



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
 Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



"Seleção de bactérias lácticas de equinos com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou adjuvante imune"

Bruno Campos Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Alvaro Cantini Nunes
 Dr. Alvaro Cantini Nunes - Orientador
 (UFMG)

Luís Carlos Croeco Afonso
 Dr. Luís Carlos Croeco Afonso
 (UFOP)

Maria Rosa Quaresma Bomfim
 Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim
 (UniCeuma/MA)

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
 Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
 (UFMG)

Regina Maria Nardi Drummond
 Dra. Regina Maria Nardi Drummond
 (UFMG)

Belo Horizonte, 19 de junho de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO


**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE EQUINOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO OU ADJUVANTE IMUNOLÓGICO**

ORIENTADO: BRUNO CAMPOS SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES

BELO HORIZONTE
JUNHO - 2015
BRUNO CAMPOS SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE EQUINOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO COMO PROMOTOR DE
CRESCIMENTO OU ADJUVANTE IMUNOLÓGICO**



Tese apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Área de Concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES

**BELO HORIZONTE
JUNHO/2015**

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial a minha mãe Joyce (*in memoriam*), com todo meu amor e gratidão, por tudo que fez por mim ao longo da minha vida e por ser para sempre um exemplo e uma referência pessoal. Saudades eternas!

*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito...
Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser.
Mas, graças a Deus,
não somos o que éramos.”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, professor Álvaro Cantini Nunes, pela oportunidade, orientação, amizade, pelos valiosos ensinamentos e confiança.

À professora Rosa Maria Esteves Arantes pelo auxílio com as análises histopatológicas.

À professora Maria Rosa Quaresma Bonfim pela colaboração e pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e a FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À coordenação, professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Genética do ICB/UFMG.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitos, pela amizade, companheirismo e auxílio na condução dos experimentos.

Aos demais amigos, com os quais, convivo diariamente na UFMG, pelos momentos de amizade e companheirismo.

A todos meus familiares, principalmente ao meu pai e minha irmã, por todo apoio, carinho e afeto.

A Deus a quem dedico todas as minhas conquistas e sempre me dá forças para superar as dificuldades na minha vida.

Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Equinocultura	16
1.1.1. Microbiota do tratogastrointestinal dos equinos	17
1.2. Probióticos	19
1.2.1. Histórico e definição	19
1.2.2. Mecanismos de ação de um probiótico	20
1.2.2.1. Competição por sítios de ligação	20
1.2.2.2. Competição por nutrientes	20
1.2.2.3. Indução da produção de muco e defensinas	21
1.2.2.4. Imunomodulação	22
1.2.2.5. Produção de substâncias antibacterianas	24
1.2.3. Identificação, critérios de seleção e efetividade de um probiótico	25
1.2.4. Utilização de probióticos em equinos	26
1.3. O gênero <i>Lactobacillus</i>	28
1.4. O gênero <i>Weissella</i>	30
1.4.1. Histórico	31
1.4.2. Características taxonômicas, morfológicas e metabólicas	31
1.4.3. <i>Weissella</i> como probiótico	32
1.5. O gênero <i>Pediococcus</i>	32
1.6. O gênero <i>Salmonella</i>	34
1.6.1. História, taxonomia, transmissão e infecção	34
1.6.2. Tratamento de salmonelose e modelo experimental	35
1.6.3. Salmonelose em equinos	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38

3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Isolamento de bactérias lácticas de equinos	39
3.2. Identificação ao nível de espécie por ARDRA ou sequenciamento 16S rRNA.....	39
3.3. Identificação ao nível de linhagem por rep-PCR (GTG) ₅	40
3.4. Caracterização probiótica funcional <i>in vitro</i>	40
3.4.1. Linhagens de bactérias lácticas testadas	41
3.4.2. Reativação das bactérias criopreservadas	41
3.4.3. Resistência ao suco gástrico artificial	41
3.4.4. Tolerância aos sais biliares	42
3.4.5. Hidrofobicidade da superfície celular	42
3.4.6. Antagonismo <i>in vitro</i> contra patógenos bacterianos	42
3.4.7. Antibiograma.....	43
3.5. Caracterização probiótica funcional <i>in vivo</i>	44
3.5.1. Animais.....	44
3.5.2. Microrganismos	44
3.5.2.1. <i>P. pentosaceus</i> 40 e <i>Weissella confusa</i> 1.....	44
3.5.2.2. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Typhimurium.....	45
3.5.3. Tratamento dos animais com as bactérias lácticas, desafio dos animais com <i>Salmonella</i> , ensaio de mortalidade e variação do peso ao longo do experimento...	45
3.5.4. Eutanásia.....	46
3.5.5. Determinação dos índices hepático e esplênico e análise histopatológica do fígado.....	46
3.5.6. Cinética do tratamento com a bactéria láctica para avaliação imune.....	47
3.5.7. Extração de RNA total, tratamento para remoção do DNA genômico e produção de cDNA a partir de tecido das porções do intestino dos animais.....	48
3.5.8. Quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado usando RT-qPCR.....	48
3.5.9. Análise estatística.....	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Isolamento de bactérias lácticas e caracterização morfológica	50
4.2. Identificação molecular.....	50
4.3. Caracterização probiótica funcional <i>in vitro</i>	56
4.3.1. Resistência ao suco gástrico artificial	56
4.3.2. Resistência aos sais biliares.....	57
4.3.3. Hidrofobicidade da superfície celular.....	57
4.3.4. Antagonismo <i>in vitro</i> contra patógenos bacterianos	58
4.3.5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma).....	60
4.4. Seleção de linhagens de bactérias lácticas para testes <i>in vivo</i>	63
4.5. Testes <i>in vivo</i>	65
4.5.1. Avaliação da segurança do tratamento com <i>P. pentosaceus</i> 40 ou <i>W. confusa</i> 1 e da capacidade protetora em camundongos infectados ou não com <i>S. Typhimurium</i>	66
4.5.2. Aspectos histológicos do fígado dos animais convencionais tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40.....	73
4.5.3. Expressão relativa de mRNA de genes de citocinas nos dias 1, 4, 7 e 10 de tratamento com <i>P. pentosaceus</i> 40.....	75
5. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	105
APÊNDICES	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de ação de um probiótico.....	21
Figura 2. Perfil filogenética das bactérias do ácido láctico.....	32
Figura 3. Diversidade de espécies de bactérias lácticas isoladas de fezes de equinos	51
Figura 4. Perfis de restrição enzimática dos isolados de fezes de equinos ao nível de espécie.....	52
Figura 5. Géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referentes à resolução dos produtos de PCR (GTG) ₅ das bactérias lácticas isoladas na 1ª coleta das fezes de potros jovens.	53
Figura 6. Géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referentes à resolução dos produtos de PCR (GTG) ₅ das bactérias lácticas isoladas na 2ª coleta das fezes de potros jovens	53
Figura 7. Tendência de ganho/perda de peso dos grupos de animais convencionais controle e tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40, desafiados ou não com <i>S. Typhimurium</i>	66
Figura 8. Tendência de ganho/perda de peso dos grupos de animais convencionais controle e tratados com <i>W. confusa</i> 1, desafiados ou não com <i>S. Typhimurium</i>	66
Figura 9. Índice hepático médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40 (p40)	68
Figura 10. Índice hepático médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com e <i>W. confusa</i> 1 (W1)	68
Figura 11. Índice esplênico médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40 (p40).....	69

Figura 12. Índice esplênico médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com <i>W. confusa</i> 1 (W1)	69
Figura 13. Taxa de sobrevivência de camundongos convencionais tratados ou não com <i>P. pentosaceus</i> 40 após 28 dias pós infecção com <i>S. Typhimurium</i>	71
Figura 14. Taxa de sobrevivência de camundongos convencionais tratados ou não com <i>W. confusa</i> 1 após 28 dias pós infecção com <i>S. Typhimurium</i>	71
Figura 15. Aspectos histológicos do fígado dos animais convencionais (aumento 10x).....	74
Figura 16. Score histopatológico do fígado de animais tratados e não tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40 desafiados ou não com <i>S. Typhimurium</i> , 10 dias após o desafio.....	75
Figura 17. Expressão relativa de citocinas próinflamatórias e regulatórias no intestino delgado de camundongos tratados e não tratados com <i>P. pentosaceus</i> 40 no 1º, 4º, 7º e 10º dia após o início do tratamento.....	77

LISTA DE QUADROS, TABELAS E APÊNDICES

Tabela 1. Designação de espécies de <i>Lactobacillus</i> e <i>Leuconostoc</i> para o novo gênero <i>Weissella</i>	31
Tabela 2. Resultado da identificação molecular das bactérias lácticas isoladas de fezes de potros jovens.....	55
Tabela 3. Antagonismo <i>in vitro</i> contra patógenos bacterianos pelas bactérias lácticas isoladas de equinos.....	60
Tabela 4. Suceptibilidade/resistência aos antimicrobianos de bactérias lácticas isoladas de fezes de potros.....	62
Tabela 5. Resultado da caracterização funcional das bactérias lácticas isoladas de fezes de potros jovens.....	64

Quadro 1. Grupos de estudo e esquema de tratamento com <i>P. pentosaceus</i> 40 (p40) ou <i>W. confusa</i> 1 (W1) e desafio com <i>S. Typhimurium</i> em animais convencionais	47
Apêndice I. Curvas de crescimento obtidas para os isolados de bactérias lácticas em presença de suco gástrico artificial.....	105
Apêndice II. Curvas de crescimento obtidas para os isolados de bactérias lácticas na presença de oxgall 0,3%.....	112
Apêndice III. Dados do sequenciamento das amostras não identificadas pelo PCR-ARDRA. As amostras 1, 10 e 28 e 40 foram sequenciadas para o gene 16S rRNA.....	117
Apêndice IV. Cursos extracurriculares realizados no período da tese, resumos e artigos publicados em congressos referentes à tese.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C. – antes de Cristo

Actb – Beta-actina

Ad libitum – à vontade

ANOVA – “Analysis of variance” - Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC- Células apresentadoras de antígenos

ARDRA – “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” - Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado

ATCC – “American Type Culture Collection” - Coleção Americana de Cultura-Tipo

BAL – Bactérias do Láticas

BHI – “Brain Heart Infusion” - Infusão de Cérebro e Coração

CCE – Concurso completo de equitação

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA – “Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxiribonucléico

EFSA – “European Food Safety Authority” - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FAO/WHO – “Food and Agriculture Organization/World Health Organization” - Organização para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

GALT – “Gut Associated Lymphoid Tissue” - Tecido linfóide associado ao intestino

Gapdh – “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GC – conteúdo de guanina-citosina

GRAS – “Generally Recognized as Safe” / Geralmente Reconhecido como Seguro

H – horas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IBDs – “Inflammatory Bowel Diseases” - Doenças Inflamatórias Intestinais

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFNG – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL1 – Interleucina 1

IL2 – Interleucina 2

IL6 – Interleucina 6

IL10 – Interleucina 10

IL12 – Interleucina 12

IL17 – Interleucina 17

mg/kg – miligrama por quilograma

MAMPs – “Microorganism Associated Molecular Patterns” - Padrões moleculares associados a microorganismos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MATS – “Microbial Adhesion to Solvents” - adesão de micróbios aos solventes

MDR – “MultiDrug-Resistant” - multiresistente às drogas

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MRS – De Man, Rogosa, Sharpe

NB2 – Nível de Biossegurança 2

OD – “Optical Density” - densidade ótica

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs – “Pathogen-associated molecular patterns” - Padrões moleculares associados aos patógenos

PRRs – “Pattern Recognition Receptors” - Receptores de Reconhecimento de Padrão

PCR – “Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial Hidrogeniônico

RNA – “Ribonucleic acid” - Ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossômico

REP – Reação em cadeia da DNA polimerase com seqüências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos

RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism” - Polimorfismo de fragmento de restrição

RLmRNA – expressão relativa média da quantidade de mRNA

RT-qPCR – “Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction” -

sIgA – Imunoglobulina A secretada

TGI – Trato Gastrointestinal

Th1 – “T-helper- 1” - T auxiliar 1

TNFA – Fator de necrose tumoral alfa

tRNA – RNA transportador

TGFB1 – Fator de transformação do crescimento beta

U – unidade

UFC – Unidade Formadora de Colônia

v/v – volume por volume

RESUMO

O uso de aditivos alimentares nas dietas dos animais é uma das técnicas aplicadas com resultados significativos para melhorar os índices zootécnicos e aumentar a produtividade. Entre os aditivos utilizados na produção animal destacam-se os probióticos, os quais trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não promovem resistência às drogas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo caracterizar *in vitro* e *in vivo* bactérias lácticas isoladas de fezes de potros jovens para uso como probióticos na suplementação alimentar, como promotor de crescimento ou adjuvante imune. Trinta e três bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* e *Enterococcus* foram testadas *in vitro* a fim de caracterizar e selecionar potenciais linhagens probióticas. A viabilidade das bactérias foi verificada perante os desafios do trato gastrintestinal: a maior parte destas foi resistente ao pH ácido do estômago e cerca de 30% apresentou inibição de crescimento leve ou moderada aos sais biliares. O potencial de adesão à superfície do epitélio intestinal foi avaliado indiretamente pela capacidade das bactérias se associarem a solventes orgânicos apolares, com 40% das linhagens testadas apresentando alta ou moderada hidrofobicidade da superfície celular. Algumas das linhagens de bactérias apresentaram forte atividade antagonista contra quase todos os patógenos bacterianos testados. Todas as linhagens testadas apresentaram padrão similar de resistência/suceptibilidade a antimicrobianos utilizados na terapia humana e animal. As linhagens *Pediococcus pentosaceus* 40 e *Weissella confusa* 1 apresentaram melhores resultados nos testes *in vitro* de caracterização funcional probiótica e foram escolhidas para os testes *in vivo* em camundongos em modelo de infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. A suplementação alimentar de camundongos convencionais com as duas linhagens de bactérias lácticas por 10 dias consecutivos não causou aumento dos índices hepático e esplênico, nem a morte dos camundongos, demonstrando sua segurança. Todavia, estas bactérias não promoveram uma maior sobrevivência dos animais infectados experimentalmente com o enteropatógeno *S. Typhimurium*. A quantificação relativa dos níveis de mRNA de genes codificadores das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNFA), interferon gama (IFNG), fator de transformação de crescimento beta (TGFB1) e interleucinas 6 (IL6) e 10 (IL10), após 1, 4, 7 e 10 do início do tratamento com *P. pentosaceus* 40 revelou um perfil inflamatório, induzindo um aumento da expressão de IFNG e um aumento significativo da expressão de TNFA 10 dias após o início do tratamento. Portanto, as linhagens *W. confusa* 1 e *P. pentosaceus* 40 mostraram-se seguras, porém não se apresentaram como uma terapia apropriada contra infecção por *S. Typhimurium*. Por induzir um perfil inflamatório de expressão de citocinas, é possível que a linhagem *P. pentosaceus* 40 sirva como adjuvante imune em vacinas ou que confira proteção frente a alguma

importante infecção viral. Já em relação à linhagem *W. confusa* 1 é necessário que seja feita a mesma análise do perfil de indução de citocinas, mas os demais resultados *in vivo* foram muito semelhantes a *P. pentosaceus* 40. É importante ressaltar a necessidade de serem realizados testes de triagem em bactérias candidatas a probióticos, assim como foi feito neste trabalho, antes de sua extensa utilização na terapia animal e humana, tendo em vista que os efeitos nem sempre serão benéficos para todos os tipos de infecção, como foi demonstrado no presente estudo.

ABSTRACT

The use of food additives in animals diet is one of the techniques applied with significant results to improve production indices. Probiotics, which are beneficial to the health of the host and do not leave residues in animal products and do not promote drug resistance, are highlighted among the additives used in animal production. In this context, the present study aimed to characterize *in vitro* and *in vivo* lactic acid bacteria isolated from the feces of young foals for use as probiotics in food supplementats, growth promoters or immune adjuvants. Thirty-three bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* were tested *in vitro* in order to characterize and select potential probiotic strains. Some of these bacteria were stomach low pH resistant and about 30% showed mild or moderate growth inhibition by bile salts. Potential for adhesion to the intestinal epithelium surface was assessed indirectly from the ability shown by the bacteria to associate with nonpolar organic solvents. We observed that 40% of the tested isolates showed high or moderate cell surface hydrophobicity. Some bacterial strains showed strong antagonistic activity against almost all bacterial pathogens tested. All of the strains showed similar resistance/susceptibility patterns to antimicrobials used in human and animal therapy, do not having any tranferable resistance marker. The *Pediococcus pentosaceus* strain 40 and the *Weissella confusa* strain 1 showed better results in this *in vitro* probiotic functional characterization tests and they were chosen for the *in vivo* tests in mouse model of typhoid fever by infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. The safety of these two strains of lactic acid bacteria was demonstrated by the supplementation of mice for 10 consecutive days, which caused no increase in liver and spleen indexes, nor the death of any mice. However, these bacterial treatments did not promote an increase in the survival of those animals experimentally infected with *S. Typhimurium* enteropathogen. Quantification of relative mRNA levels of genes encoding the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNFA), interferon gamma (IFNG), transforming growth factor beta (TGFB1) and interleukin 6 (IL6) and 10 (IL10). Testing, after 1, 4, 7 and 10 days of treatment with *P. pentosaceus* 40 revealed an inflammatory profile, inducing the expression of IFNG and a significant increase of TNFA expression, at 10 days

after initiation of treatment. Therefore, the strains *W. confusa* 1 and *P. pentosaceus* 40 strains were considered safe, but they did not appear as an appropriate therapy against infection by *S. Typhimurium*. By inducing an inflammatory cytokine expression profile, it is possible that the *P. pentosaceus* 40 strain may serve as a vaccines immune adjuvant or confer some protection against major viral infections. Regarding the *W. confusa* 1, it is necessary to do the same cytokine induction profile analysis. However, the other *in vivo* results were very similar to *P. pentosaceus* 40. It is important to emphasize the need for *in vivo* tests to be performed on bacterial candidates for probiotics before they are used extensively in animal and human therapies. As the present study demonstrates, their effects will not always be beneficial against all kinds.

1. Introdução

1.1. Equinocultura

O rebanho equino brasileiro é o terceiro maior do mundo, com cerca de 5.800.000 animais, perdendo em quantidade apenas para a China e o México (MAPA, 2013). O complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. O equino, no aspecto econômico, desempenha as funções de sela, carga e tração. A partir da segunda metade do século XX, destacam-se no aspecto social, as atividades de esportes e lazer, como a equoterapia para tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio-afetiva (Lima *et al.*, 2006). No agronegócio equino destacam-se também os vários fornecedores de insumos, produtos e serviços para a criação, como medicamentos, rações, selas e acessórios, ferrageamento, veterinários e treinadores, transporte de equinos e o ensino e pesquisa. No complexo agropecuário, o segmento de equinos utilizados em diversas atividades esportivas movimenta valores da ordem de R\$ 705 milhões e emprega cerca de 20.500 pessoas, com a participação estimada de 50 mil atletas (Lima *et al.*, 2006).

As atuais pesquisas estão relacionadas às perspectivas dos segmentos do complexo do agronegócio equino no país (Almeida; Silva, 2010). Nos últimos anos, a equinocultura brasileira tem se apresentado como um mercado interno em expansão em especial para as raças de trabalho e esporte. E o Brasil tem se firmado no cenário internacional como país exportador de cavalos, principalmente para outros países do continente americano, tanto de hipismo (adestramento, salto e circuito completo de equitação) quanto de corrida. Além do mais, o Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina. Bélgica, Holanda, Itália, Japão e França são os principais importadores da carne de cavalo brasileira, também consumida nos

Estados Unidos (MAPA, 2013). Com essa expansão, torna-se maior a preocupação com a qualidade de vida dos animais utilizados para as competições. Neste aspecto, a busca por uma boa alimentação torna-se um dos fatores mais relevantes para atender as necessidades dos animais e contribuir para o máximo desempenho. Os cavalos, por serem herbívoros não ruminantes, são capazes de utilizar grande quantidade de alimento para atender as exigências nutricionais. Entretanto, para maximizar o crescimento e a produtividade dos equinos, têm-se utilizado dietas com alta porcentagem de grãos e de suplementos alimentares (Tribucci, 2011).

A nutrição e a alimentação são as principais áreas estudadas, tendo em vista sua importância produtiva e econômica para adequado desempenho zootécnico e saúde animal. A utilização de aditivos na nutrição animal vem crescendo nos últimos anos, mas ainda faltam trabalhos científicos que comprovem todos os benefícios esperados para equinos (Nutrients, 2007), especialmente quando criados nas condições brasileiras. O Brasil é um país tropical onde os períodos de chuva são bem definidos e a grande extensão territorial das propriedades permitem a adoção de sistema produtivo diferenciado daquele preconizado nos países de clima temperado. Em diversos criatórios, os equinos permanecem soltos durante todo ano, sendo o pasto seu único alimento e que perde seu valor nutricional durante o período de seca (Carvalho; Haddad, 1987, Moura, 2010).

1.1.1. Microbiota do trato gastrintestinal dos equinos

As principais funções da microbiota gastrintestinal são a resistência à instalação e multiplicação de microorganismos exógenos (efeito barreira e/ou exclusão competitiva), a estimulação de resposta imunológica mais rápida e adequada em caso de infecção por patógenos (imunomodulação) e o auxílio na regulação da fisiologia digestiva e fornecimento de nutrientes (contribuição nutricional). A microbiota normal induz diversas mudanças na anatomia e fisiologia das células intestinais do hospedeiro, devido à presença desses microorganismos e/ou produção de ácidos graxos voláteis, especialmente butirato. Os principais benefícios que auxiliam na capacidade digestiva e defesa contra patógenos são o aumento no tamanho da borda em escova das células intestinais, o aumento de tecido linfóide e tecido conectivo, a produção de muco, a vascularização intestinal (através das células de Paneth), a acidificação do estômago, a produção enzimática e a produção de substâncias que inibem ou matam patógenos (Savage, 1986; Bergman, 1990; Whiteley *et al.*, 1996; Stappenbeck *et al.*, 2002; Servin, 2004).

Todos os animais, inclusive os invertebrados, possuem uma microbiota no tubo digestivo que interage com eles por mutualismo. Os níveis populacionais dos microorganismos

endógenos podem exceder 1×10^{10} células viáveis por grama de material seco, sendo subdivididos em três populações: dominante (concentração acima de 10^9 ufc/g do conteúdo), subdominante (concentração entre 10^7 a 10^8 ufc/g do conteúdo) e residual (concentração abaixo de 10^7 ufc/g do conteúdo). Os dois primeiros grupos permanecem relativamente constantes e estáveis no tempo e entre indivíduos, sendo a população residual bastante variável. Coletivamente, a microbiota digestiva pode ser considerada como um “órgão” metabolicamente ativo, no qual os microorganismos dominantes e subdominantes são capazes de gerar metabólitos que interferem com o organismo hospedeiro (Stappenbeck *et al.*, 2002; Nicoli *et al.*, 2003).

O sistema gastrointestinal de monogástricos, dentre os quais se incluem os equinos, é livre de microorganismos ao nascer, mas é rapidamente colonizado após 5 ou 6 dias do nascimento pela microbiota presente no ambiente onde vive. Normalmente, há grande variedade de espécies (400 a 500 linhagens diferentes) chegando um animal adulto a ter 100 trilhões de UFC de bactérias no aparelho gastrointestinal. Segundo Gedek (1999), nesta grande população que é a microbiota de equinos pode-se distinguir uma microbiota dominante com mais de 90% da contagem total composta por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacteroides*. Uma microbiota subdominante com aproximadamente 10% formada por *Escherichia coli* e *Enterococcus*; e uma microbiota residual menor que 0,01% composta por *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* e leveduras do gênero *Candida*.

A colonização das superfícies e cavidades corporais, incluindo o trato gastrointestinal, ocorre a partir do nascimento, tendo início dentro do canal do parto. Segundo Sakaitani *et al.* (1999), citados por Yuyama *et al.* (2004), a colonização em potros neonatos ocorre numa sequência bem definida, aparecendo primeiramente bactérias anaeróbias facultativas, seguidas por bactérias anaeróbias obrigatórias da família Bacteroidaceae (gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides*) e bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido lático do gênero *Lactobacillus*, as quais passam a predominar na segunda semana de vida. *Lactobacillus* é o microorganismo endógeno predominante no trato digestivo equino, com 178 cepas isoladas (Morotomi *et al.*, 2002), sendo que as principais espécies que colonizam a região aglandular do estômago são *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. reuteri* e *L. agilis* (Yuki *et al.*, 2000).

A microbiota gastrointestinal pode variar dentro da mesma espécie durante toda a vida do animal dependendo diretamente da alimentação, manejo e instalações. Mudanças na microbiota ocorrem normalmente, mas quando o equilíbrio entre populações é alterado, as bactérias patogênicas passam a dominar sobre as benéficas, o que leva a problemas digestivos que têm impacto sobre os custos e a produtividade (Weese *et al.*, 2003). Uma

alternativa para reestabelecer o equilíbrio da microbiota é a suplementação alimentar dos animais com probióticos (Moura *et al.*, 2010)

1.2. Probióticos

1.2.1. História e Definição

O uso de bactérias benéficas à saúde na alimentação humana tem uma longa história. Os primeiros relatos dos efeitos positivos das bactérias na alimentação datam da versão persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que descreve que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de coalhada”. Plínio, um filósofo romano, recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de doenças intestinais em 76 a.C. (Teitelbaum e Walker, 2002).

Embora o consumo destes microorganismos ocorra a milhares de anos, apenas no século XX pesquisas científicas passaram a ser realizadas a fim de determinar as reais causas dos benefícios conferidos pelos produtos lácteos. O pioneiro nestas pesquisas e o responsável por relacionar a presença de bactérias do ácido láctico na microbiota intestinal a uma manutenção da saúde foi o ganhador do prêmio Nobel, Elie Metchnikoff (1908), um microbiologista russo (Desland *et al.*, 2012, Mackowiak, 2013).

Em 1908, Elie Metchnikoff, trabalhando no Instituto Pasteur na França, observou o surpreendente número de pessoas na Bulgária que viviam mais de 100 anos. Esta longevidade não podia ser atribuída às condições de saúde daquela época, pois a Bulgária era um dos países mais pobres da Europa e a medicina não apresentava grandes avanços. O Dr. Metchnikoff também observou que os camponeses búlgaros consumiam muito iogurte. Ele isolou as bactérias do iogurte e descobriu que elas conferiam grandes benefícios à saúde dos indivíduos (Metchnikoff, 1908).

O termo probiótico quer dizer pró-vida ou a favor da vida e tem sido utilizado para descrever microorganismos benéficos à saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a definição de bactérias probióticas é a de microorganismos vivos que, quando administrados na quantidade adequada, conferem algum benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

A maioria dos microorganismos probióticos são Bactérias do Ácido Láctico (BAL), Gram positivo, geralmente catalase negativo, não esporulantes, anaeróbias estritas, facultativas ou que crescem em microaerofilia. Assim sendo, os probióticos incluem espécies de BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Oliveira-Sequeira, Ribeiro e Gomes, 2008), além de *Bifidobacterium* e algumas linhagens das leveduras

Saccharomyces boulardii e *S. cerevisiae* (Naidu *et al.*, 1999). Entretanto, existem preparações probióticas comerciais incluindo bactérias Gram negativo, tal como a linhagem *E. coli* Nissle 1917 (Nissle, 1959; Schultz *et al.*, 2004). Culturas simples ou mistas de microorganismos vivos são usadas em preparações probióticas, em diferentes formulações tecnológicas, incluídas na dieta humana e animal (Berg, 1998, Vaughan *et al.*, 1999).

Nas últimas duas décadas se intensificaram as pesquisas de base e de caráter clínico nos probióticos, resultando em mais de seis mil publicações na literatura biomédica, sendo 60% destas nos últimos cinco anos. Algumas destas publicações foram em revistas de altos *rankings* de classificação e fator de impacto em periódicos nas bases indexadoras (Rijkers *et al.*, 2011).

1.2.2. Mecanismos de ação de um probiótico

1.2.2.1. Competição por sítios de ligação

As bactérias probióticas ocupam os sítios de ligações (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal, formando um tipo de barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias patogênicas não conseguem se ligar a esses receptores e, conseqüentemente, são excluídas pela competição (Fuller, 1992; Havenaar; Brink; Huis-int`veld, 1992; Ouwehand *et al.*, 1999; Cross, 2002; Lavermicocca *et al.*, 2005; Reid e Hammond, 2005).

Os microorganismos probióticos presentes no trato gastrintestinal atuam também como uma barreira defensiva do animal, impedindo que microorganismos potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos, uma vez que se aderem às paredes intestinais e reduzem a área de ocupação destes (Saad, 2006). De acordo com Kos e colaboradores (2003), a aderência bacteriana envolve vários fatores, sendo que o processo inicial é baseado em interações físico-químicas, que estão relacionadas às cargas elétricas presentes e a hidrofobicidade da parede celular do microorganismo.

1.2.2.2 Competição por nutrientes

A escassez de nutrientes disponíveis na luz intestinal que possam ser metabolizados pelas bactérias patogênicas é um fator limitante de manutenção das mesmas neste ambiente, uma vez que o intestino já se encontra colonizado por microorganismos comensais, que naturalmente competem por alimentos com as bactérias patogênicas. As bactérias probióticas se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas

enzimas digestivas normais, ou que foram intencionalmente adicionados à dieta como prebióticos (Gibson e Roberfroid, 1995; Rolfe, 2000; Gibson, McCartney, Raltall, 2005).

Na maioria das vezes, os probióticos são selecionados a partir das bactérias da microbiota indígena, aumentando as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro. Assim, um probiótico é capaz de metabolizar de forma mais rápida e eficiente os nutrientes, tornando-os indisponíveis aos patógenos e, conseqüentemente, impedindo a proliferação destes (Spencer; Chesson, 1994; Pancheniak, 2005).

1.2.2.3. Indução da produção de muco e defensas

A ligação das linhagens probióticas às células epiteliais do intestino como, por exemplo, as células de Paneth e enterócitos, estimulam a produção de defensas e muco, respectivamente, substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra invasão por patógenos (**Figura 1**) (Lebeer *et al.*, 2010).

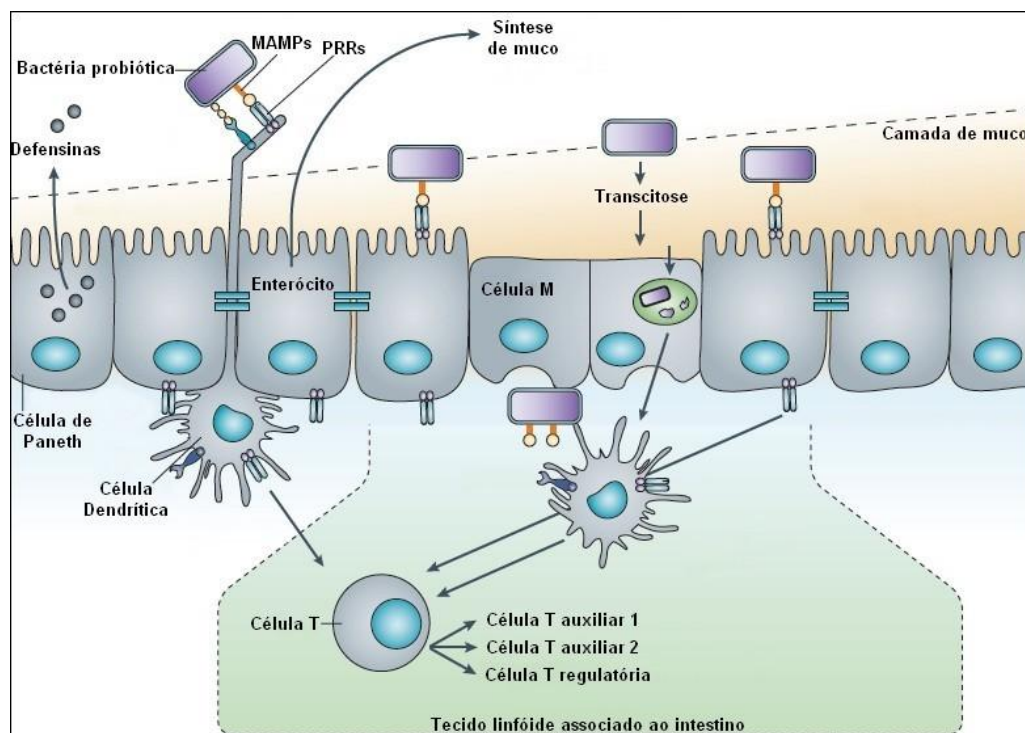


Figura 1: Principais vias de ação de um probiótico.

Um probiótico é capaz de estimular a produção de defensas e muco quando em contato com as células de Paneth e com os enterócitos. Além disso, pode interagir com as células dendríticas na lâmina própria através de suas prolongações entre as células epiteliais intestinais e pela transcitose mediada pelas células M. O tipo de interação é dependente da dinâmica do muco intestinal e, independente da via, é capaz de induzir a produção de citocinas que podem atuar como adjuvante imune. Fonte: Adaptado de Lebeer *et al.*, 2010.

1.2.2.4. Imunomodulação

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como as bactérias láticas e *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon, entre outras citocinas. Entretanto, o verdadeiro mecanismo pelo qual essas bactérias estimulam o sistema imune ainda permanece com muitos pontos a serem esclarecidos (Fuller, 1992; Isolauri, *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005; Rinne *et al.*, 2005; Peluso *et al.*, 2007) e as propriedades imunomodulatórias variam consideravelmente dependendo de cada linhagem considerada (Van Overtvelt *et al.*, 2010).

A imunomodulação pelos probióticos é resultado da interação de moléculas conservadas da parede celular destes microrganismos (MAMPs) com receptores de reconhecimento do hospedeiro (PRRs), induzindo as vias de sinalização do sistema imune, sendo que o tipo de resposta imunológica gerada é diretamente dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga (Cross, 2002; Oelschlaeger, 2010).

A interação do microrganismo probiótico com as células dendríticas é o fator que promove a produção de citocinas, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) para apresentação de antígenos, e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipos 1 e 2. Além disso, bactérias probióticas podem atingir o tecido linfóide associado ao intestino atravessando células intestinais especiais (transcitose), chamadas células M, e interagir diretamente com as células dendríticas, modulando a resposta imune (**Figura 1**) (Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010).

Outro aspecto importante é que uma vez estabelecido no TGI, o probiótico promove o estímulo à proliferação de células T regulatórias e imunoglobulinas, principalmente IgA secretora (sIgA), permitindo um desenvolvimento normal do sistema imune por meio da indução da tolerância a antígenos luminiais, auxiliando no combate a patógenos entéricos, prevenção de doenças autoimunes e alergias alimentares (Shi e Walker, 2004).

Diversos estudos têm investigado o papel dos probióticos na modulação da liberação de citocinas (Griffiths *et al.*, 2004; Blumer *et al.*, 2007; Frick *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007). As citocinas são substâncias sinalizadoras que atuam na imunidade inata e adaptativa transportando informações entre células inflamatórias. Elas podem aumentar a indução de células efectoras e proteínas que potencializam a resposta antimicrobiana (Abbas; Lichtman, 2005).

A resposta inflamatória é a reação local inicial da imunidade inata, na qual linfócitos são ativados e recrutados para o local da infecção para combatê-la. A reação de inflamação em combate a microrganismos invasores é iniciada por citocinas, principalmente fator de necrose tumoral (TNFA), interleucina-1 (IL1) e quimiocinas, que agem ativando e recrutando leucócitos (Abbas e Lichtman, 2005).

O TNFA é uma citocina multifuncional que possui atividades centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. O aumento exagerado da síntese de TNFA está relacionado com a presença de doenças inflamatórias como artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (Palladino *et al.*, 2003). Dentre as diversas funções atribuídas ao TNFA encontram-se o estímulo de linfócitos B produtores de IgA e linfócitos T produtores de IL2, IFNG e outras citocinas, indução de produção de proteína C reativa pelos hepatócitos, supressão da atividade da lipase lipoprotéica e indução da febre e sono (Eigler *et al.*, 1997).

A IL6 é uma citocina importante na cascata de resposta à infecção do hospedeiro. Ela ativa a resposta de fase aguda, estimula linfócitos T, induz a diferenciação terminal de linfócitos B e a produção de proteína C reativa pelos hepatócitos (Papanicolaou *et al.*, 1998). Produzida por diversos tipos celulares, atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Ela é considerada um pirogênico endógeno, visto que é capaz de induzir a febre e a produção de proteínas de fase aguda que, semelhante à ação dos anticorpos, apresentam especificidade para moléculas de patógenos (Janeway; Travers, 1997).

O IFNG, produzido pelas células Th1, é a principal citocina ativadora de macrófagos (Abbas e Lichtman, 2005) e tem importante papel na defesa do organismo contra patógenos. As células T produzem IFNG em resposta ao reconhecimento de antígenos e ele aumenta a ação antimicrobiana de macrófagos pela estimulação da síntese de intermediários reativos do oxigênio e de óxido nítrico (Gantner *et al.*, 1996).

O papel das citocinas IL10 e TGF β 1 é regular a imunidade e a inflamação, sendo capazes de suprimir a inflamação hepática durante a infecção por *Schistosoma mansoni* (Herbert, 2008). O TGF β 1 além da função supressora sobre as células alvo, como os macrófagos, está envolvido na cicatrização exercendo funções reparadoras para minimizar os danos teciduais (Melo *et al.*, 2009). Como a IL-10, inibe a ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) e é antagonista do IFNG, sendo relacionada às reações de controle da inflamação nos tecidos alvo (Sojka *et al.*, 2008).

Existem ainda outros trabalhos que falam do uso de bactérias lácticas como adjuvantes em vacinas contra gripe, poliomielite, rotavírus e cólera como *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CRL431, *L. acidophilus* La-14, *L. fermentum* CECT5716,

L. casei DN-114 001 e *Bifidobacterium lactis* BI-04 (Boge *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2011; Isolauri *et al.*, 1995; Kaila *et al.*, 1992; Paineau *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). A palavra “adjuvante” na frase “adjuvante probiótico” não é usada em sua definição tradicional, na qual uma substância adjuvante está incluída na formulação da vacina para auxiliar a resposta imunitária ao antígeno da vacina. Em vez disso, os adjuvantes probióticos melhoram a imunogenicidade das vacinas, quando administradas por via oral repetidamente próximo ao momento de vacinação e separadamente da vacina. Os dados revelam que normalmente os adjuvantes probióticos são indutores de citocinas do tipo Th1 como IL12 e IFNG e são capazes de levar a produção de IgA específica contra o antígeno (Hori *et al.*, 2001; Olivares *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

1.2.2.5. Produção de substâncias antibacterianas

As bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas (Villani *et al.*, 1995; Rodrigues, 1996; Naidu, Bidlack, Clemens, 1999; Vélez *et al.*, 2007), ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Havenaar, Brink e Huis-int`veld, 1992; Naidu; Bidlack; Clemens, 1999), que têm ação bacteriostática ou bactericida, especialmente em relação às bactérias patogênicas.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos de ação local, que inibem o crescimento de outras bactérias. No caso dos probióticos, existem na literatura vários trabalhos descrevendo a ação antagonista destas substâncias contra vários patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, dentre outros (Jamuna, Babusha e Jeevaratnam, 2004; Garcia *et al.*, 2006; Todorov e Dicks, 2007; Todorov, 2009).

As bactérias lácticas produzem nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina, dentre outras. Essas substâncias apresentam atividade inibitória, tanto para bactérias Gram-negativo quanto para Gram-positivo (Keersmaecker *et al.*, 2006; Cleusix *et al.*, 2007; Corr *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2007). As bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro, produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, o acético, o butírico e o láctico, além do peróxido de hidrogênio, cujos espectros de ação incluem também a inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Por isso, não deve ser descartada a idéia de que todas estas substâncias antibacterianas podem atuar em associação (Villani *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 1996; Naidu; Bidlack; Clemens, 1999; Naaber *et al.*, 2004; Laughton *et al.*, 2006).

1.2.3 Identificação, critérios de seleção e efetividade de um probiótico

A identificação de bactérias lácticas por métodos fenotípicos é uma tarefa árdua e demorada, e são necessários cerca de dezessete testes para determinar com alguma precisão um isolado de *Lactobacillus* ao nível de espécie (Tannock *et al.*, 1999).

De acordo com Klein *et al.* (1998), a aplicação de ensaios fenotípicos visando à designação das culturas probióticas empregadas em produtos comerciais tem promovido divergências na identificação, sendo observados erros, como por exemplo espécies de *L. johnsonii* e *L. gasseri* relatadas como *L. acidophilus* e cepas de *L. paracasei* descritas como *L. casei*. Como alternativa aos testes fenotípicos, técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso para análise filogenética, estudo da ecologia microbiana de ecossistemas e identificação de microrganismos dos gêneros de bactérias (Floresta, 2003; Lee *et al.*, 2008).

Dentre as abordagens moleculares, algumas técnicas têm sido utilizadas, como a PCR-ARDRA (análise de restrição do DNA ribossômico amplificado), REP-PCR (reação da polimerase em cadeia com seqüências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos) e o sequenciamento do gene 16S do rRNA (Bjorkroth 2002; Moreira, 2005; Viegas, 2008; Lee *et al.*, 2011, Sandes *et al.*, 2014).

Para comprovar as propriedades probióticas, as bactérias selecionadas devem ser avaliadas quanto alguns critérios, dentre eles a capacidade de resistir às condições adversas impostas pelo organismo do hospedeiro como as variações de pH ao longo do trato gastrointestinal, a presença de sais biliares e de enzimas gástricas e intestinais, além de serem capazes de aderir à mucosa intestinal e de ter atividade antagonista contra os patógenos (Hoyos, 1997; Turner, Dritz e Minton, 2001; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008) seja pela produção de compostos antagonistas (bacteriocinas e antibióticos) ou pela competição por sítios de adesão (Morelli, 2000; Saarela *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2006).

Tais microrganismos não devem ter potencial patogênico, devem ser provenientes de animais saudáveis, habitantes normais do intestino, não devem ser tóxicos nem patogênicos e, além disso, é preferível que as cepas utilizadas sejam hospedeiro-específicas, para que se obtenha uma eficácia máxima do produto (Salminen *et al.*, 1998; Murarolli, 2008, Nagpal *et al.*, 2012).

Os probióticos devem apresentar características que permitam a sua produção em larga escala, como uma fácil proliferação *in vitro*, fácil manipulação, boas condições de produção industrial e que sobrevivam no produto final conservando sua função (Pancheniak, 2005). Além disso, deve ser observada a habilidade da cultura em coexistir com a microbiota indígena do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Deste modo, testes indiretos *in vitro* baseados

nos mecanismos de ação probiótica dos microorganismos podem direcionar a seleção de linhagens com características de interesse.

As propriedades desejáveis dos probióticos são dependentes de sua capacidade de permanecer viáveis e de colonizar o intestino. Para isso, um número suficiente de bactérias viáveis deve estar presente nos produtos no momento do consumo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Instrução Normativa nº46, de 23 de Outubro de 2007, estabelece que para um produto probiótico apresentar a alegação de promoção da saúde, a quantidade mínima viável do microorganismo probiótico deve estar situada entre 10^8 - 10^9 UFC dose diária do produto final, conforme a indicação de consumo pelo fabricante (Brasil, 2007). O consumo de 10^8 - 10^9 UFC/dia é necessário para garantir que as bactérias probióticas cheguem ao intestino em níveis populacionais semelhantes aos da microbiota dominante (Ouwehand *et al.* 2002a) permitindo, desta maneira, o desenvolvimento de algum efeito benéfico (Sellars, 1991). A busca por formulações farmacêuticas ou terapêuticas que garantam a viabilidade das bactérias, por longos períodos, é um dos grandes desafios atuais dos pesquisadores da área de alimentos funcionais (Lee e Salminen, 1995).

1.2.4. Utilização de probióticos em equinos

O equilíbrio da microbiota presente no TGI de um animal saudável é extremamente importante para a máxima absorção e aproveitamento dos nutrientes. Contudo, em situações de estresse (transporte, período pós-operatório, exercício físico em excesso, desmame, doenças e alimentação inadequada), este equilíbrio pode ser afetado negativamente, diminuindo o aproveitamento de nutrientes e aumentando a incidência de distúrbios gastrintestinais, como a cólica. Diante disso, o uso de probióticos consiste em auxiliar a manutenção e/ou restabelecimento do equilíbrio ideal entre microorganismos benéficos e patogênicos (Moura *et al.*, 2010).

Entre os aditivos utilizados na produção animal, destacam-se os probióticos, os quais trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não promovem resistência às drogas (Nepomuceno e Andreatti, 2000; Furtado *et al.* 2010). Segundo Lyons (1997), os probióticos têm sido utilizados em outros monogástricos (aves e suínos) como promotores de crescimento em substituição aos antimicrobianos. Os produtos contêm microorganismos e substâncias que propiciam o balanceamento microbiano intestinal adequado e contribuem efetivamente para a melhoria na absorção dos nutrientes pelo organismo animal.

Os produtos probióticos comumente destinados aos equinos são compostos por culturas bacterianas vivas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Bacillus subtilis*, e culturas das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*; sendo comumente utilizados no combate de problemas associados com estresse, tais como falha na ingestão de colostro, desmame, mudanças na alimentação, transporte, clima adverso, doenças recorrentes, animais debilitados nutricionalmente, e antibioticoterapia prolongada. Esses aditivos estão disponíveis sob várias formas de apresentações, tais como pós, pastas, gel, cápsulas, sendo administrados via oral, sobre o alimento ou na água de bebida (Montes e Pugh, 1993; Lewis, 2000).

Diversos estudos comprovaram a melhoria da digestibilidade dos nutrientes com a utilização de probióticos na dieta de equinos, especialmente sobre a fração fibrosa dos alimentos (Kim *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1994; Hill e Gutsell, 1998; Medina *et al.*, 2002; Jouany *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2009, 2010;). Em alguns trabalhos foram observados os efeitos dos probióticos sobre a disponibilidade de minerais, como fósforo, cálcio e magnésio (Pagan, 1990, Moura *et al.*, 2010;). No entanto, existe uma grande variação nos resultados observados nesses estudos, provavelmente devido às diferenças na concentração e dosagem dos aditivos testados, interação entre composição da dieta, grupos experimentais e tempo de adaptação à dieta.

Em animais recém-nascidos a administração de probióticos, constituídos por *Lactobacillus*, é capaz de diminuir a incidência de diarreias e aumentar a taxa de crescimento. Potros suplementados com probióticos apresentaram maior peso corporal, cerca de 6% a mais em relação àqueles que não foram suplementados (Yuyama *et al.*, 2004). No caso de potros desmamados, o uso de probióticos também promove um efeito benéfico, aumentando o aproveitamento dos nutrientes fornecidos pela dieta (Moura, 2010).

Em animais atletas, a alta exigência energética ocasionada por treinamentos intensos pode provocar aumento na incidência de cólicas, pois uma maior quantidade de amido não digerido pode chegar ceco e intestino grosso causando rápida fermentação e redução de pH (Moura, 2007). Nesses casos, Medina *et al.* (2002) constataram que a suplementação com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) foi capaz de reduzir a variação do ácido láctico e pH intestinal, tornando os animais mais tolerantes a este padrão de alimentação.

Apesar de uma série de produtos comerciais a base de probióticos serem vendidos para a espécie equina, ainda não existem pesquisas suficientes que justifiquem sua ampla utilização prática, pois os resultados publicados ainda são conflitantes. Mais estudos são necessários visando à elaboração e fornecimento de produtos comerciais criteriosamente avaliados com relação às espécies utilizadas e concentrações adequadas (Moura, 2007).

1.3. O gênero *Lactobacillus*

Com o surgimento de novos patógenos, o reaparecimento de antigos patógenos e o desenvolvimento de linhagens resistentes à múltiplos antimicrobianos, tem crescido o interesse na pesquisa e seleção de linhagens de bactérias lácticas com propriedades probióticas, que possam ser usadas para combater infecções bacterianas (McCoy e Gilliland, 2007). Essas bactérias fazem parte da microbiota intestinal dos mamíferos e fermentam uma variedade de nutrientes em ácido láctico como principal produto. Os principais gêneros pertencentes a esta classe de bactérias são *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera* e *Oenococcus* (Carr *et. al.*; 2002). Estes microorganismos são caracterizados por serem Gram positivo, não esporulantes, majoritariamente catalase-negativo, desprovidos de citocromos, aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos. Porém, a principal característica do grupo é a capacidade de produzir ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (Holzapfel *et al.*, 2001, Axelsson, 2004).

O gênero *Lactobacillus* constitui-se num grupo heterogêneo de bactérias que compreende 213 espécies e 28 subespécies (Euzéby, 2015). De acordo com o Delineamento Taxonômico dos Procariotos (Garrity *et. al.*, 2004), o gênero pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae. Ocupam diversos nichos ecológicos como solo, vegetais e água; trato respiratório, gastrintestinal e urogenital de humanos e animais; e alimentos, especialmente iogurtes, bebidas fermentadas, queijos, carnes e outros (Felis; Dellaglio, 2007; Euzéby, 2015;). Os *Lactobacillus*, descritos por Beijerinck em 1901, são bactérias Gram positivo, não formadores de esporos, com morfologia bacilar ou cocobacilar, fermentadoras, microaerófilas e quimio-organotróficas, que requerem meios ricos para seu crescimento. Além disso, são catalase-negativo, entretanto, atividade de pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens. De forma geral, o genoma dos lactobacilos tem conteúdo GC menor que 54% (Felis e Dellaglio, 2007). São fermentadores de glicose, majoritariamente homofermentativos, em que o produto final é o ácido láctico, mas há representantes heterofermentativos que produzem lactato, CO₂ e etanol em quantidades equimolares.

No intestino, os *Lactobacillus* contribuem com todas as funções benéficas da microbiota indígena para o hospedeiro. Além disso, a redução da população de *Lactobacillus* na microbiota intestinal está associada ao envelhecimento e à disbiose, sendo esta redução fator para desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais ("Inflammatory Bowel

Diseases”) (IBDs) (Woodmansey, 2007). Portanto, os *Lactobacillus* estão intimamente associados à promoção da saúde e do bem-estar do hospedeiro.

A frequência de ocorrência de bactérias lácticas e, portanto de *Lactobacillus*, como bactérias oportunistas é extremamente rara. Além disso, não foram descritas associações dessas bactérias com fatores de virulência conhecidos (Lee e Salminen, 1995; Maassen *et al.* 2003; Lorca e de Valdez, 2009). A International Union of Microbiological Societies concluiu que não existem dados substanciais que relacionam *Lactobacillus* como organismos que representam risco a saúde do hospedeiro (Lee e Salminen, 1995). Esses dados, somados ao uso corriqueiro destes microorganismos na alimentação humana, levaram os *Lactobacillus* a adquirirem o status GRAS (“Generally Recognized as Safe”). Diante disso, e da constatação de efeitos benéficos advindos do uso de *Lactobacillus* na dieta, vários estudos apontam bactérias deste gênero como possuidoras de propriedades probióticas.

Várias linhagens pertencentes ao gênero foram isoladas e têm tido seu potencial probiótico intensamente caracterizado, sendo publicados vários efeitos benéficos advindos da sua utilização. Por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* LC1 (ATCC 53103) possui capacidade de aumentar a imunidade natural; *L. rhamnosus* GG está associado à prevenção de diarreia após tratamento com antimicrobianos, tratamento de diarreia relacionada com a infecção por *Clostridium difficile*, redução dos sintomas da doença de Crohn e possui atividade de adjuvante imune; *L. casei* Shirota tem efeitos descritos na prevenção de distúrbios intestinais além de efeitos anticarcinogênicos (Lee e Salminen, 1995; Maassen *et al.* 2003; Lorca e de Valdez, 2009). Os *Lactobacillus* apresentam em geral antagonismo contra uma variedade de patógenos, tais como *Salmonella enterica* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157 (Cross, 2002). Atividade pró-inflamatória tem sido correlacionada à administração de diferentes linhagens, como por exemplo, *L. casei* Shirota, *L. gasseri* e *L. johnsonii*. Entretanto, efeitos anti-inflamatórios (como redução da produção de IL12, IL6 e TNFA) têm sido observados na associação de *L. reuteri* com células dendríticas *in vitro* (NG *et al.*, 2009). Além disso, os efeitos benéficos associados ao uso de probióticos em sua maioria, também estão associados ao uso de *Lactobacillus*. Os *Lactobacillus* têm sido usados como suplementos alimentares na pecuária (Sandes, 2013, Gaagia *et al.*, 2010; Frizzo *et al.*, 2011). Entretanto, a maior parte dos suplementos usados na nutrição animal são preparações probióticas mistas constituídas de diferentes linhagens de leveduras e bactérias.

1.4 O gênero *Weissella*

1.4.1 Histórico

Trabalhando com bactérias de salsichas gregas, um grupo de pesquisadores percebeu que alguns microrganismos isolados apresentavam características peculiares que não se enquadravam em nenhuma classificação existente (Collins *et. al.*, 1993). Por meio de uma identificação preliminar e por testes bioquímicos as bactérias desconhecidas assemelhavam-se aos microrganismos do gênero *Leuconostoc* pelo tipo de ácido láctico produzido, mas diferiam das espécies deste gênero em várias outras características fisiológicas.

Para esclarecer estes resultados obtidos, os pesquisadores realizaram o sequenciamento do gene 16S de rRNA destas bactérias. As análises dos valores correspondentes às distâncias evolutivas entre os microrganismos desconhecidos e grupos de bactérias do ácido láctico, evidenciaram uma forte relação filogenética entre as cepas isoladas de salsicha, algumas linhagens de *Lactobacillus* e a espécie *Leuconostoc paramesenteroides*. Assim, o gênero *Weissella* foi proposto com o intuito de abranger estes microrganismos, sendo a linhagem desconhecida classificada como *Weissella hellenica* (Viegas, 2008).

A partir destas análises, algumas bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* passaram a ser classificadas como do gênero *Weissella*, assim como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella*.

Antiga Designação	Nova Designação
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus confusus</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	<i>Weissella halotolerans</i>
<i>Lactobacillus kandleri</i>	<i>Weissella kandleri</i>
<i>Lactobacillus minor</i>	<i>Weissella minor</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i>

Fonte: Collins *et al.*, 1993.

1.4.2 Características taxonômicas, morfológicas e metabólicas

O gênero *Weissella* pertence à família Leuconostocaceae, ordem Lactobacillales, classe Bacilli, filo Firmicutes (Collins *et al.*, 1993). Assim como os *Lactobacillus*, também é considerado um grupo de bactérias do ácido láctico, incluindo microrganismos heterofermentadores obrigatórios, com formato de cocos ou bastonetes, Gram positivo, catalase negativo, não esporulantes, microaerófilos e geralmente imóveis (Jang *et al.*, 2002; Amari *et al.*, 2012). O gênero *Weissella* forma um agrupamento monofilético, constituindo um novo táxon inter-relacionado a outros gêneros de bactérias do ácido láctico (**Figura 2**).

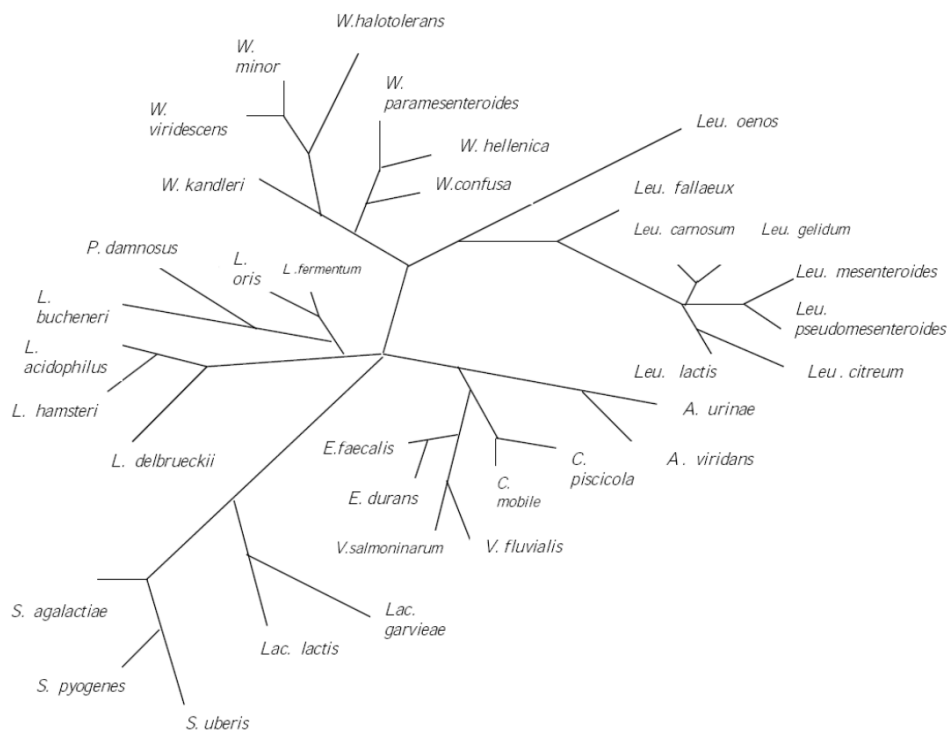


Figura 2. Perfil filogenética das bactérias do ácido láctico.

A, *Aerococcus*; C, *Carnobacterium*; E, *Enterococcus*; L, *Lactobacillus*; Lac, *Lactococcus*; Leu, *Leuconostoc*; P, *Pediococcus*; S, *Streptococcus*; V, *Vagococcus*; W, *Weissella*. Fonte: Collins *et al.*, 1993.

Até o momento, foram descritas 20 espécies de *Weissella* (Euzéby, 2015), isoladas de fontes variadas como o solo, vegetais, carnes, peixes, alimentos fermentados, além do trato gastrintestinal e vaginal humano e de animais (Valerio *et al.*, 2009; Fusco *et al.*, 2011). Além disso, alguns trabalhos já mostraram a possibilidade do desenvolvimento de probióticos a partir de representantes deste gênero (Nam *et al.*, 2002; Lee, 2005; Kang, *et al.*, 2012).

1.4.3 *Weissella* como probiótico

Pesquisas têm demonstrado que as bactérias deste gênero são capazes de prevenir e controlar patógenos bacterianos por meio da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (Espeche *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2012; Serna-Cock *et al.*, 2012).

A cepa *W. kimchii* PL9023, por exemplo, isolada do trato vaginal de uma mulher saudável, demonstrou ter atividade antagonista contra patógenos vaginais como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Lee, 2005).

Em 2010 foi descrito que a aplicação contínua de linhagens de *Weissella* spp. nas glândulas mamárias de vacas leiteiras poderia ser utilizada como uma alternativa viável em relação ao uso de antibióticos para prevenção e controle de mastite bovina, uma vez que os antimicrobianos podem promover resistência bacteriana a longo prazo e afetar negativamente a produção e qualidade do leite (Serna-Cock; Valencia-Hernandez; Campos-Gaona, 2010).

Assim como os *Lactobacillus*, bactérias pertencentes ao gênero *Weissella* são encontradas colonizando os alimentos, plantas e mucosas orais e intestinais de animais e humanos (Euzéby, 2009). Além disso, podem ser encontradas em culturas de sangue e urina e bem como em drenagens ou amostras de vesículas biliares (Björkroth *et al.*, 2002), não sendo descartados potenciais patogênicos a esses microrganismos (Olano *et al.*, 2001). Apesar disso, *Weissella* spp. apresentam potenciais funcionais probióticos, sendo isoladas novas linhagens das mucosas humanas (Lee *et al.*, 2011) e animais (Soto *et al.*, 2010; Ayeni *et al.*, 2011; Alvim, 2015) para utilização como promotor da saúde em seus hospedeiros.

1.5 O Gênero *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* pertence à família Lactobacillaceae e consiste de 15 espécies: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. clausenii*, *P. cellicola*, *P. stilesii*, *P. inopinatus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. dextrinicus*, *P. siamensis*, *P. ethanolidurans*, *P. argentinicus*, *P. halophilus*, *P. lolii*, *P. urinaeequi* (Euzéby, 2015). Os microrganismos pertencentes ao gênero são Gram positivo, catalase-negativo, microaerófilos, homofermentativos e produtores de D-lactato. À microscopia se apresentam morfologicamente como cocos isolados, em pares ou mais comumente em tétrades. Estão presentes em produtos fermentados em geral e em menor

quantidade em produtos lácteos fermentados (Bhowmik e Marth, 1990; Kantor *et al.*, 1997; Nigatu *et al.*, 1998). Dentre as espécies do gênero, podem-se destacar duas delas: *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* que são amplamente usadas na fermentação de vegetais, carnes, massas, sucos de fruta, derivados lácteos e silagem (Bhowmik, Marth, 1990; Luchansky *et al.* 1992; Knorr, 1998; Hudson *et al.*, 2000).

Pediococcus são componentes comuns da microbiota intestinal tanto em humanos quanto em animais (Frizzo *et al.*, 2010) e são reconhecidamente responsáveis por controlar diarreias em crianças (Frizzo *et al.*, 2010), reduzir o número de coliformes no intestino de bezerros (Ellinger *et al.*, 1990; Frizzo *et al.*, 2010), e controlar efeitos de patógenos como *Salmonella* e *Escherichia coli* (Collins e Carter, 1978; Underdhal *et al.*, 1983; Frizzo *et al.*, 2010). Diversos estudos descrevem o potencial probiótico de *Pediococcus* spp., principalmente pela produção de compostos antimicrobianos como as pediocinas. A pediocina PA-1 é uma bacteriocina pertencente à classe IIa (ou família das pediocinas) e devido ao seu amplo espectro antimicrobiano e estabilidade em alimentos tornou-se uma substância de grande interesse industrial e clínico como biopreservativo em virtude de seu potencial probiótico. Bhunia *et al.* (1990) avaliaram aspectos imunológicos da pediocina em coelhos e não constataram potencial imunogênico e nem tóxico, podendo ser aplicada com segurança em alimentos como um biopreservativo. Rodriguez *et al.* (2002) constataram que *P. acidilactici* BA28 produtora de pediocina foi capaz de retardar o crescimento e a colonização estomacal por *H. pylori* em camundongos, além de reverter o processo infeccioso causado pelo patógeno. Dabour *et al.* (2009) avaliando a diferença do efeito protetor frente a infecção por *Listeria monocytogenes* na administração intragástrica de pediocina e na administração oral de *P. acidilactici* constataram que a bacteriocina exerce maiores efeitos benéficos em detrimento da bactéria, quando administrados oralmente em camundongos.

Alguns estudos têm demonstrado o potencial probiótico de *Pediococcus pentosaceus*, especificamente, independente da produção de pediocinas. Choi *et al.* (2003) relataram que a linhagem EROM 101 de *P. pentosaceus* promoveu aumento da resposta imune, além de atividade anticancerígena e propriedades antimicrobianas. Chiu *et al.* (2007) comprovaram que a linhagem MP12 de *P. pentosaceus* foi capaz de antagonizar *in vivo* *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium inibindo as contagens desta bactéria no baço e no fígado de camundongos. Em outro estudo Jonganurakkun *et al.* (2008) verificaram na linhagem *P. pentosaceus* NB-17 um potencial probiótico, por apresentar uma capacidade imunomodulatória e por resistir adequadamente às condições adversas do TGI *in vitro*.

1.6 O Gênero *Salmonella*

1.6.1 História, taxonomia, transmissão e infecção

O gênero *Salmonella* compreende um grupo heterogêneo de microrganismos em forma de bacilos geralmente móveis, Gram negativo, não esporulantes, anaeróbios facultativos e fermentadores de glicose (Hur; Jawale; Lee, 2012). Taxonomicamente, pertencem à família Enterobacteriaceae, Ordem Enterobacteriales, Classe Gammaproteobacteria e Filo Proteobacteria (Pickler, 2012).

Os microrganismos deste gênero são fermentadores de glicose, mas são geralmente incapazes de fermentar a lactose e a sacarose. O pH ótimo para a sua multiplicação é próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. A temperatura ideal de crescimento encontra-se na faixa de 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. A designação do gênero *Salmonella* foi adotada em 1900 por Lignières, em homenagem a Daniel Elmer Salmon, médico veterinário norte-americano responsável por isolar do intestino de suínos a primeira espécie do gênero, *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis, em 1886 (Griffith, Schwartz e Meyerholdz, 2006).

Atualmente, são descritas duas espécies e algumas subespécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (subespécies enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica, bongori, choleraesuis). Em cada subespécie são reconhecidos diferentes sorovares com base na caracterização de seus antígenos somáticos e flagelares, totalizando 2.610 sorovares (Tindal *et al.*, 2005; Guibourdenche *et al.*, 2010).

A transmissão para o hospedeiro ocorre, principalmente, por meio da ingestão de cepas patogênicas de *Salmonella* spp. por meio do consumo de água e/ou alimentos contaminados (Shinohara *et al.*, 2008; Mastroeni; Grant, 2011).

A *S. enterica* infecta o hospedeiro usualmente através da rota oral. No intestino delgado, a *Salmonella* invade principalmente as células M, coloniza as placas de Peyer e ganha acesso tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Outras rotas de invasão são usadas pela *Salmonella* como os enterócitos e células dendríticas. Atingindo o tecido linfóide, a *Salmonella* invade principalmente os fagócitos residentes, nos quais a bactéria sobrevive e se replica. Essas células-alvo acabam servindo também como veículos, através dos quais ela se espalha pelo corpo (Raupach; Kaufmann, 2001). A translocação bacteriana é definida como a passagem de bactérias viáveis a partir do TGI para os nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos extra-intestinais como o fígado, baço e sangue. Esta passagem acontece através das células M, podendo ocorrer entre enterócitos que sofreram

alguma injúria (Schley; Field, 2002; Gatt, Reddy; Macfie, 2007). A capacidade de translocação é considerada o principal fator responsável pela patogenicidade e infectividade de *S. Typhimurium* (Gill *et al.*, 2001).

Além de ser um problema de saúde pública, *S. enterica* pode causar doenças fatais em animais domésticos, gerando perdas econômicas (Mastroeni e Grant, 2011). Existem duas principais manifestações clínicas associadas com a infecção por *S. enterica*: a febre tifóide (doença sistêmica) e a salmonelose não tifóide (uma doença gastrointestinal conhecida como enterite aguda) (Layton; Galyov, 2007). *S. enterica* sorovar Typhi e Paratyphi apresentam infectividade restrita aos primatas e causam a febre tifóide. Os sintomas associados a essa patologia são febre progressiva, dor abdominal, diarreia não-sanguinolenta e sudorese. *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis causam, em humanos, gastroenterites não-tifóides. Porém, a infectividade destes sorovares não é restrita aos primatas, sendo capazes de colonizar diferentes hospedeiros.

1.6.2 Tratamento da salmonelose e modelo experimental

O tratamento da salmonelose, classicamente, envolve a utilização de antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas. Porém, o uso terapêutico e como promotor de crescimento de fluoroquinolonas em animais de produção acarretou um aumento do número de infecções por *Salmonellas* resistentes. Além disso, constatou-se que a resistência do tratamento com esta droga começou a tornar-se frequente. O posterior aparecimento de linhagens de *Salmonella* multi-resistentes, MDR (multidrug-resistant), agravou a situação, devido à limitação de tratamento contra as infecções em seres humanos (WHO, 2012).

Diante deste cenário, o uso de probióticos tem sido apontado como uma possível bacterio-profilaxia contra a infecção por *Salmonella*, devido ao efeito protetor conferido por algumas linhagens probióticas frente ao desafio em camundongos com *Salmonella* (Cross, 2002). A proteção conferida pelos probióticos no modelo experimental de salmonelose murina é provavelmente atribuída à combinação de dois mecanismos: a produção de substâncias antibacterianas contra *Salmonella* e o aumento da resposta imune do hospedeiro contra a infecção, observada pelo incremento da produção de anticorpos IgA específicos contra o patógeno na mucosa intestinal, bem como aumento da atividade de células do sistema imune (Perdigón *et al.*, 1990a; Bernet-camard *et al.*, 1997). A utilização da mistura *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei* causou efetiva redução na translocação dos patógenos para o fígado e o baço, o que levou à sobrevivência de todos os animais desafiados (Perdigón *et al.*, 1990b). Resultados similares foram encontrados por Gill *et al.*

(2001), com efeito protetor conferido pelo pré-tratamento com *L. rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium lactis* HN019 contra o desafio oral de camundongos por *Salmonella*.

A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium é um patógeno natural de roedores, promovendo nos animais lesões muito semelhantes às observadas em vítimas humanas de febre tifóide. Assim, as interações desta bactéria com seu hospedeiro natural, como os camundongos, são consideradas o melhor modelo experimental para o estudo deste enteropatógeno (O'Brien, 1982).

Os camundongos infectados por *S. Typhimurium* desenvolvem uma doença sistêmica, cuja cinética encontra-se bem estabelecida. Inicialmente, ocorre uma rápida eliminação de bactérias, havendo, então, a instalação destas no fígado e baço, onde se replicam nas células fagocitárias, promovendo hepato e esplenomegalia, respectivamente. Posteriormente, há o reconhecimento do microrganismo, por intermédio das células fagocíticas, pelo sistema imune inato por meio dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), o que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNFA, IL1, IL6, IL12 e IFNG) e uma infiltração de monócitos e neutrófilos nos locais de inflamação. Na última fase do processo infeccioso, mecanismos efetores da imunidade adaptativa são gerados, fazendo intervir as células B e T, e os títulos de anticorpos anti-*Salmonella* aumentam (Grassl e Finlay, 2008).

O desafio experimental de *S. Typhimurium* em camundongos constitui um excelente modelo de estudo para compreensão da infectividade e patogenicidade deste enteropatógeno, permitindo a identificação de fatores de virulência, bem como viabilizando as possíveis formas de prevenção e tratamento da salmonelose, tanto em animais quanto em humanos (Santos *et al.*, 2001).

1.6.3 Salmonelose em equinos

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial. A *Salmonella* é uma enterobactéria encontrada em diferentes espécies animais, apresentando ampla distribuição e permanência no ambiente, podendo causar doenças fatais, gerando perdas econômicas (Weiss *et al.*, 2002; Mastroeni; Grant, 2011). Todos estes fatores contribuem para que este microrganismo assuma um papel importante na saúde pública, sendo a terceira zoonose mais descrita no Brasil, segundo dados da divisão de epidemiologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013).

A infecção por *Salmonella* é a causa mais comum de diarreia aguda nos potros, levando-se em consideração que 80% dos potros apresentam pelo menos um episódio até os seis meses de idade (Jones; Spier, 2000; Melo *et. al.*, 2007). A salmonelose pode produzir surto de bacteremia, diarreia, choque séptico e morte, especialmente em potros mais jovens que oito dias de idade. O diagnóstico, o tratamento e o manejo da salmonelose representam um desafio ao veterinário.

Os princípios da terapia da salmonelose incluem reposição das perdas de líquidos e eletrólitos, controle da inflamação colônica e redução da secreção líquida, controle da endotoxemia e da sepse e restabelecimento da microbiota normal. O tratamento com antimicrobianos em equinos com salmonelose é controverso. Não se considera que os tratamentos com antibióticos alterem o curso da enterocolite. O cloranfenicol e a gentamicina são os dois mais utilizados no tratamento da salmonelose em equinos (Duijkeren *et al.*, 1995; Jones; Spier, 2000).

A manutenção da microbiota bacteriana e o antagonismo de bactérias patogênicas como a *Salmonella* no TGI são importantes mecanismos de defesa na prevenção da colonização por bactérias patogênicas. Preparados probióticos e outros destinados ao restabelecimento da microbiota normal no trato gastrintestinal são utilizados clinicamente para encurtar o curso da salmonelose com resultados variáveis (Parraga *et. al.*, 1997; Jones e Spier, 2000). Espera-se com este trabalho, encontrar uma bactéria láctica que tenha potencial probiótico de prevenção e proteção contra a salmonelose para futuro uso em equinos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Isolar bactérias lácticas adaptadas ao ecossistema gastrointestinal de potros lactentes e não lactentes e selecionar novas linhagens com características fisiológicas desejáveis em probióticos, para uso na suplementação alimentar, como promotores de crescimento ou como adjuvantes imunológicos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Isolar bactérias lácticas do trato gastrointestinal de potros lactentes e não lactentes e identificá-las molecularmente ao nível de espécie e linhagem.

2.2.2. Caracterizar *in vitro* as novas linhagens de bactérias lácticas de acordo com as seguintes propriedades funcionais desejáveis em probióticos:

- tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares;
- alta hidrofobicidade da superfície celular;
- capacidade antagonista contra patógenos Gram positivo e Gram negativo;
- ausência de resistência aos antimicrobianos associada a elementos genéticos móveis.

2.2.3. Selecionar as linhagens de bactérias lácticas com melhores respostas frente aos testes de caracterização *in vitro* para realização dos ensaios *in vivo* em camundongos convencionais, desafiados ou não com *Salmonella enterica* sor. Typhimurium:

- determinar a variação de peso e taxa de mortalidade;
- analisar os índices hepático e esplênico;
- avaliar os aspectos histológicos do fígado;
- determinar o padrão de resposta celular por RT-qPCR pela quantificação relativa de mRNA para citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

3. Material e Métodos

3.1 Isolamento de bactérias lácticas de equinos

Duas coletas de fezes foram realizadas, sendo a primeira de três animais da raça Mangalarga Machador de aproximadamente um ano de vida na Fazenda Recanto do Paraíso no município de Baldin, MG, e a segunda em dois animais da raça Mangalarga Machador de aproximadamente um mês de vida em uma fazenda no município de Passatempo, MG. As fezes destes cavalos jovens (potros de no máximo um ano de vida) foram transportadas em gelo e processadas no laboratório em até 24 horas para o isolamento de bactérias lácticas. As amostras foram suspensas e homogeneizadas com bastão de vidro em função do peso, numa diluição 10^{-1} em salina estéril. A partir desta diluição foram feitas novas diluições decimais em salina. A partir destas diluições foi usada uma alíquota de 0,1 ml para semear uma placa de Petri contendo meio ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos). Após espalhar o inóculo com alça de Drigalski esterilizada, as placas foram incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂) durante dois dias. Posteriormente, foram feitas as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) e o isolamento de colônias. Numa placa contendo em torno de 100 UFC, as colônias morfológicamente diferentes e mais significativas do ponto de vista populacional foram repicadas a partir do ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) em caldo MRS e crescidas em anaerobiose como acima.

3.2. Identificação ao nível de espécie por ARDRA ou sequenciamento 16S rRNA

As bactérias isoladas foram triadas por observação microscópica após coloração de Gram e teste de catalase. Para os isolados Gram-positivo e catalase-negativo, a identificação do gênero e espécie foi realizada por uma análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) das regiões 16S-23S do RNA ribossômico amplificado (PCR-ARDRA) (Moreira *et al.*, 2005, Sandes *et al.*, 2014). O espaçador interno transcrito 1 (ITS1) foi amplificado utilizando 10 pmols de cada um dos iniciadores 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCATTCGGA 3') como descrito por Tilsala *et al.* (1997), PCR Master Mix (Promega) na concentração de uma vez e 100 ng de DNA genômico. A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 minutos). Os amplicons obtidos foram submetidos

à restrição utilizando 12 enzimas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) de acordo com o fabricante e incubados por 2 horas a 37° C.

As bactérias que não apresentaram perfil de DNA compatível com os existentes para diversas espécies de *Lactobacillus*, como descrito por Sandes *et al.* (2014), foram submetidos à uma reação de PCR da região 16S do rRNA com 10 pmols dos iniciadores 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') e 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') como descrito por Reysenbach *et al.* (2000). A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) após a desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 minutos). Os amplicons foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA) e enviados para o sequenciamento no Laboratório Myleus Biotechnology (<http://www.myleus.com.br>).

3.3. Identificação ao nível de linhagem por rep-PCR (GTG)₅

A fim de identificá-las ao nível de linhagens, as bactérias isoladas de fezes de potros jovens foram submetidas à reação de rep-PCR (repetitive extragenic polymorphic-based polymerase chain reaction) fingerprinting usando iniciadores (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') de acordo com Versalovic *et al.* (1994). As condições da PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 200 pmol do oligonucleotídeo, 0,125 U/µL Taq DNA polimerase (Promega), 0,001% de gelatina e tampão de reação (pH 8,5). Por fim, os ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: um ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e finalmente um ciclo de 72°C por 10 minutos. Para a visualização dos padrões de bandas das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram resolvidos em gel de poliacrilamida (8%) e corados com nitrato de prata (Solução fixadora de Ácido Acético 0,5% e Etanol 10%, Solução de Nitrato de Prata 0,1%, Solução Reveladora de Formaldeído 0,1% e Hidróxido de Sódio 1,5%).

3.4. Caracterização probiótica funcional *in vitro*

Todos os experimentos para caracterização funcional dos isolados foram realizados três vezes independentemente, em triplicata, com exceção dos testes de antagonismo e antibiograma, conduzidos duas vezes em duplicata. Após os testes de caracterização das

amostras quanto às propriedades desejáveis funcionais em linhagens probióticas (resistência ao pH ácido e aos sais biliares do TGI, exclusão competitiva de microorganismos patogênicos, potencial de adesão à mucosa intestinal e resistência aos antibióticos) foram selecionadas as linhagens com maior potencial probiótico.

3.4.1. Linhagens de bactérias lácticas testadas

Um isolado pertencente a cada uma das linhagens bacterianas, separadas pelo padrão de bandas único de rep-PCR com primers GTG₅, foi avaliado nos testes *in vitro* de caracterização probiótica. Os resultados obtidos nestes testes de caracterização funcional foram considerados similares para aquelas bactérias de uma mesma linhagem.

3.4.2. Reativação das bactérias criopreservadas

Antes de iniciar cada um dos testes de caracterização funcional, as bactérias isoladas que estavam estocadas a -80°C foram ativadas por meio de duas passagens em caldo MRS a partir de um inóculo de 2% (v/v). Em cada uma das passagens os isolados foram mantidos em estufa por 18 horas a 37°C para o crescimento.

3.4.3. Resistência ao suco gástrico artificial

O teste de resistência a ácidos, baseado em Neumann *et al.* (1991), foi adaptado para microplacas de acordo com Silva *et al.* (2013). Culturas de bactérias lácticas em fase estacionária foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,9% pH 7,0 e em 1 mL de suco gástrico artificial (NaCl 2 g.L⁻¹, pepsina 3.2 g.L⁻¹, pH 2.5) e incubadas a 37°C por 3h. Posteriormente, a solução salina 0,9% e o suco gástrico artificial foram desprezados e os sedimentos bacterianos ressuspensos com 1 mL de caldo MRS. As culturas foram novamente inoculadas a 2% em caldo MRS em uma microplaca em triplicata que foi incubada em um Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 (Molecular Devices, CA, USA) a 37°C por 18 horas. A OD_{620nm} foi determinada a cada 30 minutos. O cálculo da área sob a curva de crescimento para cada gráfico (controle salina e teste suco gástrico artificial) foi realizado no programa OriginPro 8.5 (OriginLab) para se obter a percentagem de inibição de crescimento: $(1 - \text{areaT}/\text{areaC}) \times 100$

3.4.4. Tolerância aos sais biliares

O teste de sensibilidade aos sais biliares foi feito de acordo com Walker e Gilliland (1993) adaptado para microplacas conforme Silva *et al.* (2013). Inicialmente os isolados de bactérias lácticas em fase estacionária foram submetidos a um inóculo de 2% em caldo MRS contendo ou não 0,3% de oxgall (Oxoid Co.) em uma microplaca. A OD_{620nm} foi determinada em intervalos de 30 minutos durante 18 horas de incubação a 37°C no Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340. O cálculo da área sob a curva de crescimento para cada gráfico (controle salina e teste sais biliares) foi realizado no programa OriginPro 8.5 para se obter a percentagem de inibição de crescimento: $(1 - \text{areaT}/\text{areaC}) \times 100$.

3.4.5. Hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada através da medida do MATS (microbial adhesion to solvents) conforme descrito em Pelletier *et al.* (1997), Kos *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2013). Culturas de bactérias lácticas em fase estacionária foram lavadas duas vezes com salina tamponada e ajustadas para uma OD_{600nm} de 0,6 com 0,1M de KNO₃, pH 6.2 (A0). Um volume de 0,2 mL de xileno foi adicionado a uma suspensão de 1,2 mL de células e após 10 minutos de pré-incubação a temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas em vortex por 2 minutos. A fase aquosa foi removida após 30 minutos e sua OD_{600nm} medida (A1). A percentagem de MATS foi calculada $(1 - A1/A0) \times 100$.

3.4.6. Antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos

O procedimento se deu segundo metodologia de Gomes *et al.* (2006) Branco *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2013). Placas contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) 1,5% foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4°C e em seguida incubadas durante 12 horas a 37°C. Cinco µL das bactérias isoladas ativadas foram inoculados em ágar MRS 1,5%, mantendo um spot definido e foram incubados por 18 horas em aerobiose a 37°C. Em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia) sete bactérias patogênicas – *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 – foram ativadas com inóculo de 2% e crescidas a 37°C durante 18 horas, com dois repiques

subsequentes realizados. Os sete patógenos ativados em caldo BHI foram inoculados a 0,5% v/v em BHI semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico) e foram vertidos sobre as placas contendo as bactérias láticas previamente mortas com vapor de clorofórmio (2 ml em papel filtro), formando uma sobrecamada. Um outro patógeno *Streptococcus equi zooepidemicus*, isolado das fezes de equinos, foi ativado em caldo MRS com inóculo de 2% v/v e crescido a 37°C durante 18 horas, com dois repiques subsequentes realizados. Foi, posteriormente, inoculado a 0,5% em MRS semi-sólido (0,75% de ágar bacteriológico) e vertido sobre as placas contendo os lactobacilos mortos com vapor de clorofórmio (2 mL em papel filtro), formando uma sobrecamada. As placas contendo os oito patógenos inoculados foram incubadas a 37°C durante 24 horas em aerobiose. A atividade antagonista foi avaliada medindo-se os halos de inibição, com um paquímetro, após incubação das placas. O resultado do teste de antagonismo foi considerado positivo para halos de inibição maiores que 10 mm.

3.4.7. Antibiograma

O antibiograma foi realizado através do método de difusão em disco como descrito por Silva *et al.* (2013). Os isolados foram mantidos em crescimento em ágar MRS durante 24 horas a 37°C. Em seguida a turbidez das amostras isoladas foi ajustada em salina 0,9% de acordo com a escala nefelométrica de McFarland equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro – referente ao tubo de número 0,5 da escala. As amostras ajustadas foram espalhadas em placas de Petri contendo ágar MRS com o auxílio de zaragatoa estéril, cobrindo totalmente a superfície do meio. Em seguida os discos com os antimicrobianos – Amicacina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cloramfenicol (30 µg), Eritromicina (15 µg), Penicilina (10 U), Oxacilina (1 µg) e Vancomicina (30 µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) – foram depositados sobre a superfície das placas e incubados durante 48 horas à 37°C. Os halos de inibição de crescimento foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda., Santo Amaro, Brasil) e os isolados foram categorizados para cada um dos antibióticos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes de acordo com Charteris *et al.* (1998) (**Anexo I**).

3.5. Caracterização probiótica funcional *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos no Biotério de Experimentação (NB2) do Departamento de Biologia Geral, locado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5.1. Animais

Camundongos da linhagem BALB/c, de quatro a seis semanas de idade com peso variando de 16 a 24 g, de ambos os sexos, foram utilizados nos estudos *in vivo*. Os animais receberam ração comercial (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água autoclavada *ad libitum*, sendo mantidos em mini-isoladores Alesco (Modelo ALE. MIL.01.03, Monte Mor, São Paulo, Brasil) acoplados em estantes ventiladas (Alesco, ALERKD-70).

Os experimentos foram realizados, respeitando-se as características biológicas e fisiológicas dos camundongos, a fim de manter o bem-estar animal durante todos os procedimentos. A manutenção dos animais no biotério apresenta um ciclo diurno/noturno de 12 horas, temperatura de 21-22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), água e ração *ad libitum* e a troca dos isoladores era realizada a cada três dias, a fim de permitir a troca de ar e impedir o acúmulo de amônia.

A pesquisa aqui apresentada está certificada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolado sob o número 203/2009, aprovado em 09/12/2009 (**Anexo II**). Além disso, todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2013).

3.5.2. Microorganismos

3.5.2.1. *Pediococcus pentosaceus* linhagem 40 e *Weissella confusa* linhagem 1

Após a caracterização probiótica *in vitro* das BAL, as linhagens *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1 foram selecionadas para os testes *in vivo*. A manutenção e ativação dos isolados antes da realização dos procedimentos foram realizadas como descrito no item 3.3.2.

3.5.2.2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium

O desafio experimental foi realizado utilizando-se uma linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium de origem humana mantida no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos (LEFM/ICB/UFMG). O patógeno foi isolado na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brasil) e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli. Os microorganismos patogênicos foram conservados em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Sparks, EUA) adicionados de glicerol esterilizado (30%) a -80°C em Deep Freezer (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, EUA). Antes dos experimentos, as bactérias foram ativadas por duas passagens em caldo BHI, sendo mantidos em aerobiose por 18h a 37°C para crescimento.

3.5.3. Tratamento dos animais com as bactérias lácticas, desafio dos animais com *Salmonella*, ensaio de mortalidade e variação do peso ao longo do experimento

Os camundongos foram divididos em quatro grupos compostos por dez animais cada, de ambos os sexos, que foram submetidos a diferentes tratamentos, por via intragástrica, durante trinta e nove dias. O protocolo de tratamento e infecção foi dividido em três fases: tratamento pré-desafio (1° ao 10° dia), desafio (11° dia) e tratamento pós-desafio (12° ao 39° dia), conforme descrito no **Quadro 1**. Os animais sobreviventes foram eutanasiados logo após o tratamento, no 39° dia. A variação do peso promovida pelos diferentes tratamentos foi avaliada a partir da pesagem dos camundongos no início (Dia 1) até o final do experimento (Dia 39), os camundongos foram pesados a cada dois ou três dias.

Os grupos experimentais tratados (desafiados ou não desafiados) receberam diariamente por gavagem um inóculo de 10^8 UFC de *P. pentosaceus* 40 ou *W. confusa* 1, enquanto os grupos controles (não tratados) foram inoculados com 0,1 mL de solução salina (0,9%).

O desafio experimental foi realizado pelo inóculo de uma dose de 10^6 UFC de *S. Typhimurium* no 11° dia, por via intragástrica, preparado a partir de uma cultura ativada por duas passagens em meio BHI, crescida por 18 horas a 37°C, submetida a diluições sucessivas em salina autoclavada. A viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas foram confirmadas pelo plaqueamento em ágar MacConkey (Difco), após 24 horas de incubação a 37°C. Os grupos não desafiados, ao invés do inóculo de *S. Typhimurium*, receberam 0,1 mL de solução salina (0,9%), também por via intragástrica.

A capacidade de *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1 de proteger os camundongos contra o desafio experimental por *S. Typhimurium* foi avaliada durante 28 dias após o desafio. Para isso, os animais do grupo desafiado e tratado (Desafio + p40 ou Desafio + W1) foram comparados aos do grupo desafiado e não tratado (Desafio), a fim de avaliar a taxa de sobrevivência decorrente da infecção com o patógeno utilizado.

Quadro 1. Grupos experimentais - esquema de tratamento com *P. pentosaceus* 40 (p40) ou *W. confusa* 1 (W1) e desafio com *Salmonella* Typhimurium em animais convencionais.

Grupos	Dias (Tratamento)
Controle	10 (salina 0,9%) + 1 (salina 0,9%) + 28 (Salina 0,9%)
p40 ou W1	10 (p40 ou W1) + 1 dia (salina 0,9%) + 28 (p40 ou W1)
Desafio	10 (salina 0,85%) + 1 (<i>Salmonella</i>) + 28 (Salina 0,9%)
p40 ou W1 + Desafio	10 (p40 ou W1) + 1 (<i>Salmonella</i>) + 28 (p40 ou W1)

3.5.4. Eutanásia

Ao final do período experimental os camundongos sobreviventes foram anestesiados intraperitonealmente com Quetamina (100 mg/kg de peso) e Xilasina (20 mg/kg de peso) (Syntec, Cotia, Brasil) e, posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical. Os animais foram submetidos à laparotomia em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas, para coleta de baço e fígado.

3.5.5. Determinação dos índices hepático e esplênico e análise histopatológica do fígado

Em outro experimento, os dez animais de cada grupo foram sacrificados no décimo dia após o desafio (21º dia) com *S. Typhimurium* e os pesos do fígado e baço foram registrados para determinação do índice hepático e esplênico, respectivamente, sendo os resultados expressos como peso do órgão (mg) por peso corporal (g) (Zhou *et al.*, 2000; Steinberg, 2014). No final, três animais de cada um dos quatro grupos tiveram os lóbulos maiores dos fígados removidos para posterior análise histopatológica. Exames histológicos foram realizados em amostras do lóbulo maior do fígado de três camundongos convencionais por grupo de experimentação, referente apenas aos animais tratados ou não com *P. pentosaceus* 40 e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (controle, p40, desafio e p40 + desafio). As amostras de fígado foram destinadas à rotina histológica para inclusão em

parafina, seguido de microtomia (dois cortes de secções histológicas consecutivas com 4 µm de espessura) e coloração com Hematoxilina e Eosina para estudos morfológicos. As imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de uma vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente por uma mesma patologista (Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG) que não teve acesso ao significado dos códigos, sendo as amostras decodificadas apenas após o laudo ter sido emitido. Um valor numérico foi atribuído para as mudanças observadas no fígado (áreas de alterações degenerativas no parênquima e infiltrado inflamatório) e cada animal recebeu um valor de score como descrito por Mathur *et al.* (2012). As lâminas de fígado foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: 0 (sem alterações nos hepatócitos ou na arquitetura tecidual; celularidade normal), 1 (presença de discretos focos inflamatórios, máximo de 1 por campo de 10 X, associado a congestão de vasos da lâmina própria), 2 (focos inflamatórios mais visíveis 1 a 2 por campo 10X, associado a alterações discretas hepatócitos), 3 (Focos inflamatórios em número de 3 ou mais por campo de 10X com moderadas alterações degenerativas, tais como vacuolização hepatocitária), 4 (Focos coalescidos de infiltrado inflamatório associado a intensas alterações degenerativas dos hepatócitos; intensa vacuolização intracelular). Os resultados dos scores de cada grupo foram expressos como a média dos scores dos três animais avaliados e seus respectivos desvios padrões.

3.5.6. Cinética do tratamento com a bactéria láctica para avaliação imune

Oitenta animais convencionais, de ambos os sexos, foram divididos em grupos tratados e não tratados com *P. pentosaceus* 40 em dois experimentos independentes. Em um grupo experimental os animais receberam um inóculo diário por via intragástrica de 10^8 UFC de *P. pentosaceus* 40 por até dez dias. Em outro grupo experimental os animais foram usados como controles negativos e receberam inóculo diário de solução salina 0,9%. Dez animais de cada grupo foram sacrificados 1, 4, 7 e 10 dias após o primeiro dia de inóculo intragástrico. Fragmentos de 1-2 cm de porções proximal, medial e distal do intestino

delgado foram removidos e estocados em RNA later e congelados a -20°C para posterior extração de RNA.

3.5.7. Extração de RNA total, tratamento para remoção de DNA genômico e produção de cDNA a partir de tecido das porções do intestino dos animais

O protocolo de extração de RNA total, para todos os materiais biológicos, foi realizado usando o reagente TRIZOL[®] seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, para avaliação do estado de degradação e foi quantificado por espectrometria usando o equipamento NanoDrop (Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Foram utilizadas amostras que apresentaram quantificação acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ de RNA, relação de A260/A280 entre 1,7-2,1 e uma relação geral de 2x de intensidade da banda do rRNA 28S em relação a banda do rRNA 18S nos géis de eletroforese. 10 μg de RNA total obtido de amostras das diferentes porções intestinais foi submetido à remoção de DNA genômico usando o kit Turbo DNase I (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total tratado foi usado em reações de Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) para produção de cDNA usando o kit High Capacity (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações de transcrição reversa foram feitas no mesmo dia e com o mesmo lote de reagentes. Foi utilizado 1 μg de RNA para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20°C .

3.5.8. Quantificação relativa da expressão de citocinas nas porções inicial, medial e distal do intestino delgado usando RT-qPCR

Para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas IL6, IL10, IFNG, TGFB e TNFA, em amostras de cDNA oriundas de RNA total obtido de tecido intestinal, foi realizada amplificação do cDNA por RT-qPCR. As reações de RT-qPCR foram feitas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Life Techonologis, Grand Island, NY, USA). As reações foram realizadas usando o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Techonologis), primers para cada gene como descrito por Giulietti *et al.* (2001) e o cDNA obtido do RNA total das diferentes porções intestinais. Os dados de expressão do grupo controle com salina do primeiro dia de tratamento foram usados como calibrador para os experimentos em animais. Os resultados foram expressos graficamente usando média e desvio-padrão dos valores do

nível relativo de mRNA de cada citocina pelo fator de normalização, este último dado pela média geométrica das quantidades relativas de mRNA de Gapdh e Actb, para cada grupo experimental.

3.5.9. Análise estatística

Para a produção de todos os gráficos e análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o software GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software Inc.). Os valores obtidos foram avaliados pelo teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade das distribuições. As amostras paramétricas foram submetidas às análises de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo pós-teste de Tukey, para verificar se estas eram diferentes significativamente. As amostras não paramétricas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. As curvas de mortalidade em animais convencionais tratados ou não com *Weissella* ou *Pediococcus* e desafiados com *Salmonella* foram avaliadas pelo teste Log-Rank (Mantel-Cox). Em todos os testes foram considerados como diferença estatística os valores com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$), sendo obtidos as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação de todos os dados. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais foram identificadas nos gráficos com letras diferentes localizadas acima da barra de desvio-padrão.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento de bactérias lácticas e caracterização morfológica

Das amostras de fezes dos cinco potros foram isoladas 54 bactérias que cresceram no meio MRS em anaerobiose a 37°C. Estas foram selecionadas de acordo com as características morfológicas (coloração de Gram e forma bacilar) e fisiológicas (catalase), sendo 33 bactérias caracterizadas como Gram positivo e catalase negativo, pressuposto de bactérias lácticas.

4.2 Identificação Molecular

As metodologias para identificação molecular das bactérias lácticas foram ARDRA dos espaçadores intergênicos 16S-23S rRNA (Sandes *et al.*, 2014), capaz de identificar 41 das 213 espécies de *Lactobacillus* (Euzéby, 2015), e sequenciamento do gene 16S rRNA para os demais gêneros. O método de ARDRA se baseia na presença de inserções gênicas (tRNAs) na região do espaçador transcrito da região 16S e 23S rRNA (ITS-1). A amplificação desta região genômica é capaz de separar os gêneros de bactérias lácticas em três grupos: por exemplo, *Streptococcus* e *Lactococcus* com um único espaçador, *Enterococcus* com dois espaçadores de tamanhos diferentes, e *Lactobacillus*, *Weissella* e *Pediococcus* com três espaçadores de tamanhos diferentes. Deste modo, 30 bactérias apresentaram três espaçadores, prováveis espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella*, e as outras três bactérias apresentaram dois espaçadores, possivelmente pertencendo ao gênero *Enterococcus* (**Figura 3 e 4**).

Para a identificação ao nível de espécie das 30 bactérias com amplificação de três espaçadores intergênicos, as amostras foram digeridas com endonucleases de restrição que reconhecem sítios específicos gerando perfis polimórficos do tipo RFLP. Doze enzimas de restrição foram utilizadas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HindII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) e com elas foi possível afiliar 12% das bactérias em duas espécies de *Lactobacillus* (*L. reuteri* e *L. crispatus*) de acordo com Sandes *et al.* (2014) (**Tabela 2**). Os isolados pertencentes as demais espécies não puderam ser identificados através dos perfis de restrição, pois não apresentaram perfis compatíveis com os já conhecidos ou descritos (Sandes *et al.*, 2014). Estes isolados foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA. Após o sequenciamento, os isolados de números 10, 14 e 22 foram classificados

como pertencentes à espécie *Enterococcus casseliflavus*, enquanto os isolados 28 e 33 foram classificados como *Lactobacillus equi*, e os isolados 26, 27 e 40 foram classificados como *Pediococcus pentosaceus*. Desta forma, ao final da identificação molecular de todas as bactérias lácticas isoladas, foi possível identificar 6 diferentes espécies com a seguinte abundância: *Weissella confusa* (64%), *P. pentosaceus* (9%), *E. casseliflavus* (9%), *L. reuteri* (6%), *L. crispatus* (6%) e *L. equi* (6%) (**Figura 3**).

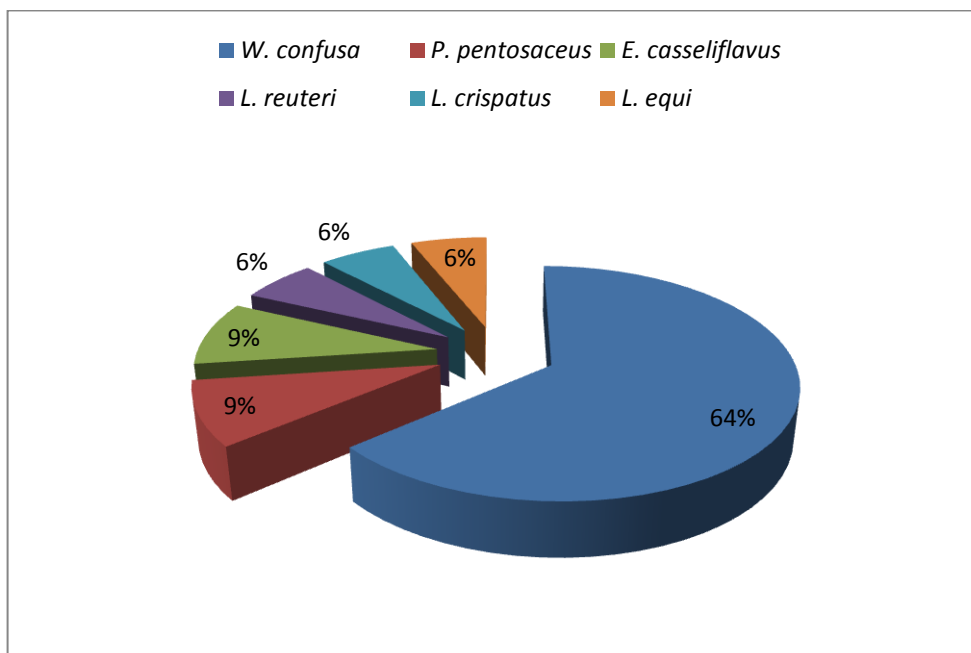


Figura 3: Diversidade de espécies de bactérias lácticas isoladas de fezes de equinos.

A **Figura 3** mostra as espécies bacterianas isoladas durante este trabalho. As três espécies de *Lactobacillus* isoladas no presente estudo já haviam sido detectadas anteriormente em fezes de equinos por outros pesquisadores: *L. equi* (Morotomi *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2009), *L. crispatus* e *L. reuteri* (Morotomi *et al.*, 2002). A espécie *L. equi* segundo a literatura até o momento é tida como exclusiva da espécie equina (Morotomi *et al.*, 2002). Espécies do gênero *Enterococcus* provenientes de fezes de cavalos foram descritas por Niederhäusern *et al.* (2007), incluindo linhagens de *E. casseliflavus*, como encontrado no presente estudo. Este resultado concorda com os resultados de Endo *et al.* (2009), onde a espécie *W. confusa* foi uma das predominantes em fezes de equinos de 4 a 15 anos de idade, juntamente com bactérias de *L. johnsonii*, *L. equi* e *L. hayakitensi*.

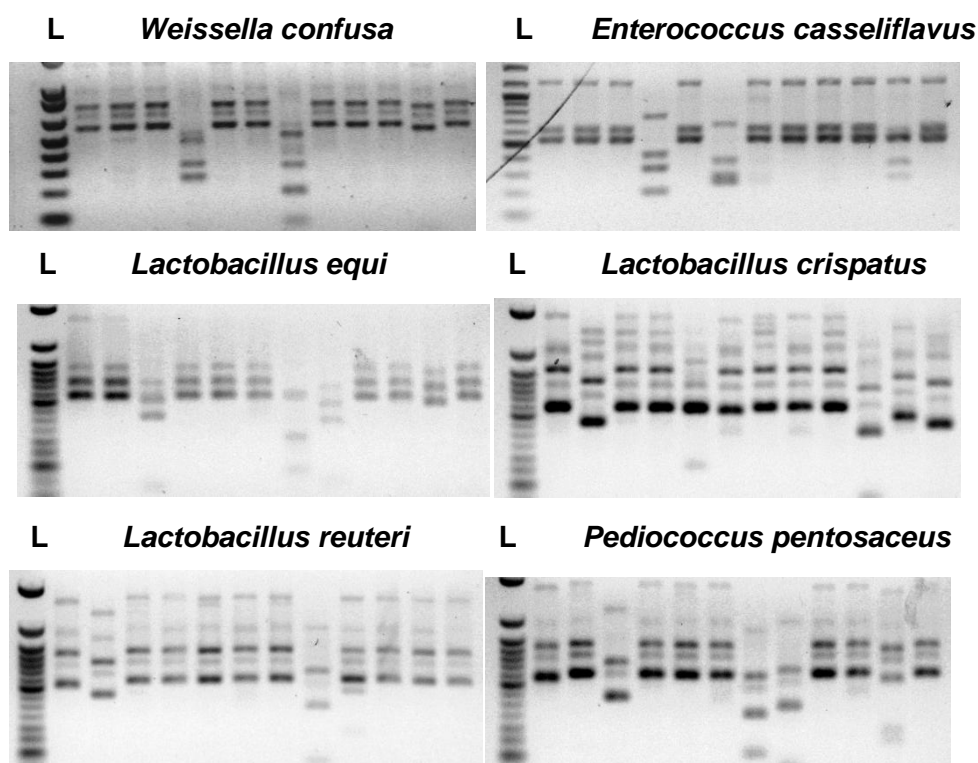


Figura 4: Perfis de restrição enzimática dos isolados de fezes de equinos ao nível de espécie. *P. pentosaceus*, *Enterococcus casseliflavus* e *Lactobacillus equi* tiveram sua identificação confirmada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Da esquerda para direita, L, *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *Csp45I*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*. L: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Bactérias isoladas do mesmo animal foram testadas quanto à possibilidade de serem geneticamente relacionadas através da técnica de rep-PCR (“genomic fingerprinting repetitive sequence-based polymerase chain reaction”) usando iniciadores GTG₅. Trata-se de uma metodologia rápida, de fácil execução e reprodutível para diferenciação de microorganismos em nível de espécies, subespécies e potencialmente em nível de linhagens de microorganismos (Gevers *et al.*, 2001). Se o padrão de bandas obtido for idêntico para dois diferentes microorganismos, estes podem, portanto, ser considerados como pertencentes à mesma linhagem. O fingerprinting GTG₅ separou as 33 bactérias lácticas isoladas dos cinco potros em 18 diferentes linhagens (**Figuras 5 e 6**). Dentre os três isolados pertencentes à espécie *E. casseliflavus*, aqueles de números 10 e 22 apresentaram padrão de bandas idêntico, o que permitiu concluir que eram pertencentes à mesma linhagem, o isolado de número 14 pertence à uma linhagem diferente em relação aos demais. Com relação à espécie predominante *W. confusa*, dos 21 isolados obtidos, foi possível observar apenas 7 diferentes linhagens, sendo que 14 isolados foram pertencentes a uma mesma linhagem que foi chamada de L4 e outros 2 isolados (números 9 e 18) pertenciam a uma outra linhagem diferente denominada L5. Quanto aos isolados das

espécies *P. pentosaceus*, *L. reuteri* e *L. equi*, todos os isolados mostraram-se pertencentes a diferentes linhagens de acordo com o padrão de bandas de $(GTG)_5$. A relação dos isolados e sua respectiva identificação encontra-se na **Tabela 2**.

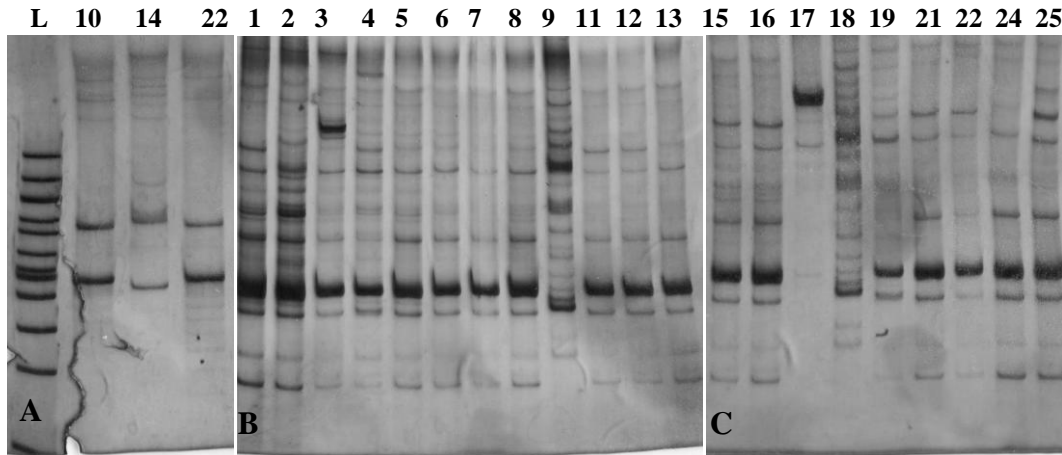


Figura 5: Géis de poliácridamida 8% corados com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referente à resolução dos produtos de PCR $(GTG)_5$ das bactérias lácticas isoladas na 1ª coleta das fezes de potros jovens. L: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). **A:** isolados da espécie *E. casseliflavus* identificados por seus números. **B, C:** isolados da espécie *W. confusa* identificados por seus números.

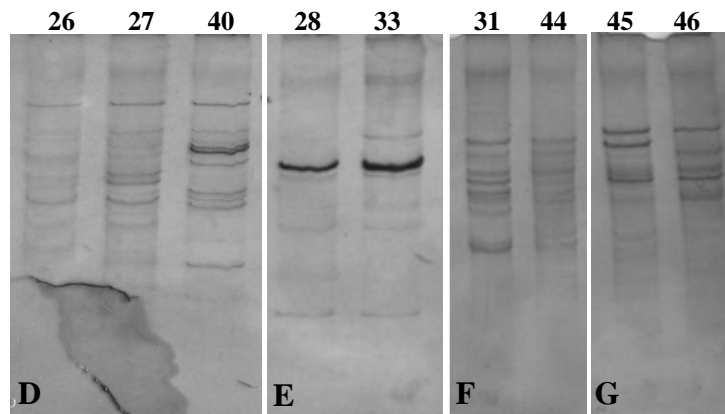


Figura 6: Imagem mostrando os géis de poliácridamida 8% corados com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referente à resolução dos produtos de PCR $(GTG)_5$ das bactérias lácticas isoladas na 2ª coleta das fezes de potros jovens.

D: isolados da espécie *P. pentosaceus* identificados por seus números **E:** isolados da espécie *L. equi* identificados por seus números. **F:** isolados da espécie *L. crispatus* identificados por seus números. **G:** isolados da espécie *L. reuteri* identificados por seus números.

Levando-se em consideração que as bactérias numeradas de 1 a 25 (primeiro isolamento) foram obtidas de potros de aproximadamente um ano de vida e que as demais

numeradas de 26 a 45 (segundo isolamento) de potros lactentes com aproximadamente um mês de vida, observou-se uma maior diversidade de espécies de bactérias lácticas nas amostras dos potros lactentes do segundo isolamento. É importante ressaltar, entretanto, que a espécie predominante *W. confusa* foi encontrada apenas nas amostras de fezes dos potros com um ano de idade, do qual foram obtidas linhagens de *W. confusa* e *E. casseliflavus*. Por outro lado, apenas nas amostras do segundo isolamento de potros lactentes foram encontradas as três espécies de *Lactobacillus*: *L. equi*, *L. reuteri* e *L. crispatus*. Kuhl *et al.* (2011) isolaram bactérias de fezes de potros recém nascidos e de outros com até seis semanas de vida, assim como de cavalos adultos, para comparar os resultados. A partir de quatro semanas de idade, os potros não apresentaram diferença entre bactérias obtidas por isolamento em relação aos animais adultos, consideraram, portanto, que a partir desta idade a microbiota dos equinos se tornou indistinguível. Por outro lado, Earing *et al.* (2012) consideraram que a partir de cinco semanas de idade os potros já passam a pastorear e a alimentação passa a não ser exclusivamente o leite materno, desta maneira, os resultados mostraram que a microbiota dos potros se tornou indistinguível em relação aos adultos a partir de seis semanas de idade. É possível, portanto, que as diferenças encontradas entre os dois isolamentos de animais lactentes (um mês) e não lactentes (um ano) sejam devidas as diferenças das dietas destes animais e suas respectivas microbiotas adaptadas a estas dietas. Importante ressaltar ainda que os animais estavam em fazendas diferentes e distantes, o que pode ter contribuído para uma maior diferença em relação à composição da microbiota intestinal dos mesmos.

Tabela 2. Resultado da identificação molecular das bactérias lácticas isoladas de fezes de potros jovens.

Isolado	Local	Animal	Idade	Espécie	GTG ₅
1	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L1
2	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L2
3	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L3
4	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
5	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
6	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
7	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
8	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
9	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L5
10	Baldin - MG	1	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L6
11	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
12	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
13	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
14	Baldin - MG	3	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L7
15	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
16	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
17	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L8
18	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L5
19	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L9
20	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
21	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
22	Baldin - MG	1	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L6
24	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
25	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4
26	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L10
27	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L11
28	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. equi</i>	L12
31	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. crispatus</i>	L13
33	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. equi</i>	L14
40	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L15
44	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. crispatus</i>	L16
45	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. reuteri</i>	L17
46	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. reuteri</i>	L18

GTG₅: Identificação ao nível de linhagem

4.3. Caracterização probiótica funcional *in vitro*

4.3.1. Resistência ao suco gástrico artificial

Para promover os efeitos benéficos o probiótico deve resistir e manter a viabilidade sob as condições adversas ou desafios impostos pelo organismo do hospedeiro. O primeiro destes desafios é o suco gástrico, que contém as enzimas gástricas digestivas que funcionam em um pH extremamente baixo. Muitas bactérias não sobrevivem bem em pH ácido (Jin *et al.* 1998) sendo que os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia da bactéria ainda não foram completamente entendidos, mas a acidificação interna reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos para proteínas e para o DNA (Leeber *et al.* 2008).

No presente estudo, as bactérias foram testadas quanto à capacidade de sobreviver em suco gástrico artificial em pH 2,5 por 3 horas e todos os isolados apresentaram uma taxa de inibição de crescimento menor que 11% e isso indica que, provavelmente, seriam capazes de sobreviver em pH ácido, levando-se em consideração que o pH estomacal dos equinos varia entre 2,5 e 5,6 e que o alimento permanece por aproximadamente duas a seis horas no estômago dos animais (Voros, 2008; Botha, 2011). De acordo com Fernandez *et al.* (2003), potenciais microrganismos probióticos devem tolerar ao menos um valor próximo ao pH 3.0. Pelo cálculo da área sob a curva de crescimento das bactérias na ausência ou após o tratamento ácido, quase todas puderam ser consideradas resistentes ao pH ácido, pois apresentaram uma porcentagem de inibição variando de 0 a 10%. Apenas *W. confusa* linhagem 17 foi considerada como tolerante ao pH ácido e apresentou uma porcentagem de inibição de 11,1% (**Tabela 5, Apêndice I**).

Outros autores como Weese *et al.* (2004) testaram bactérias lácticas de equinos quanto à resistência ao pH ácido avaliando o crescimento destas isoladas ante um desafio em pH 2,0 e 4,0 durante 24 horas de incubação. Em relação ao desafio em pH 4,0, os autores verificaram que a taxa de inibição de crescimento foi de aproximadamente 25%, enquanto que em pH 2,0 a taxa de inibição de crescimento foi de aproximadamente 75% para todas as bactérias. Uma pequena porcentagem destas bactérias foi considerada como tolerante ao pH ácido, ou seja, foram considerados como bactérias que seriam capazes de sobreviver nestas condições estridentes. O resultado obtido neste estudo corrobora com outros autores (Morelli, 2000; Silva *et al.* 2013) que observaram que bactérias de origem intestinal tendem a ser mais resistentes aos ácidos estomacais.

4.3.2. Resistência aos sais biliares

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, os microrganismos com propriedades probióticas têm como desafio os sais biliares intestinais. Os sais biliares representam moléculas anfipáticas com atividade antimicrobiana, agindo como detergentes, rompendo membranas biológicas (Leeber *et al.* 2008; Merit e Donaldson, 2009). Ainda em relação aos sais biliares, uma concentração de 0,3% (p/v) é considerada a ideal para a seleção de linhagens probióticas resistentes (Mainville *et al.*, 2005). Sabe-se que a taxa de resistência aos sais biliares tende a variar entre as bactérias lácticas e entre as linhagens de uma mesma espécie (Xanthopoulos, 1997; Weese *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 1999; Mirlohi *et al.*, 2000; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013). No caso de equinos, a bile é constantemente liberada no intestino delgado, já que os cavalos não possuem a vesícula biliar em seu trato gastrintestinal (Botha, 2011).

Considerando-se o cálculo da área sob a curva de crescimento dos isolados equinos na presença e na ausência de sais biliares, as bactérias isoladas submetidas ao desafio por sais biliares a uma concentração de 0,3% por 18 horas foram classificadas como resistentes (até 40% de inibição), tolerantes (40 a 60% de inibição) e sensíveis (mais de 60%). De acordo com o resultado, 15% das bactérias lácticas de equinos revelaram-se resistentes, 15% tolerantes e 70% mostraram-se sensíveis aos sais biliares (**Tabela 5, Apêndice II**). Weese *et al.* (2004), que testaram bactérias lácticas ante o desafio com sais biliares a 0,3% após 24 horas de crescimento, observaram que a maioria dos seus isolados (64%) apresentou uma taxa de inibição inferior a 25%, enquanto que os demais apresentaram uma taxa de inibição que variou entre 25 e 50% de inibição de crescimento, por fim considerou todos os seus isolados como tolerantes aos sais biliares.

4.3.3. Hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade relaciona-se diretamente com as capacidades das linhagens em aderir às superfícies inertes. Está relacionada aos componentes apolares presentes na membrana externa do microrganismo e acredita-se que as interações hidrofóbicas apresentam papel importante na adesão das bactérias ao epitélio (Mangoni, 2009). Através do teste de adesão a solventes (MATS) é possível avaliar qualitativamente o quão polar ou apolar é a superfície bacteriana, sendo importante, pois indicaria o potencial de adesão do probiótico às superfícies apolares do epitélio intestinal e vaginal. Entretanto, propõe-se ser o teste apenas o indicador primário para adesão de microrganismos (Mangoni, 2009).

Os resultados de MATS (“microbial adhesion to solvents”) obtidos neste estudo são mostrados na **Tabela 5**. *Lactobacillus* probióticos isolados de bovinos também foram submetidos ao teste de adesão a hidrocarbonetos para verificar sua hidrofobicidade em trabalho desenvolvido por Nader-Macías *et al.* (2008) e mais de 92,2% das amostras apresentaram hidrofobicidade relativamente baixa (0 a 33%), 5,4% média hidrofobicidade (33,34 a 66,66%) e apenas 2,4% dos isolados apresentaram alta hidrofobicidade (66,67% a 100%). Entretanto, nos ensaios feitos neste trabalho foram estabelecidas as faixas conforme Silva *et al.* (2013), que consideraram como de alta hidrofobicidade as bactérias com um índice de adesão à solventes apolares superior a 60%, que representam cerca de 10% das bactérias lácticas isoladas dos potros; de média hidrofobicidade aquelas com valores de MATS entre 50-60%, que corresponderam a aproximadamente 30% das bactérias isoladas; e 60% dos isolados apresentaram baixa hidrofobicidade da superfície celular, que são aqueles que apresentam MATS abaixo de 50%. Botha (2011) testou quatro linhagens de bactérias lácticas isoladas de equinos, sendo que uma delas apresentava hidrofobicidade de 50%, podendo ser considerada de média hidrofobicidade, enquanto que as demais tinham hidrofobicidade baixa de 0 e 8%. Entretanto, quando ele fez os ensaios de adesão às células epiteliais intestinais *in vitro* e constatou que a hidrofobicidade não interferiu na adesão das bactérias ao epitélio intestinal e que todas as quatro linhagens aderiram da mesma forma às células epiteliais. Os dados na literatura são controversos e outros trabalhos dizem que a hidrofobicidade está diretamente relacionada à capacidade de adesão das bactérias ao epitélio intestinal (Mangoni, 2009; Steinberg, 2012).

4.3.4. Antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos

Os resultados do teste de antagonismo podem ser observados nos **Tabela 3**. As bactérias isoladas no presente trabalho apresentaram atividade antagonista para patógenos Gram positivo e Gram negativo, o efeito inibitório pode ser devido à produção de H₂O₂, ácido láctico, bacteriocinas, substâncias que agem como antimicrobianos, ou a combinação de vários destes compostos (Nardi *et al.* 2005). O presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas produtoras, porém as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras que teriam se difundido pelo ágar e impedido o crescimento das culturas reveladoras (Naidu *et al.* 1999).

As bactérias lácticas isoladas dos potros que apresentaram antagonismo para sete patógenos testados (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Listeria monocytogenes) foram *W. confusa* 1, *P. pentosaceus* 26, *P. pentosaceus* 27, *L. equi* 28 e *P. pentosaceus* 40 (**Tabela 3**).

A infecção por *Salmonella* é a causa mais comum de diarreia aguda nos potros (Jones e Spier, 2000) e tem potencial zoonótico (Weiss *et al.*, 2002; Mastroeni e Grant, 2011). Portanto *Salmonella* torna-se o patógeno mais importante a ser antagonizado por nossos candidatos a probióticos. A maioria dos isolados das fezes de equinos (70%) apresentou atividade antagonista contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Dados da literatura afirmam que estas bactérias produzem ácido láctico o que seria suficiente para inibir o crescimento deste patógeno (Weese *et al.*, 2004), pois o ácido láctico é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana externa de microrganismos Gram negativo, inibindo o funcionamento da célula microbiana.

Nota-se, também, que algumas das bactérias lácticas isoladas dos potros apresentaram atividade antagonista para *Enterococcus faecalis* (15%), uma BAL, mostrando que pode existir outra substância antagonista diferente do ácido láctico nestas linhagens. Provavelmente, as linhagens *W. confusa* 1, *P. pentosaceus* 26, *P. pentosaceus* 27, *L. equi* 28 e *P. pentosaceus* 40 são produtoras de outra substância antagonista diferente do ácido láctico. Bacteriocinas são possíveis alternativas, pois consistem de peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos e produzidos pela maioria das bactérias Gram positivo (Hansen *et al.*, 1989, Cotter, Hill e Ross, 2005; Ryan *et al.*, 2008) para antagonizar bactérias intimamente relacionadas (Klaenhammer, 1993).

Nenhuma linhagem isolada dos potros apresentou antagonismo contra *Streptococcus equi zooepidemicus*, uma bactéria láctica com potencial patogênico. Weese *et al.* (2004) testaram um isolado de *L. pentosus* em relação à atividade antagonista contra *S. equi zooepidemicus* e verificaram que este isolado apresentou uma atividade antagonista moderada a este patógeno. *S. equi zooepidemicus* é considerado uma bactéria comensal da mucosa intestinal de equinos saudáveis, porém está associado a infecções respiratórias em potros e infecções uterinas e abortos em éguas grávidas (Timoney, 2004). Dados na literatura demonstraram que estas bactérias possuem potencial zoonótico (Abbott *et al.*, 2010).

Tabela 3. Antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos pelas bactérias lácticas isoladas de equinos.

PRODUTORA	Patógenos							
	Gram +				Gram -			
	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. equi</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1 - <i>W. confusa</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
2 - <i>W. confusa</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
3 - <i>W. confusa</i>	+	+	+	NT	-	+	+	+
4 - <i>W. confusa</i>	-	+	-	NT	-	-	-	-
9 - <i>W. confusa</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
10 - <i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	NT	-	-	-	-
14 - <i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	NT	-	-	-	-
17 - <i>W. confusa</i>	+	+	+	NT	-	+	+	+
18 - <i>W. confusa</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
19 - <i>W. confusa</i>	+	+	+	NT	-	+	+	+
26 - <i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	NT	+	+	+	+
27 - <i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
28 - <i>L. equi</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
31 - <i>L. crispatus</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
33 - <i>L. equi</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
40 - <i>P. pentosaceus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
44 - <i>L. crispatus</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
45 - <i>L. reuteri</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-
46 - <i>L. reuteri</i>	-	-	-	NT	-	-	-	-

NT: não testado; +: presença de halo de inibição > 10 mm; -: ausência de halo de inibição ou halo < 10 mm.

4.3.5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

Bactérias lácticas isoladas de animais e utilizadas como probióticos tem sido alvo de intensos estudos no que diz respeito à análise da presença de resistência antimicrobiana (Barton, 2000; Denielsen e Wind, 2003; Belletti *et al.*, 2009). A preocupação existente é em relação à aquisição de resistência não intrínseca a certos antibióticos e à transmissão desta para microorganismos patogênicos, o que poderia vir a comprometer a eficiência destes compostos na terapia humana (Turner, Dritz e Minton, 2001; Costa, Tse e Miyada, 2007; Junior *et al.*, 2010). O perfil de resistência/suceptibilidade de microorganismos intestinais é um importante critério para seleção de linhagens probióticas, provavelmente devido à possibilidade de transferência horizontal através de plasmídeos conjugativos. Linhagens contendo plasmídeos conjugativos não devem ser usadas como probióticos para animais ou humanos (Mathur e Singh, 2005; Palop e Narbad, 2011; Ripamonti *et al.*, 2011)

De acordo com a técnica de disco difusão, as linhagens que foram selecionadas podem ser classificadas como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos de acordo com o critério de Charteris *et al.* (1998) (**Anexo I**). Todos os

isolados testados foram resistentes à vancomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), amicacina (30 µg), mas foram sensíveis à eritromicina (10 µg), ampicilina (30 µg), penicilina (10U), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg) e ampicilina (45 µg) (**Tabela 4**).

A resistência à vancomicina tem sido demonstrada como intrínseca a muitas bactérias do ácido láctico, sendo que estudos com *Lactobacillus* isolados de diferentes origens apontaram resistência em 100% das linhagens testadas (Teuber, Meile e Schwarz, 1999; Mathur e Singh, 2005; Ouoba, Lei e Jensen, 2008). Microrganismos pertencentes a outros gêneros de bactérias lácticas (*Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*) também foram destacados como portadores desta resistência à vancomicina (Wright, 2003; Mathur e Singh, 2005). Os resultados encontrados aqui estão de acordo com numerosas pesquisas que frequentemente relatam um elevado grau de resistência dos gêneros de bactérias lácticas aos antibióticos das classes dos glicopeptídeos (vancomicina), aminoglicosídeos (amicacina) e oxacilina (Barton, 2000; Bywater, 2005; Ammor, Flórez e Mayo, 2007; Belletti *et al.*, 2009).

Todos os isolados analisados apresentaram-se susceptíveis à ampicilina, ceftriaxona, cloranfenicol e eritromicina. Bactérias lácticas sensíveis a estes antibióticos são reportadas comumente em artigos científicos (Ferreira, 2006; Klare, 2007; Fukao e Yajuma, 2012).

Danielsen e Wind (2003) relataram alta sensibilidade de *Lactobacillus* sp. frente à presença dos inibidores de síntese de parede celular como a ampicilina e a penicilina, assim como pôde ser confirmado neste trabalho e também no trabalho de Coppola *et al.* (2005).

Tabela 4. Suceptibilidade/resistência aos antimicrobianos de bactérias lácticas isoladas de fezes de potros.

Bactéria	Espécie	ANTIBIÓTICO								
		CRO	ERI	TET	AMP	VAN	PEN	AMI	CLO	OXA
1	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
2	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
3	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
4	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
9	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
10	<i>E. casselifavus</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
14	<i>E. casselifavus</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
17	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
18	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
19	<i>W. confusa</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
26	<i>P. pentosaceus</i>	S	MS	MS	S	R	S	R	S	R
27	<i>P. pentosaceus</i>	MS	S	S	S	R	S	R	S	R
28	<i>L. equi</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	R
31	<i>L. crispatus</i>	S	S	MS	S	R	MS	R	S	R
33	<i>L. equi</i>	S	S	MS	S	R	MS	R	S	R
40	<i>P. pentosaceus</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
44	<i>L. crispatus</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
45	<i>L. reuteri</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
46	<i>L. reuteri</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R

CRO = ceftriaxona (30 µg), ERI = eritromicina (10 µg), TET = tetraciclina (30 µg), AMP = ampicilina (30 µg), PEN = penicilina (10U), VAN = vancomicina (30 µg), AMI = amicacina (30 µg), CLO = cloranfenicol (30 µg), OXA = oxacilina (1 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

4.4. Seleção de linhagens de bactérias lácticas para testes *in vivo*

A observação do comportamento *in vitro* específico de cada linhagem que se pretende utilizar tem sido um método eficiente para seleção preliminar de bactérias probióticas (Morelli, 2000; FAO/WHO, 2002; Mirlohi *et al.*, 2009). Assim, os critérios utilizados neste trabalho para seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico foram baseados na avaliação *in vitro* das bactérias isoladas de equinos por características fisiológicas desejáveis nestas. A síntese dos resultados obtidos *in vitro* é apresentada na **Tabela 5**.

Pediococcus pentosaceus 40 foi a única bactéria isolada que cumpriu plenamente todos os requisitos estabelecidos nos testes *in vitro* de caracterização funcional de linhagens probióticas, apresentando-se resistente ao suco gástrico artificial, resistente aos sais biliares, com alta hidrofobicidade da parede celular, amplo antagonismo contra patógenos e sensível aos principais antimicrobianos associados a elementos móveis utilizados na terapia humana e animal. Deste modo, esta linhagem bacteriana foi a que apresentou maior potencial para ser utilizada como suplemento alimentar animal, podendo ser administrada por via oral, uma vez que se mostrou capaz de resistir às condições adversas do TGI, sendo selecionada para os testes *in vivo* de caracterização probiótica.

Além de *P. pentosaceus* 40 foi escolhido também *W. confusa* 1, das muitas bactérias desta espécie provenientes da primeira coleta, para análise comparativa nos testes *in vivo*. Esta linhagem mostrou-se igualmente resistente ao suco gástrico artificial, com alta hidrofobicidade da superfície celular, amplo antagonismo contra patógenos e um padrão de sensibilidade aos antimicrobianos semelhante ao *Pediococcus*. A única diferença encontrada em relação a *P. pentosaceus* 40 foi que *W. confusa* 1 mostrou-se apenas tolerante aos sais biliares, com uma porcentagem de inibição de aproximadamente 56%, entretanto, acredita-se, com base em outros dados na literatura, que esta linhagem bacteriana seja capaz de sobreviver ao desafio dos sais biliares e chegar ao TGI em quantidades suficientes (Steinberg, 2012).

Tabela 5. Resultado da caracterização funcional das bactérias lácticas isoladas de fezes de potros jovens.

Isolado	Local	Animal	Idade	Espécie	GTG ₅	SG (%)	SB (%)	MATS (%)	antagonismo
1	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L1	2,1	56,6	52,3	++++++
2	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L2	5,7	60,5	49,4	-----
3	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L3	3,5	70,6	53,5	+++++
4	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4	6,7	74,4	17,1	----+
5	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
6	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
7	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
8	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
9	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L5	0	68,7	51,2	-----
10	Baldin - MG	1	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L6	5	57	40,6	----+
11	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
12	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
13	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
14	Baldin - MG	3	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L7	1,2	54,9	54,8	-----
15	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
16	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
17	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L8	11,1	72,6	55,2	++++++
18	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L5				
19	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L9	4,2	59	53,7	++++++
20	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
21	Baldin - MG	1	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
22	Baldin - MG	1	um ano	<i>E. casselifavus</i>	L6				
24	Baldin - MG	2	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
25	Baldin - MG	3	um ano	<i>W. confusa</i>	L4				
26	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L10	4,7	35	13,4	++++++
27	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L11	0	25	35,1	+++----
28	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. equi</i>	L12	3,2	93,9	43,4	+++----
31	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. crispatus</i>	L13	0	93,6	93,3	-----
33	Passatempo - MG	4	um mês	<i>L. equi</i>	L14	4,4	99,8	71,4	-----
40	Passatempo - MG	4	um mês	<i>P. pentosaceus</i>	L15	0	39,6	56,5	+++----
44	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. crispatus</i>	L16	0	97,5	93,6	-----
45	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. reuteri</i>	L17	2,5	22,4	59,9	----+
46	Passatempo - MG	5	um mês	<i>L. reuteri</i>	L18	2,5	16,3	56,2	-----

Característica desejável: □; característica indesejável: ■; bactérias selecionadas □. SG: porcentagem de inibição ao suco gástrico artificial. SB: porcentagem de inibição aos sais biliares. MATS: porcentagem de adesão a solventes orgânicos.

4.5. Testes *in vivo*

4.5.1. Avaliação da segurança do tratamento com *P. pentosaceus* 40 ou *W. confusa* 1 e da capacidade protetora em camundongos infectados ou não com *S. Typhimurium*

A utilização de aditivos alimentares nas dietas dos animais têm sido uma das técnicas aplicadas com resultados significativos para promover melhora nos índices zootécnicos e aumentar a produtividade (Costa, Tse e Miyada, 2007).

A variação de peso resultante da suplementação alimentar de camundongos convencionais com os isolados *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1, desafiados ou não com *S. Typhimurium*, foi avaliada durante os 20 dias do experimento, a fim de verificar a influência do pré-tratamento com estes possíveis probióticos em 10 animais por grupo, de ambos os sexos distribuídos uniformemente, em dois experimentos distintos. Em relação ao *P. pentosaceus* 40, como visto na **Figura 7**, houve uma queda estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado e desafiado (p40 + desafio) em relação aos grupos não desafiados (controle, p40). A variação de peso no grupo controle desafiado com *S. Typhimurium* não foi significativa ao longo da infecção neste período. Alguns animais morreram nos grupos desafiados após o 5º dia de tratamento, e que a variação do peso foi avaliada nos animais sobreviventes no 9º após a infecção, no grupo tratado e desafiado (p40 + desafio) sobreviveram três animais, enquanto que no grupo desafiado (desafio) sobreviveram cinco animais.

Da mesma forma, em relação ao isolado de *W. confusa* 1, como observado na **Figura 8**, os grupos desafiados (desafio e W1 + desafio) apresentaram uma significativa perda de peso ($p < 0,05$). Da mesma forma, no 9º após a infecção sobreviveram três animais no grupo tratado desafiado (p40 + desafio) e um animal no grupo desafiado (desafio). Ambos os tratamentos provocaram maior perda de peso nos grupos desafiados com *S. Typhimurium* (desafio + p40 e desafio + W1) em relação aos grupos desafiados e não tratados (desafio), principalmente no caso de *P. pentosaceus* 40. Os resultados se assemelham aos de Santana (2015) que encontrou perda de peso nos animais desafiados e tratados com uma linhagem de *P. acidilactici* em relação aos controles infectados (grupo desafio) sete dias após o desafio. Moura *et al.* (2001), utilizando condições experimentais muito próximas das utilizadas neste estudo, também demonstraram que o tratamento de camundongos convencionais com a linhagem probiótica *L. delbrueckii* UFV-H2b20 levou a perda de peso após 5 dias de infecção com *S. Typhimurium*, indicando, igualmente, um resultado desfavorável em relação a proteção contra este enteropatógeno.

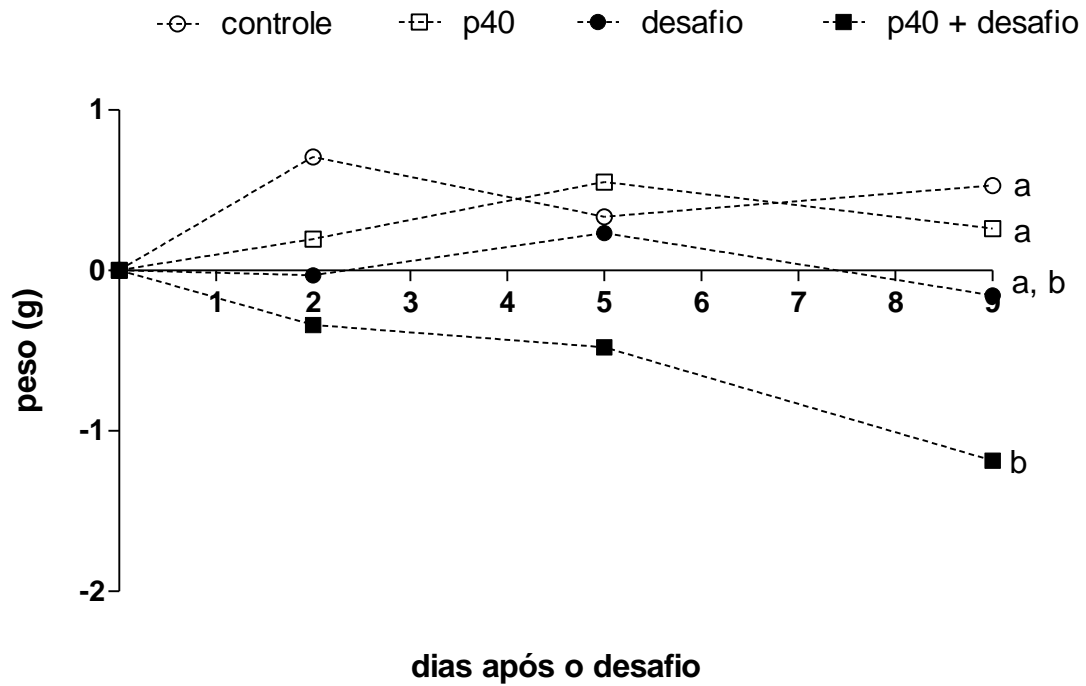


Figura 7. Tendência de ganho/perda de peso dos grupos de animais convecionais controle e tratados com *P. pentosaceus* 40, desafiados ou não com *S. Typhimurium*. Retas seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA 1 pós teste de Tukey. Dias 2 e 5: $n = 10$ p/ todos os grupos. Dia 9 $n = 5$ p/ grupo desafio e $n = 3$ p/ grupo p40 + desafio.

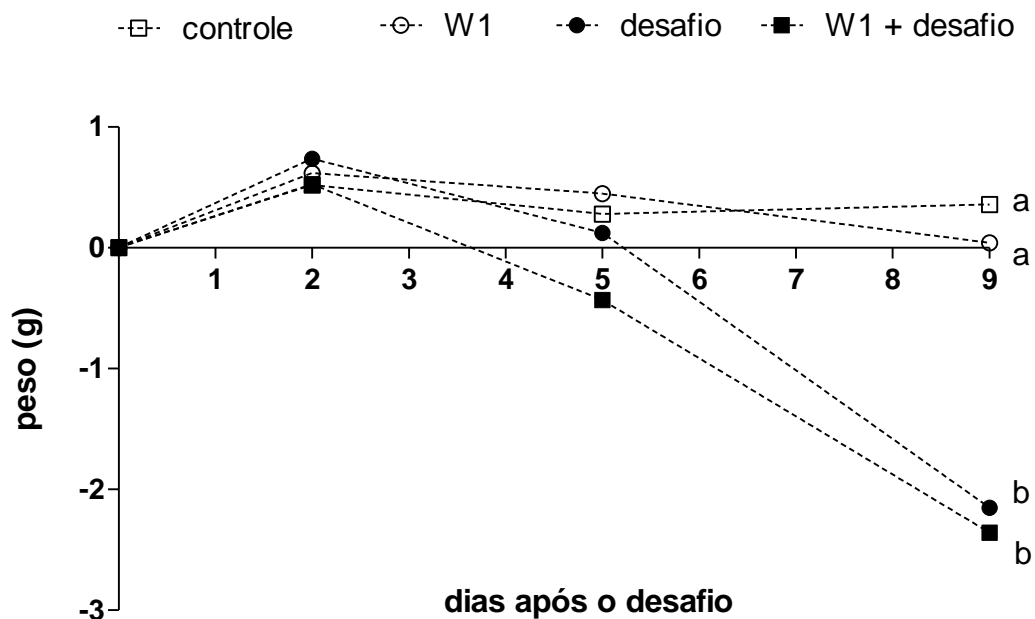


Figura 8. Tendência de ganho/perda de peso dos grupos de animais convencionais controle e tratados com *W. confusa* 1, desafiados ou não com *S. Typhimurium*. Retas seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA 1 e pós teste de Tukey. Dias 2 e 5: $n = 10$ p/ todos os grupos. Dia 9: $n = 3$ p/ grupo desafio e $n = 1$ para grupo W1 + desafio.

Os resultados referentes ao índice hepático dos animais tratados com *P. pentosaceus* 40 ou *W. confusa* 1, desafiados ou não com *S. Typhimurium*, são apresentados na **Figura 9 e 10**. Os índices hepáticos demonstraram que os tratamentos com *W. confusa* 1 ou *P. pentosaceus* 40 não promoveram aumento significativo do tamanho desse órgão em relação aos animais do grupo controle. Diferenças estatísticas foram apenas observadas ($p < 0,05$) quando foram confrontados os índices dos animais dos grupos não desafiados (controle e tratados) com aqueles dos animais desafiados (desafio e tratados + desafio). Os resultados dos índices esplênicos dos animais tratados com *P. pentosaceus* 40 ou *W. confusa* 1, desafiados ou não com *S. Typhimurium* são mostrados na **figura 11 e 12**. De maneira similar, os índices esplênicos demonstraram que os tratamentos com *W. confusa* 1 ou *P. pentosaceus* 40 não promoveram aumento significativo do tamanho do baço em relação aos animais controles. Novamente, diferença estatística foi observada ($p < 0,05$) apenas quando foram confrontados os índices dos animais dos grupos não desafiados (controle e tratados) com os desafiados (desafio e tratados + desafio). Os dois pré-tratamentos com *W. confusa* 1 ou *P. pentosaceus* 40 não foram capazes de evitar ou reverter a hepatomegalia e a esplenomegalia causadas pela infecção com o enteropatógeno.

A hepatomegalia e a esplenomegalia são frequentemente relatadas como indicativos indiretos de infecção bacteriana. Logo, como os pré-tratamentos com *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1 não promoveram aumento destes índices, pode-se dizer que em relação a estes parâmetros ambas as linhagens analisadas são seguras para uso como aditivo alimentar. Já o aumento do fígado e do baço era esperado para animais infectados por *S. Typhimurium*, uma vez que este microrganismo é um parasita intracelular facultativo que se desenvolve dentro de macrófagos localizados nestes órgãos (Silva *et al.*, 1999; Raupach e Kaufmann, 2001; Grassl e Finlay, 2008).

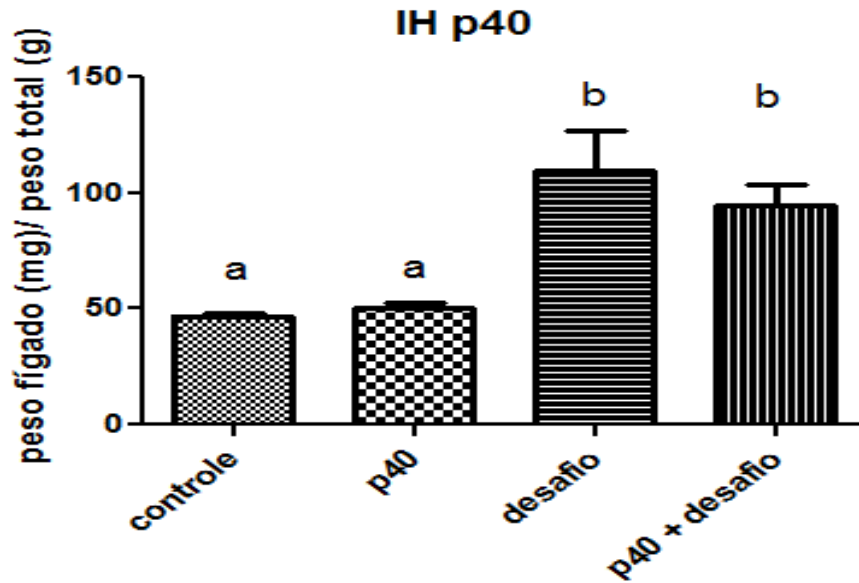


Figura 9. Índice hepático médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com *P. pentosaceus* 40 (p40). Barras seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste ANOVA 1 e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 10$).

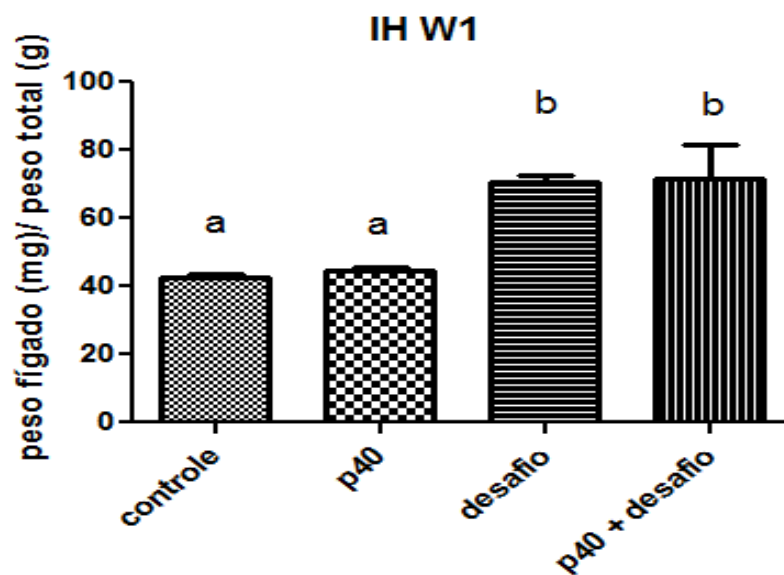


Figura 10. Índice hepático médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com *W. confusa* 1 (W1). Barras seguidas por letras distintas diferem entre si por ANOVA 1 e pós teste de tukey ($p < 0,05$; $n = 10$).

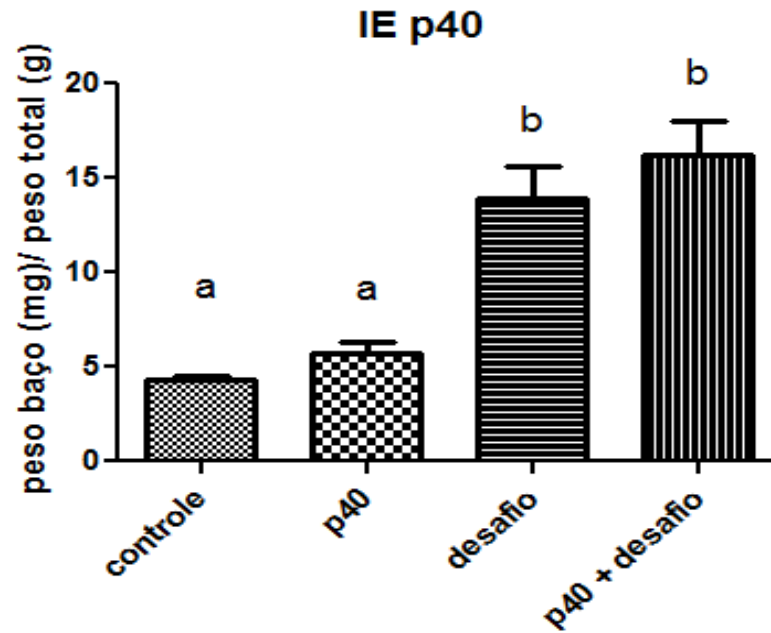


Figura 11. Índice esplênico médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com *P. pentosaceus* 40 (p40). Barras seguidas por letras distintas diferem entre si por ANOVA 1 e pós teste de tukey ($p < 0,05$; $n = 10$).

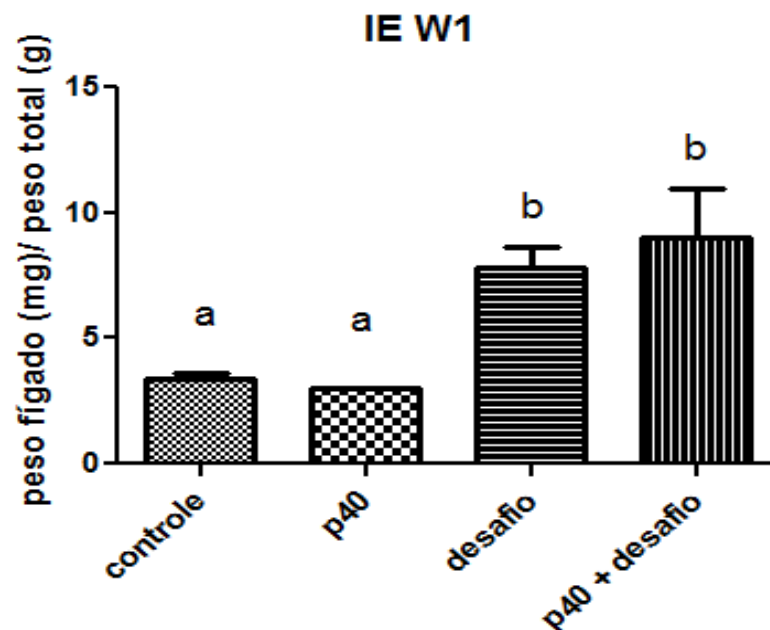


Figura 12. Índice esplênico médio dos grupos experimentais e controles dos animais convencionais tratados com *W. confusa* 1 (W1). Barras seguidas por letras distintas diferem entre si por ANOVA 1 e pós teste de tukey ($p < 0,05$; $n = 10$).

Mudanças significativas na aparência e comportamento dos animais desafiados foram observadas quatro dias após a infecção, como: inapetência, eriçamento dos pêlos, postura curvada com distensão abdominal e pelagem áspera (Grassl e Finlay, 2008). A taxa de

sobrevivência nos animais pertencentes aos grupos experimentais desafiados (animais tratados, animais tratados/desafiados, animais não tratados/desafiados e animais não tratados/não desafiados) foi comparada para se obter informações a respeito da segurança e da capacidade de proteção destas linhagens de *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1 contra um importante enteropatógeno que é a *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium, uma característica descrita para cepas com reconhecido potencial probiótico (Gill *et al.*, 2001; Vasconcelos, Nicoli e Nardi, 2003; Silva *et al.*, 2004; LeBlanc, Castillo e Perdigon, 2010). A administração oral das linhagens de *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1 nos camundongos não foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais após a infecção com *Salmonella* Typhimurium. Em relação ao *P. pentosaceus* 40 (**figura 13**), a taxa de sobrevivência no grupo desafio foi de 20% e no grupo desafiado e tratado (desafio + p40) foi de 10%, a sobrevivência total foi menor no grupo tratado, entretanto não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos pelo teste de Long-Rank ($p > 0,05$). O tempo de sobrevivência médio no grupo tratado e infectado (desafio + p40) foi de 6 dias e de 7 dias no grupo infectado (desafio). Em relação ao isolado de *W. confusa* 1 (**figura 14**) a sobrevivência foi de 20% no grupo infectado e não tratado (desafio) e 0% no grupo desafiado tratado (desafio + W1), e assim como no experimento anterior, não houve diferença significativa pelo teste de Long-Rank ($p > 0,05$) entre as taxas de sobrevivência nos dois grupos avaliados. A sobrevivência média no grupo tratado e infectado (desafio + W1) foi de 5 dias e de 6 dias no grupo infectado (desafio). Observou-se que dos cinco animais que sobreviveram ao desafio com *Salmonella* Typhimurium, em ambos os grupos e em ambos os experimentos, quatro pertenciam ao sexo feminino. Dados na literatura dizem que o sexo feminino nos camundongos é menos susceptível à infecção (Gautier *et al.*, 1998). Em ambos os experimentos, os grupos não infectados (p40, W1 e controle) tiveram uma sobrevivência de 100% dos animais.

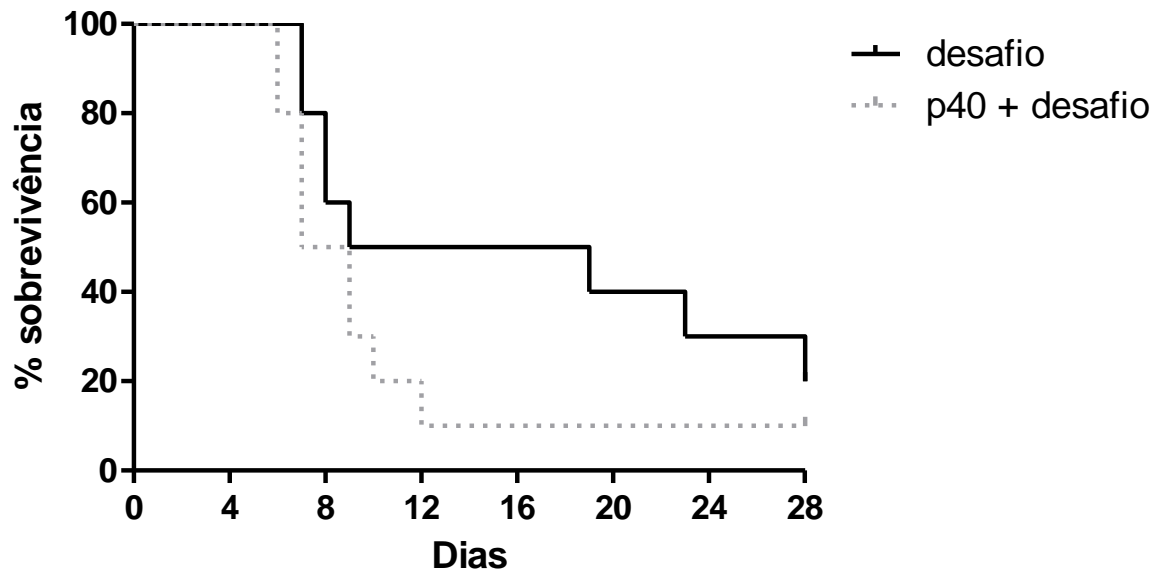


Figura 13. Taxa de sobrevivência de camundongos convencionais tratados ou não com *P. pentosaceus* 40 após 28 dias pós infecção com *S. Typhimurium*. Teste de long-rank (n=10). Desafio: controle do desafio com *S. Typhimurium*. Desafio + p40: tratamento e desafio com *S. Typhimurium*.

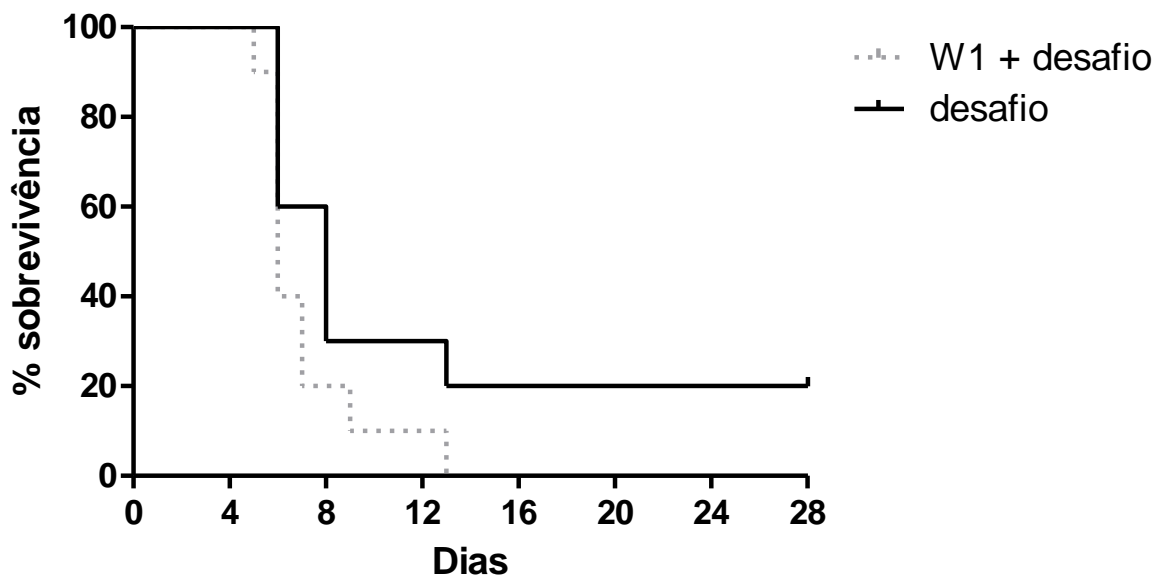


Figura 14. Taxa de sobrevivência de camundongos convencionais tratados ou não com *W. confusa* 1 após 28 dias pós infecção com *S. Typhimurium*. Teste de long-rank (n=10). Desafio: controle do desafio com *S. Typhimurium*. W1 + Desafio: tratamento e desafio com *S. Typhimurium*.

Resultados descritos por Frizzo *et al.* (2010), por meio de administração oral de cultura mista de *L. plantarum* e *P. pentosaceus* em camundongos da linhagem *Swiss* desafiados com *Salmonella* Dublin (10^5 UFC), mostraram taxas de sobrevivência em grupos tratados e 50% de grupos não tratados, apresentando diferença significativa ($p < 0,01$). Além disso, os autores observaram que as mortes se iniciaram nove dias no grupo tratado e seis dias no grupo não tratado após a administração do patógeno. Eles consideraram a diferença do dia da primeira morte do grupo tratado em relação ao não tratado como outro indicador de proteção dos animais. No presente estudo, porém, os grupos desafio + p40 e desafio + W1 apresentaram a primeira morte sempre 24 horas antes da primeira morte nos respectivos grupos controles infectados. Embora *S. Typhimurium* e *S. Dublin* apresentem características de patogenicidade distintas, esses dados podem ser importantes no que tange a dinâmica da invasão dos patógenos, sendo retardados pelos probióticos.

Ishikawa *et al.* (2010) estudaram o efeito inibitório de *S. Typhimurium* por *L. plantarum* b240 mortas pelo calor por meio da administração oral em camundongos C57BL/6. Avaliaram que, inoculando 10^4 UFC de *S. Typhimurium*, os animais começaram a morrer no sétimo dia pós-infecção, apresentando taxas de mortalidade de 58,3% quando tratados com uma dose de 1 mg de b240. Já quando tratados com uma dose de 10 mg de b240 após vinte dias de infecção apresentaram uma mortalidade de 50%. Entretanto, os autores afirmaram que, quando foi testado um inóculo de 10^5 UFC de *S. Typhimurium*, a linhagem b240 não foi capaz de inibir a invasão e a adesão do patógeno *in vitro*, como havia sido observado quando a dose foi de 10^4 UFC. Esses dados permitem inferir que uma dose infectante mais baixa do enteropatógeno nos camundongos tratados com W1 e p40 poderia permitir a observação de um possível efeito protetor por parte dos microrganismos pesquisados. Entretanto, não existem muitos trabalhos abordando o uso das espécies *W. confusa* e *P. pentosaceus* elucidando seus efeitos protetores *in vivo*, especialmente em modelos murinos de infecção com *Salmonella* Typhimurium, tornando difícil caracterizar a resposta aqui obtida por esses microrganismos.

O tratamento com estas bactérias não causou aumento dos índices hepático e esplênico, nem a morte dos camundongos e apesar não promover uma maior sobrevivência dos animais infectados com o enteropatógeno, pode-se dizer que as linhagens *W. confusa* 1 e *P. pentosaceus* 40 mostraram-se seguras, mesmo não tendo se apresentado como uma terapia apropriada contra infecção por *S. Typhimurium*.

4.5.2 Aspectos histológicos do fígado dos animais convencionais tratados com *P. pentosaceus* 40

O uso de modelos animais é recomendado como padrão ouro para avaliar características funcionais e relativas à segurança de potenciais linhagens probióticas. Na análise histopatológica, o fígado dos animais do grupo controle (salina) demonstrou arquitetura lobular preservada e aspecto celular normal dos hepatócitos (**figura 15A**). Nos animais tratados com *P. pentosaceus* 40 não desafiados (p40), o fígado apresentou-se semelhante ao controle sem tratamento (**figura 15B**). A ausência de alterações macro e microscópicas no intestino, no baço e no fígado, assim como indicadores em geral de saúde dos animais tratados com *P. pentosaceus* 40 sugerem que esta linhagem bacteriana é segura para uso oral como suplemento alimentar. Outros potenciais probióticos que foram recentemente isolados e não apresentaram história de utilização em humanos e outros animais mostraram resultados similares: *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 e *Bifidobacterium lactis* HN019 foram administrados a camundongos BALB/c e também não causaram mudanças nos índices hepático e esplênico e nas características histológicas do fígado, do baço e do intestino em relação aos grupos controles, além de não promoverem alterações em outros indicadores de saúde dos animais (EFSA, 2005).

Já em relação aos animais desafiados com *S. Typhimurium*, tratados ou não com *P. pentosaceus* 40 (desafio + p40 e desafio), observaram-se intensas alterações necrótico-degenerativas e inflamatórias, com exuberante infiltrado inflamatório misto distribuído em grandes focos no interior do parênquima e ao redor dos espaços portas de forma aleatória (**figuras 15C e D**). Em associação notam-se grandes áreas de edema, necrose de grupos de hepatócitos, bem como intensa acidofilia citoplasmática (degeneração e necrose) de hepatócitos isolados ou ao redor de áreas de parênquima destruídas. Há grandes espaços de edema, com marginação leucocitária nos vasos, e sinais de hematopoiese extramedular reacional. Também há congestão sinusoidal, dilatação sinusoidal e infiltração celular do parênquima adjacente. Congestão venosa e dilatação de veias portas.

Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os *scores* histopatológicos dos grupos controle (controle) e tratado com *P. pentosaceus* 40 (p40). Da mesma maneira, não foi encontrada diferença significativa entre os *scores* dos dois grupos desafiados (desafio + p40 e desafio). Somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos desafiados com os grupos não desafiados (**figura 16**). A ausência de mudanças significativas nos parâmetros gerais de saúde (ganho de peso, taxa de mortalidade, índices hepático e esplênico) e nos *scores* histopatológicos do fígado nos camundongos infectados com *Salmonella*, apesar do pré-tratamento com *P. pentosaceus* 40, são fortes indicadores de que esta linhagem não protegeu os animais contra a infecção.

Produtos probióticos contendo *L. acidophilus* e *B. bifidum*, assim como um iogurte comercial contendo *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. também já falharam em proteger camundongos contra a infecção causada por *Salmonella* (Van de Veerdonk *et al.*, 2009; Ritchie and Romanuk, 2012).

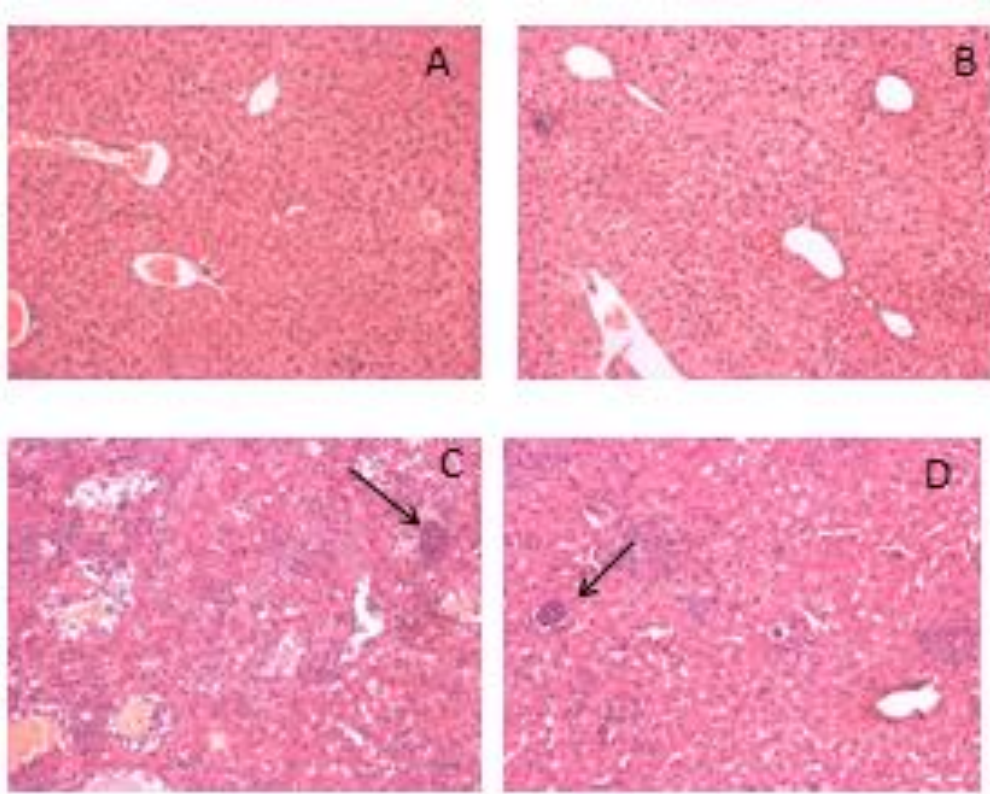


Figura 15. Aspectos histológicos do fígado dos animais convencionais (aumento 10x). Fígado: A) grupo controle; B) grupo tratado não desafiado (p40); C) grupo desafiado e não tratado (desafio); D) grupo desafiado e tratado (p40 + desafio). Seta: infiltrados inflamatórios difusos.

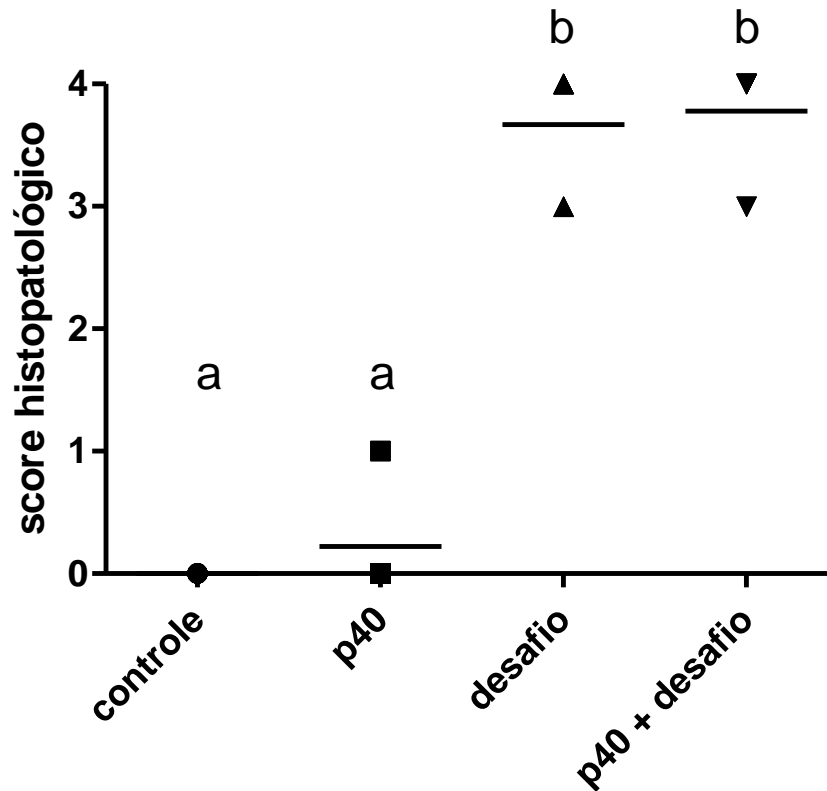


Figura 16. Score histopatológico do fígado de animais tratados e não tratados com *P. pentosaceus* 40 desafiados ou não com *S. Typhimurium*, 10 dias após o desafio. Os resultados estão expressos como a média dos scores histopatológicos por grupo e variam em uma escala que vai de 0 (normal) a 4 (lesão severa da arquitetura do tecido) (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Análise estatística foi feita por ANOVA 1 e pelo pós-teste de Tukey.

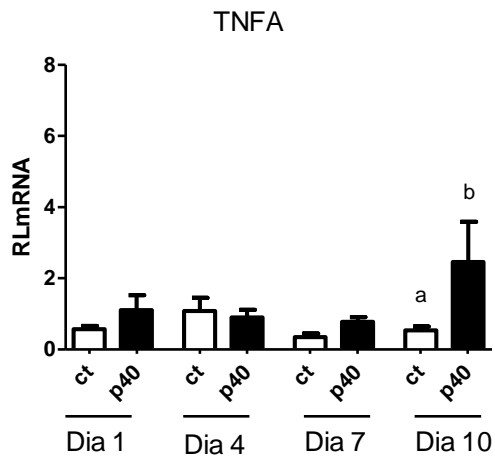
4.5.3. Expressão relativa de mRNA de genes de citocinas nos dias 1, 4, 7 e 10 de tratamento com *P. pentosaceus* 40

A quantificação relativa dos níveis de mRNA de genes codificadores de citocinas 1, 4, 7 e 10 dias após o início do tratamento com *P. pentosaceus* 40 está representada na **figura 17**. O tratamento com *P. pentosaceus* 40 revelou um perfil inflamatório, induzindo um aumento significativo na expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNFA) 10 dias após o início do tratamento quando comparados com o grupo controle do 10^o dia (**figura 17a**). Da mesma forma, houve uma tendência de aumento da expressão relativa de interferon gama (IFNG) dos grupos tratados em relação aos grupos controles (**figura 17b**) em todos os dias analisados. TNFA e IFNG são importantes no processo inflamatório local para o controle de uma infecção, entretanto, uma resposta exarcebada leva a uma disfunção da barreira

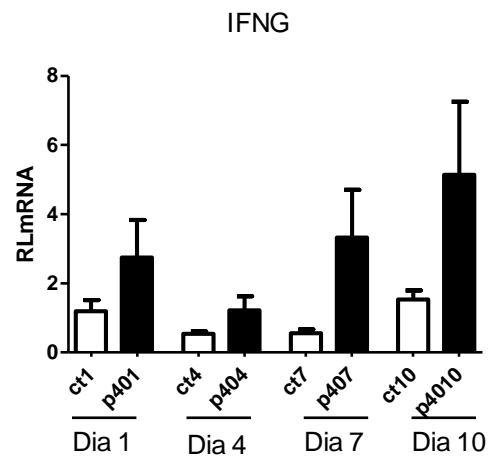
epitelial intestinal, contribuindo para a entrada e colonização da bactéria patogênica (Castillo, 2011). Estes resultados podem em parte explicar o maior índice de mortalidade em animais tratados com *P. pentosaceus* 40 e desafiados com *S. Typhimurium* em relação àqueles que foram desafiados e não tratados. A análise do nível da expressão de citocinas no 10º dia após o início do tratamento foi importante, pois este período corresponde àquele onde aconteceu a infecção por *S. Typhimurium*. Levando-se em consideração que a infecção com *S. Typhimurium*, por si só, induz o aumento dos níveis de citocinas pró inflamatórias como TNFA, IFNG e IL17, é provável que o tratamento com *P. pentosaceus* 40 tenha levado a uma resposta inflamatória exarcebada que facilitou a translocação da *Salmonella* (Castillo, 2011). São poucos os trabalhos que abordam e discutem o perfil de citocinas ideal para combater a salmonelose em camundongos, principalmente, aqueles que se referem a 10 dias após o início do tratamento. Alguns autores dizem que um perfil regulatório de expressão de citocinas foi induzido por bactérias que conferiram proteção à salmonelose e foram consideradas potenciais linhagens probióticas (Viljanen et. al. 2005; Corthesy et. al., 2007; Silva, 2008; Alvim, 2015), outros ainda dizem que o ideal é que a linhagem bacteriana testada induza a expressão tanto de citocinas regulatórias (TGFB1 e IL10) como de citocinas pró inflamatórias (IFNG, IL12, IL17), contribuindo para um balanço adequado entre os dois tipos de resposta imune (Galdeano e Perdigon, 2004; Cebra et. al., 2005; Steinberg, 2014). Existem ainda aqueles trabalhos que mostram que linhagens probióticas que induzam a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFNG e TNFA são capazes de inibir a replicação viral e proteger animais diante de uma infecção viral (Karapiah et. al., 1993; VanCanpem, 1994), um exemplo é a linhagem *L. casei* Shirota que protegeu contra o Virus da Influenza e é amplamente utilizado em leite fermentado para consumo humano (Hori et. al., 2001). Dados na literatura ainda reportam a utilização de bactérias lácticas que induzam uma resposta pró-inflamatória como adjuvantes imunes em vacinas contra influenza, poliomielite, rotavírus e cólera (Isolauri et. al., 1995, Paineau et. al., 2005; Winkler et. al., 2005; Zhang et. al., 2008; Boge et al., 2009; Davidson et. al., 2011;)

Para as citocinas IL6, IL10 e TGFB1 não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

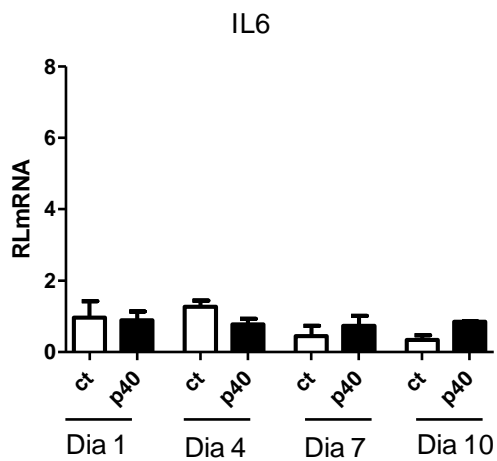
a)



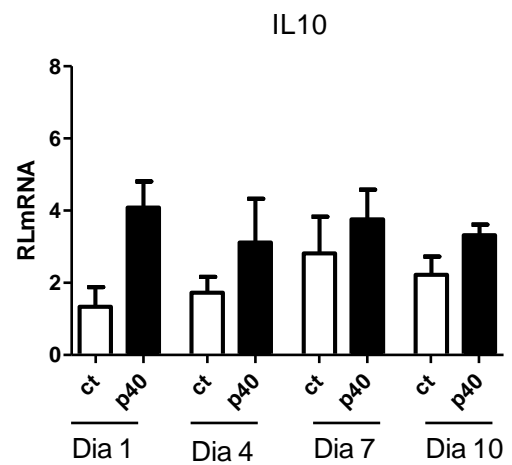
b)



c)



d)



e)

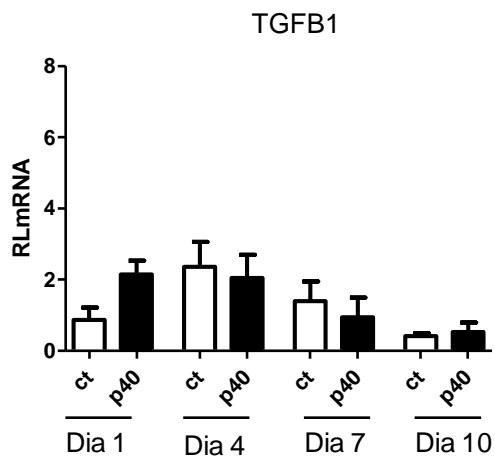


Figura 17. Expressão relativa de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias no intestino delgado de camundongos tratados e não tratados com *P. pentosaceus* 40 no 1º, 4º, 7º e 10º dias após o início do tratamento. a) TNFA b) INFG c) IL6 d) IL10 e) TGFB1. Os dados foram expressos como a média relativa de quantidade de mRNA (RLmRNA) usando como calibrador o nível de expressão do grupo controle com um dia de tratamento em relação aos demais grupos experimentais (n = 5 animais por grupo). ct: grupo controle, p40: grupo tratado. As barras verticais representam a média do desvio padrão de cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre um grupo experimental e um grupo controle do mesmo dia avaliado ($p < 0,05$). ANOVA 1 e pós teste de Tukey.

5. Conclusões

As linhagens *P. pentosaceus* 40 e *W. confusa* 1, selecionadas com base em propriedades funcionais desejáveis em probióticos *in vitro*, não promoveram uma maior sobrevivência dos camundongos infectados com o enteropatógeno *S. Typhimurium* nos testes *in vivo*, não sendo uma terapia apropriada contra a infecção. Todavia, o tratamento com as duas linhagens bacterianas não causou aumento dos índices hepático e esplênico, nem a morte dos camundongos, por isso, são sugestivos para utilização como adjuvante imune.

A análise da expressão do mRNA de citocinas induzidas por *P. pentosaceus* 40 revelou um perfil inflamatório de expressão de citocinas no intestino. Com base em dados na literatura, é possível que o tratamento com a linhagem *P. pentosaceus* 40 sirva como adjuvante imune de vacinas ou confira proteção frente a alguma importante infecção viral em equinos, como as diarreias em potros causadas por Rotavírus ou Coronavírus, ou ainda infecções do trato respiratório ou sistêmicas como Influenza Equina, Artrite Viral Equina e Encefalite Viral Equina.

É importante ressaltar a necessidade de serem realizados testes de triagem em bactérias candidatas a probióticos, assim como foi feito neste trabalho, antes de sua extensa utilização na terapia animal e humana, tendo em vista que os efeitos nem sempre serão benéficos para todos os tipos de infecção, como foi demonstrado no presente estudo.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Células e tecidos do sistema imunológico. **In: Imun. Cel. e mol.** Rio de Janeiro: Elsevier. 5ª ed. pp.17-40 (580p.), 2005.
- ABBOTT Y., *et al.* Zoonotic transmission of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from a dog to a handler. **J. Med. Microbiol.**, v.59, p.120–123, 2010.
- ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.119-129, 2010 (supl. especial).
- ALVIM, L. B. **Segurança e efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 isolada de suíno na infecção experimental com *Salmonella* Typhimurium em camundongos.** Tese (doutorado) em Genética. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Geral. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 2015.
- AMARI, M. *et al.* Genome sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, isolated from a wheat sourdough. **J. Bacteriol.**, v.194, p.1608-1609, 2012.
- AMMOR, M.S., A.B. FLOREZ AND B. MAYO. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid generate food grade vectors. **Food Microbiol.**, v.24, p.559-570, 2007.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Alimentos: alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saud e>>. Acesso: 15 de fev. de 2013.
- AXELSSON, L. T. *et al.* Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microb. Ecol. in Health and Dis.**, v.2, p.131-136, 1989.
- AYENI, F.A. *et al.* Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **Int. J. Food Microbiol.**, v.147, p.97–104, 2011.

- BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrit. Res. Rev.**, v.13, p.279-299, 2000.
- BELLETTI, N. *et al.* Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses. **J. of F. Prot.**, v.72, p.2162-2169, 2009.
- BERG, R. D. Probiotic, probiotics or 'conbiotics'? **Trends Microbiol.**, v. 6, p.89–92, 1998.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiolog. Rev.**, v.70, n.2, p. 567-590, 1990.
- BERNET-CAMARD, M. F. *et al.* The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes non-bacteriocin antibacterial substances active *in vitro* and *in vivo*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 2747–2753, 1997.
- BJORKROTH, K. J. *et al.* Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **Int. J. of Syst. and Evolut. Microbiol.**, v.52, p.141-148, 2002.
- BHOWMIK, T., MARTH, E.H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: A review. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.859–866, 1990.
- BLUMER, N. *et al.* Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. **Clin. and Exp. Allergy**, v.37, p.348-357, 2007.
- BOGE, T. *et al.* A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. **Vacc.**, v.27, p.5677-5684, 2009.
- BOTHA, M. **Selection of probiotic lactic acid bacteria for horses based on *in vitro* and *in vivo* studies.** South Africa. University of Stellenbosch. (Dissertação de mestrado), 2011.
- BRANCO *et al.* Identification and *in vitro* production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 43, n.4, p.338-344, 2010.

- BHUNIA, A. K. *et al.* Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. **J. Appl. Bacteriol.**, v.69, n.2, p.21-25, 1990.
- BYWATER, R. J. Identification and Surveillance of Antimicrobial Resistance Dissemination in Animal Production. **Poult. Sci.**, v.84, p.644-648, 2005.
- CASTILLO, N.A. *et al.* Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **BMC Microbiol.**, v.11, p.1-12., 2011.
- CARR, F. J. *et al.* The lactic acid bacteria: A literature survey. **Crit. Ver. in Microbiol.**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.
- CARVALHO, R.T.L.; HADDAD, C.M. **Pastagens e alimentação de equinos.** Piracicaba: FEALQ, 85p. 1987.
- CEBRA, J.J *et al.* The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system. In: **Mucosal Immun.**, 3rd Edition (Eds.: Mestecky, M.E.L.J., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J., and Mayer, L.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, 335-368, 2005.
- CHARTERIS, A. *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. of F. Protect.**, v.61, p.1636-1643, 1998.
- CLEUSIX, V. *et al.* Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. **BMC Microbiol.**, v.7, p.101, 2007.
- CHIU, H.-H. *et al.* Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. **J. of App. Microbiol.**, v.104, p.605–612, 2008.
- CHOI, C.W., *et al.* Novel microorganism *Pediococcus pentosaceus* EROM 101, having immune enhancement, anticancer and antimicrobial activities. **Free patents online**, 2003.

- COLLINS, M. D. *et al.* Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. of App. Bacteriol.**, v.75, p.595-603, 1993.
- COLLINS, F. M.; CARTER, P. B. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. **Infect. Immun.**, v.21, p.41-47, 1978.
- COPPOLA, R.; *et al.* Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait**, v.85, p.193-204, 2005.
- CORR, S. C. *et al.* Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceed. of the Nat. Acad. of Sc. of the United States of America**, v.104, n.18, p.7617-7621, 2007.
- CORTHÉSY, B.; GASKINS, H. R. Cross talk between probiotic bacteria and the host immune system. **J. Nutr.**, v.137, p.781S–790S, 2007.
- COSTA, L. B *et al.* Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Rev. Bras. de Zootec.**, v.36, p.589-595, 2007.
- COTTER P. D., *et al.* Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, n.10, p.777–788, 2005.
- CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Immun. and Med. Microbio.**, v.34, p.245-253, 2002.
- DABOUR, N. *et al.* Ismail Fliss. *In vivo* study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.133, p.225–233, 2009.
- DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 82, p.1-11, 2003.

- DAVIDSON, L. E. *et al.* *Lactobacillus* GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.65, p.501-507, 2011.
- DE KEERSMAECKER, S.C.J. *et al.* Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella* Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiol. Letters**, v.259, p.89–96, 2006.
- DESLAND, F. *et al.* **Commonly asked question about probiotics and the potencial benefits for your health. Institute of food and agricultural sciences (IFAS extension)**, p. 1-7. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012
- DUIJKEREN, E. V.; *et al.* *In vitro* susceptibility to antimicrobial drugs of 62 *Salmonella* strains isolated from horses in the netherlands. **Vet. Microbiol.**, v.45, n.1, p.19-26, 1995.
- EARING, J. E. *et al.* "Bacterial Colonization of the Equine Gut; Comparison of Mare and Foal Pairs by PCR-DGGE," **Adv. in Microbiol.**, v.2, p.79-86, 2012.
- EIGLER, A. *et al.* Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, v.18, p.487-492, 1997.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. **EFSA J.**, v.226, p.1–12, 2005.
- ELLINGER, D.K *et al.* Influence of feeding fermented colostrums of *Lactobaccillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. **J. Dairy Sci.**, v.63, p.478-482, 1980.
- ENDO, A *et al.* *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Diversity in Horse Feces, Revealed by PCR-DGGE. **Curr. Microbiol.**, v.59, p.651-655, 2009.
- ESPECHE, M. C. *et al.* Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. **Vet. Microbiol.**, v.135, p.346-357, 2009.

- EUZEBY, J.P.: List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47, 590-592, 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>> Acesso em: 02 Abril. 2015.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organiz. Guid. for Eval. of Probiot. in F.**, v.1, p.1-11, 2002.
- FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v.8, n.2, p.44-61, 2007.
- FERNANDEZ, M.F *et al.* Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal. **Tract. J. Appl. Microbiol.**, v.94, p.449-455, 2003.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3.** Lavras-MG: UFLA, 2010.
- FERREIRA, A. B. **Estudo da Resistência a Antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* H2b20 Submetido a Condições de Estresse.** 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- FLORESTA, F. A. **Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20: filogenia e presença de sequência de inserção putativa.** 2003. 54 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- FRICK, J.S *et al.* Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: Implications for the development of probiotics. **Infect. and Imm.**, v.75, p.3490-3497, 2007.
- FRIZZO, L.S. *et al.* Protective Effect of na Inoculum of Lactic Acid Bacteria from Bovine Origin Against *Salmonella* Serotype Dublin in the Intestinal Tract of Mice. **J. Animal Vet. Adv.**, v.9, p.2113-2122, 2010.
- FRIZZO, L.S. *et al.* Effects of probiotics on growth performance in young calves: A metaanalysis of randomized controlled trials. **Anim. Feed Sci. Tech.** v.169, 147-156, 2011.

- FUKAO, M.; YAJIMA, N. Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Lactobacilli. In: PANA, M. (Ed). **Antibiotic Resistant Bacteria: a Continuous Challenge in the New Millennium**. 6 ed. Croácia: InTech. p. 503-512, 2012.
- FULLER, R. (Ed) **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992.
- FURTADO, C.E. *et al.* Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.10, p.2194-2199, 2010.
- FUSCO, V. *et al.* Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker. **J. of F. Microbiol.**, v.1, p.1-7, 2011.
- GAGGIÀ, F. *et al.* Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **Int. J. Microbiol.** v.141, p.S15–S28, 2010.
- GALDEANO, C. M.; G. PERDIGÓN. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. **J. Appl. Microbiol.**, v.97, p.673–681, 2004.
- GANTNER, F. *et al.* T cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. **Exp. Cell Res.**, v.229, p.137-146, 1996.
- GARCIA, G. R. *et al.* Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. **Rev. Port. de C. Vet.**, v. 101, p. 263 - 268, 2006.
- GARRITY, G.M. *et al.* Taxonomic outline of the Procaryotes. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. **Bergey's Manual of Syst. Bact.**. 2nd ed. Vol. 2. New York, USA: Springer; The Proteobacteria, 2004.
- GATT, M. *et al.* Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. **Aliment. Pharmacol. Ther.**. 25(7):741-57, 2007.
- GAUTIER, A.V. *et al.* Mouse susceptibility to infection by the *Salmonella abortusovis* vaccine strain Rv6 is controlled by the *Ity/Nramp 1* gene and influences the antibody but not the complement responses. **Microb. Pathog.** 24(1):47-55, 1998.

- GEDEK, B. R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Myc.**, v.42, p.261-264, 1999.
- GEVERS, D. *et al.* J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.205, p.31–36, 2001.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **J. of Nut.**, v.125, p.1401-1412, 1995.
- GIBSON, G. R. *et al.* Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **Brit. J. of Nut.**, London, v. 93, n. 1, p. 31-34, 2005.
- GILL, S. H. *et al.* Protection against translocating *Salmonella* typhimurium infection in mice by feeding the immune-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. **Med. Microbiol. and Immunol.**, v.190, p.97-104, 2001.
- GIULIETTI, A. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Met.**, v.25, p.386–401, 2001.
- GOMES, D.A. *et al.* Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. **Folia Microbiol.**, v. 51, p.141-145, 2006.
- GORDON, J.I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **P. of the N. Acad. of Sc. of the United States of America**, v.99, n.24, p. 15451-15455, 2002.
- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **C. Op. in Gastroenterol.**, v.24, p.22-26, 2008.
- GRIFFITHS, E.A. *et al.* *In vivo* effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in Balb/c mice. **Digest. Dis. and Sc.**, v.49, p.579-589, 2004.
- GRIFFITH, R. W. *et al.* **J. Dis. of Swine**. Oxford: Blackwell Publishing. v.9, p 739-751, 2006.

- GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res. in Microbiol.**, v.161, p.26-29, 2010.
- HAVENAAR, R. *et al.* Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall,. p.209-224, 1992.
- HERBERT, D.R. *et al.* IL-10 and TGF- β redundantly protect against severe liver Injury and mortality during acute schistosomiasis. **J. of Imm.**, v.181, p.7214-7220, 2008.
- HILL, J.; GUTSELL, S. Effect of supplementation of a hay and concentrate diet with live yeast culture on the digestibility of nutrients in 2 and 3 year old riding school horses. Proceed. **Brit. Soc. Anim. Sci.**, v.7, p.128, 1998.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **F. Res. Int.**, v.35, p.109-116, 2002.
- HORI, T. *et al.* Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, p.593-597, 2001.
- HOYOS, G. Aplicación de la biotecnología en la producción animal: la experiencia mexicana de una década. **Mem. del 1er Simp. Mex. sobre Prob.** p.131-148, 1997.
- HUDSON, J.A. *et al.* Identification and enumeration of oleic acid and linoleic acid hydrating bacteria in the rumen of sheep and cows. **J. Appl. Microbiol.**, v.88, p.286–292, 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 24/3/2013.
- ISHIKAWA, I. *et al.* Oral administration of heatkilled *Lactobacillus plantarum* strain b240 protected mice against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.74, n. 7, p.1338-1342, 2010.
- ISOLAURI, E. *et al.* Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. **Vacc.**, v.13, p.310-312, 1995.

- ISOLAURI, E. *et al.* Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. **F. Microbiol.**, v.22, p.449-454, 2005.
- JACOBSEN, C. N. *et al.* Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Env. Microbiol.**, v.65, n.11, p.4949-4956, 1999.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. **Immunobiology: The immune system in health and disease.** New York: Garland Publ., 3a ed. 1997.
- JANG, J. *et al.* Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.212, p.29-34, 2002.
- JIN, L. Z. *et al.* Probiotics in poultry: modes of action. **Worlds Poultry Sc. J.**, v.53, n.4, p.351-368, 1997.
- JONES, S. L.; SPIER, S. J. Enfermidades inflamatórias do intestino grosso que causam diarreia. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina interna eqüina.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- JONGANURAKKUN, B. *et al.* *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. **J. Biosci. Bioeng.**, v.106, p.69-73, 2008.
- JOUANY, J.P. *et al.* Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and high-starch diet and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **J. Anim. Sci.**, v.87, p. 2844-2852, 2009.
- JUNIOR, A. M. P. *et al.* **Uso de aditivos antimicrobianos na alimentação animal: controle, restrições e tendências.** In: CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE AVICULTURA, SUINOCULTURA E LATICÍNIOS, 1, 2008, São Bento. Palestra. São Bento: Nutron, p. 1-7, 2010.
- KANG, M. S. *et al.* Comparison of temperature and additives affecting the stability the probiotic *Weissella cibaria*. **Chonnam Med. J.**, v.48, p.159-163, 2012.

- KANTOR, A. *et al.* Molecular characterization of the replicon of the *Pediococcus pentosaceus* 43200 pediocin A plasmid pMD136. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.151,p.237–244, 1997.
- KHOURY, K. A. *et al.* Small intestinal mucosal cell proliferation and bacterial flora in the conventionalization of the germfree mouse. **J.Exp. Med.**, v.130, p.659-670, 1969.
- KIM, S. M. *et al.* Evaluation of nutrient values of some feedstuffs, and the effects of yeast culture supplementation on digestibilities of nutrients and blood parameter in horse. **Korean J. Anim. Nut. Feed.**, v.15, n.5, p.272-280, 1991.
- KLARE, I. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **J. of Ant. Chem.**, v.59, p.900-912, 2007.
- KLEIN, G. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **J. of F. Microbiol.**, v.41, p103-125, 1998.
- KNORR, D. Technological aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v.9, p.295–306, 1998.
- KOS, B. *et al.* Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. of App. Microbiol.**, v. 94, p. 981-987, 2003.
- KUHL J, *et al.* Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first six weeks of life. **Vet. Microbiol.** v.151, p.321-328, 2011.
- LAUGHTON, J.M. *et al.* Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiol.**, v.152, p.1155-1167, 2006.
- LAVERMICOCCA P. *et al.* Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on Table Olives with the aim of formulating a new probiotic. **Food Appl. Environ. Microbiol.** v.71, p.4233–4240, 2005.
- LAYTON, A. N.; GALYOV, E.E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Exp. Rev. in Mol. Med.**, v.9, p.1-17, 2007.

- LEBEER, S. *et al.* J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Rev. Microbiol.**, v.8, p.171-184, 2010.
- LEBEER, S. *et al.* Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiol. and Mol. Biol. Rev.**, v.72, n.4, p. 728, 2008.
- LEBLANC, A. M *et al.* Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Internat. J. of F. Microbiol.**, v.138, p.223-231, 2010.
- LEE, M. R. *et al.* Bacteraemia caused by *Weissella confusa* at a university hospital in Taiwan, 1997–2007. **Clin. Microbiol. Infect.** v.17, p.1226–1231, 2011.
- LEE, C. M. *et al.* Discrimination of probiotic *Lactobacillus* strains for poultry by repetitive sequenced-based PCR fingerprinting. **J. of the Sc. of F. and Ag.**, v.10, p.1-7, 2011.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trend. in Food Sc. & Technol.**, v.6, p.241-245, 1995.
- LEE. Y. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.250, p.157-162, 2005.
- LEWIS, L.D. Alimentação e cuidados dos eqüinos para desempenho atlético. In: **Nutrição Clínica Equina**. São Paulo: Roca, p.293-348, 2000.
- LIMA, E. T. *et al.* Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Can. J. Vet. Res.**, v.71, p.103–107, 2007.
- LIMA, R.A.S *et al.* **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: ESALQ/USP. 250p, 2006.
- LORCA, G. L.; VALDEZ G. F. *Lactobacillus* stress responses, p. 115-137. In A. Ljungh, and T. Wadström (ed.), **Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics**. Calister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. 2009.

- LUCHANSKY, J.B. *et al.* Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in Turkey summer sausage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.3053–3059, 1992.
- LYONS, T.P. A new era in animal production: the arrival of the scientifically proven natural alternatives. In: **Biotechnology in the Feed Industry, PROCEEDINGS OF THE ANNUAL SYMPOSIUM**, 13, Nottingham. Proceedings. Nottingham: Nottingham University Press. p.1-13, 1997.
- MAASSEN C. *et al.* Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. **Vacc.**, v.21, p.2751-2757, 2003.
- MACKOWIAK, P.A. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. **Front. Pub. Health**, v.1, p.52, 2013.
- MAINVILLE, I. *et al.* A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **Inter. J. Food Microbiol.**, v.99, p.287-296, 2005.
- MANGONI, J. **Potencial Probiótico de Lactobacilos de origem suína**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.
- MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Divisão de epidemiologia: Informes Semestrais e Anuais OIE - Brasil 2005 a 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal/informacoes-epidemiologicas>>. Acesso em: 16 de jan. de 2013.
- MASTROENI, P; GRANT, A.J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Exp. Rev. in Mol. Med.**, v.13, p.1-15, 2011.
- MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. **Int. J. of F. Microbiol.**, v.105, p.281-295, 2005.
- MATHUR R, *et al.* A mouse model of *Salmonella typhi* infection. **Cell**, v.151, p.590-602, 2012.

- MATSUMOTO, S *et al.* Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clin. & Exp. Immun.**, v.140, p.417–426, 2005.
- McCOY, S.; GILLILAND, S. E. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species Having Potential for Use as Probiotic Cultures for Dogs. **F. Microbiol. and Saf.**, v.72, n.3, p.94-97, 2007.
- MEDINA, B.; *et al.* Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **J. Anim. Sci.**, v.80, n 5, p.2600–2609, 2002.
- MELO, U. P. *et al.* Doenças Gastrointestinais em Potros: Etiologia e Tratamento. **C. Anim. Bras.**, v.8, n.4, p.733-744, 2007.
- MELO, K. M. *et al.* A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. **PLoS One**; 4(7):e6269, 2009.
- MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **J. Medic. Microbiol.**, v. 58, p.1533-1541, 2009.
- METCHNIKOFF, E. **Prolongation of Life: Optimistic Studies**. New York: Put-nam's Sons. 1908.
- MIRLOHI, M. *et al.* Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. **Iran. J. of Biotec.**, v.7, p.233-240, 2009.
- MONTES, A. J.; PUGH, D. G. The use of probiotics in food-animal practice. **Vet. Med.**, v.88, p.282-288, 1993.
- MOORE, B. E *et al.* Yea-Sacc1026: cecal fermentation in the horse. Effect of yeast culture (Yea-Sacc1026) on microbial populations and digestion in the cecum and colon of the equine. **J. Anim. Sci.**, v.72, Suppl. 1, p.252-253, 1994.

- MOREIRA, J. L. S. *et al.* Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiol.**, v.5, n.15, p.1-9, 2005.
- MORELLI, L. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **C. Iss. in Intest. Microbiol.**, v.1, p.59-67, 2000.
- MORITA, H., *et al.* *Lactobacillus hayakitensis*, *L. equigenerosi* and *L. equi*, predominant lactobacilli in the intestinal flora of healthy thoroughbreds. **Anim. Sci. J.** v.80, p.339–346, 2009.
- MOROTOMI, M. *et al.* *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.52, p.211–214, 2002.
- MOROTOMI, M. *et al.* *Lactobacillus equi* sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.52, p.211–214, 2002.
- MOTA, R. M. *et al.* Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotech.**, v.6, p.1-11, 2006.
- MOURA, L. N. *et al.* Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Braz. J. of Microbiol.**, v.32, p.66-69, 2001.
- MOURA, R. S. **Probióticos e fitase em dietas para potros Mangalarga Marchador**. 2010. 95 f. Tese (Zootecnia). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010
- MOURA, R.S. *et al.* Digestibilidade aparente de dietas suplementadas com probióticos ou fitasa para potros Mangalarga Marchador. **Arch. Zootec.**, v.60, p.193-203, 2010.
- MOURA, R.S. *et al.* Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. **Rev. Bras. Zootec.**, v.38, n.6, p.1045-1050, 2009.

- MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- NAABER, P. *et al.* Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.551–554, 2004.
- NADER-MACIAS, M. E. F. *et al.* Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. **J. of Ind. Microbiol. & Biotec.**, v.35, n.11, p.1387-1395, 2008.
- NAGPAL, R. *et al.* Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.334, p.1–15, 2012.
- NAIDU, A.S. *et al.* Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.38, p.13-126, 1999.
- NAM, H. *et al.* Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. **App. and Env. Microb.**, v.68, p.4642-4645, 2002.
- NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. **Probióticos e prebióticos na avicultura.** In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2. 2000, Santa Maria. Anais... Concórdia: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, v.1, p.45-55, 2000.
- NEUMANN, E. **Comportamento *in vitro* de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo.** Viçosa: UFV 86p. (Dissertação de Mestrado), 1991.
- NIGATU, A. *et al.* Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *P. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. **Let. Appl. Microbiol.**, v.26, p.412–416, 1998.
- NG, S. C. *et al.* Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.15, n.2, p.300-310, 2009.

- NICOLI, J.R. *et al.* **Probióticos: Experiências com animais gnotobióticos**. In: FERREIRA, C.L.L.F. (Ed.) *Prebióticos e Probióticos – Atualizações e Prospecção*. Viçosa: UFV, 2003, p. 123-133, 2003.
- NIEDERHAUSERN, S *et al.* Van A-type vancomycinresistant enterococi in equine and swine rectal swabs and in human clinical samples. **C. Microbiol.**, v.55, p.240, 2007
- NISSLE, A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria and the mechanism of action of *E. coli* therapy (mutaflor). **Med.**, v.4, n.21, p.1017–1022, 1959.
- NUENO PALOP, C.; NARBAD, A. Probiotic assesment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated during an *in vitro* screening of lactic acid bacteria. **Int. J. of Food Microbiol.**, v.145, p.390-394, 2011.
- NUTRIENTS requeriments of horses**. 6 ed. Washington: National Academy of Science, 341p, 2007.
- O'BRIEN, A. D. Innate resistance of mice to *Salmonella typhi* infection. **Infect. Immun.**, v.38, p.948–952, 1982.
- OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - a review. **Int. J. of Med. Microbiol.**, v.300, p.57-62, 2010.
- OLANO A. *et al.* *Weissella confusa* (basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.1604–1607, 2001.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. *et al.* Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **C. Rural**, v.38, p.2670-2679, 2008.
- OUOBA, L. I. I *et al.* Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **Int. J. of Food Microbiol.**, v.121, p.217-224, 2008.
- OUWEHAND, A.C. *et al.* Probiotics: mechanisms and established effects. **Int. D. J.**, v.9, n.1, p.43-52, 1999.

- PAGAN, J. D. Effect of yeast culture supplementation on nutrient digestibility on nutrient digestibility in aged horses. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.371, 1990.
- PAINEAU, D. *et al.* Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double blind, randomized, controlled trial. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.53, p.107-113, 2008.
- PALLADINO, M.A. *et al.* Anti TNF- α therapies: the next generation. **Nature Rev. Drug Disc.**, v.2, p.736-746, 2003.
- PANCHENIAK, E. F. R. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos.** 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- PAPANICOLAOU, D.A. *et al.* The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Ann. Intern. Med.**, v.128, p.127-137, 1998.
- PARRAGA, M. E.; *et al.* A clinical trial of probiotic administration for prevention of *Salmonella* shedding in the postoperative period in horses with colic. **J. of Vet. Internal Med.**, v.11, n.1, p.36-41, 1997.
- PELLETIER, C *et al.* Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **App. and Env. Microbiol.**, v.63, n 5, p.1725-1731, 1997.
- PELUSO, I. *et al.* *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infect. Immun.**, v.75, p.1730-1737, 2007.
- PERDIGÓN, C. *et al.* The Oral Administration of Lactic Acid Bacteria Increases the Mucosal Intestinal Immunity In Response to Enteropathogens. **J. Food Protect.**, v.53, p.404-410, 1990a.
- PERDIGÓN, G. *et al.* Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Res.**, v.57, p.255-264, 1990b.

- PICKLER, L. *et al.* Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desfiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.1, p.27-36, 2012.
- RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? **Microb. and Infect.**, v.3, p.1261-1269, 2001.
- REID, G.; HAMMOND, J.A. Probiotics. Some evidence of their effectiveness. **Canad. Fam. Phys.**, v.51, p.1487–1493, 2005.
- RIJKERS, G.T. *et al.* Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. **Br. J. Nutr.**, v.106, p.1291–1296, 2011.
- RINNE, M.M. *et al.* Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.43, p.59–65, 2005.
- RIPAMONTI, B. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. Università degli Studi di Milano, Department of Veterinary Science and Technology for Food Safety, Milan, Italy. **Anaer.**, v.17, p.97-105, 2011.
- RITCHIE, M. L., & ROMANUK, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. **PLoS One**, v.7, e34938, 2012.
- ROCHAT, T. *et al.* Antiinflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microb. Cell Fact.**, v.6, 22, 2007.
- RODRIGUES, A. C. P. *et al.* Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella* typhimurium and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **J. of App. Bacteriol.**, v.81, p.251-256, 1996.
- RODRIGUEZ, J.M. *et al.* Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. **Crit. Ver. Food Sci. Nut.**, v.42, p.91–121, 2002.

- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v.130, p.396S–402S, 2000.
- RUIZ-MOYANO, S. *et al.* Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Sc.**, v.80, p.715-721, 2008.
- RYAN, K. A. *et al.* Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. **J. Antimic. Chemo.**, v.61, n.4, p.831–834, 2008.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. de C. Farm.**, v.42, p.1-16, 2006.
- SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. of Biotech.**, v.84, p.197-215, 2000.
- SAKAITANI, Y. *et al.* Colonization of intestinal microflora in newborn foals. **J. Intest. Microbiol.**, v.13, p.9-14, 1999.
- SALMINEN, S. *et al.* Demonstration of safety of probiotics - a review. **Int. J. of Food Microbiol.**, v.44, p.93-106, 1998.
- SANDES, S.H.C. **Seleção de Bactérias Lácticas com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa na pecuária bovina.** 112 f. Dissertação (Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- SANDES, S.H.C. *et al.* *Lactobacillus* species identification by amplified ribosomal 16S-23S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis. **Benef. Microbes**, v.5, p.471-481, 2014.
- SANTANA, F. P. ***Lactobacillus* e *Pediococcus* de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico.** 76 f. Dissertação (Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2015.

- SANTOS, R. L. *et al.* Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microb. and Inf.**, v.3, p.1335–1344, 2001.
- SAVAGE, D.C. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. **Annu. Rev. Nutr.**, v.6, p.155-178, 1986.
- SCHLEY P. D.; FIELD C. J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. **Brit. J. of Nut.**, v.87, Suppl. 2, p.221–230, 2002.
- SCHULTZ, M. *et al.* Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n.2, p.372–378, 2004.
- SERNA-COCK, L. *et al.* Effects of fermentation substrates and conservation methods on the viability and antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites. **Elect. J. of Biotech.**, v.15, p.1-8, 2012a.
- SERNA-COCK, L. *et al.* Kinetics of fermentation and antimicrobial action of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Rev. Facult. de Ingeniería**, v.55, p.55-65, 2010.
- SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.28, p.405-440, 2004.
- SHI, H. N.; WALKER, A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. **Can. J. of Gastroent.**, v.18, p.493-500, 2004.
- SHINOHARA, N. K. S. *et al.* *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **C. & Saúde Colet.**, v.13, p.1675-1683, 2008.
- SILVA, A. C. **Potencial imunomodulador e alergênico do leite humano cru e pasteurizado suplementado com Bifidobacterium breve em ratos Wistar.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, Minas Gerais. 2008.
- SILVA, A. M. *et al.* Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **J. of App. Microbiol.**, v.97, p.29-37, 2004.

- SILVA, A. M. *et al.* Protective effect of bifidus Milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. **J. of App. Microbiol.**, v.86, p.331-336, 1999.
- SILVA, B.C. *et al.* *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Benef. Microbes**, v.4, p.267-275, 2013.
- SOJKA, D.K. *et al.* Mechanisms of regulatory Tcell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunol.**, v.124, p.13-22, 2008.
- SOTO, L.P. *et al.* Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. **Vet. Med. Int.**, v.1, article ID 274987, 2010.
- SPENCER, R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **J. of App. Bacteriol.**, v. 7, p. 215 - 220, 1994.
- STEINBERG, R. S. **Avaliação da capacidade imunomodulatória de isolados de *Lactobacillus* bovinos (L38 e L36) em modelo experimental murino desafiado por *Salmonella enterica* subsp. enterica sorovar Typhimurium.** 2012. 172 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.
- STEINBERG, R. S. *et al.* Safety and Protective Effectiveness of Two Strains of *Lactobacillus* with Probiotic Features in an Experimental Model of Salmonellosis. **Int. J. of Env. Res. and Public Health**, v.11, p.8755–8776, 2014.
- TAJABADI, N. *et al.* *Weissella* sp. Taj-Apis, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. **J. of Food, Agric. and Env.**, v.10, p.263-267, 2012.
- TANNOCK, G. W. *et al.* Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **App. and Env. Microbiol.**, v.65, p.4264-4267, 1999.
- TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annu. Rev. Nutr.**, v.22, p.107-138, 2002.

- TEIXEIRA, G. S. *et al.* Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. **J. of Med. Microbiol.**, v.59, p.891-897, 2010.
- TEUBER, M.; *et al.* Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek J.**, v.76, p.115-137, 1999.
- TIMONEY, J.F. The pathogenic equine streptococci. **Vet. Res.**, v.35, p.397-409, 2004.
- TINDAL, B. J. *et al.* Note Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.** v. 55, p. 521–524, 2005.
- TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. **Braz. J. of Microbiol.**, v.40, p.209-221, 2009.
- TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* st712bz isolated from boza. **Braz. J. of Microbiol.**, v.38, p.166-172, 2007.
- TRIBUCCI, A. M. O. **Palatabilidade e digestibilidade aparente de equinos submetidos a dietas com diferentes níveis de inclusão de polpa cítrica.** 2011.53 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2011.
- TURNER, J. L. *et al.* Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine Diets. **The Prof. Anim. Scient.**, v.17, p.21 -226, 2001.
- UNDERDHAL, N.R *et al.* Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of Escherichia coli-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. **Anim. J. Vet. Res.**, v.43, p.2227-2232, 1983
- UMESAKI, Y *et al.* Expansion of $\alpha\beta$ T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. **Immun.**, v.79, p.32–37, 1993.
- VALERIO, F. *et al.* Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Syst. and App. Microbiol.**, v.32, p.438-448, 2009.

- VAN DE VEERDONK, F.L. *et al.* Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMB Rep.**, v.42, p.776–787, 2009.
- VAN OVERTVELT, L. *et al.* Lactic acid bacteria as adjuvants for sublingual allergy vaccines. **Vacc.**, v.28, p.2986-2992, 2010.
- VASCONCELOS, A. L. S *et al.* Antagonistic and protective effects against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by *Lactobacillus murinus* in the digestive tract of gnotobiotic mice. **Braz. J. of Microbiol.**, v.34, p.21-24, 2003.
- VAUGHAN, E. E. *et al.* Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.10, p.505–510, 1999.
- VÉLEZ, M. P. *et al.* Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.276, p.140–148, 2007.
- VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Meth.Cell. Mol. Biol.**, v.5, p.25-40, 1994.
- VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.** 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- VILJANEN M. *et al.* Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. **Allerg.**, v.60, p.494–500, 2005.
- VILLANI, F. *et al.* Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from natural whey starters for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. **Ital. J. of Food Sc.**, v.3, p.221–234, 1995.
- VOROS, A. **Diet related changes in the gastrointestinal microbiota of horses.** Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Nutrition and Management. (Dissertação de mestrado), 2008.

- WALKER, D.K.; GILLILAND, S. E. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **J. of Dairy Sc.**, v.76, n.4, p. 956-961, 1993.
- WEESE, J.S. *et al.* Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. **Equine Vet. J.**, v.36, p.351-355, 2004.
- WEISS, L. H. N. *et al.* Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Vet. Bras.**, v.22, p.104-108, 2002.
- WHITELEY, L.O *et al.* The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. **Toxicol. Pathol.**, v.24, n.3, p. 305-314, 1996.
- WINKLER, P. *et al.* Effect of a dietary supplement containing probiotic bacteria plus vitamins and minerals on common cold infections and cellular immune parameters. **Int. J. of Clin. Pharm. and Therap.**, v.43, p.318-326, 2005.
- WOODMANSEY, E. J. Intestinal bacteria and ageing. **J. of App. Microbiol.**, v.102, p.1178–1186, 2007.
- WORLD HEATH ORGANIZATION – **Organização Mundial da Saúde** - Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso 08 de fev. WHO, 2012.
- WRIGHT, G. D. Mechanism of resistance to antibiotics. **C. Op. in Chem. Biol.**, v.7, p.563-569, 2003.
- XANTHOPOULOS, V. *et al.* *In vitro* study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal in Lactic Acid Bacteria. **Press. Universit. de Caen**, Caen: Lactic 97, 1997.
- YUKI, N. *et al.* Colonization of the stratified squamous epithelium of the non-secreting area of horse stomach by lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.5030–5034, 2000.
- YUYAMA, T.; *et al.* Evaluation of a host-specific *Lactobacillus* probiotic in neonatal foals. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v.2, n.1, p.26-33, 2004.

ZHANG, W. *et al.* Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. **Vacc.**, v.26, p.29-30, 2008.

ZHOU, J.S. *et al.* Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **Int. J. of Food Microbiol.**, v.56, p.87-96, 2000.

ANEXOS

ANEXO I: Níveis de susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. aos agentes antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (milímetros) em teste de disco-difusão em ágar MRS de acordo com Charteris *et. al.*, 1998.

ANTIMICROBIANO		NÍVEL DE SUSCEPTIBILIDADE		
Nome	Concentração	Resistente	Moderadamente Sensível	Sensível
Amicacina	30 µg	< 15	16 - 17	≥ 18
Ceftriaxane	30 µg	< 13	14 - 20	≥ 21
Cloranfenicol	30 µg	< 13	14 - 17	≥ 18
Oxacilina	1 µg	< 18	19 - 20	≥ 21
Penicilina	10 U	< 19	20 - 27	≥ 28
Vancomicina	30 µg	< 14	15 - 16	≥ 17

ANEXO II: Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 203/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Determinação do potencial imunomodulatório de lactobacilos, frações da parede bacteriana e proteína S recombinante de novos isolados com potencial probiótico**", que tem como responsável(is) **Álvaro Cantini Nunes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 12/2009**.

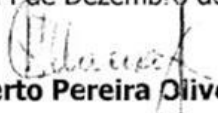
Este certificado expira-se em **9/ 12/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 203/2009**, related to the project entitled "**Determination of modulation of the immune responses induced in mice by new strains of lactobacillus, cell wall fraction and recombinant S-layer proteins**", under the supervisors of **Álvaro Cantini Nunes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 9, 2009**.

This certificate expires in **December 9, 2014**.

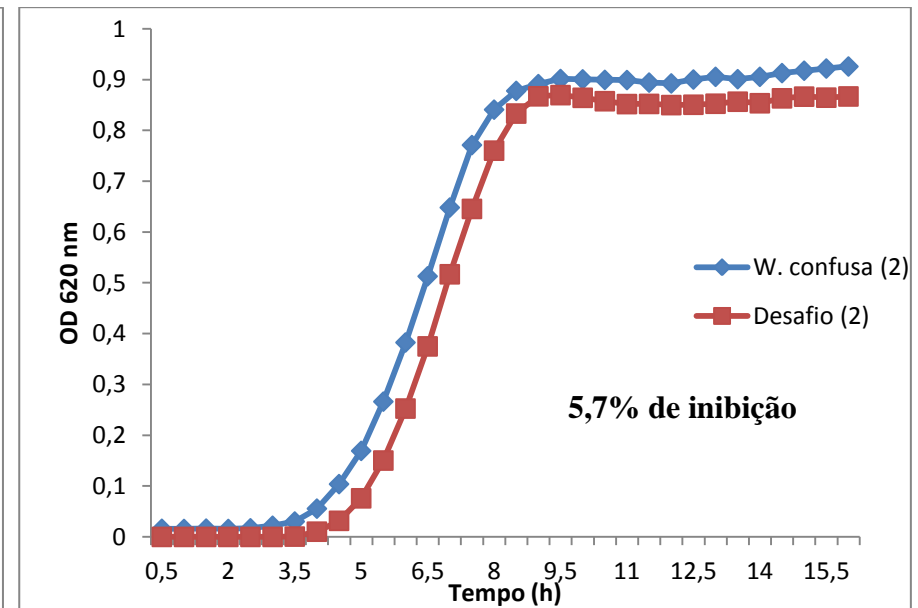
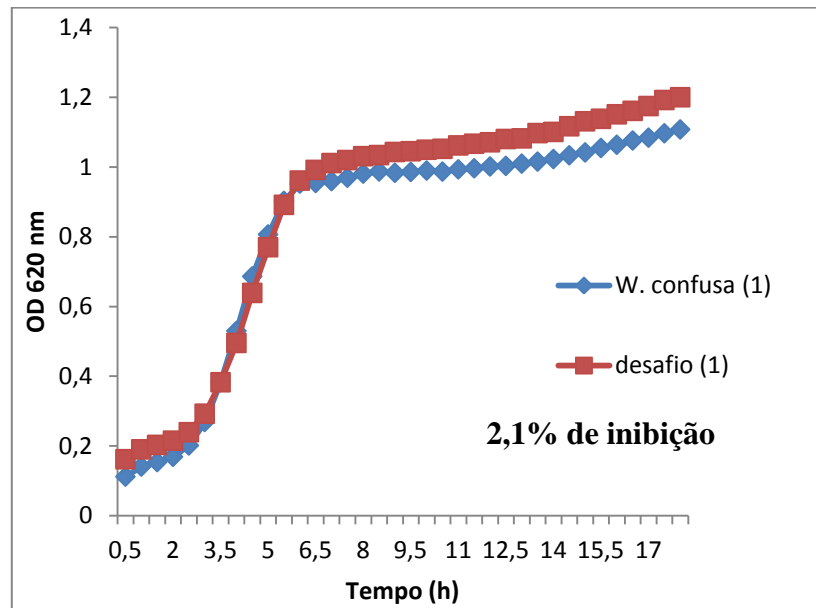
Belo Horizonte, 14 de Dezembro de 2009.

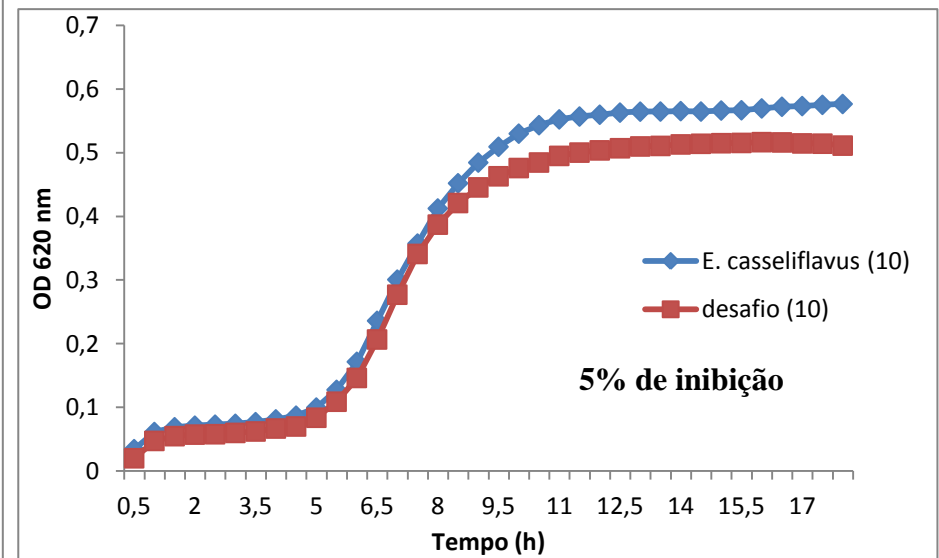
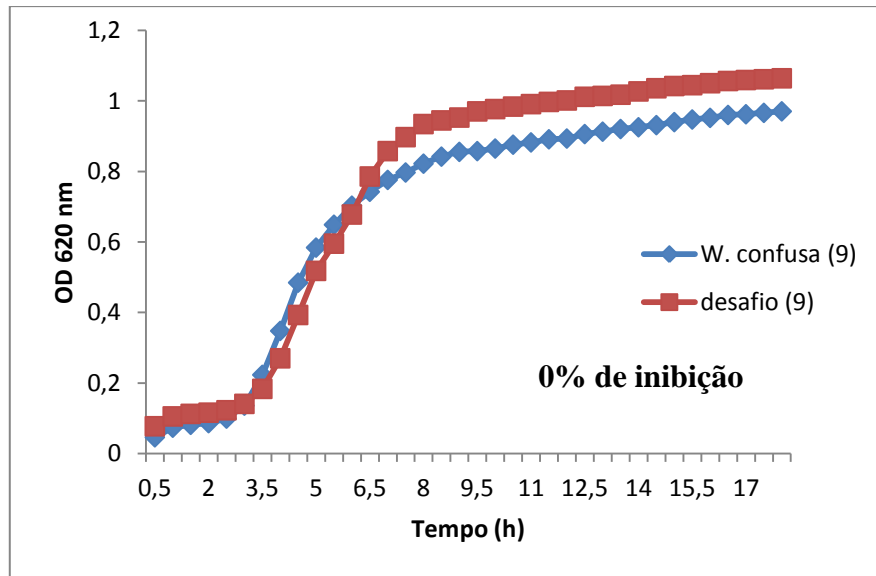
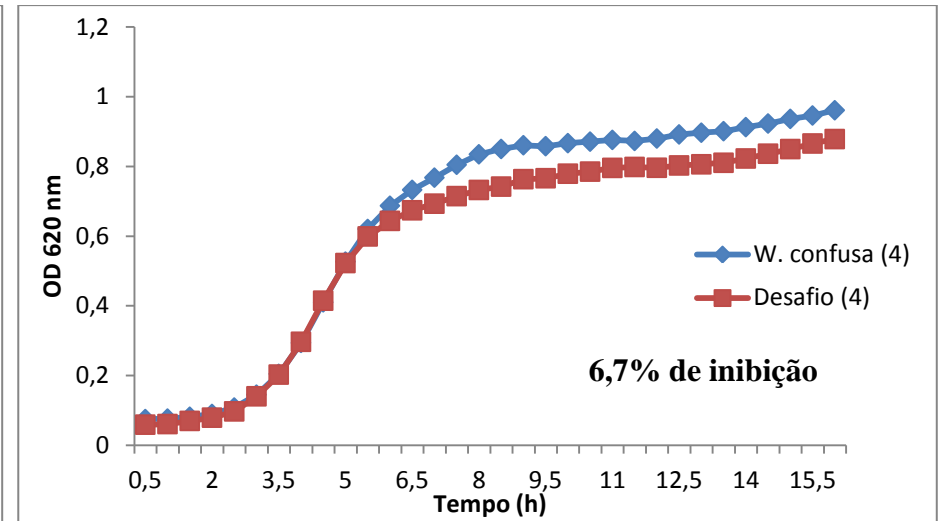
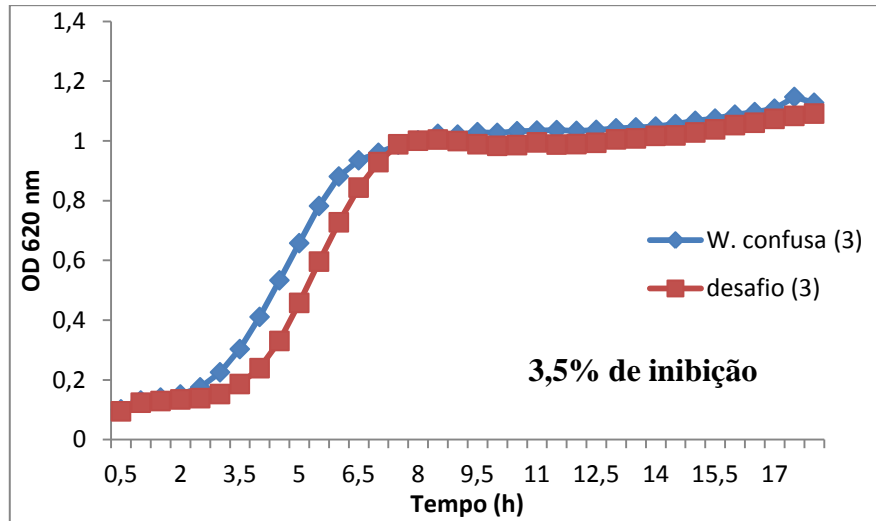

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

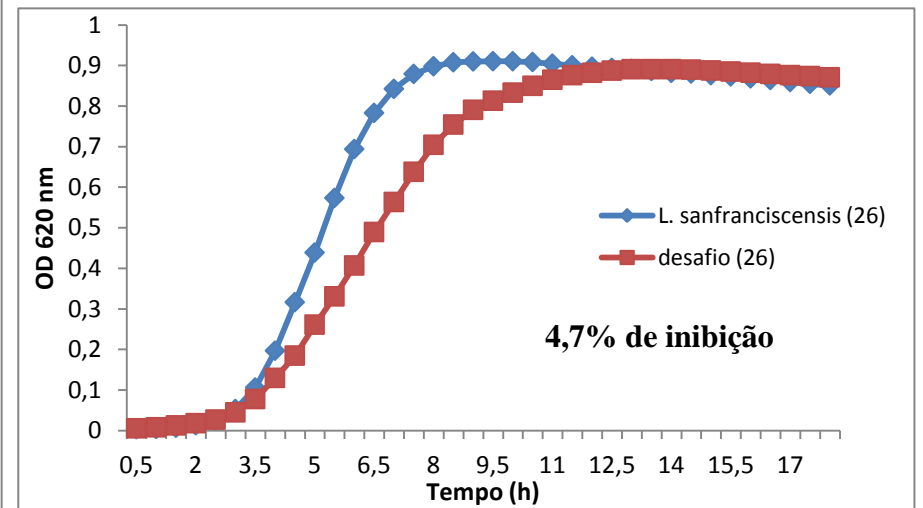
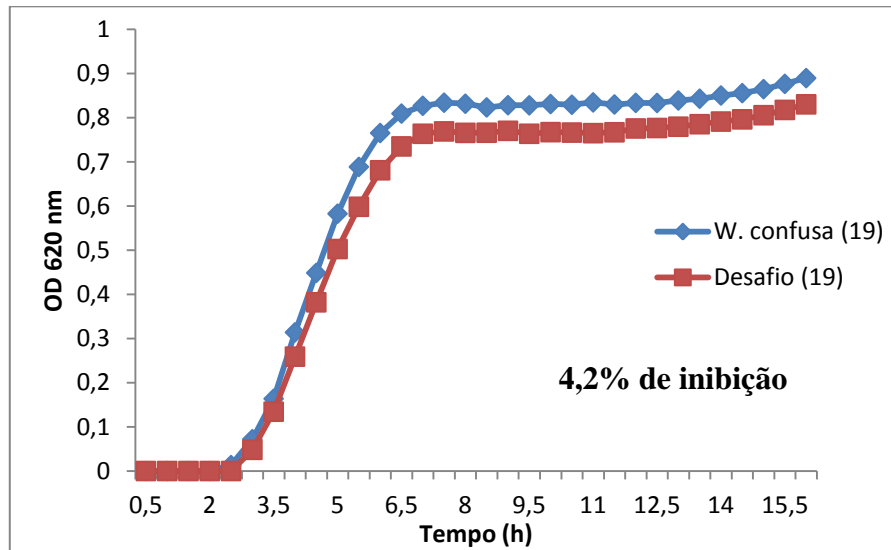
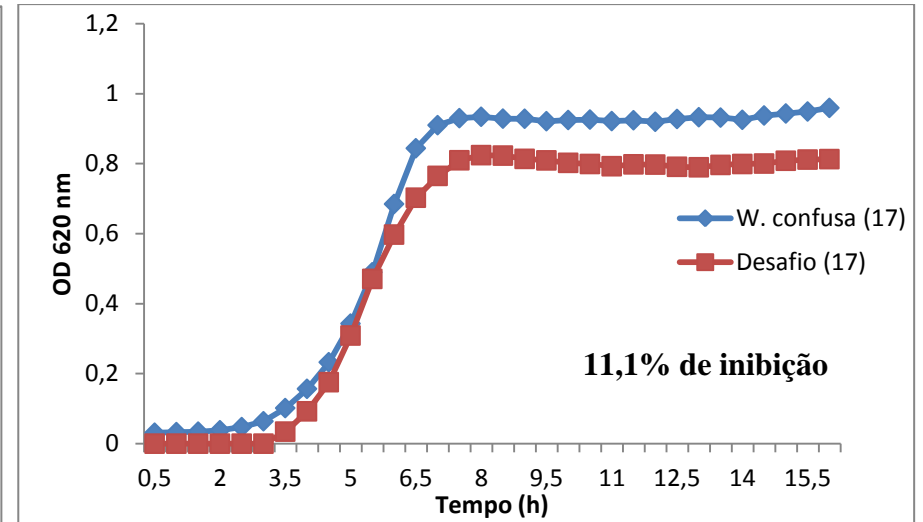
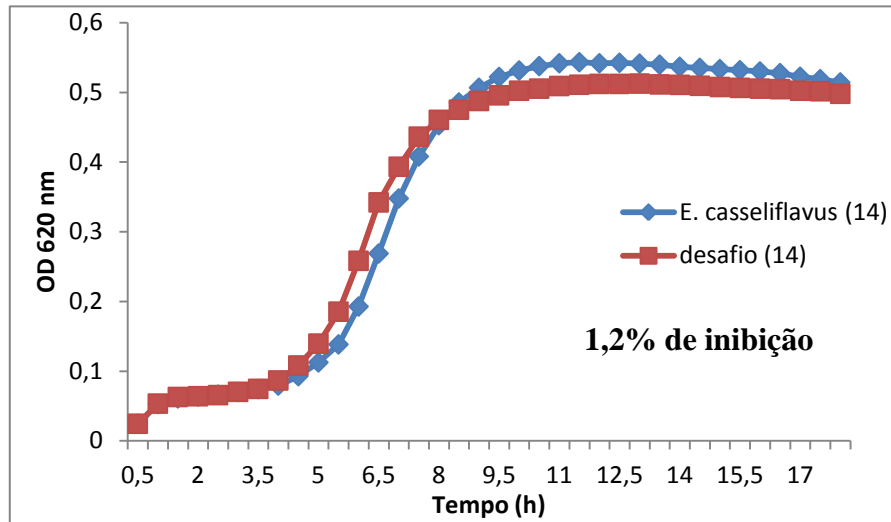
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

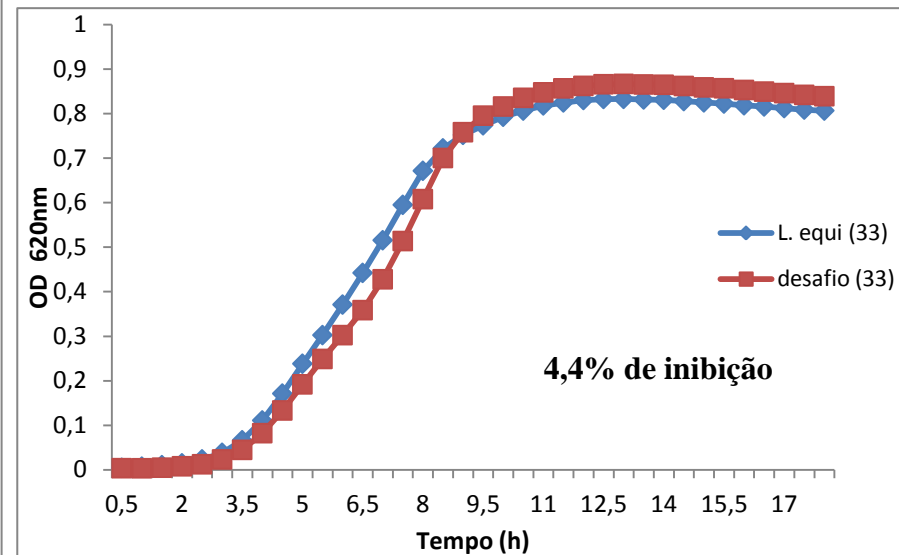
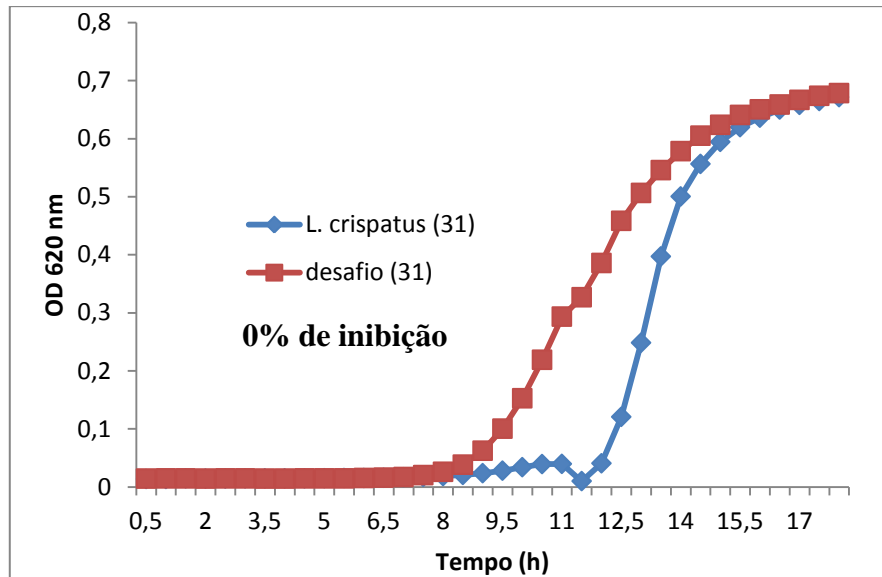
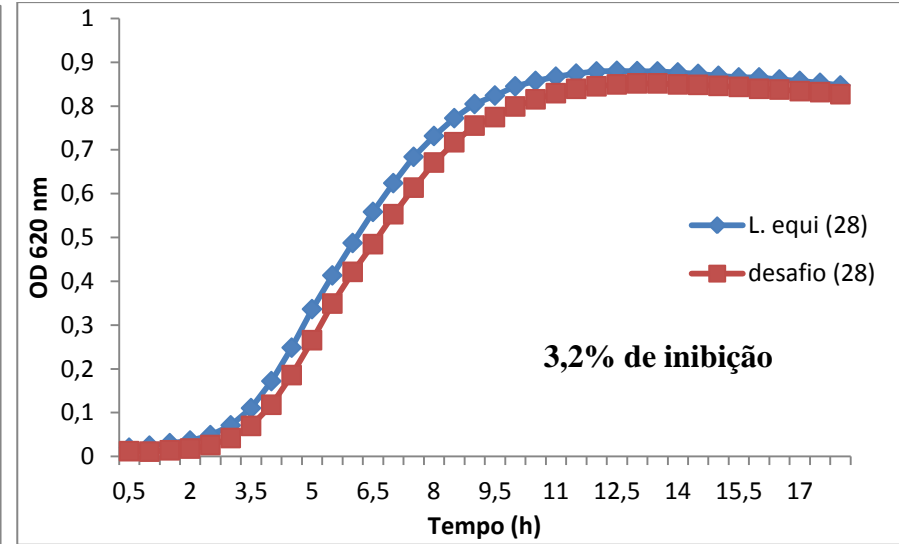
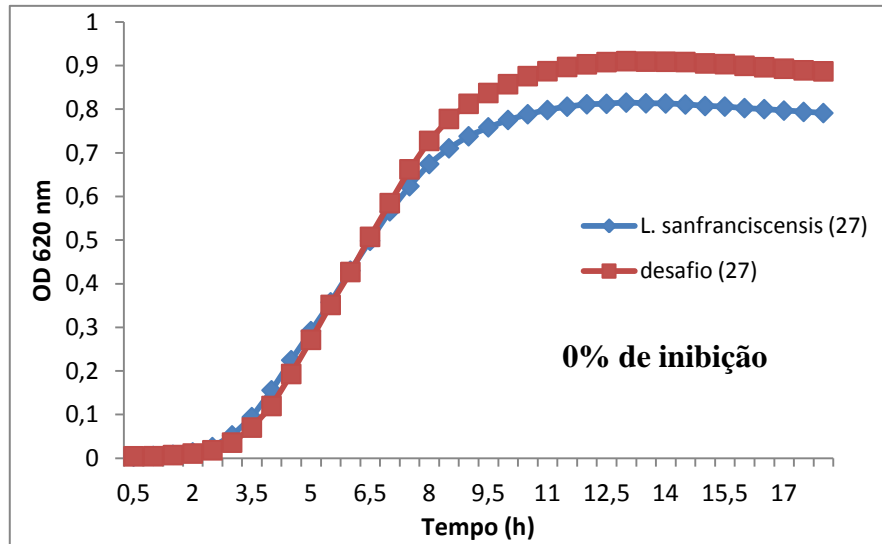
APÊNDICES

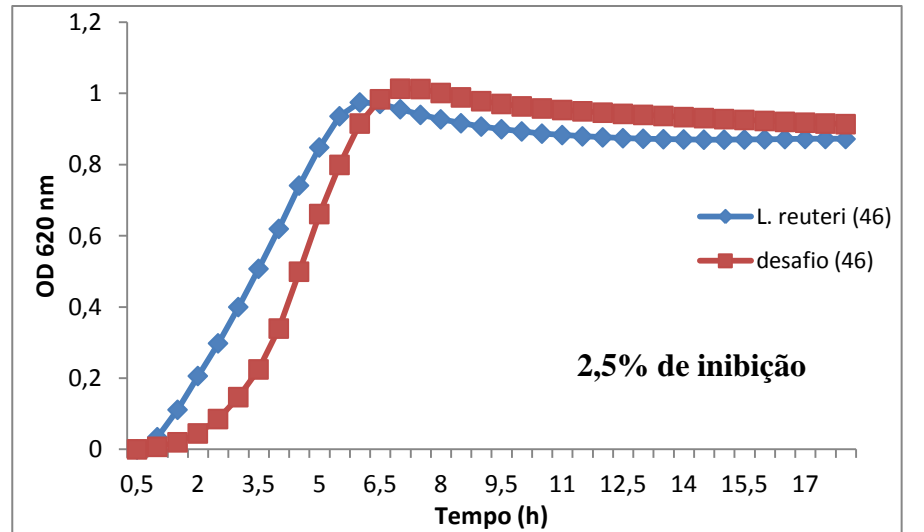
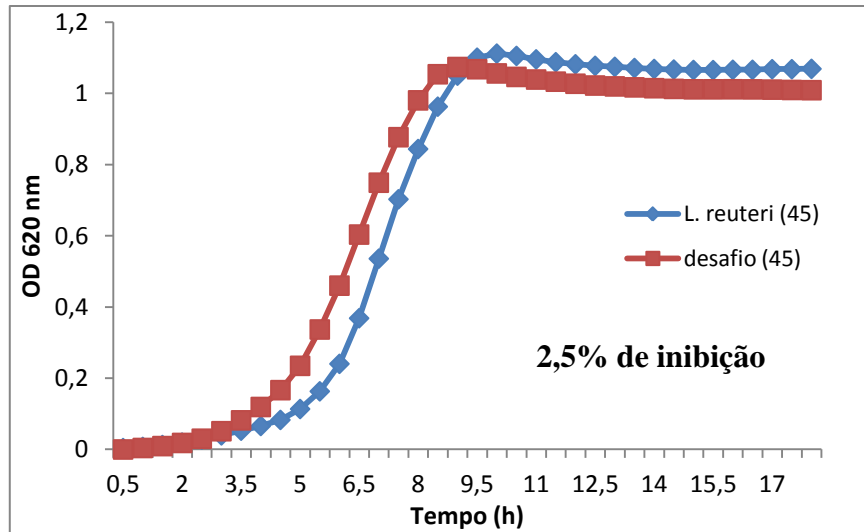
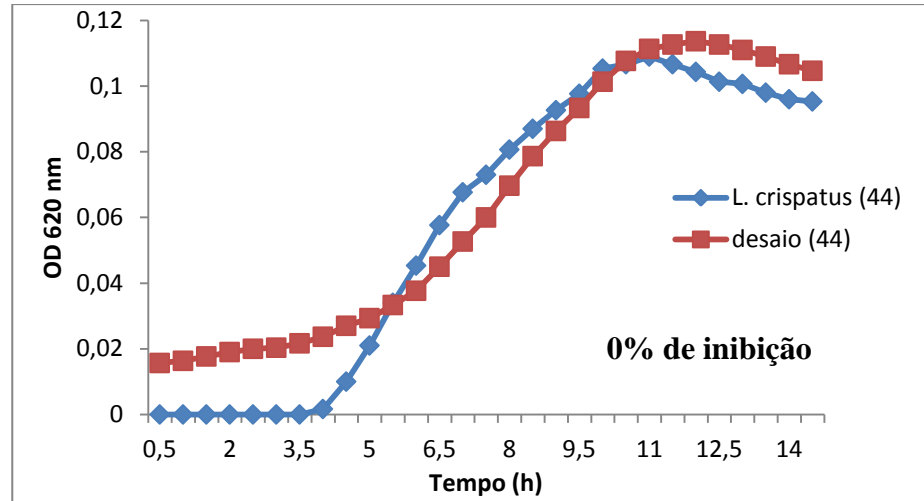
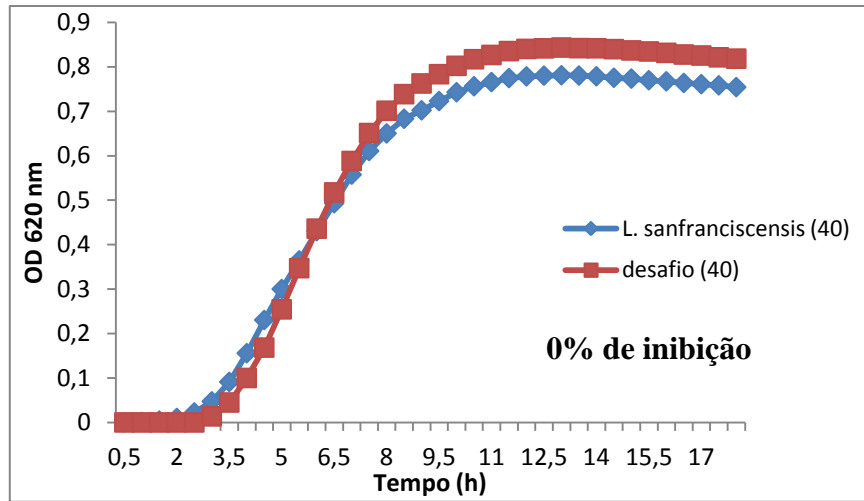
Apêndice I. Curvas de crescimento obtidas de isolados de bactérias lácticas em presença de suco gástrico artificial. A linha azul equivale ao crescimento controle, a linha vermelha ao crescimento com o desafio. A porcentagem de inibição é mostrada na **Tabela 2**.





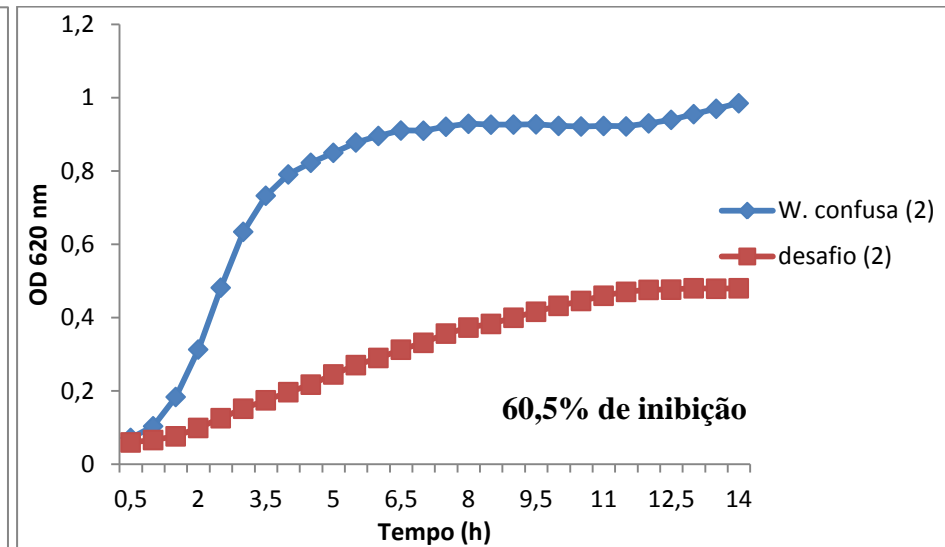
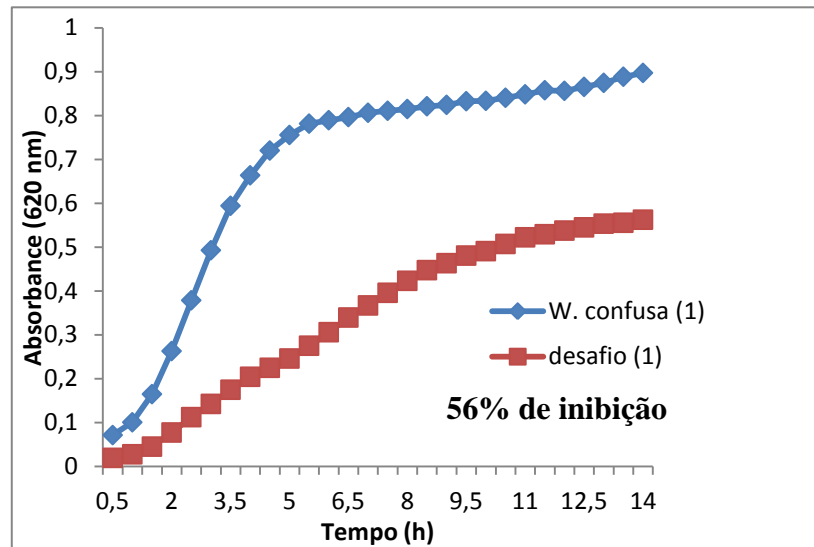


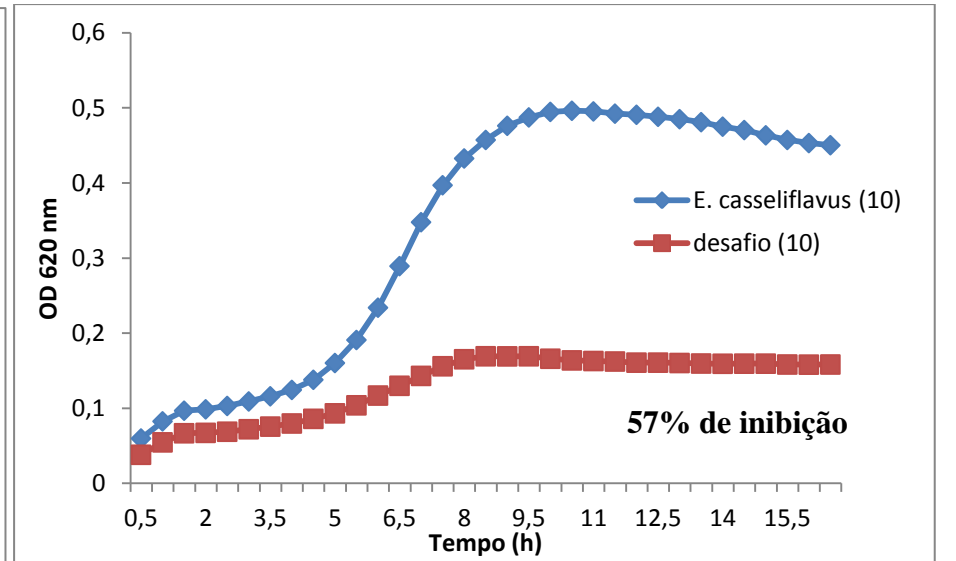
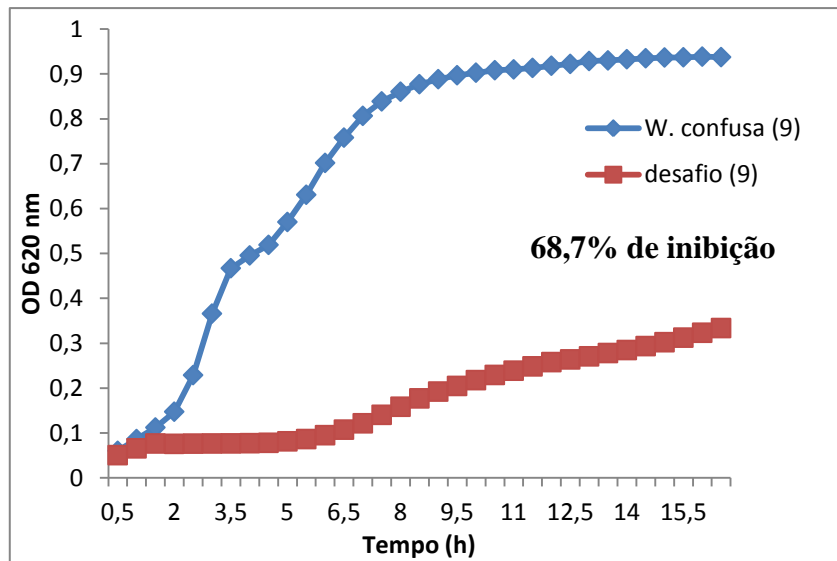
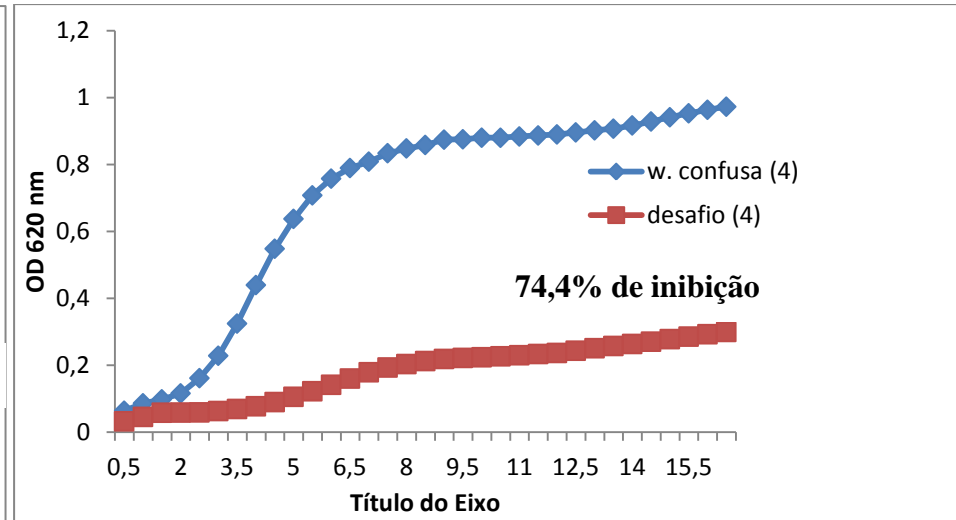
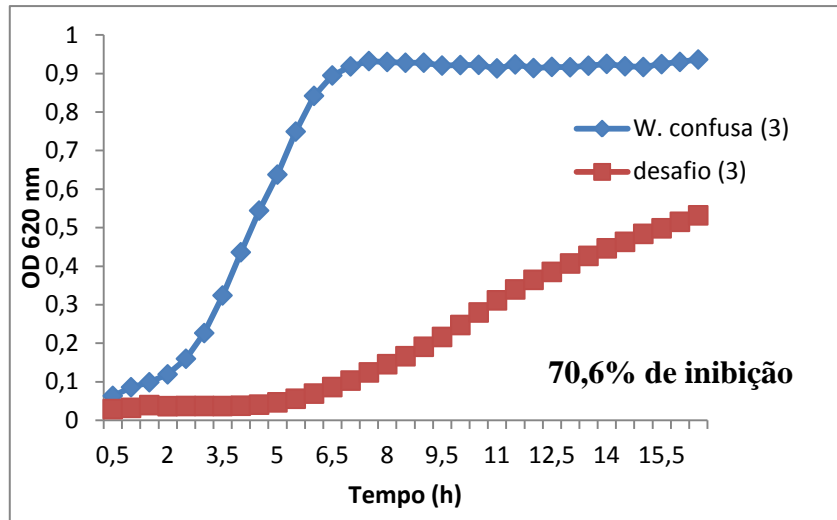


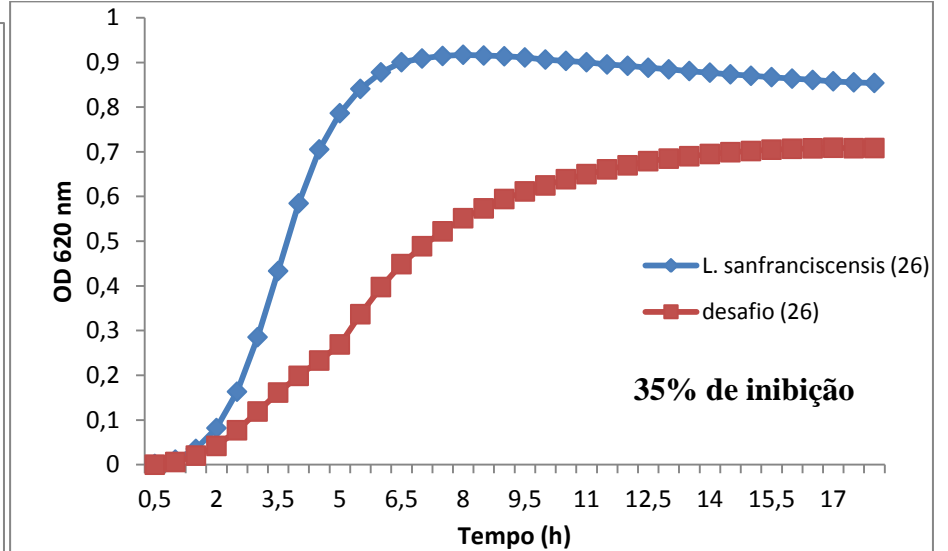
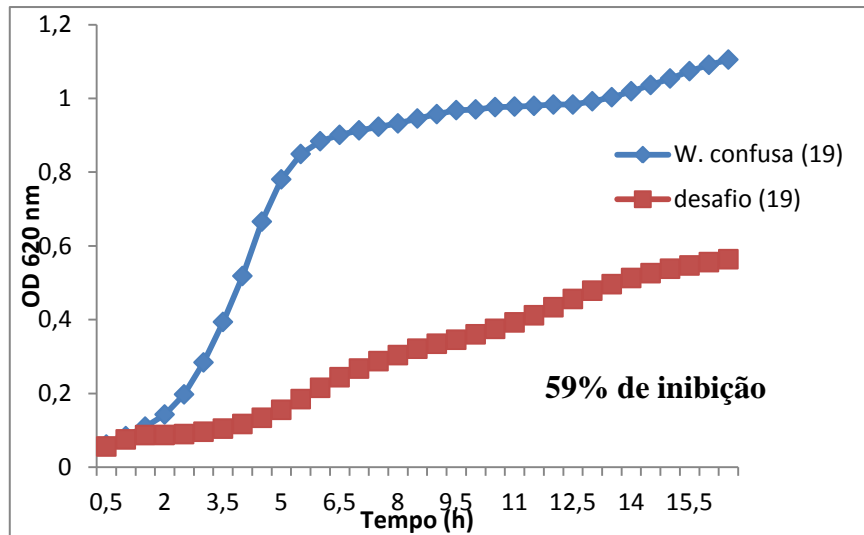
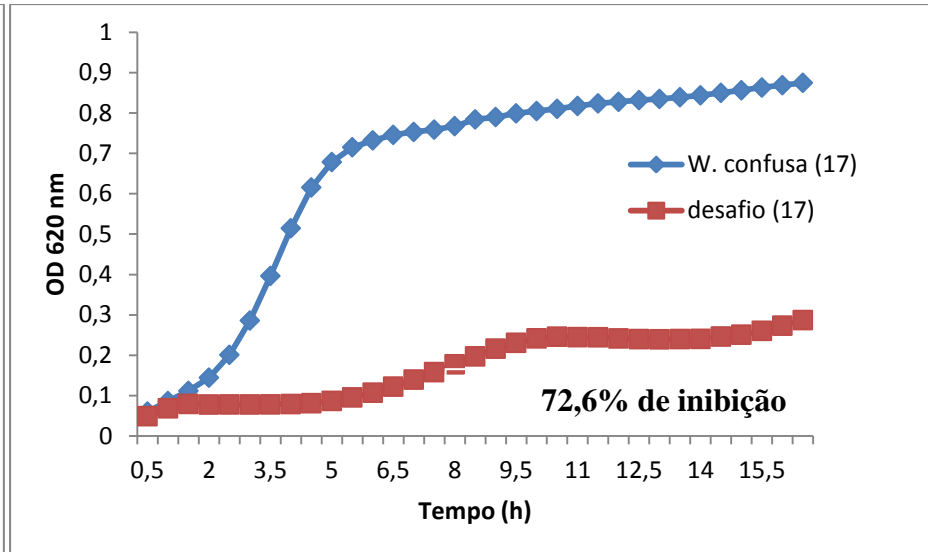
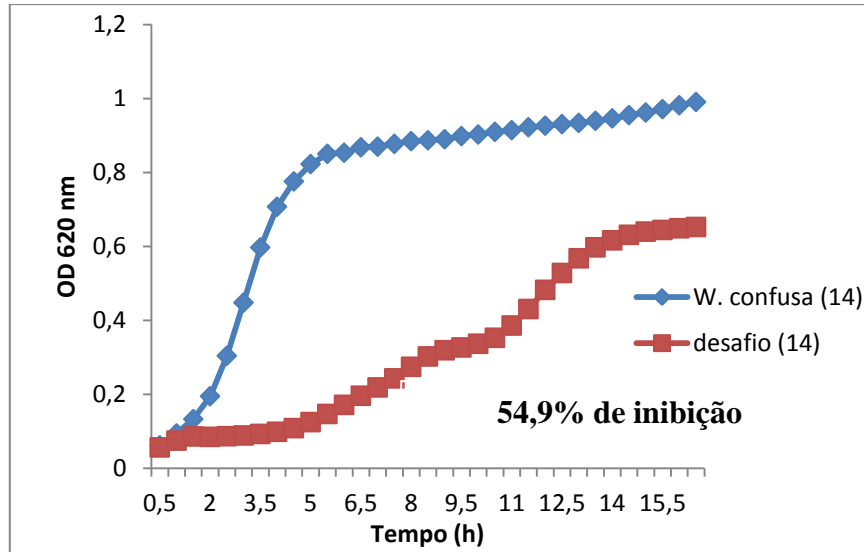


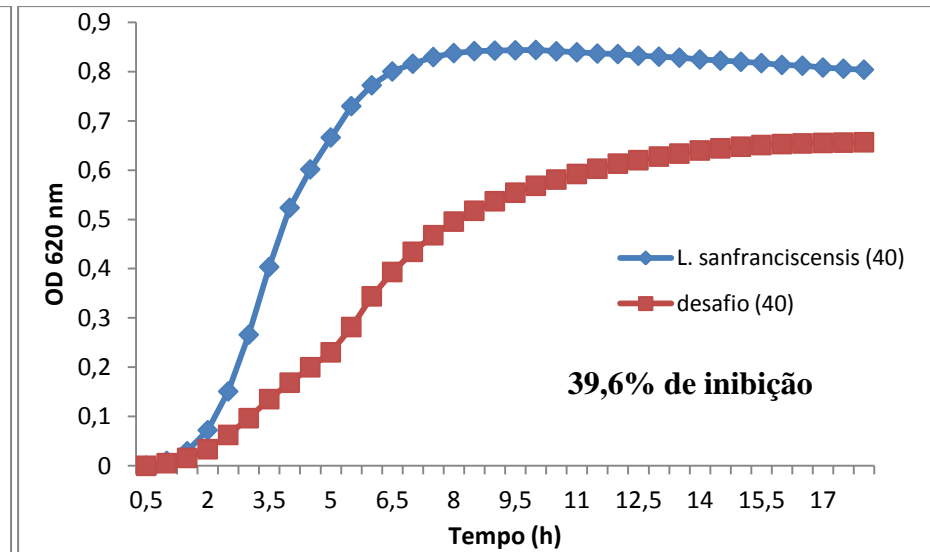
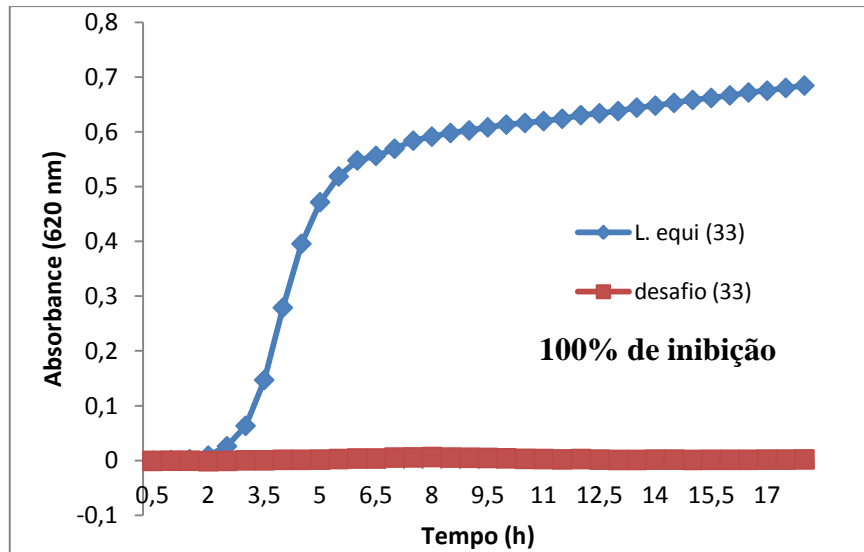
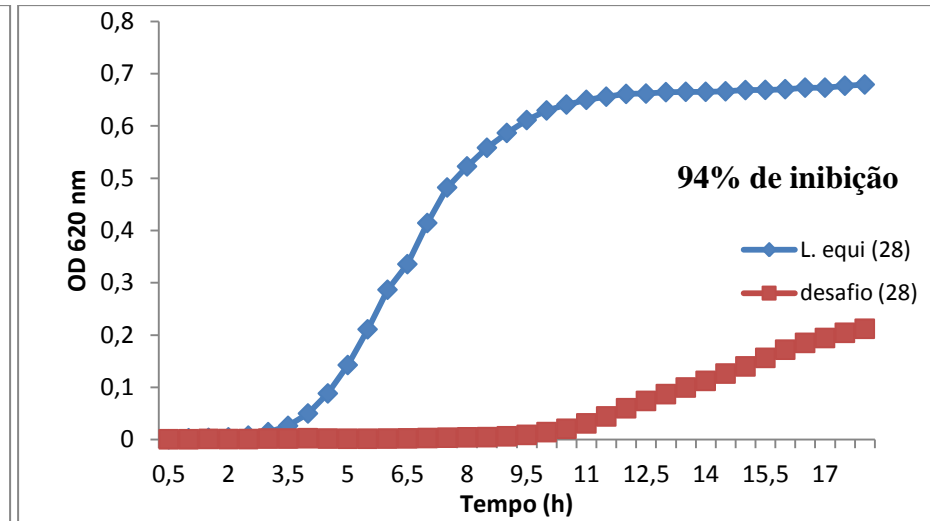
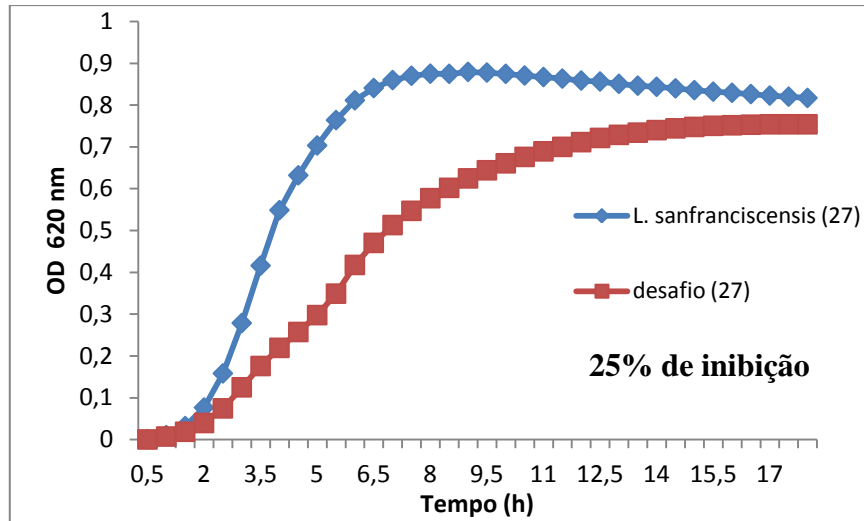
Apêndice II. Curvas de crescimento obtidas para os isolados de bactérias lácticas na presença de oxgall 0,3%.

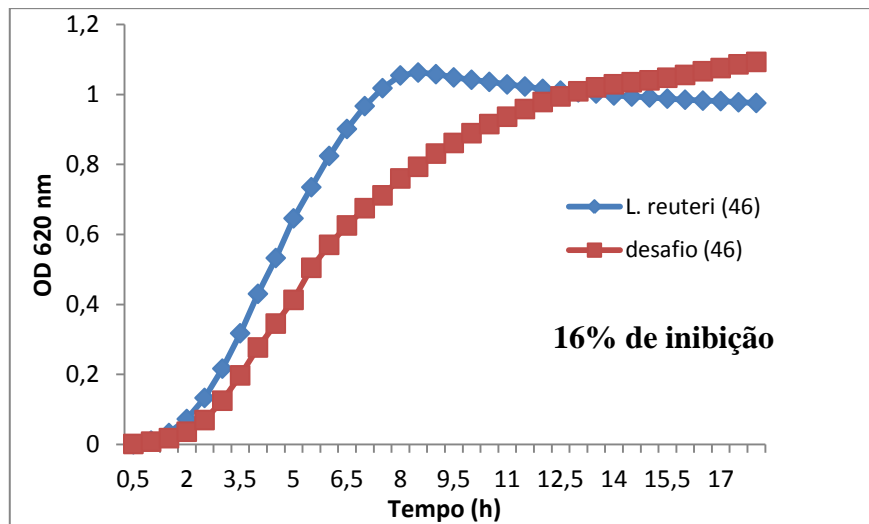
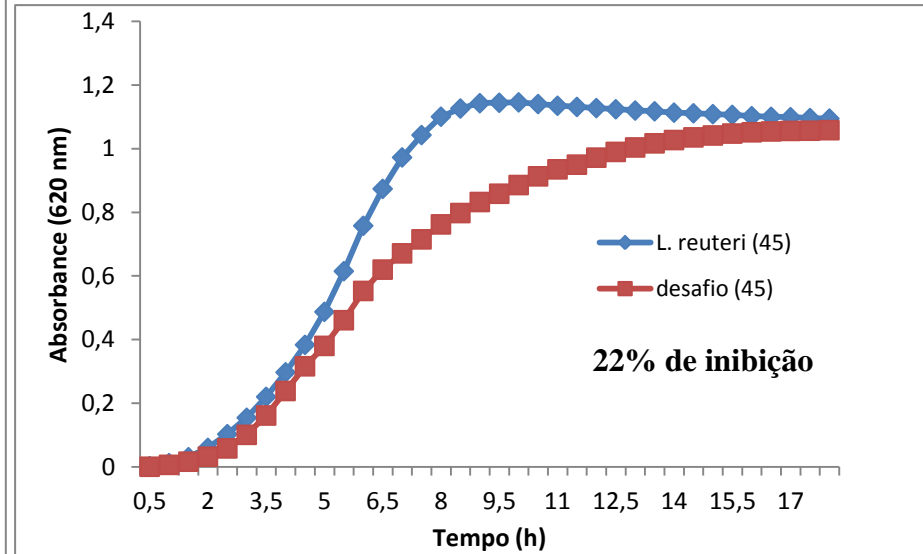
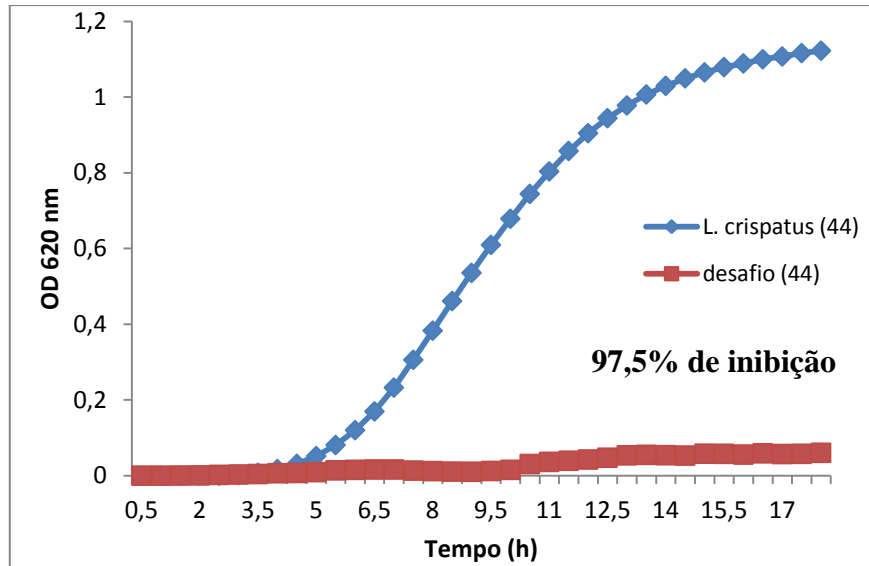
A linha azul equivale ao crescimento controle, a linha vermelha ao crescimento com oxgall 0,3%. A porcentagem de inibição é mostrada na Tabela 2.












```

Query 302 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAAATGGACG 361
          |||
Sbjct 310 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAA-TGGACG 368

Query 362 AACAGTCTGACCGAGGCAACGCCGCGTGGAGTTGAAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAAC 421
          ||
Sbjct 369 AA-AGTCTGACCGAG-CAACGCCGCGTG-AGT-GAA-GAAGTTTTTCGGATCGTAAAA-C 422

Query 422 TCTGTTGTTTAGGAGAAAGAAACAACGGGATTGAGAGTAACACACTGTTTCATCCCCTTT 481
          |||
Sbjct 423 TCTGTTGTT-AG-AGAA-GAA-CAA-GG-AT-GAGAGTAA-A-A-TGTT-CATCCC-TT- 469

Query 482 GACCGGTATCTAAACCAGGAAAGGCCACGGGCTTAACTACGTGCCAAGGCAAGGCCCGC 541
          |||
Sbjct 470 GAC-GG-TATCTAA-CCAG-AAAG-CCACGG-CT-AACTACGTGCCA-G-CA-G-CC-GC 517

Query 542 NGGTAATAACGTAGGGTGGCAAGCGTTTGTCCGGATTTTATTGGGGCGTAAACGCGAGCG 601
          |||
Sbjct 518 -GGTAATA-CGTAGG-TGGCAAGCGTT-GTCCGG-ATTT-ATTGGG-CGTAAAGCGAGCG 570

Query 602 CAGCGGTTTCTTAAGGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCACTTG 661
          |||
Sbjct 571 CAGCGGTTTCTTAAG-TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG-AGGGTCA-TTG 627

Query 662 GAAACTGGGAGCACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGACGTGGAATTCCATTGTGTAGCGGGTG 721
          |||
Sbjct 628 GAAACTGGGAG-AC-TTGAGTGCAGAAGAGGAGA-GTGAATTCCAT-GTGTAGCGG-TG 682

Query 722 AAATGCGTAGCATCTCTGGGACGGAACACCAGTTGGCGAACGGGCGGCTCTCCTGGGTCC 781
          |||
Sbjct 683 AAATGCGTAG-ATATATGG-A-GGAACACCAGT-GGCGAA-GG-CGGCTCTC-TGG-TC- 733

Query 782 TGNAACCTTGAACGGCTTGANGGCTCCGAAA 812
          |||
Sbjct 734 TGTAAC-T-GA-CG-CT-GA-GGCTC-GAAA 757

```

Isolado 28 > dbj|AB425924.1| *Lactobacillus equi* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: TB-C18; Length=1550 Score = 412 bits (223), Expect = 6e-112; Identities = 239/246 (97%), Gaps = 4/246 (2%); Strand=Plus/Plus

```

Query 11 GCGGCGTTTCCT-ATA-ATGC-AGTCGAACGCTTTTTCTTATCACCGTAGCTTGCTACAC 67
          |||
Sbjct 34 GCGGCG-TGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTTTCTTATCACCGTAGCTTGCTACAC 92

Query 68 CGATAAGAAATTGAGAGGGGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGAGGG 127
          |||
Sbjct 93 CGATAAGAAATTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGAGGG 152

Query 128 GGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATATCTCTTAGAACCGCATGGTTCTGGG 187
          |||
Sbjct 153 GGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATATCTCTTAGAACCGCATGGTTCTGGG 212

Query 188 ATGAAAGGTGGCGTAAGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTTGTGGTG 247
          |||
Sbjct 213 ATGAAAGGTGGCGTAAGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTTGTGGTG 272

Query 248 GGGTAA 253
          |||
Sbjct 273 GGGTAA 278

```

Isolado 40 > gb|KJ649285.1| *Pediococcus pentosaceus* strain LI05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; Sequence ID: |Length: 1433; Number of Matches: 1; Related Information; Range 1: 537 to 1411GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match; Alignment statistics for match #1; Score1596 bits(864); Identities874/878(99%); Gaps4/878(0%); Strand Plus/Minus

```

Query 1      CTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTA 60
|
Sbjct 1411    CTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTA 1352

Query 61     TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGC 120
|
Sbjct 1351    TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGC 1292

Query 121    AGCCTACAGTCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTAACCTCGCGGTCTCGCGA 180
|
Sbjct 1291    AGCCTACAGTCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTAACCTCGCGGTCTCGCGA 1232

Query 181    CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTT 240
|
Sbjct 1231    CTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTT 1172

Query 241    GACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTA 300
|
Sbjct 1171    GACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTA 1112

Query 301    ATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA 360
|
Sbjct 1111    ATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA 1052

Query 361    CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACCTCTAATC 420
|
Sbjct 1051    CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACCTCTAATC 992

Query 421    TCTTAGACTGTGAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAA 480
|
Sbjct 991     TCTTAGACTGTGAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAA 932

Query 481    CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGT 540
|
Sbjct 931     CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGT 872

Query 541    CGTACTCCCCAGGCGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTC 600
|
Sbjct 871     CGTACTCCCCAGGCGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTC 812

Query 601    CAACACTTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTA 660
|
Sbjct 811     CAACACTTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTA 752

Query 661    CCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGT 720
|
Sbjct 751     CCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGT 692

Query 721    TCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCAC 780
|
Sbjct 691     TCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCAC 632

Query 781    TCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAG-CTTTCACATTTAGAC 839
|
Sbjct 631     TCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATT-AGAC 573

Query 840    TTTAAAAGACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAA 877
|
Sbjct 572     TT--AAAAGACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAA 537

```

Apêndice IV. Cursos extracurriculares realizados no período da tese, resumos e artigos publicados em congressos referentes à tese.

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; **SILVA, B. C.**; ZANIRATI, D. F.; JUNG, L.R.C.; NICOLI, J.R. ; NEUMANN, E. ; NUNES, A.C. *Lactobacillus* species identification by amplified ribosomal 16S-23S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis. **Beneficial Microbes JCR**, v. 5, p. 471-481, 2014.

Citações:[SCOPUS2](#)

2. ★SILVA, B. C.; JUNG, L.R.C.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.Q.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Beneficial Microbes JCR**, v. 1, p. 1-9, 2013.

Citações:[SCOPUS5](#)

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★**SILVA, B.C.**; ALVIM, L.B.; BONFIM, M.R.Q.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *In vitro* assessment of functional features of lactic acid bacteria isolated from horse faeces. In: **4th International Probiotics Association (IPA) World Congress**, 2014, Atenas, Grécia. *Beneficial Microbes*. Wageningen. Holanda: Wageningen Academic Publishers, 2014. v. 5. p. S20-S20.

2. **SILVA, B.C.**; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; NUNES, A.C. Equine Lactic Acid Molecular Identification. In: **V Encontro de Genética de Minas Gerais**, 2014, Belo Horizonte. Anais do V Encontro de Genética de Minas Gerais, 2014.

3. Santos, C. C.; SANDES, S. H. C.; ALVIM, L. B.; **SILVA, B.C.**; CAMPOS, M. H. A.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF FOUR LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT MUCOSAL SITES OF CATTLE IN GERM FREE MURINE MODEL. In: **XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology 2014**, 2014, Búzios, RJ. Anais do XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology 2014, 2014.

4. **SILVA, B. C.**; ALVIM, L. B.; SANDES, S. H C.; BONFIM, M.R.Q.; NUNES, A.C. Equine lactic acid bacteria identification and selection as potential probiotics. In: **58º Congresso Brasileiro de Genética**, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58º Congresso Brasileiro de Genética 2012.

5. ALVIM, L. B.; SANDES, S. H. C.; **SILVA, B. C.**; Mariana de Paula Reis; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. Discrimination and creation of taxonomic framework of lactic acid bacteria strains of bovine and swine by repetitive sequenced-based PCR fingerprint. In: **58º Congresso Brasileiro de Genética** 2012, 2012, Foz do Iguaçu. Anais do 58º Congresso Brasileiro de Genética 2012, 2012.

6. CAMPOS, M. H. A.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; ALVIM, L. B.; SANDES, S. H. C.; **SILVA, B. C.**; SILVA, R. S.; SOUZA, T. C. ; LIMA, M. T. ; SANTOS, C. ; NUNES, A.C. EFEITO PROTETOR DE WEISSELLA PARAMESENTEROIDES ISOLADA DE SUÍNO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM SALMONELLA ENTERICA SUBSP. ENTERICA SOROVAR TYPHIMURIUM. In: **XXI Semana de Iniciação Científica**, 2012, Belo Horizonte. Anais da XXI Semana de Iniciação Científica, 2012.