótico. Possuem status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) reconhecidos pela FDA (*Food and Drug Administration*). O grupo BAL é composto por diversos gêneros, dos quais se destacam: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (CARR et al., 2002.; FERNANDES, 2022). Algumas dessas bactérias são benéficas, como *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, utilizadas na fermentação de alimentos, por exemplo. No entanto, algumas espécies dentro desse grupo podem ser patogênicas, como *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (BOLOTIN et al., 2001).

O grupo das BAL, consistem em bacilos ou cocos Gram-positivos, microaerófilicos ou anaeróbicos facultativos, fastidiosos, sem motilidade, com alta tolerância a baixo pH, não esporulantes, catalase negativos e geralmente encontrados em água, solo (CHAGAS, 2018.; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2016.; FERNANDES, 2022), vegetais, frutas, produtos cárneos fermentados, bebidas fermentadas, produtos em conserva, leite e derivados, além da microbiota residente de mamíferos, colonizando a pele, a mucosa respiratória, vaginal e intestinal (CANCELLA et al., 2024.; SANDES et al., 2017). As BAL são classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas. O ácido láctico é o principal produto da fermentação da glicose no grupo homofermentativo, enquanto o grupo heterofermentativo, além do ácido láctico, produz outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético e etanol (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

De acordo com Motta et al. (2023) as BAL podem ser utilizadas como culturas bioprotetoras e funcionais devido às suas atividades benéficas aos hospedeiros, uma vez que podem ser veiculadas por alimentos, sendo amplamente utilizadas em produtos lácteos. Pacheco-Martínez et al. (2023) afirmaram que os probióticos estão envolvidos na regulação de alguns fatores como homeostase intestinal, melhora da disponibilidade de nutrientes, redução de sintomas de intolerância à lactose, entre outros.

As BAL possuem potencial biotecnológico como carreadoras de vacinas orais (ZHAI et al., 2023) Também são capazes de influenciar no crescimento, redução dos efeitos de estresse ou conferir proteção contra patógenos; não ocasionar nenhum efeito deletério ou prejudicial ao hospedeiro; devem possuir boas características sensoriais, ação fermentativa, tolerância a liofilização (desejável); e devem exibir características específicas, como: tolerância ácida e

biliar; resistência às enzimas gástricas e capacidade de adesão ao trato gastrointestinal (SOUZA et al., 2023).

1. 2. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis é Gram-positivo, homofermentativo e heterofermentativo, que cresce em ótima temperatura de 37°C. Devido sua morfologia esférica, a distinção entre os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* torna-se difícil, quando baseada apenas na morfologia. Ocupa um nicho relacionado às superfícies de plantas e ao trato gastrointestinal de animais (SAMARŽIJA; ANTUNAC; HAVRANEK, 2001). Estudos sobre *L. lactis* demonstram a capacidade dessa espécie de BAL, de produzir lactato (produto final da fermentação de açúcares), conhecido por ter um efeito antimicrobiano, assim como a produção de bacteriocinas, que contribuem para a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis (MILERIENE et al., 2023.; CANCELLA et al., 2024).

Saleena et al (2022) mostraram que estudos acerca de *L. lactis*, incluem qualidades antialérgicas, anticâncer e anti-inflamatórias, assim como a capacidade de produzir enzimas como amilase e lipases, características relevantes tanto para aplicações probióticas quanto tecnológicas. Tendo como grande vantagem a capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) após administração oral, característica essa que tem permitido seu uso como um veículo para a entrega de agentes terapêuticos, como citocinas, no organismo humano. (HUANG et al., 2017; AZEVEDO et al. (2015). Atualmente, *L. lactis* tem sido modificado para expressar biomoléculas terapêuticas, representando um avanço significativo na bioengenharia. Esse desenvolvimento tem permitido aplicações terapêuticas inovadoras, com resultados promissores em diferentes modelos de doenças, pois pode atuar em vias específicas do sistema imunológico, promovendo imunomodulação com potencial para tratamento ou prevenção de doenças (CAMPOS et al., 2024).

1. 3. Métodos de desidratação de culturas microbianas

1. 3. 1. Liofilização (Freeze-drying)

O processo de liofilização tem como objetivo principal a manutenção de viabilidade celular de linhagens bacterianas após o processo de secagem e como especificação básica a mudança do estado físico da matéria, no qual se tem a conversão de água congelada diretamente para o estado de vapor por sublimação (FELLOWS, 2009). O processo de liofilização segue,

de modo geral, para outras áreas, os mesmos princípios do setor farmacêutico. Composto por três etapas principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária, de maneira a promover sublimação da água presente no material a ser desidratado (Figura 1) (KAWASAKI; SHIMANOUCI; KIMURA, 2019).

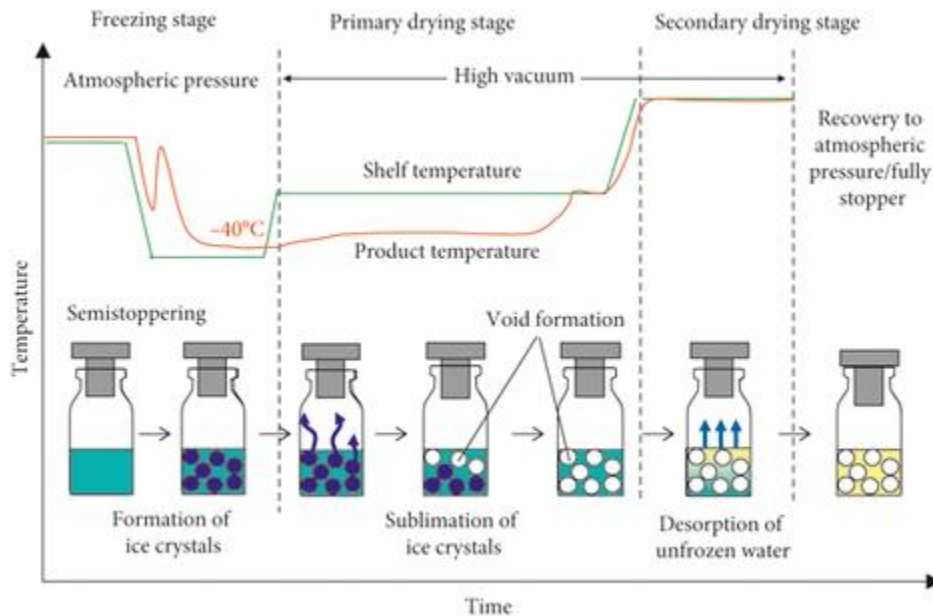


Figura 1 – Esquema de liofilização demonstrando os principais estágios: congelamento, fase de secagem primária e secundária. Adaptado de: Kawasaki et al., 2019.

As pesquisas têm se concentrado na otimização dos ciclos de liofilização para melhorar a sobrevivência bacteriana. De acordo com How et al. (2023), devido a liofilização ser um método que possui etapas de congelamento e secagem em baixas temperaturas, a mesma pode causar estresse às células, acarretando em danos a membrana celular. Devido a isso, é realizado o ajuste de parâmetros como temperaturas de congelamento, taxas de sublimação e o uso de liofilizantes (ou crioprotetores) específicos que são adicionados para proteger as culturas bacterianas em procedimentos de liofilização (SAVEDBOWORN et al., 2019). Durante as etapas de congelamento e sublimação/adsorção, ocorrem três mudanças de fase, expondo os microrganismos vivos a diversos estresses prejudiciais, como: estresses a variações térmicas, oxidação, pressão osmótica, pH, super-resfriamento e cristalização intra e extracelular, entre outros que são, em maior ou menor grau, interdependentes e ainda não completamente compreendidos (VERLHAC et al., 2019).

A liofilização geralmente proporciona os melhores resultados em termos de diversos fatores de qualidade, como os atributos morfológicos do material liofilizado (porosidade,

distribuição dos poros, taxas de reidratação, etc.) e a viabilidade bacteriana (VERLHAC et al., 2019), sendo a mais indicada para materiais sensíveis ao calor. Agentes protetores são adicionados para proteger as culturas bacterianas durante diferentes procedimentos de liofilização (SAVEDBOWORN et al., 2019).

1. 3. 2. *Spray drying*

A secagem por *spray dryer* é uma técnica amplamente utilizada para desidratar bactérias, especialmente probióticos e culturas iniciadoras. Envolve três estágios principais: (1) atomização, (2) conversão de gotículas a partículas (3) coleta de partículas (Figura 2) (AMERI; MAA, 2006). Uma solução é bombeada para um atomizador, que fragmenta a alimentação líquida em um spray de gotículas finas. Em seguida, as gotículas são ejetadas em uma câmara de gás de secagem, onde ocorre a vaporização da umidade, resultando na formação de partículas secas. Por fim, utilizando um dispositivo adequado, as partículas secas são separadas do meio de secagem e coletadas em um reservatório SANTOS et al., 2018).

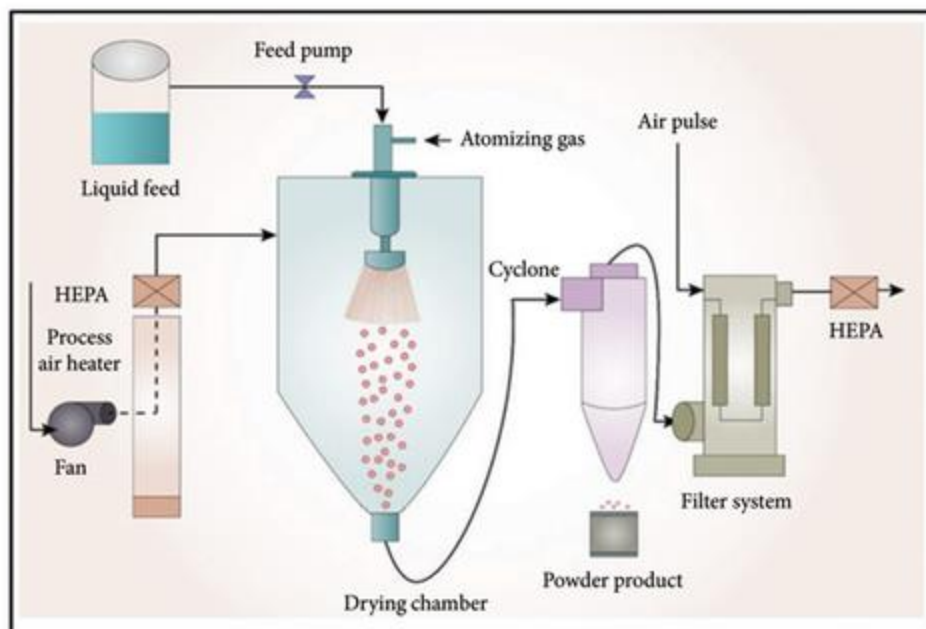


Figura 2– Esquema de *spray drying* com os três principais estágios: atomização, conversão de gotículas a partículas e coleta de partículas Adaptado de: Askari Vasselabadi et al., 2025.

A secagem por pulverização, embora mais econômica e rápida, pode não ser tão eficaz na preservação de células sensíveis. Huang et al., (2017), explicaram que, apesar da robustez das bactérias probióticas estarem provavelmente associadas ao ambiente de origem, presença

de genes específicos, interações com a matriz extracelular ou à capacidade de acumulação intracelular de polifosfatos e produção de exopolissacarídeos. As condições de secagem devem ser ajustadas para cada linhagem levando em conta mecanismos de inativação das bactérias durante a vaporização como estresses térmico, osmótico, oxidativo e de dessecação (Figura 3).

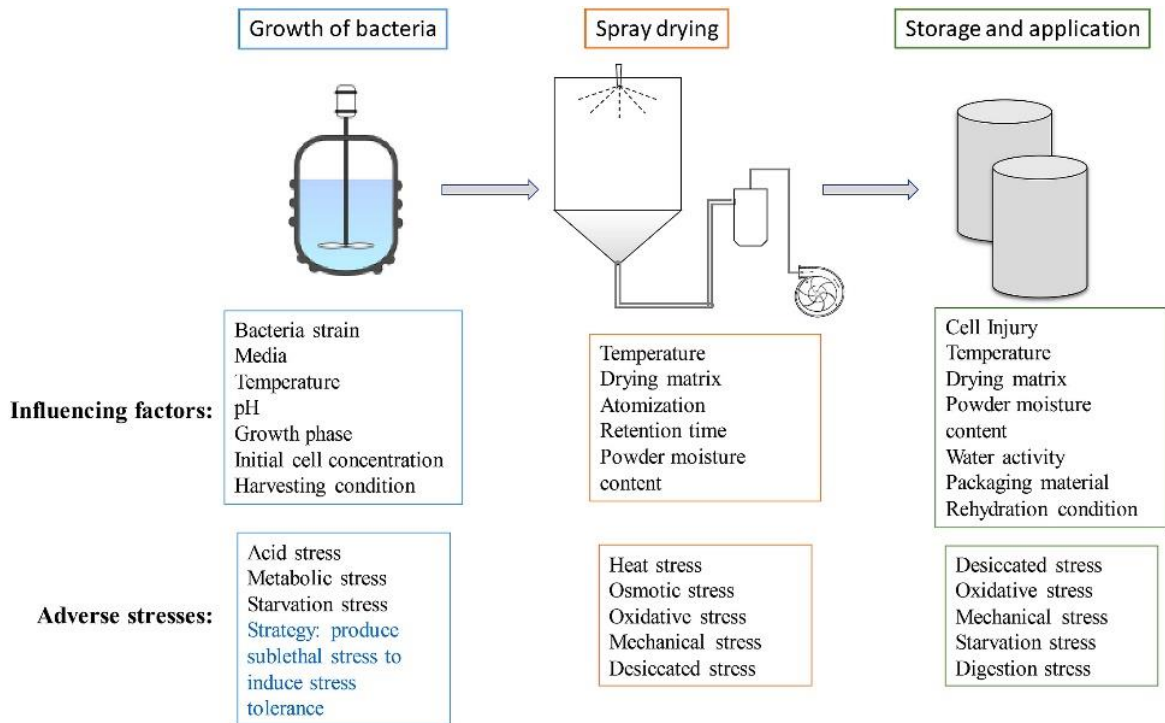


Figura 3 - Desenho esquemático sobre fatores de influência e estresses adversos sobre o crescimento de bactérias, processo de *spray drying* e armazenamento de bactérias. Adaptado de: Huang et al., 2017.

1. 4. *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, são anaeróbios facultativos, Gram negativo, de forma bacilar, possui flagelos peritríquios, não formador de esporos, patógeno intracelular, dividido em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*, além de mais de 2600 sorotipos. (OLUDAIRO et al. 2022.; KNODLER; ELFENBEIN, 2019).

Dentre as causadoras de salmonelose mais comuns estão os sorotipos tifoídes: *S. enterica* sor. Paratyphi A, B ou C, e *S. enterica* sor. Typhi que resultam na febre tifoide (FT), causando infecção sistêmica, e os sorotipos não tifoídes: *S. enterica* sor. Enteritidis e *S. enterica*

sor. Typhimurium, também possuem como reservatório o trato gastrointestinal (TGI), causando doença em humanos e animais. A infecção por *S. Typhimurium* em um modelo murino resulta em uma doença que se assemelha à febre tifoide humana e por esta razão são utilizados em modelos de experimentação animal (FÁBREGA; VILAA 2013.; PARRY et al., 2002.; OLIVEIRA et al., 2023).

A incubação da FT ocorre em um período de 7 a 14 dias, e tem como veículo de transmissão água ou alimentos contaminados (cru ou mal cozidos), suspeita-se de FT quando há febre persistente, juntamente com os demais sintomas como, diarreia, náusea, vômito, tosse, constipação, dor de cabeça, falta de apetite (anorexia), frequência cardíaca lenta, hepatoesplenomegalia, manchas rosadas no tronco, roséola típica e dissociação pulso/temperatura, além de alguns casos serem assintomáticos (VERONESE et al. 2023; SOUZA et al. 2023). Dentre os sintomas causados por salmoneloses não tifoídes, estão diarreia, dor abdominal, cólicas, náusea e vômito, e no paciente imunocomprometido, pode evoluir para doença sistêmica e causar sintomas mais graves (FERNANDES, 2022; PARRY et al., 2002; GORDON, 2008).

Estas bactérias podem ser encontradas em produtos alimentícios contaminados principalmente de aves, suínos e ovos, tendo transmissão de forma oral-fecal. A implementação de medidas preventivas e a utilização de técnicas de análise microbiológica, associadas a ferramentas de gestão da qualidade, são essenciais para garantir a prevenção de DTHA (Doenças de transmissão hídrica e alimentar) e assim barrar a transmissibilidade por salmonelose (NASCIMENTO et al., 2023; EHUWA; JAISWAL, 2021).

Um grande desafio para seu combate, é quando os sintomas se tornam graves, e a terapia antimicrobiana é indicada em caso de sinais de disseminação extraintestinal da infecção. Apesar de considerado padrão ouro, o uso de antibióticos pode aumentar linhagens resistentes e multirresistentes a medicamentos (MDR), além de acarretar em uma disbiose intestinal que pode intensificar a expansão do patógeno. Diante desses desafios, a pesquisa de novas alternativas como futuros tratamentos, tais como linhagens probióticas de BAL, representa uma estratégia promissora no combate a salmoneloses. (FÁBREGA; VILAA 2013., OLIVEIRA et al, 2023.; FERNANDES, 2022).

1. 5 Patogênese *S. Typhimurium*

S. Typhimurium é normalmente, ingerido por consumo de alimentos ou águas contaminadas. Quando é consumido um inóculo bacteriano considerável, este começará seu percurso pelo TGI, sobrevivendo a acidez do estômago, aderindo-se com auxílio de flagelos e sistemas quimiotáticos, especificamente ao íleo distal e cólon proximal. Após a passagem pela mucosa intestinal as bactérias adentram os tecidos linfoides subjacentes realizando multiplicação intracelular (Figura 4), isso se dá, através do chamado sistema de secreção do tipo III (T3SS), que é essencial para colonização do patógeno por mediar proteínas efetoras que modificam funções celulares, como a arquitetura do citoesqueleto, o tráfego de membranas, a transdução de sinais e a expressão de genes de citocinas, promovendo a sobrevivência e colonização bacteriana (ENG et al., 2015.; OLIVEIRA et al., 2023.; HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008).

Dentre as formas que as células bacterianas podem adentrar o hospedeiro realizando os processos de patogênese, as principais são: vias de células M (*microfold*), com a absorção de bactérias por células do lúmen e a captação induzida por proteínas efetoras secretadas através do sistema de secreção tipo III (T3SS) codificado pela Ilha de Patogenicidade de Salmonella 1 (SPI-I) que introduz as bactérias ao epitélio intestinal (OLIVEIRA et al., 2023). A interação bacteriana com o epitélio intestinal resulta na ativação do sistema de secreção tipo III, ocasionando a liberação de diversas proteínas efetoras que estimulam uma resposta celular do hospedeiro, levando a internalização bacteriana e reprogramação transcricional da célula (GALÁN, 2021).

As proteínas efetoras podem levar ao rearranjo do citoesqueleto, ocasionando macropinocitose, e após a internalização bacteriana, o compartimento delimitado por membrana modula o tráfego vesicular devido a expressão das proteínas efetoras estar sendo codificadas pelo sistema de secreção tipo III, localizado na ilha de patogenicidade 2 (SPI-II). Essa modulação permite uma adaptação favorável para sobrevivência e replicação do patógeno. A internalização bacteriana resulta em vacúolos chamados de fagossomo espaçoso (SP), o qual reduz de tamanho em minutos ou horas e forma uma membrana aderente ao redor de uma ou várias bactérias, sendo então chamado de vacúolo contendo salmonela (SCV). Esse vacúolo se funde com lisossomo e se acidifica, indicando dessa forma a capacidade do patógeno de resistência a peptídeos antimicrobianos, óxido nítrico e estresse oxidativo, fatores cruciais para

sua sobrevivência dentro dos macrófagos e, conseqüentemente, para sua virulência (GALÁN, 2021.; HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008).

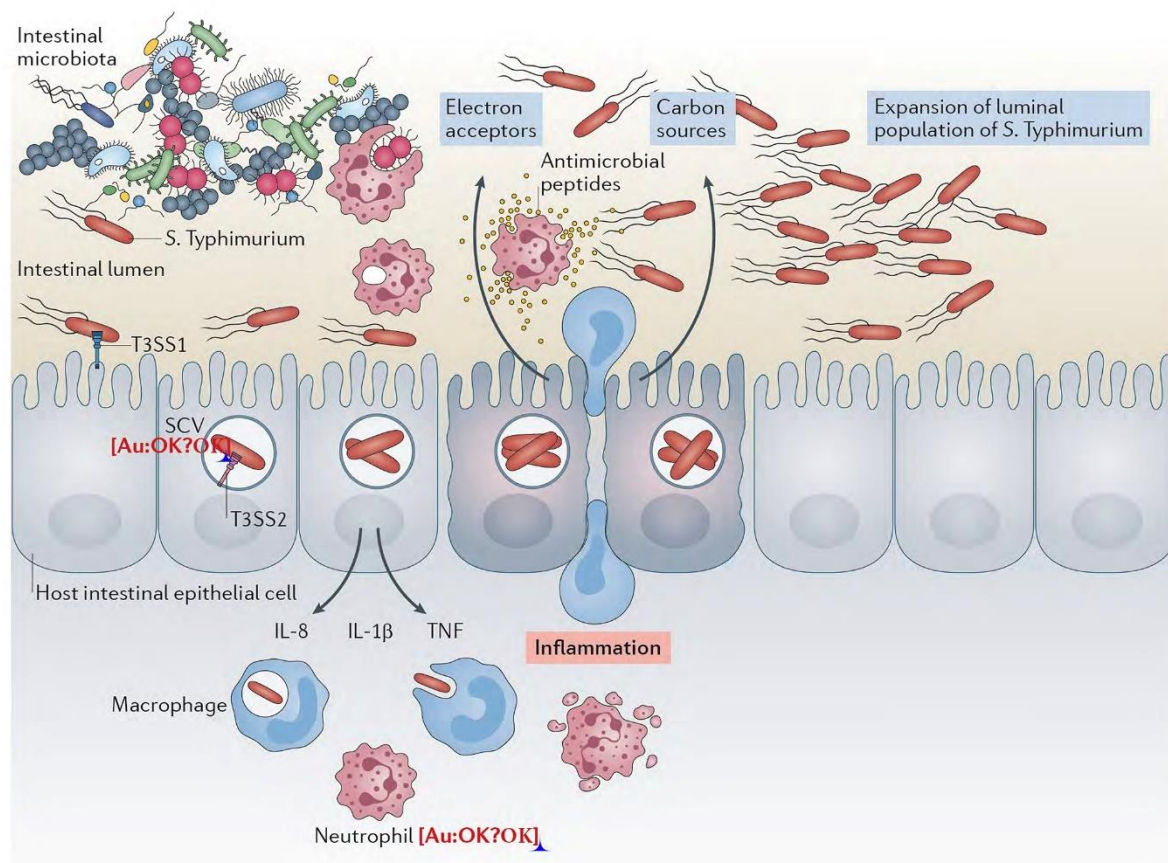


Figura 4 – Esquemática de adesão, colonização e patogênese de *S. Typhimurium* que entra em contato com o epitélio intestinal, resultando na ativação do sistema de secreção do tipo III codificado dentro de sua ilha de patogenicidade 1 (T3SS-1). Proteínas efetoras são liberadas por esse sistema desencadeando respostas celulares que levam à internalização bacteriana e à produção de citocinas pró-inflamatórias. Adaptado de Galán, J. E. (2022).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo Bhandari et al. (2023), a febre tifoide produz grande carga de mortalidade e morbidade em todo o mundo, apesar de ter sido reduzida a taxa de mortalidade geral para menos de 1% devido a avanços dos tratamentos. Dentro desta problemática, uma vez que os probióticos podem permanecer no trato gastrointestinal, ocasionando modulação da microbiota e conferir proteção ao seu hospedeiro, tornam-se uma grande vantagem profilática. Assim, o trabalho teve como a avaliação dos prováveis mecanismos de ação probiótica de uma linhagem

de bactéria láctica *L. lactis* 4U, proveniente de grãos de kefir de leite de Divinópolis, Minas Gerais, utilizando-se um modelo murino de febre tifoide. De acordo com os dados de Costa et al. (2023), essa linhagem foi capaz de expressar-se como potencial probiótico devido aos bons resultados nos ensaios *in vitro* e aumentou a sobrevivência dos animais em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*. Tal resultado nos estimulou a dar prosseguimento à avaliação dos efeitos benéficos da ingestão da linhagem *L. lactis* 4U, tanto na sua forma fresca como na desidratada, procurando entender prováveis mecanismos de ação dessa linhagem, com a finalidade de recomendar o seu uso futuro como probiótico.

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo Geral

Avaliar os prováveis mecanismos de ação probiótica da linhagem *Lactococcus lactis* 4U em modelo murino de infecção experimental por *Salmonella enterica* subs. *enterica* sor. Typhimurium. ATCC (14028).

3. 2. Objetivos Específicos

- I. Determinar periodicamente concentração de células viáveis das amostras bacterianas processadas em liofilizador e *Spray dryer*;
- II. Determinar variação de peso e taxa de sobrevivência de camundongos convencionais, recém-desmamados, tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*;
- III. Analisar translocação de *L. lactis* 4U e *S. Typhimurium* para fígado e baço de camundongos, 6 dias após desafio oral com *S. Typhimurium*;
- IV. Avaliar as lesões histopatológicas de fígado e íleo em camundongos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*;
- V. Mensurar atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) no fígado e intestino delgado dos animais;
- VI. Analisar a expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas pró e anti-inflamatórias no intestino delgado dos animais.

4. METODOLOGIA

4. 1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo eles: o Laboratório de Biologia e Biotecnologia de Bactérias (LABAC), Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do ICB, Laboratório de Genética Molecular de Procariotos Probióticos (LGMPP) e Laboratório de Apoio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

4. 2. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c convencionais, fêmeas, com 3-4 semanas de idade fornecidos pelo Biotério Central Animal/UFMG. Os animais foram alojados em micro-isoladores (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), mantidos em sistema de gaiolas ventiladas (Alesco), com iluminação controlada (12 h de luz, 12 h de escuro), umidade (60 - 80%), temperatura (22 ± 5 °C) e receberam água e dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil) *ad libitum*. Ao final do experimento os camundongos sobreviventes foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (100 mg/kg de peso) e Xilazina (20 mg/kg de peso) (Syntec, Cotia, Brasil) e, posteriormente, foram eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com “A Diretriz Brasileira para o Cuidado de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCAs)” do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA, 2016) e possuem a aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG), protocolo nº 281/2022.

4. 3. Cultivo e preparo de alíquotas microbianas de *S. Typhimurium* e *L. lactis* 4U

4. 3. 1. Armazenamento e crescimento das linhagens

A linhagem de *L. lactis* 4U foi isolada de grãos de kefir de leite de Divinópolis/MG. Seu isolamento e identificação foram realizados por Zanirati et al. (2015). *Salmonella enterica* subs. *enterica* sor. Typhimurium. ATCC 14028 é de origem humana. Ambos os microrganismos pertencem à coleção de cultura do LABAC/UFMG, onde são mantidos a -80°C em meio de

Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Acumedia) e *Brain Heart Infusion* (BHI) (Acumedia) acrescidos de 20% de glicerol (80% v/v), para os respectivos microrganismos. Quando necessárias ativações bacterianas, realizou-se dois repiques sucessivos. A linhagem *L. lactis* 4U foi inoculada e crescida em caldo MRS incubado a 37 °C de 18 a 24 horas, enquanto *S. Typhimurium* foi inoculada e crescida em caldo BHI a 37 °C por 24 horas.

4. 3. 2. Preparo das amostras para administração

Os caldos com suspensão bacteriana de ambos os microrganismos foram centrifugados (centrífuga Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) a 8000 rpm durante 5 minutos, e ressuspensos em solução salina esterilizada (0,85% m/v). As suspensões foram diluídas e plaqueadas em triplicatas durante os experimentos para acompanhamento de viabilidade celular e ajuste de concentração administradas.

Para os processos de desidratação (liofilização e *Spray drying*) *L. lactis* 4U foi crescida sendo concentrada dez vezes mais, centrifugada e ressuspensa em concentração de 10^{10} UFC/mL em 10% *Skim milk* (Difco™) + 10% Sacarose (m/v), que foi escolhido por demonstrar bons resultados como agente protetor em estudos anteriores do próprio grupo de pesquisa. Após os processos de desidratação, pós resultantes foram ressuspensos em solução salina esterilizada (0,85% m/v) e administrados 100µL de 10^{6-7} UFC (100 µL de suspensão de amostras desidratadas contendo 10^{7-8} UFC/mL). Para a gavagem aos animais tratados com *L. lactis* 4U fresca (grupo controle 4U e grupo experimental 4U + ST), o *pellet* dessa cultura foi ressuspensa em solução salina esterilizada (0,85% m/v), e administrado 100µL de 10^6 UFC. Todas as administrações foram realizadas diariamente por via intragástrica. A variação de concentração dos tratamentos se deu, devido ao decaimento de ciclos log durante os experimentos. Para os ensaios de infecção, o *pellet* de cultura da linhagem de *S. Typhimurium* foi ressuspensa em solução salina esterilizada (0,85% m/v), para administração, por gavagem em 10^{5-6} UFC (100 µL de suspensão de *S. T* contendo 10^{6-7} UFC/mL).

4. 4. Processos de desidratação

4. 4. 1. Liofilização

A técnica de liofilização foi realizada para a linhagem 4U de acordo com Li et al. (2011) e Bolla et al. (2011), com adaptações. 30 alíquotas de 2 mL de suspensão microbiana, preparadas com 10% *Skim milk* (Difco™) + 10% Sacarose (m/v) com crioprotetor, foram

distribuídas em tubos tipo falcon de 15 mL, previamente esterilizados, selados com papel filtro e os conteúdos foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido (-196 °C). Em seguida, as amostras foram distribuídas no liofilizador (modelo K10, Liotop, Brasil) onde permaneceram por 24 horas a -98 °C e 4 Pa de pressão. Ao final do ciclo, os tubos foram revestidos com papel alumínio, para evitar a incorporação de umidade e luz, e armazenados sob refrigeração até o momento de uso.

4. 4. 2. Secagem em *Spray dryer*

O equipamento utilizado foi o *Spray dryer* modelo MSDi 1.0 (LabMq, Brasil). Inicialmente foi realizada a desinfecção do equipamento com a passagem de 200 mL de etanol 70% e a normalização do sistema com a passagem de água destilada autoclavada, durante 15 minutos. Em seguida, a amostra de 500 mL de 4U, preparada com 10% *Skim milk (Difco™)* + 10% Sacarose (m/v) como carreador, foi submetida ao processo de secagem por atomização. Os parâmetros para normalização e operação do equipamento foram baseados nos trabalhos de Chagas (2018) e Huang et al. (2017) com adaptações, sendo eles: bico de atomizador de 1 mm, temperatura de entrada 100 °C ajustada quando necessário para que seja atingida a temperatura de saída de aproximadamente 65 °C, vazão de alimentação do secador de aproximadamente 0,6 L/h, pressão do ar comprimido de 3,5 kgf/cm² e vazão do ar de atomização de 40 L/min. O pó gerado em cada processo foi coletado pelo ciclone separador e armazenado em vidro de tampa de rosca revestido com papel alumínio, para evitar a incorporação de umidade e luz, e armazenadas sob refrigeração até o momento de uso.

4. 5. Delineamento experimental: ensaio de sobrevivência após desafio com *S. Typhimurium*

Os animais foram divididos em cinco grupos (n=12 animais/grupo) sendo dois grupos controle: grupo controle da linhagem 4U (4U) e grupo controle de *S. Typhimurium* (ST), e três grupos experimentais: linhagem 4U em suspensão microbiana fresca (4U + ST), linhagem 4U liofilizada (4U liofilizado + ST), linhagem 4U seca em *spray dryer* (4U *spray* + ST) (Tabela 1). Todos os grupos experimentais e o grupo controle da linhagem 4U receberam diariamente, durante todo o experimento, por gavagem, 100µL de suspensão microbiana da linhagem 4U. O grupo controle *S. Typhimurium* recebeu solução salina esterilizada (0,85% m/v) diariamente,

durante todo o experimento (Figura 4). Todos os grupos experimentais e o grupo controle *S. Typhimurium* foram desafiados pelo patógeno no 10º dia de experimentação (Tabela 1).

Tabela 1 – Esquemática do delineamento experimental

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTOS	DESAFIO (gavagem intragástrica)
<i>Lactococcus lactis</i> 4U (4U)	100µL de 10 ⁶ de suspensão microbiana fresca de <i>L. lactis</i> 4U	Sem desafio (grupo controle)
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> (ST)	100µL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85% m/v)	100µL de 10 ⁵ <i>S. T</i> (grupo controle <i>S. T</i>)
<i>Lactococcus lactis</i> 4U fresca (4U + ST)	100µL de 10 ⁶ suspensão microbiana fresca de <i>L. lactis</i> 4U	100µL de 10 ⁵ <i>S. T</i>
<i>Lactococcus lactis</i> 4U liofilizado (4U liofilizado + ST)	100µL de 10 ⁷ de amostra ressuspensa em salina	100µL de 10 ⁵ <i>S. T</i>
<i>Lactococcus lactis</i> 4U seca em <i>spray dryer</i> (4U <i>spray</i> + ST)	100µL de 10 ⁷ de amostra ressuspensa em salina	100µL de 10 ⁵ <i>S. T</i>

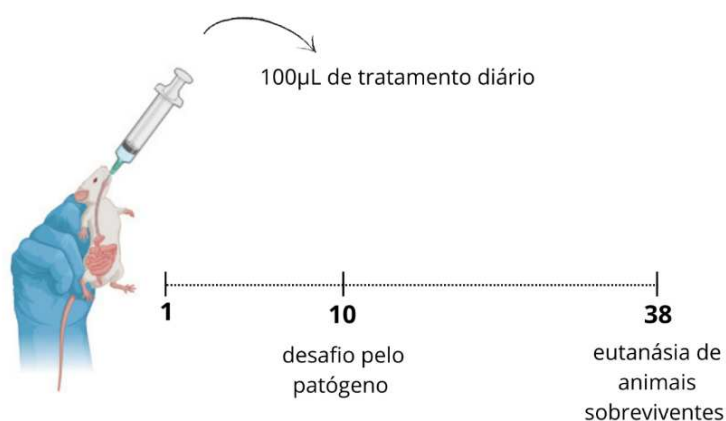


Figura 5 – Desenho experimental do ensaio de sobrevivência com camundongos BALB/c, que receberam administração diária da linhagem *L. lactis* de acordo com o delineamento experimental. (1) primeiro dia do experimento, (10) décimo dia com desafio pelo patógeno, e (38) fim do experimento com eutanásia dos animais sobreviventes. (n = 12 animais/grupo).

4. 5. 1. Verificação de variação de peso e da porcentagem de sobrevivência dos animais

Para acompanhamento da variação de peso, os animais dos grupos experimentais e controle foram pesados diariamente até o 28º dia após a infecção (tempo final do experimento). Os resultados de variação de peso e sobrevida foram expressos em porcentagem.

4. 6. Ensaio de verificação de prováveis mecanismos de ação protetora após desafio com *S. Typhimurium*

De acordo com o delineamento experimental (n = 6 animais/grupo), seis dias após o desafio com *S. Typhimurium*, os animais foram eutanasiados para coleta de fígado, baço e intestino delgado (Figura 5), que foram utilizados nos experimentos de avaliação de provável mecanismo de ação protetora de *L. lactis* 4U.

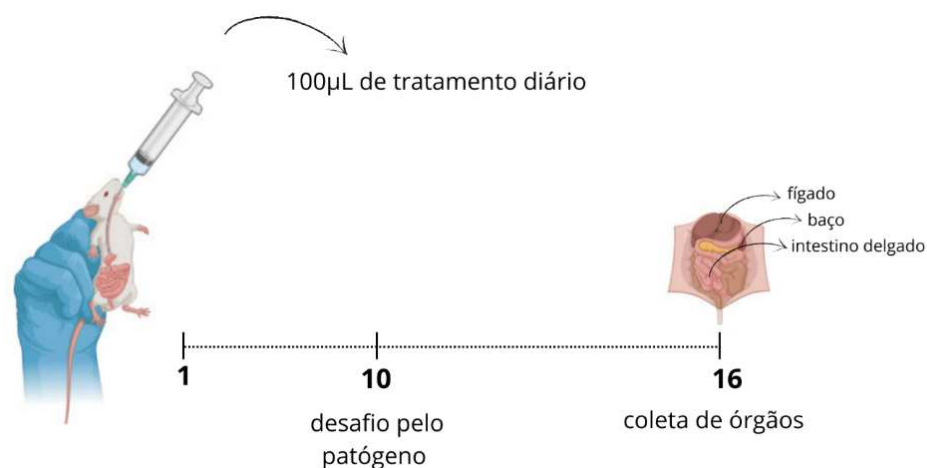


Figura 6 - Desenho experimental do ensaio de prováveis mecanismos de potencial ação probiótica, com camundongos BALB/c, que receberam administração diária da linhagem *L. lactis* de acordo com o delineamento experimental. (1) primeiro dia do experimento, (10) décimo dia com desafio pelo patógeno, e (16) décimo sexto dia com coleta de órgãos para análises de prováveis mecanismos (n = 6 animais/grupo).

4. 6. 1. Análise de translocação de *L. lactis* 4U e *S. Typhimurium* para fígado e baço de animais

No 6º dia após o desafio com *S. Typhimurium* e tratamento com *L. lactis* 4U os camundongos foram sacrificados, sendo o baço e o fígado dissecados em condições assépticas, pesados, triturados, homogeneizados e diluídos separadamente em solução salina 0,85%. Cem microlitros das diluições 10^{-1} , 10^{-2} foram plaqueadas, em triplicata, pela técnica de *spread plate*

para contagem de *L. lactis* 4U em ágar MRS (Acumedia) e incubadas por 24/48 horas a 37°C. Cem microlitros das diluições 10^{-1} , 10^{-2} foram plaquedadas em duplicata, por *spread plate* para contagem de *S. Typhimurium*, em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

4. 6. 2. Avaliação de lesões histopatológicas e análise morfométrica de íleo e fígado

No sexto dia após a infecção, os fígados e íleos foram coletados e fixados em formol tamponado 10%. Os intestinos foram retirados, o íleo separado e aberto, imediatamente pré-fixado em solução de Bouin (Formol: Ácido Pícrico 1:4). O material foi processado de acordo com Arantes e Nogueira (1997), de maneira a formar rolos de intestino com a mucosa voltada para dentro (rocambolos). As amostras de íleo e fígado foram processadas para inclusão em parafina e foram obtidos cortes histológicos de 5 μm que foram corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS). Os cortes histológicos de intestino foram visualizados pela objetiva de 20X, e para os cortes de fígado foi utilizado a objetiva de 10X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha). Os cortes de intestino tiveram a digitalização aleatória de 35 vilosidades intestinais e criptas por meio da microcâmara Q-Color3 Olympus (Toquio, Japão). As vilosidades, as criptas e a área de corte hepática foram marcadas manualmente por ferramentas do software KS300, contido no analisador de imagens Carl Zeiss, para o cálculo subsequente da altura em μm (FREITAS et al., 2019).

Para o cálculo da área ocupada por muco nas vilosidades intestinais as lâminas foram visualizadas pela objetiva de 20X do mesmo microscópio para a digitalização aleatória de imagens da mucosa intestinal, também utilizando a mesma microcâmara. Em cada animal foram analisados $1,0 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de mucosa duodenal aleatória para o cálculo das áreas de muco PAS positivas. Já para a área de parênquima hepático, em cada animal foi analisado $1,5 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ onde foi realizada a contagem de todos os microabscessos utilizando o mesmo microscópio. Todos os pixels com tons de bonina das regiões PAS+ foram selecionados para a criação de uma imagem binária, processamento digital e para a obtenção da área de muco em μm^2 , conforme descrito por Prado et al (2020).

4. 6. 3. Atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos dos neutrófilos e a dosagem de sua atividade é utilizada para estimar o índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos (Nauseef, 2018). Fragmentos de íleo dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, os tecidos foram homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA - 100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (TissueLyser LT) e centrifugados a 10.000 rpm (Megafuge 8R) por 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2%, seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, após 30 segundos) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Essas amostras foram, novamente, centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO no precipitado ressuspensionado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (DO) a 450 nm, utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

4. 6. 4. Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado

Foi realizada a quantificação relativa dos níveis de mRNA dos genes TGF-β, IFN-γ (para íleo e fígado) de acordo com Acurcio et al. (2017). Fragmentos do intestino delgado (proximal, medial e distal) e fígado medindo 1-2 cm foram coletados dos animais, imersos em RNAlater (Ambion, Austin, Texas, EUA) e mantidos em freezer -20 °C até o momento da extração do RNA total. O RNA total foi extraído usando Trizol (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA isolado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) para avaliação da integridade e, posteriormente, quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific, Inc., Bremen, Alemanha). Apenas amostras de RNA total com mais de 200 µg/mL e uma razão A260/A280 entre 1,7 e

2,1 foram usadas. O DNA genômico foi removido pela utilização de Turbo DNase I antes da transcrição reversa, realizada com o kit High capacity cDNA Reverse Transcription, ambos de acordo com instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O cDNA resultante foi amplificado por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando o kit Sybr Green PCR Master Mix 2X, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os iniciadores gene-específicos para as citocinas e os genes de referência Actb (β actina) e Gapdh (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) utilizados como normalizadores para os dados de expressão são descritos por Acurcio et al. (2017). O nível de expressão do grupo controle I foi usado como calibrador e a expressão relativa de mRNA para cada citocina foi obtida pelo método de quantificação relativa derivada (HELLEMANS et al., 2007). Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão da expressão relativa de mRNA para cada citocina normalizada pelo nível de expressão do gene de referência.

4.7 Análises estatísticas

A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo consideradas como diferença estatística os valores com nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, para comparação das médias, e as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-Rank Survival.

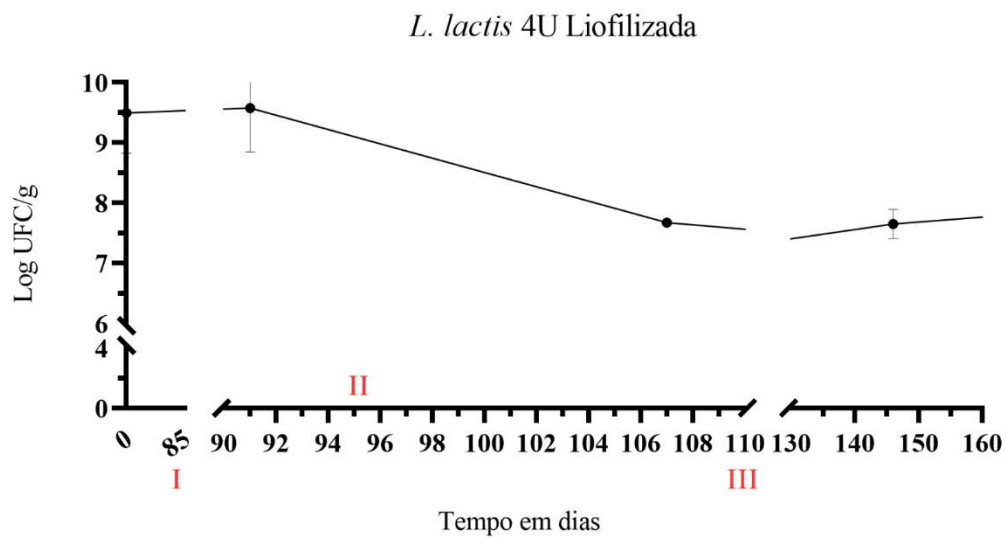
5. RESULTADOS

5.1. Concentração de células viáveis de *Lactococcus lactis* 4U em cultura fresca, liofilizada e seca em *spray dryer*.

A cultura fresca, ativada diariamente se manteve ao longo de todo experimento (sobrevivência e avaliação de prováveis mecanismos de ação protetora) em $8 \log_{10}$ UFC/mL. Os tratamentos liofilizados, encontravam-se armazenados há 85 dias sob refrigeração e número de células viáveis ao começo do experimento de sobrevivência estava em $9,5 \log_{10}$ UFC/g, chegando a $7,5 \log_{10}$ UFC/g após 105 dias de armazenamento, mantendo-se assim até 145 após

a liofilização (Figura 7 A). A secagem por *spray drying* da suspensão de *L. lactis* 4U utilizada em todos os experimentos ocorreu 11 dias antes do início do experimento de sobrevivência e 90 dias antes do experimento de avaliação de prováveis mecanismos de ação da linhagem. O número de células viáveis reduziu durante o armazenamento sob refrigeração para $7,5 \log_{10}$ UFC/g após 45 dias e se manteve assim até o 110º dia (Figura 7)

A)



B)

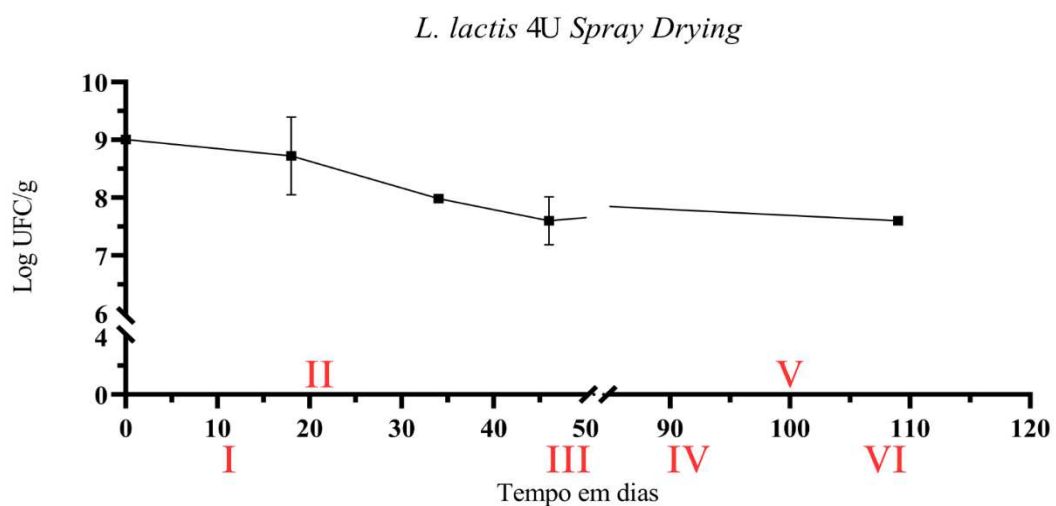


Figura 7 - (A) Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U em cultura liofilizada por até 160 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de sobrevivência, com utilização da amostra liofilizada há 85 dias. (II) desafio com patógeno e (III) fim do experimento de sobrevivência. (B) Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U seca em *spray dryer* por

até 120 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de sobrevivência, com utilização da amostra seca em *spray dryer* há 11 dias, (II) desafio com patógeno, (III) fim do experimento de sobrevivência, (IV) início do experimento de prováveis mecanismos de ação protetora com amostra seca há 91 dias, (V) desafio com patógeno e (VI) fim do experimento com eutanásia dos animais para coleta de órgãos. Ambas amostras foram armazenadas sob refrigeração (n = 3).

Uma vez que houve perda da viabilidade celular para as amostras liofilizadas utilizadas no experimento de sobrevivência, foi realizada uma nova desidratação da linhagem *L. lactis* 4U, para o ensaio de prováveis mecanismos de ação protetora. Logo após o processo de desidratação, a concentração foi de 9,5 UFC/g. Porém, para esta liofilização, também houve redução de mais de dois ciclos log na viabilidade celular em 9/11 dias (Figura 8).

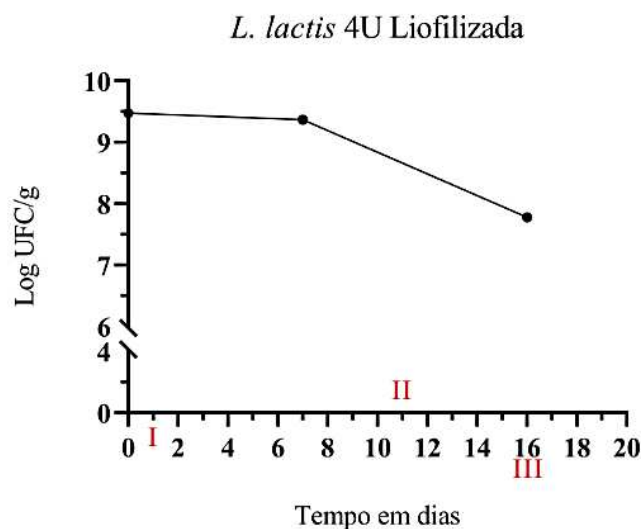


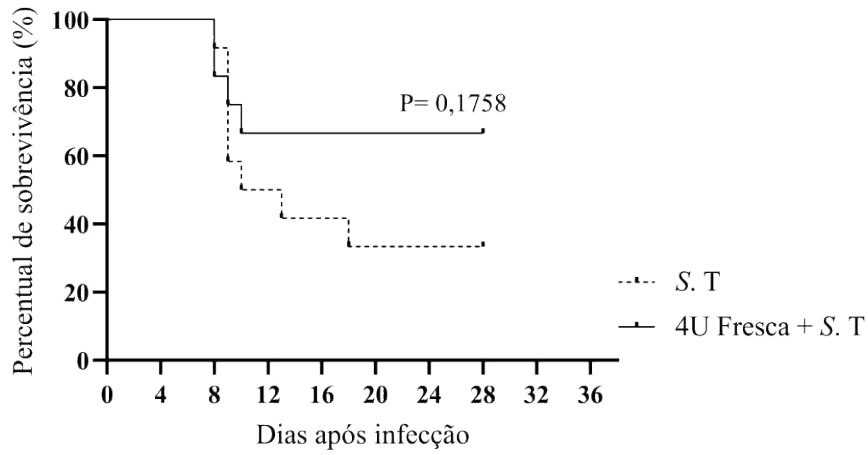
Figura 8 - Concentração de células viáveis de *L. lactis* 4U em cultura liofilizada por até 20 dias. Números em vermelho indicam: (I) início do experimento de prováveis mecanismos de ação protetora, com utilização da amostra liofilizada há 1 dia. (II) desafio com patógeno e (III) fim do experimento com eutanásia dos animais para coleta de órgãos.

5. 2. Ensaio de sobrevivência após desafio com *S. Typhimurium*

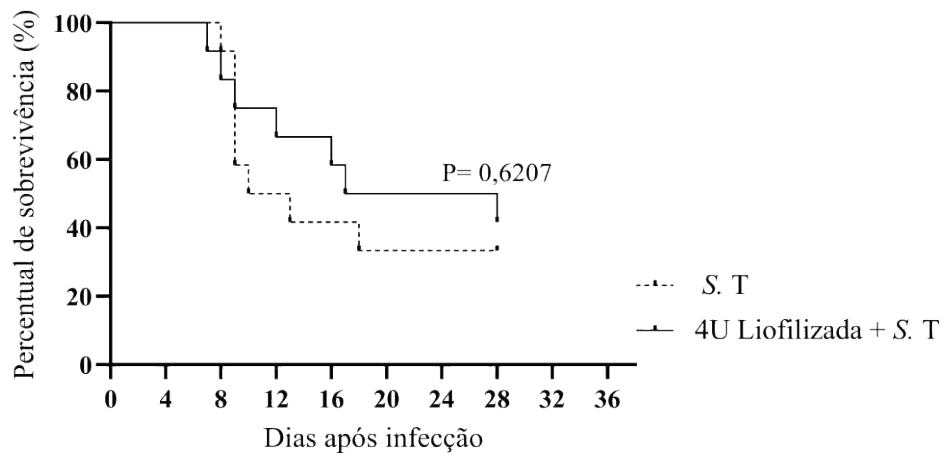
A administração oral da linhagem *L. lactis* 4U possibilitou uma maior porcentagem de sobrevivência aos animais infectados de todos os grupos. A curva de sobrevivência do grupo controle 4U foi de 100% (dados não mostrados). Para o grupo controle da infecção com *S. Typhimurium*, a sobrevivência foi de 33%, enquanto os grupos tratados com 4U e desafiados com o patógeno atingiram 66,67% para 4U fresca + ST (P = 0,1758) (Figura 9 A), 41,67% para

4U liofilizada + ST ($P= 0,6207$) (Figura 9 B) e 75% para 4U *spray* + ST ($P= 0,0049$) (Figura 9 C).

A)



B)



C)

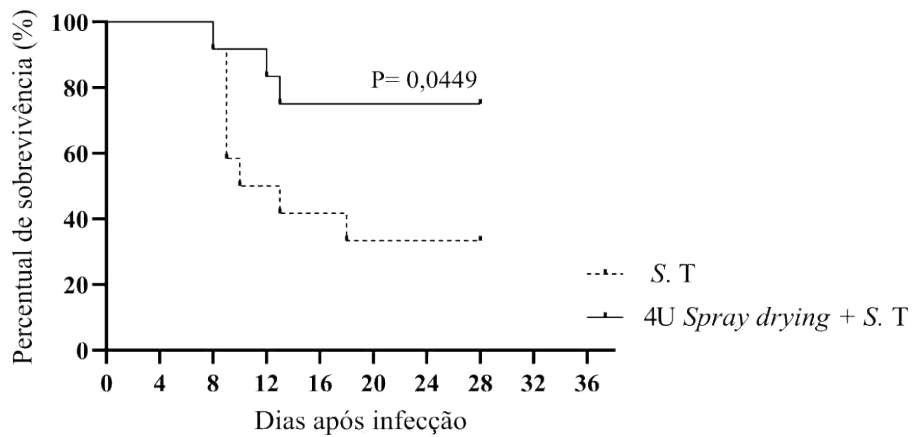
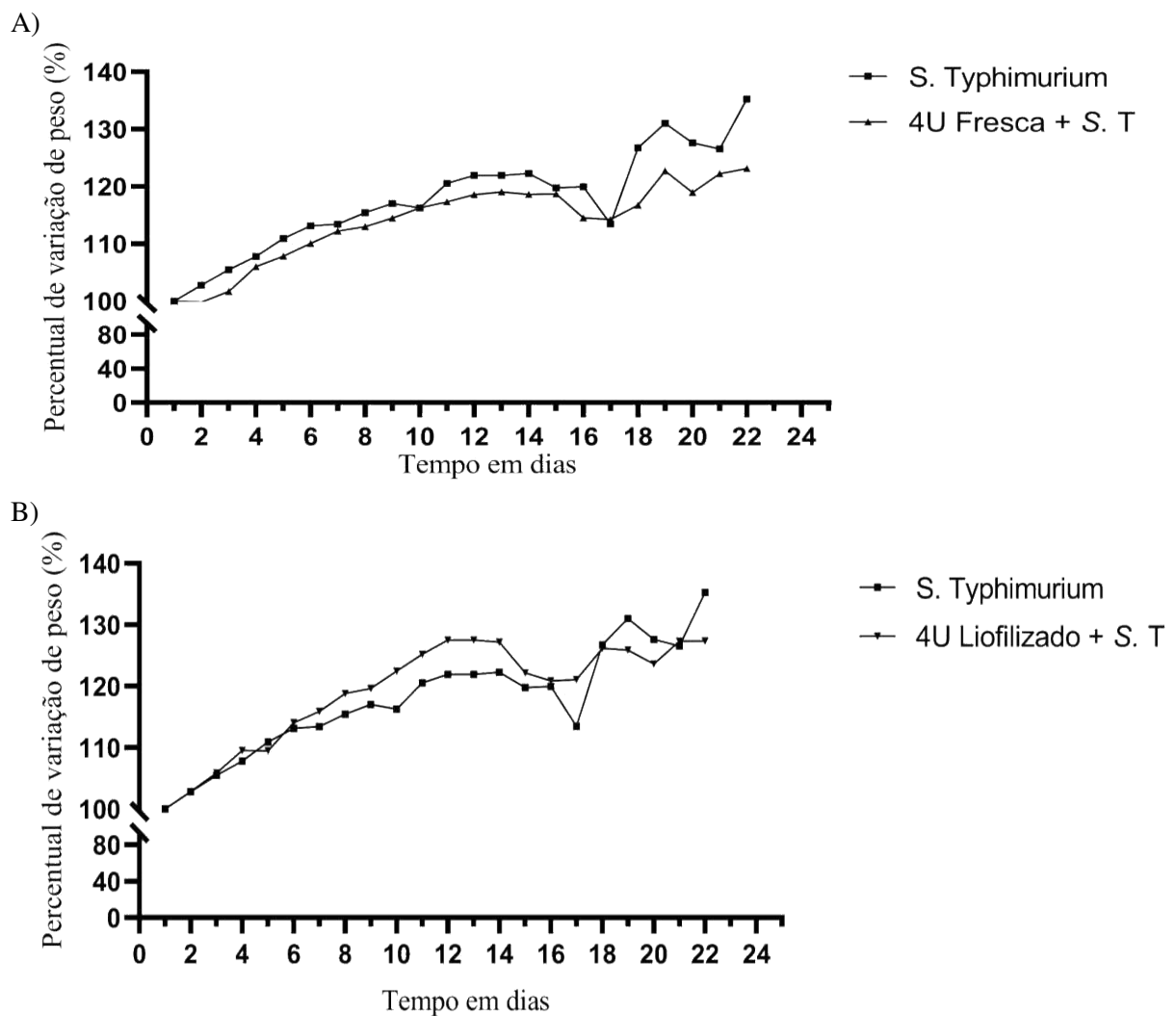


Figura 9 - Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c tratados ou não (A) grupo controle S.T e grupo cultura fresca de *L. lactis* 4U + S. T. (B) grupo controle S.T e grupo cultura liofilizada de *L. lactis* 4U + S.T, (C) grupo controle S.T e grupo com cultura de *L. lactis* 4U seca em *Spray dryer* + S.T (n = 12 animais/grupo).

Houve ganho de peso dos animais durante os 10 primeiros dias de administração das diferentes preparações da cultura de *L. lactis* 4U. Entre os dias 5 e 12 após o desafio com *S. Typhimurium*, foram observadas reduções no peso percentual médio para todos os grupos experimentais (Figura 10 A, B e C), período que coincide com o maior número de mortes de animais. Após o 12º dia de infecção, os animais sobreviventes de todos os grupos retomaram o ganho de peso, coincidindo com o período de menor número de mortes



C)

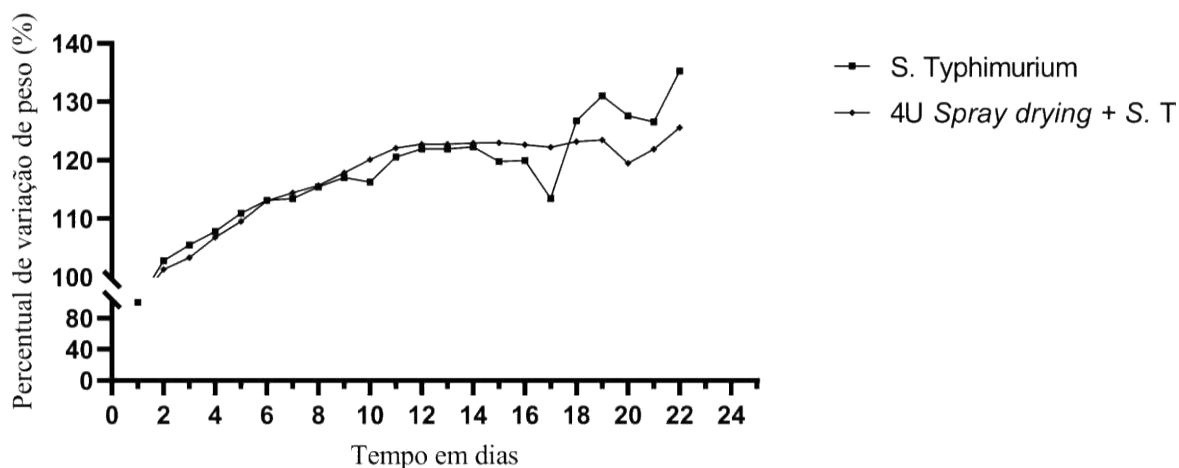


Figura 10 – Percentual de variação de peso de camundongos BALB/c tratados ou não com (A) cultura fresca de *L. lactis* 4U + *S.T.*, (B) cultura liofilizada de *L. lactis* 4U + *S.T.*, (C) cultura de *L. lactis* 4U seca em *Spray dryer* + *S.T.* (n = 12 animais/grupo).

5. 3 Avaliação dos mecanismos de potencial ação protetora de *Lactococcus lactis* 4U em modelo de infecção por *S. Typhimurium*

5. 3. 1. Translocação para fígado e baço

Não foi observada translocação bacteriana de *L. lactis* 4U para fígado e baço em nenhum dos grupos tratados, no entanto, foi observada translocação do patógeno para todos os grupos experimentais e o grupo controle *S. Typhimurium* em 10^5 UFC/g.

5. 3. 2. Avaliação histopatológica de íleo e fígado

O grupo tratado com 4U fresca + ST e sem desafio com o patógeno apresentaram aspectos histológicos normais, sem sinal de danos teciduais ou alterações evidentes na mucosa intestinal (Figura 11 A), enquanto o grupo não tratado com 4U e desafiado com *S. Typhimurium* apresentou quadro histológico caracterizado por um achatamento notável das vilosidades e criptas da mucosa, além de uma diminuição das áreas PAS+, indicando um comprometimento da função de mucinas protetoras (Figura 11 B). Os grupos que receberam a linhagem 4U fresca, liofilizada ou seca em *spray dryer*, apresentaram, no sexto dia após o desafio com *S. Typhimurium*, manutenção plena da mucosa intestinal, aumento das áreas de PAS+ e

manutenção de vilosidades quando comparados ao grupo não tratado com 4U e altura normal das vilosidades (Figura 11 C, D e E),

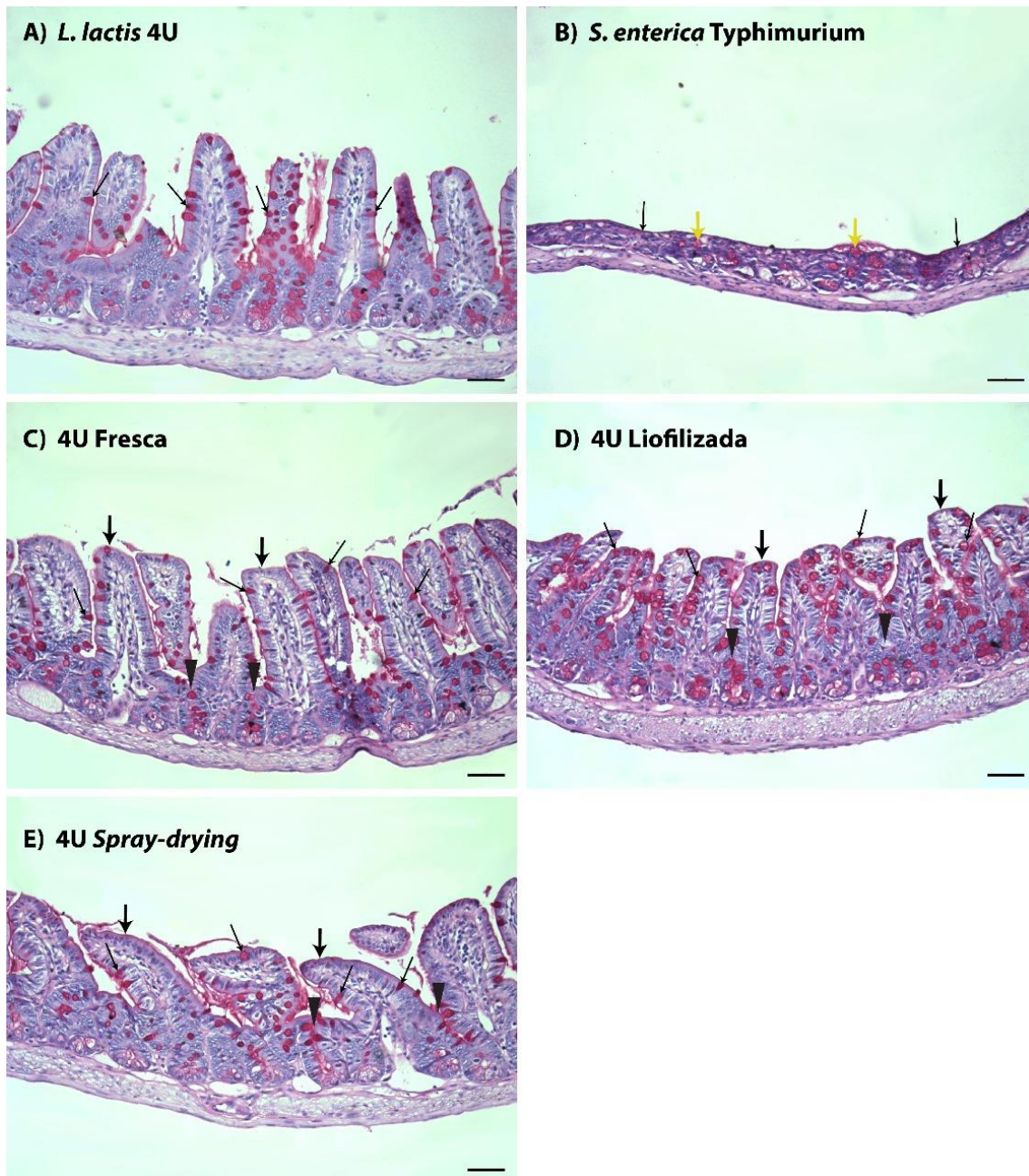


Figura 11- Histopatologia do íleo de camundongos BALB/c tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*. (A) controle *L. lactis* 4U: íleo de aparência histológica normal, com áreas PAS⁺ devido a presença de mucinas (setas pretas). (B) controle ST: mucosa intestinal com apagamento marcante das vilosidades e criptas (setas pretas.) e, redução das áreas PAS⁺ (setas amarelas). (C) 4U fresca + ST, (D) 4U liofilizada + ST e (E) 4U *spray dryer* + ST, mucosa intestinal com aumento das áreas PAS⁺ (setas pretas) e manutenção da altura normal das vilosidades (setas pretas) e da profundidade das criptas (cabeças de setas),

quando comparado ao grupo controle S.T. Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 50 μ m (n = 6 animais/grupo).

Para o grupo controle 4U sem desafio com o patógeno, observou-se preservação da estrutura lobular hepática, sem alterações na celularidade, com exibição normal dos aspectos histológicos (Figura 12 A). Como esperado, o grupo controle ST apresentou aumento dos focos de infiltrado inflamatório, associado a áreas de necrose hepática, também chamados microabscessos (Figura 12 B). Em contrapartida, os grupos experimentais tratados com o potencial probiótico e desafiados com *S. Typhimurium* (Figura 12 C, D e E) apresentaram menores números de microabscessos se comparados ao grupo controle ST, demonstrando uma provável ação protetora atribuída aos tratamentos diários com *L. lactis*.

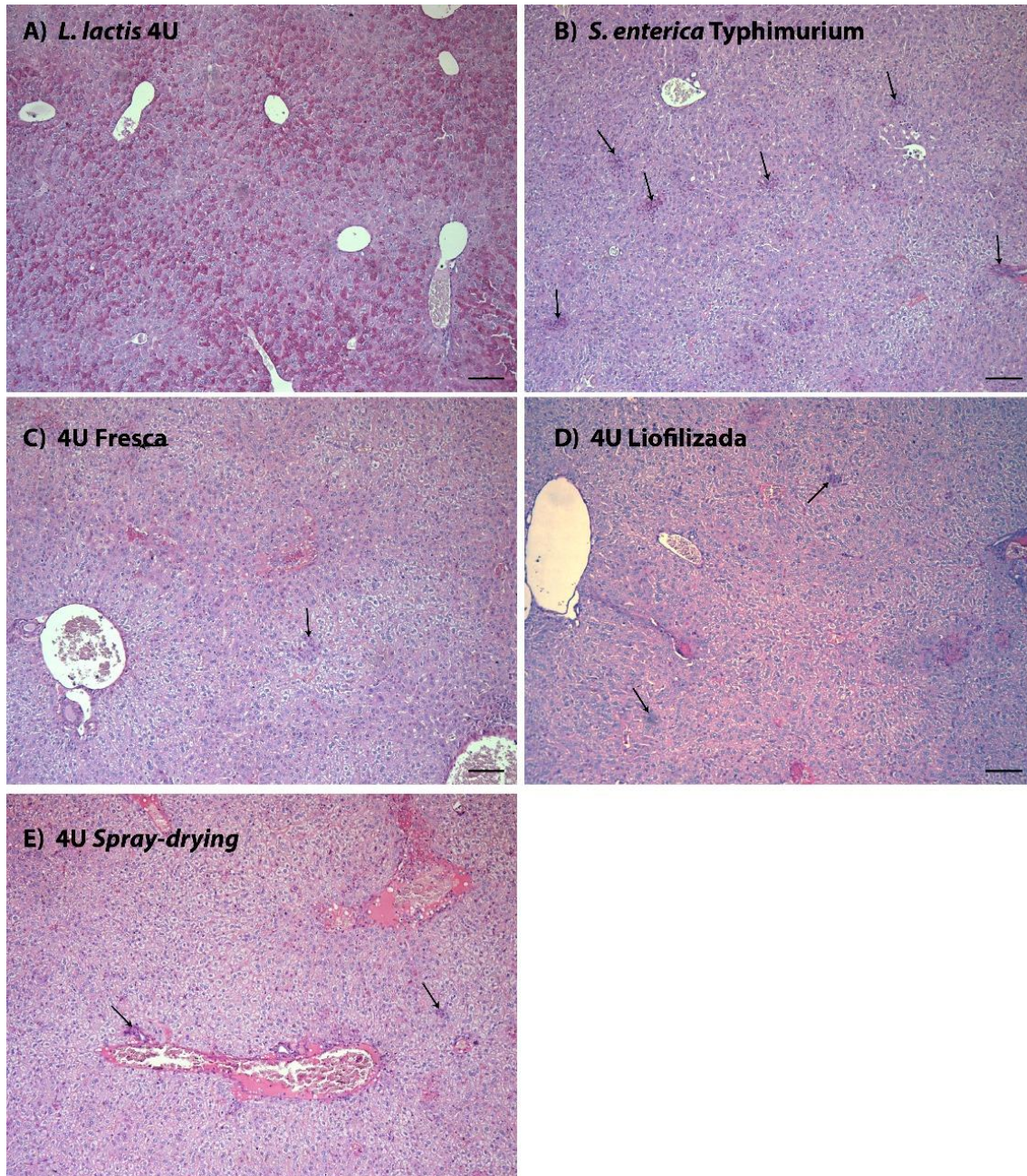


Figura 12 - Histopatologia do fígado de camundongos BALB/c tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium*. (A) controle *L. lactis* 4U: exibindo parênquima hepático de aspecto normal. (B) controle ST: presença de vários microabscessos (setas pretas). (C) 4U fresca +ST, (D) 4U liofilizada + ST e (E) 4U *spray drying* + ST: com redução marcante do número de microabscessos (setas pretas) quando comparados ao grupo controle ST. Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 100 μ m (n = 6/grupo).

5. 3. 3. Atividade enzimática de MPO

No sexto dia após o desafio com *S. Typhimurium*, foram dosados os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras de fígado dos animais. Não houve diferença estatística entre os valores de MPO encontrados para todos os grupos avaliados (Figura 13 A). No Fígado, a concentração de MPO foi maior nos grupos desafiados com *S. Typhimurium*, quando comparados ao grupo sem desafio (Figura 13 B).

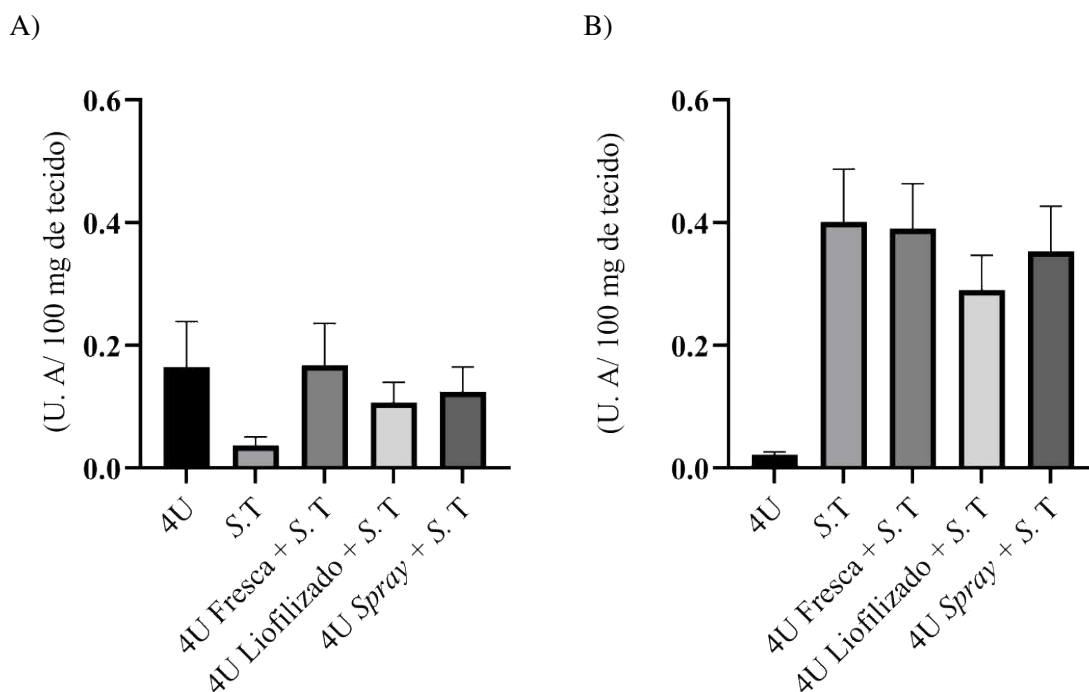


Figura 13 - Atividade enzimática de mieloperoxidase em (A) amostras de fígado e (B) fígado camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão, (n = 6 animais/grupo), U. A: unidades arbitrárias.

5. 3. 4. Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de fígado e fígado

No sexto dia após o desafio, a expressão relativa do gene *ifn γ* em amostras de fígado dos animais desafiados com *S. Typhimurium* e tratados com *L. lactis* 4U obtiveram mesma média de expressão (p = 0,5482), quando comparados com o grupo controle ST, que foi utilizado como calibrador (Figura 14 A). A expressão de *tgf- β* foi similar em todos os grupos analisados apresentando baixos níveis de expressão (p = 0,8221). (Figura 14 B).

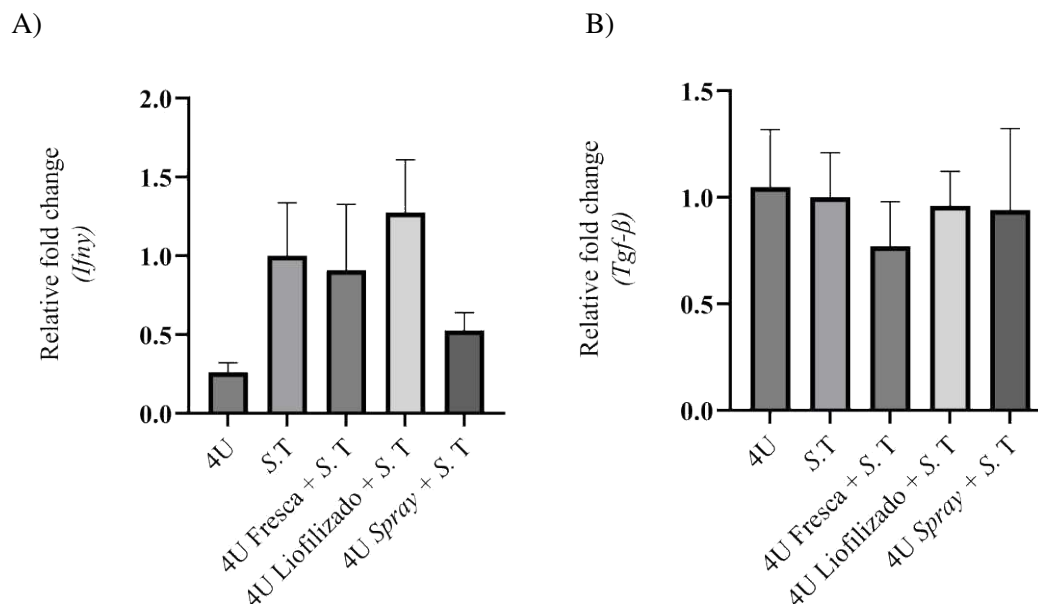


Figura 14 - Expressão relativa dos genes *ifny* (A) e *tgf-β* (B) em amostras de fígado de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). O resultado de cada grupo está expresso em média \pm desvio padrão da quantidade relativa da expressão dos genes em relação ao grupo calibrador (controle ST), que tem nível de expressão definido como 1x.

A expressão relativa do gene *ifny* foi dez vezes maior em amostras de fígado do grupo controle desafiado com *S. Typhimurium* quando comparado ao grupo controle 4U (Figura 15 A). A administração de 4U fresca, liofilizada ou seca em *spray dryer* reduziu a expressão de *ifny* após o desafio com o patógeno, quando comparado ao grupo controle ST, no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa ($p = 0,2878$). Para o gene *tgf-β*, o grupo controle ST obteve média de expressão relativa duas vezes maior que o grupo controle 4U, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos analisados ($p = 0,5652$) (Figura 15 B)

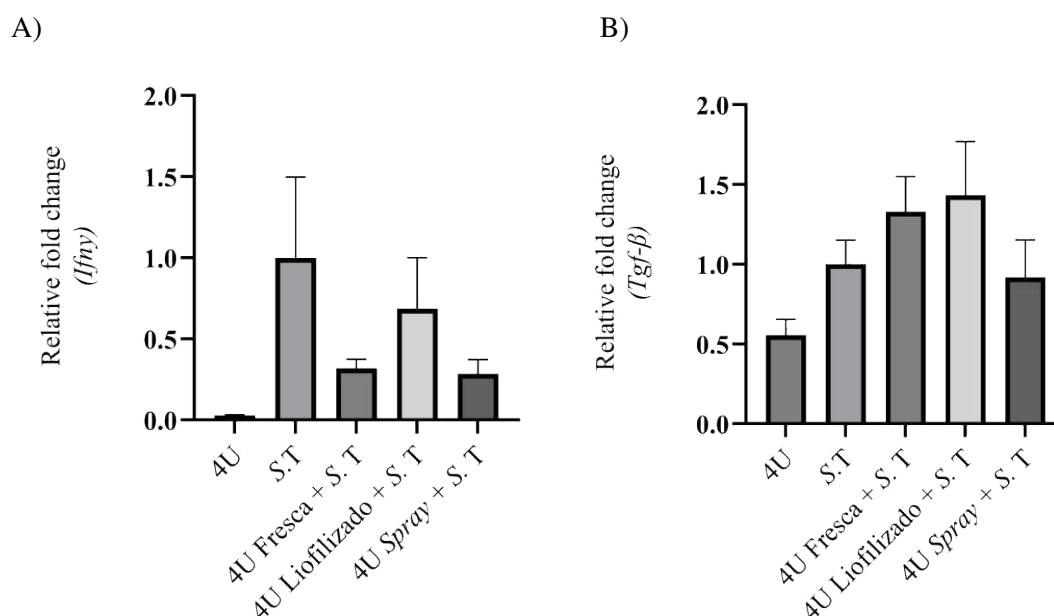


Figura 15 - Expressão relativa dos genes *ifny* (A) e *tgf-β* (B) em amostras de fígado de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com *L. lactis* 4U e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (n = 6 animais/grupo). O resultado de cada grupo está expresso em média \pm desvio padrão da quantidade relativa da expressão dos genes em relação ao grupo calibrador (controle ST), que tem nível de expressão definido como 1x.

6. DISCUSSÃO

A linhagem *L. lactis* 4U, estudada neste trabalho, foi testada após diferentes processos de desidratação para melhor entender seu comportamento diante de um quadro de infecção contra o patógeno estudado. Avaliou-se também sua inocuidade para o hospedeiro. Dessa forma, o uso de *L. lactis* 4U demonstrou que, se administrado dentro das concentrações ideais, pode influenciar na resposta dos animais frente ao patógeno, aumentando sua porcentagem de sobrevivência pós infecção. Além disso, a linhagem bacteriana também não mostrou sinais de toxicidade quando administrada só, assegurando peso constante, sinais de bem estar e sobrevivência de 100%.

O grupo controle *L. lactis* 4U e o grupo experimental (desafiado pelo patógeno) *L. lactis* 4U fresca + ST tiveram seus tratamentos preparados da mesma forma. Assim a diferença entre os grupos se dá pelo desafio do patógeno. A linhagem de potencial probiótico manteve sua concentração estável em $8 \log_{10}$ UFC/mL ao longo dos experimentos. Houve média de 66,67% de sobrevivência para *L. lactis* 4U fresca + ST (Figura 9 A), mostrando que, mesmo em dosagem mínima de 10^7 UFC/mL, a porcentagem de sobrevivência foi considerável diante da infecção

causada por *S. Typhimurium*. Estes resultados demonstram *in vivo* dados coletados *in vitro* por Costa et al. (2023), onde a linhagem isolada de kefir de leite foi submetida a ensaios de atividade hemolítica não apresentando halos de inibição, o que configura critério de segurança para potenciais probióticos, bom crescimento a 37°C após 24 horas, resistência a sais biliares e suco gástrico, moderadamente hidrofóbica e antagonismo contra *S. Typhimurium*.

Os processos de desidratação celular como os utilizados nesse estudo, como liofilização e *spray drying*, trazem uma forma alternativa, a utilização dessa linhagem em diversas aplicações industriais e biotecnológicas. Observou-se que quando liofilizada, a linhagem manteve até 9,5 log₁₀ UFC/g por 85 dias (Figura 7 A). É recomendado para estes processos que as culturas de microrganismos estejam concentradas acima de 10⁷ células/mL, para garantia da manutenção de sua viabilidade não só depois do processo, mas também durante longos períodos de estocagem, permitindo reconstituição e propagação satisfatória das linhagens liofilizadas (MORGAN et al., 2006).

Foi observado por Costa et al (2023) que a mesma linhagem no mesmo agente protetor, após processo de liofilização encontrou-se em concentração de 10 log₁₀ UFC/g, e manteve-se por até em 180 dias quando mantidos em embalagens de alumínio, seladas a vácuo. Nesse estudo, percebeu-se um decaimento na primeira liofilização de mais de dois ciclos log₁₀, que pode ser atribuído à diferente forma de armazenamento (embalagem não selada a vácuo). O segundo processo de liofilização também mostrou perda de viabilidade celular. Além disso, o grupo experimental de animais que receberam a linhagem liofilizada (Figura 9 B) obteve neste estudo 41,67% de sobrevivência frente ao patógeno. Divergindo de dados encontrados por Costa (2023) que demonstrou 80% de sobrevivência por *L. lactis* 4U em tratamento liofilizado, no mesmo modelo experimental. Estas divergências podem ser explicadas, uma vez que neste estudo, o potencial probiótico foi administrado em 10⁷ UFC/mL, evidenciando a importância da dosagem para probióticos.

A linhagem *Lactococcus lactis* se mostra suscetível a fatores de ambiente externos, como temperatura e umidade durante o armazenamento, o que pode reduzir a vitalidade da bactéria. Em dados coletados por Heidebach et al. (2010), é evidenciado que o armazenamento em temperaturas baixas, o metabolismo celular diminui, resultando em uma menor taxa de reações químicas prejudiciais, sendo dessa forma recomendada para sua conservação. Alguns estudos mostraram que a viabilidade bacteriana pós liofilização é capaz de durar dez anos de armazenamento, porém a taxa de sobrevivência de bactérias Gram-positivas tende a ser superior

do que a de bactérias Gram-negativas, provavelmente devido à composição estrutural de sua superfície (AGUIAR et al., 2012).

O resultado da figura 7B, para a amostra seca por *spray dryer*, apesar de a viabilidade ter caído um log, mostra que a concentração foi mantida por até 115 dias. E sua administração resultou em 75% de sobrevivência (Figura 9 C), sendo este o único grupo a ter diferença ($P = 0,0049$), corroborando com Costa (2023) que encontrou, por meio deste mesmo processo de secagem, com a mesma linhagem e mesmos agentes protetores uma concentração inicial de 10,5 UFC/g, que perdeu um ciclo log em 90 dias, mas manteve sua concentração por até 180 dias. Esses dados sugerem que a forma de preservação contribui para um maior tempo de viabilidade celular, e melhora a perspectiva de uma futura aplicabilidade industrial.

O grupo controle *S. Typhimurium* teve apenas 33% de sobrevivência. Esse resultado pode evidenciar a patogenicidade bacteriana, e contrasta com os grupos experimentais, que tiveram maior porcentagem de sobrevivência devido a administração do potencial probiótico. Os animais submetidos à infecção e tratados diariamente com solução salina, tiveram suas mortes espaçadas ao longo de 15 dias e uma perda de peso bem mais acentuada cinco dias após a infecção, que pode ser comparado com o quadro sintomático de FT, como a falta de apetite resultando em anorexia. Os animais também apresentaram perda de pelo e pelo ouriçado. Esses resultados corroboram com Oliveira et al. (2023) que encontrou até 40% de sobrevivência no mesmo modelo.

Durante os processos de patogenicidade, *Salmonella* adere o TGI e o deixa comprometido, facilitando sua adesão e translocação para órgãos interno. Neste trabalho a administração do potencial probiótico não impediu a translocação de *S. Typhimurium* para baço e fígado em todos os grupos experimentais, sendo encontrado 10^5 UFC/g de colonização do patógeno, assim como o grupo controle *S. Typhimurium*. Como descrito por Gal-Mor et al (2014), foi observado aspectos de hepatoesplenomegalia, no momento da coleta de órgãos. E para análise histológica nos tecidos de fígado foram observados demasiados focos de inflamação e microabscessos, que reduziram nos animais tratados com potencial probiótico. Alto nível de infiltrado inflamatório podem ser compatíveis com uma resposta exacerbada ao desafio patogênico. A quantificação histopatológica área de PAS+ no íleo e microabscessos hepáticos encontra-se em andamento até a publicação deste trabalho.

Por meio da adesão e colonização, notou-se, para o grupo controle ST, perda de vilosidades e redução da área de PAS+ (Figura 11 B), sugerindo comprometimento da produção de mucinas protetoras. Apesar de ser conhecido que *L. lactis* 4U possui baixo nível de co-

agregação, resultados identificados por Costa, (2023) obteve-se neste trabalho, para todos os grupos experimentais, uma análise histológica com plena manutenção da mucosa do íleo e aumento das áreas de PAS+, que pode indicar um auxílio e manutenção da mucosa pela linhagem *L. lactis* 4U (Figura 11 A, C, D e E). O muco é composto principalmente por proteínas glicosiladas chamadas mucinas que formam um hidrogel gelatinoso. Essa barreira física formada no epitélio intestinal, ajuda a conter bactérias comensais no lúmen do intestino, impedindo a sua adesão nas células epiteliais (MÉNARD et al., 2022).

No ambiente intestinal, Segundo Galán (2021), *Salmonella* Typhimurium enfrenta limitações para induzir a inflamação exclusivamente por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano e flagelina, pelos receptores do sistema imune inato. Para contornar essa restrição, a bactéria desenvolveu mecanismos especializados que promovem a ativação da resposta inflamatória por meio da liberação dirigida de efetores em células do hospedeiro, utilizando sistemas de secreção do tipo III. Ainda de acordo com o autor, proteínas efetoras de *S. Typhimurium* são capazes de estimular MAP quinases e a sinalização de NF- κ B em células epiteliais intestinais, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como (TNF- α , IL1, IL6, IL12, IFN- γ), bem como na infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos nos locais de inflamação. Essa ativação depende estritamente da atividade do sistema de secreção do tipo III (T3SS) codificado na ilha de patogenicidade SPI-1. Essas adaptações garantem que a bactéria desencadeie inflamação no trato intestinal, favorecendo sua replicação e persistência no hospedeiro (GALÁN, 2021.; JUNIOR, M. A. 2018).

Foram testadas as expressões relativas de genes codificadores de citocinas pro e anti-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , porém devido a alguns resultados inconclusivos, apenas resultados para IFN- γ e TGF- β foram observados, onde a expressão relativa de IFN- γ no íleo revelou uma expressão aumentada nos animais do grupo controle *S. Typhimurium*, assim como os grupos experimentais que se mantiveram na mesma média, indicando possivelmente que a administração do potencial probiótico não influenciou na diminuição da resposta gerada por IFN- γ , apesar da redução de danos teciduais para as amostras de íleo. De acordo com Kupz et al. (2014) o IFN γ orchestra uma resposta imune bifásica contra *Salmonella*. Na fase inicial, células imunes inatas, principalmente NK (*Natural killer*) respondem rapidamente após o desafio com salmonela, sugerindo uma resposta inflamatória por meio da ativação de macrófagos e aumentando sua capacidade de apoptose pela produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. O TGF- β , secretado por células T reguladoras

(Tregs), é uma citocina amplamente reconhecida por seu papel na modulação negativa da resposta inflamatória, atuando na supressão de processos inflamatórios exacerbados, na proteção das células epiteliais contra danos e na preservação da homeostase intestinal (SINGH; KOO, 2024). Esse perfil regulador pode ser refletido nos níveis de expressão gênica observados nas amostras hepáticas, nas quais os grupos experimentais apresentaram menor expressão de *IFN- γ* em comparação com níveis mais elevados de *TGF- β* .

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a linhagem *Lactococcus lactis* 4U apresenta características compatíveis com a definição de probiótico, evidenciadas pela capacidade de modular a resposta inflamatória, promovendo a redução ou a manutenção/auxílio controlado da inflamação. Esses atributos são essenciais para a preservação da homeostase intestinal e para a prevenção de danos teciduais decorrentes de respostas inflamatórias exacerbadas. Além disso, o perfil de segurança da cepa foi confirmado por sua inocuidade, uma vez que não provocou mortalidade no modelo experimental. A linhagem também não realizou translocação bacteriana para órgãos internos, tampouco indução significativa de citocinas pró ou anti-inflamatórias, e não foram observadas alterações patológicas, como microabscessos no fígado ou modificações estruturais nas vilosidades intestinais, reforçando seu potencial de aplicação segura em modelos *in vivo*.

8. PERSPECTIVAS

- I. Realizar teste de sobrevivência com maior concentração do potencial probiótico;
- II. Continuar explorando formas de desidratação e observar sua viabilidade ao longo de vários tempos para este potencial probiótico;
- III. Analisar expressão de mais citocinas anti e pró-inflamatórias, que não puderam ser realizadas neste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579–588, 24 ago. 2017.
- AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de microrganismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 80–93, 10 nov. 2012.
- AMERI, M.; AND MA, Y.-F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763–768, 1 jul. 2006.
- ASKARI VASELABADI, S., et al. Advancements in Spray-Drying for the Microencapsulation of Fat-Soluble Vitamins: Stability, Bioavailability, and Applications. **Journal of Food Biochemistry**, 2025(1), 9974476.
- BOLLA, P. A. et al. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **The Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 15–22, fev. 2011.
- BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Research**, v. 11, n. 5, p. 731–753, maio 2001.
- BRASIL, Governo Federal. **Febre tifoide: Casos confirmados** Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Available from: Informações de Saúde (TABNET) – DATASUS (saude.gov.br), 2023.
- CAMPOS, G. M. et al. *Lactococcus lactis* as an Interleukin Delivery System for Prophylaxis and Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 16, n. 2, p. 352–366, abr. 2024.
- CANCELLA, M. J. et al. Bactérias lácticas como probióticas, bioconservantes de alimentos e produtoras de bacteriocinas: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 79, n. 1, p. 37–47, 8 nov. 2024.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CHAGAS, V. S. Microencapsulação por Spray drying de bactéria láctica com potencial probiótico. 2018.
- CHOURADDI, R. et al. A review on probiotics for animals and their mode of action. [s.d.].
- CONCEA (Centro Nacional de Controle de Experimentação Animal). Disponível em: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2016.
- COSTA, K. Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite adicionadas ou não de linhagem probiótica. 5 maio 2023.
- CRUMP, J. A. Progress in Typhoid Fever Epidemiology. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 68, n. Suppl 1, p. S4–S9, 15 fev. 2019.

DE FREITAS F. et al. Probiotic effect of *Bifidobacteria longum* 51A and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY**, v. 1, p. 2-28, 2019.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 907, maio 2021.

ENG, S.-K. et al. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284–293, 3 jul. 2015.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–341, abr. 2013.

FAO/WHO working group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO Working Group, 2002, p. 1-11.

FEITO, J. et al. Draft Genome Sequence of *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* WA2-67: A Promising Nisin-Producing Probiotic Strain Isolated from the Rearing Environment of a Spanish Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Farm. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 521, 28 fev. 2022.

FELLOWS, P. J. 23 - Freeze drying and freeze concentration. Em: FELLOWS, P. J. (Ed.). **Food Processing Technology (Third Edition)**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 687–699.

FERNANDES, L. J. DA S. Avaliação do efeito enteroprotetor de dez linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* em modelo murino de infecção induzida por *Salmonella* Typhimurium. 30 set. 2022.

GALÁN, J. E. *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 716–725, nov. 2021.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y. et al. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. **Research in Veterinary Science**, v. 108, p. 125–132, out. 2016.

GASBARRINI, G.; BONVICINI, F.; GRAMENZI, A. Probiotics History. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics&New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015, p. S116–S119, 2016.

GOGINENI, V. K. Probiotics: History and Evolution. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**, v. 01, n. 02, 2013.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 53–66, jan. 2008.

HOW, Y. H. et al. Freeze drying of food-grade recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900-fermented milk with different protecting agents. **International Dairy Journal**, v. 146, p. 105752, 1 nov. 2023.

HILL, Colin *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, ago. 2014.

- HUANG, S., et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 63, p. 1-17, 2017.
- KAWASAKI, H.; SHIMANOUCI, T.; KIMURA, Y. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. **Journal of Chemistry**, v. 2019, n. 1, p. 9502856, 2019.
- KNODLER, L. A.; ELFENBEIN, J. R. Salmonella enterica. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 964–965, 1 nov. 2019.
- KUPZ, A. et al. *In Vivo* IFN- γ Secretion by NK Cells in Response to *Salmonella* Typhimurium Requires NLRC4 Inflammasomes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97418, 14 maio 2014.
- LI, B. et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 609–616, nov. 2011.
- MATOUSKOVA, P. et al. Stress Effect of Food Matrices on Viability of Probiotic Cells during Model Digestion. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1625, 30 jul. 2021.
- MCFARLAND, L. V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60 Suppl 2, p. S85-90, 15 maio 2015.
- MÉNARD, S. et al. Cross-Talk Between the Intestinal Epithelium and *Salmonella* Typhimurium. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 6 jun. 2022.
- MILERIENE, J. et al. Whole-Genome Sequence of *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* LL16 Confirms Safety, Probiotic Potential, and Reveals Functional Traits. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1034, 15 abr. 2023.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Publicada segunda versão do guia de probióticos. 2021. Available from: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/noticias-anvisa/2021/publicada-segunda-versao-do-guia-de-probioticos>>.
- MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183–193, 1 ago. 2006.
- MOTTA, A. S. DA; QUADROS, D. S.; LERMEN, A. M. Cultivo associado de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8: Propriedades antimicrobianas e potencial aplicação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 30, p. 1–12, 3 jan. 2023.
- NASCIMENTO, M. S. G. et al. A importância do controle microbiológico de alimentos. Em: Científica Digital, E. (Ed.). **Open Science Research XI**. 1. ed. [s.l.] Editora Científica Digital, 2023. p. 25–33.
- NAUSEEF, W. M. Biosynthesis of Human Myeloperoxidase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 642, p. 1–9, 15 mar. 2018.
- OLIVEIRA, S. R. M. et al. Evaluation of a Functional Craft Wheat Beer Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 to treat *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 5, p. 1180–1192, 1 out. 2023.
- OLUDAIRO, O. O. et al. A Review on *Salmonella* Characteristics, Taxonomy, Nomenclature with Special Reference to Non-Typhoidal and Typhoidal Salmonellosis. **Zagazig Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 161–176, 30 jun. 2022.

- PACHECO-MARTÍNEZ, C. K. et al. Características de microorganismos utilizados como probióticos tradicionales y nuevos probióticos. **Actualidades Biológicas**, v. 45, n. 119, p. 1–12, 18 maio 2023.
- PARRY, C. M. et al. Typhoid fever. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1770–1782, 28 nov. 2002.
- SALEENA, L. A. K. et al. Ação imunomoduladora de *Lactococcuti lactis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 135, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2023.
- SAMARŽIJA, D.; ANTUNAC, N.; HAVRANEK, J. L. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. [s.d.].
- SANDES, S. et al. Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through *in vitro* and *in vivo* approaches for immunoprophylaxis applications. **Microbiological Research**, v. 200, p. 1–13, jul. 2017.
- SAVEDBOWORN, W. et al. Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 795–805, jun. 2019.
- SINGH, S.; KOO, O. K. A Comprehensive Review Exploring the Protective Role of Specific Commensal Gut Bacteria against Salmonella. **Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 642, ago. 2024.
- SOUZA, V. O. DE; FRANCO, A. L. DE M. X.; SILVA, M. C. DA. Febre tifoide. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 20, p. 1–10, 1 fev. 2023.
- SOUZA, Antonio Carlos Freitas et al. Seleção in vitro de isolados do trato gastrointestinal de *Colossoma macropomum*, com potencial probiótico. **Scientia Plena**, v. 18, n. 5, 2023.
- VERLHAC, P. et al. Experimental study and optimization of freeze-drying cycles of a model Casei type probiotic bacteria. **Drying Technology**, v. 38, n. 16, p. 2120–2133, 16 nov. 2020.
- VERONESE, P. et al. Severe Typhoid Fever Complicated by Superior Mesenteric and Splenic Vein Thrombosis. **Infectious Disease Reports**, v. 15, n. 4, p. 377–385, 8 jul. 2023.
- ZANIRATI, D. F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, abr. 2015.
- ZHAI, K. et al. Mucosal immune responses induced by oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing the S1 protein of PDCoV. **Virology**, v. 578, p. 180–189, jan. 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Typhoid**. Available from: Febre tifoide (who.int), 2023.

ANEXOS

COMPROVANTE APROVAÇÃO CEUA

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 281/2022 (CEUA-UFMG)

1 message

ceua@prpq.ufmg.br <ceua@prpq.ufmg.br>
To: enemann@cb.ufmg.br, elisabeth.neumann@gmail.com

Tue, Nov 22, 2022 at 10:16 AM


UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 281/2022
Título do projeto: Avaliação do efeito protetor de kefir produzido com culturas iniciadoras e de linhagens de bactérias lácticas que as compõem em modelo murino de infecção por Salmonella Typhimurum.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Elisabeth Neumann
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 21/11/2022. Validade: 21/11/2022 à 20/11/2027.

Belo Horizonte, 22/11/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-001 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3406-4610
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br