

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU

ORIENTADA: **Nina Dias Coelho Rocha**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

CO-ORIENTADORA: **Dra. Pamela Del Carmen Mancha Agresti**

BELO HORIZONTE
2020

Nina Dias Coelho Rocha

Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Versão final

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientadora: Dra. Pamela Del Carmen Mancha Agresti

Belo Horizonte
2020

043 Rocha, Nina Dias Coelho.

Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU [manuscrito] / Nina Dias Coelho Rocha. – 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientadora: Dra. Pamela Del Carmen Mancha Agresti.

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

1. Genética. 2. Probióticos. 3. Mucosite. 4. Fluoruracila. 5. Infecções Bacterianas. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Mancha Agresti, Pamela Del Carmen. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Genética
Instituto de Ciências Biológicas

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	Nº 303/2020
	Entrada 1º/2019
Nina Dias Coelho Rocha	CPF: 134.972.596-08

Às quatorze horas do dia **18 de dezembro de 2020**, reunidos remotamente devido a pandemia do novo coronavírus (COVID 19) a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	APROVADA
Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	UFMG	080.173.536-00	APROVADA
Dr. Álvaro Cantini Nunes	UFMG	678.159.606-34	APROVADA
Dr. Flaviano dos Santos Martins	UFMG	043.684.026-00	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2020.

Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo – Orientador

Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

Dr. Alvaro Cantini Nunes

Dr. Flaviano dos Santos Martins

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Cantini Nunes, Membro**, em 18/12/2020, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0483824** e o código CRC **F61F362D**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Prospecção de bactérias lácticas para uso como probióticos e avaliação do efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU"

NINA DIAS COELHO ROCHA

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador

UFMG

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

UFMG

Álvaro Cantini Nunes

UFMG

Flaviano dos Santos Martins

UFMG

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Álvaro Cantini Nunes, Membro**, em 18/12/2020, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **0483899** e o código CRC **CD0CEDC2**.

Aos meus pais, Levindo e Margarida, que sempre colocaram a minha educação acima de tudo e sempre me deram apoio incondicional na trajetória emocionante da Biologia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Levindo, agradeço pelo conforto que sempre me passa acima de qualquer pessoa e pela paciência de me levar na UFMG para a realização dos experimentos, incluindo sábados e domingos. À minha mãe, Margarida, por todas as orações que me ajudaram a chegar nesse momento e pelo orgulho que tem da “filha cientista”. À minha irmã, Milla, pelas orações, pela companhia e por ser exemplo de perseverança e determinação para mim. Às minhas tias, tios, avós e primos que tanto me motivam a seguir com honra e ética na profissão. Aos meus amigos de infância do Sagrado que nunca saíram do meu lado, sempre me dando suporte e ao meu namorado, Diego, que foi companhia fundamental nos dias que mais precisei.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Vasco pelo acolhimento, em especial na reta final do mestrado. Obrigada pela confiança e por acreditar no meu trabalho e no meu potencial mesmo em épocas que eu estava desmotivada. A todos do grande grupo do LGCM que me ajudaram ativamente nos experimentos. Ao Luis, meu amigo e confidente, a Vivi, Laísa e ao Tales que foram meus companheiros de caminhada, passando as dificuldades e comemorando as vitórias juntos. Aos ICS que me deram a oportunidade de poder ensinar o que sei e que me ajudaram de uma maneira muito importante na condução dos experimentos. Foram 5 anos neste laboratório e levarei para a vida cada ensinamento. Muito obrigada!

Aos meus companheiros felinos: Syd, Lucy e Maria Rita. O ser humano só saberá o que é compaixão quando aprender a olhar todos os seres a sua volta como iguais. Agradeço sim aos animais, que são meu refúgio mental e que me dão as maiores lições de lealdade e de um amor paciente. Dedico grande parte da minha saúde mental a eles. Sendo assim, meu reconhecimento também aos animais que me permitiram realizar este experimento. Todo cientista deve valorizar o impacto que vidas tão pequenas trazem para o conhecimento. Sonho pelo dia em que a pesquisa se refinará a ponto de não precisarmos utilizar destes meios para obtermos resultados aplicáveis. E é isso que me faz lutar a cada dia por uma ciência mais justa para todos.

A CAPES agradeço pela concessão da bolsa que permitiu me dedicar integralmente a condução deste trabalho. A UFMG, minha segunda casa e ao Programa de Pós Graduação em Genética.

RESUMO

Os benefícios exercidos pelos probióticos têm impulsionado uma série de pesquisas em busca de novas linhagens com este potencial. Nesse contexto, este estudo visou identificar e caracterizar 21 novas linhagens provenientes de ambientes diversos baseando-se em testes para avaliação de probiose sugeridos por diretrizes de agências reguladoras para posterior verificação do potencial protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU). A identificação por MALDI-TOF revelou que todas as linhagens pertencem ao grupo das bactérias lácticas (BLs), sendo relatados os gêneros *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus*. Foram realizados testes *in vitro* de segurança por meio da análise da resistência à antibióticos, degradação da mucina e potencial hemolítico e de eficácia e funcionalidade, por meio da avaliação da resistência das linhagens aos sais biliares, tolerância ao pH ácido, produção de substâncias antimicrobianas, adesão e imunoestimulação em células Caco-2. Nenhum destes critérios foram excludentes quanto ao enquadramento das linhagens como probióticos, uma vez que todas apresentaram bons parâmetros na prospecção. Quatro delas pertencentes a espécies diferentes foram inicialmente direcionadas a estudos *in vivo*, sendo elas *Lacticaseibacillus paracasei* Lpa1 (*Lactobacillus paracasei* Lpa1), *Enterococcus faecalis* Efc15, *Lactiplantibacillus plantarum* Lpl19 (*Lactobacillus plantarum* Lpl19) e *Lactobacillus crispatus* Lc21. Ao serem administradas aos animais sem a indução da mucosite, todas as linhagens apresentaram parâmetros semelhantes aos animais controle, sugerindo não toxicidade. Todavia, as quatro não foram capazes de prevenir significativamente a perda de peso, redução do consumo hídrico e alimentar, redução das vilosidades e inflamação intestinais, característicos da doença. Contudo, mesmo não apresentando eficácia no tratamento da mucosite intestinal quando administradas, não se pode excluir o potencial destas linhagens em outros modelos de doenças e aplicações. Desta forma, o presente estudo abre uma gama de linhas de pesquisa para explorar o papel não somente das quatro linhagens testadas *in vivo*, mas também de todas as outras que apresentaram características sugestivas de probiose na prospecção.

Palavras-chave: Prospecção de probióticos. Testes de funcionalidade. Bactérias lácticas. Mucosite intestinal. 5-FU.

ABSTRACT

The benefits exerted by probiotics have driven a series of studies in search for new strains with this potential. In this context, this study aimed to identify and characterize 21 new strains provided from different environments based on tests for evaluation of probiosis suggested by guidelines of regulatory agencies for further verification of the protective effect in murine model of mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU). Identification by MALDI-TOF revealed that all strains belong to the group of lactic bacteria (BLs), belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Pediococcus* and *Enterococcus*. In vitro safety tests were performed through the analysis of antibiotic resistance, mucin degradation and hemolytic potential and efficacy and functionality tests, through the resistance of the strains to bile salts, tolerance to acid pH, production of antimicrobial substances, adhesion and immune stimulation in Caco-2 cells. None of these criteria were excluding regarding the classification of the strains as probiotics, once all of them presented good parameters in prospection. Four of them belonging to different species were initially directed to in vivo studies, being *Lacticaseibacillus paracasei* Lpa1 (*Lactobacillus paracasei* Lpa1), *Enterococcus faecalis* Efc15, *Lactiplantibacillus plantarum* Lpl19 (*Lactobacillus plantarum* Lpl19) and *Lactobacillus crispatus* Lc21). When administered to the animals without the induction of mucositis, all strains showed similar parameters to the control animals, suggesting non-toxicity. However, the four were not able to significantly prevent weight loss, reduced water and food consumption, reduction of intestinal villi and inflammation, characteristic of the disease. However, even if they are not effective in the treatment of intestinal mucositis, the potential of these strains in other disease models and applications cannot be excluded. In this way, the present study opens up a range of lines of research to explore the role not only of the four strains tested in vivo, but also of all others that showed characteristics suggestive of probiosis in prospecting.

Key words: Probiotic prospection. Functionality testing. Lactic Acid Bacteria. Intestinal mucositis. 5-FU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de ação dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs).....	21
Figura 2: Mecanismos de ação de bactérias probióticas no organismo humano.....	22
Figura 3: A sequência de eventos biológicos envolvidos na mucosite divididos em cinco fases: iniciação, resposta a danos primários e amplificação, ulceração e cicatrização.....	34
Figura 4: Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil no organismo e sua estrutura molecular.....	35
Figura 5: Ações da microbiota comensal sob a mucosa intestinal.....	37
Figura 6: Esquema da placa montada para realização do teste de resistência ao baixo pH.....	47
Figura 7: Esquema da placa montada para realização do teste de resistência aos sais biliares.....	48
Figura 8: Cronograma experimental do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	57
Figura 9: Avaliação da degradação da mucina por parte das linhagens testadas	62
Figura 10: Análise do potencial hemolítico das linhagens testadas.....	63
Figura 11: percentual de adesão das linhagens testadas em células Caco-2.....	67
Figura 12: Análise da expressão gênica de TLR-2 (A), Tnf (B), IL6 (D) e IL10 (E)....	68
Figura 13: Variação do peso corporal durante o intervalo experimental.....	70
Figura 14: Avaliação do consumo hídrico e alimentar antes e depois da indução da mucosite.....	71
Figura 15: Avaliação do comprimento intestinal antes e após indução da mucosite....	72
Figura 16: Índice visceral de inflamação do fígado, baço e intestino antes e após a indução da mucosite.....	73
Figura 17: Análises histopatológicas do íleo dos animais dos diferentes grupos.....	75
Figura 18: Análise morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de <i>Lactobacillus</i> com potenciais efeitos à saúde.....	24
Tabela 2: Componentes para apresentação do dossiê técnico-científico para avaliação de uma linhagem probiótica.....	29
Tabela 3: Fontes das respectivas linhagens isoladas.....	40
Tabela 4: Agentes antimicrobianos e interpretação das suas respectivas zonas de inibição através do teste de susceptibilidade com discos de antibióticos.....	44
Tabela 5: Linhagens patogênicas utilizadas como reveladoras e sua procedência....	49
Tabela 6: Lista dos primers desenhados para o ensaio de RT-PCR.....	54
Tabela 7: Grupos experimentais, tratamento realizado e via de administração.....	56
Tabela 8: Identificação por MALDI-TOF das linhagens de bactérias lácticas.....	59
Tabela 9: Análise da do perfil de resistência à antibióticos das linhagens estudadas..	61
Tabela 10: Porcentagem de inibição do crescimento das linhagens bacterianas na presença de suco gástrico artificial.....	64
Tabela 11: Porcentagem de inibição das linhagens bacterianas pelos sais biliares....	65
Tabela 12: Tamanho do halo de inibição em milímetros (mm).....	66
Tabela 13: Sumarização dos resultados obtidos através de RT-PCR referente à expressão gênica de TLR-2, Tnf, IL6 e IL10.....	69

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula 1: Cálculo da DO inicial.....	41
Fórmula 2: Cálculo da UFC bacteriana.....	44
Fórmula 3: Cálculo para obtenção do número de células Caco-2 a serem utilizadas.....	51
Fórmula 4: Cálculo da taxa de adesão.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ - Micro

5-FU - 5-fluorouracil

ACNFP - “Advisory Committee on Novel Foods and Processes” / Comitê Consultivo sobre Novos Alimentos e Processos

AMP - Ampicilina

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - “American Type Culture Collection” / Coleções de Cultura Tipo Americano

BL - Bactérias Lácticas

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

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CAN - Canamicina

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CLO - Cloranfenicol

CLSI - “Clinical & Laboratory Standards Institute” / Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CO₂ - Dióxido de carbono

COX - Ciclo-oxigenase

DEPC - Dicarbonato de dietila

DMEM - Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - “Deoxyribonucleic Acid” / Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

DSS - “Dextran Sulfate Sodium” / Dextrano Sulfato de Sódio

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid” / Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFSA - “European Food Safety Authority” / Autoridade Europeia para Segurança Alimentar

ERI - Eritromicina

ESTR - Estreptomicina

EUCAST - “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” / Comitê Europeu de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations” / Organização de alimentos e agricultura das Nações Unidas

FDA – “Food and Drug Administration” / Administração de Alimentos e Medicamentos
FdUMP - Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP - Fluorodeoxiuridina trifosfato
FUTP- 5-fluorouridina trifosfato
g – Grama
GEN - Gentamicina
GPCRs - “G protein-coupled receptor” / Receptores acoplados à proteína G
GRAS – “Generally Recognized as Safe” / Geralmente Reconhecido como Seguro
h – Horas
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HCCA - Ácido α -ciano-4-hidroxycinnâmica
HDACs - Histona deacetilase
Hz - Hertz
IFN γ – Interferon gama
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
ITS – “Internal Transcribed Spacer” / Espaçador Interno Transcrito
Kg - Quilograma
KNO₃ - Nitrato de potássio
kV - Quilovolt
L – Litro
LAMASP - Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública
LMA - Laboratório de Microbiologia Aplicada
m – Mili
M – Molar
m/z - razão massa sobre a carga
MALDI-TOF – “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry” / Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisado de tempo-de -voo
MAMPs – “Microorganism Associated Molecular Patterns” / Padrões Moleculares Associados a Microrganismos
MIC - “Minimum Inhibitory Concentration” / Concentração Mínima Inibitória
MRS – De Man, Rogosa & Sharpe
MSP - “Main spectra library” / Biblioteca espectral principal

NaCl – Cloreto de Sódio

nm - Nanômetros

°C – Grau Célsius

PBS - “Phosphate Buffered Saline” / Salina tamponada com fosfato

pH – Potencial Hidrogeniônico

QPS - “Qualified Presumption of Safety” / Presunção Qualificada de Segurança

rpm – Rotações por Minuto

RT-PCR - “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction” / Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeira da Polimerase

s - Segundo

SCFA - “Short Chain Fatty Acids” / Ácidos Graxos de Cadeia Curta

SFB - Soro Fetal Bovino

SFB - Bactérias filamentosas segmentadas

TET - Tetraciclina

TNF – Fator de necrose tumoral

UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

v – Volume

VAN - Vancomicina

WHO – “World Health Organization” / Organização Mundial da Saúde

ZO-1 - Zonula ocludente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 PROBIÓTICOS.....	18
1.2 MECANISMO DE AÇÃO.....	19
1.3 GÊNEROS DE IMPORTÂNCIA.....	22
1.3.1 GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	23
1.3.2 GÊNERO <i>Enterococcus</i>	26
1.3.3 GÊNERO <i>Pediococcus</i>	27
1.4 PROSPECÇÃO E REGULAMENTAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICOS.....	28
1.4.1 COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE.....	29
1.4.2 COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA.....	30
1.4.3 COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA.....	31
1.5 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	33
1.5.1 A MUCOSITE INTESTINAL.....	33
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	40
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS.....	42
4.2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CADA LINHAGEM APÓS INCUBAÇÃO OVERNIGHT.....	43
4.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA.....	44
4.3.1 ANTIBIOGRAMA.....	44
4.3.2 DEGRADAÇÃO DA MUCINA.....	45
4.3.3 POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	45
4.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA.....	46
4.4.1 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO SUCO GÁSTRICO.....	46
4.4.2 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES.....	47
4.4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	48
4.4.4 ENSAIOS DE ADESÃO E IMUNOESTIMULAÇÃO EM CÉLULAS CACO2.....	50
4.4.5 ENSAIO DE ADESÃO ÀS CÉLULAS CACO-2.....	51

4.4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IMUNO-ESTIMULAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS <i>IN VITRO</i>	52
4.4.6.1 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS CACO-2 ÀS LINHAGENS AVALIADAS.....	52
4.4.6.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....	53
4.4.6.3 Q-PCR.....	54
4.5 ANÁLISES <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	55
4.5.1 ANIMAIS.....	55
4.5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO.....	55
4.5.3 ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS E CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR.....	57
4.5.4 ANÁLISE DO COMPRIMENTO INTESTINAL E TAXA DE INFLAMAÇÃO VISCERAL.....	57
4.5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	58
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5 RESULTADOS	59
5.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS.....	59
5.2 IDENTIFICAÇÃO.....	59
5.3 ANTIBIOGRAMA.....	61
5.4 DEGRADAÇÃO DA MUCINA.....	62
5.5 POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	63
5.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO SUCO GÁSTRICO.....	63
5.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES.....	64
5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	65
5.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO EM CÉLULAS.....	67
5.10 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO EFEITO DAS LINHAGENS EM MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU.....	70
5.10.1 ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS E CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR.....	70
5.10.2 ANÁLISE DO COMPRIMENTO INTESTINAL E TAXA DE INFLAMAÇÃO	71
5.10.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	73
6. DISCUSSÃO	77
7. PERSPECTIVAS	89
8. REFERÊNCIAS	90

APÊNDICES	109
ANEXOS.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill et al, 2014). Podem pertencer a diferentes gêneros e espécies de bactérias, tendo também um gênero representante de leveduras (*Saccharomyces*), sendo seus efeitos dependentes da linhagem (Jacobsen, 1999; Maasen et al., 2000, FAO/WHO, 2001).

Os principais representantes dos probióticos atuais são bactérias lácticas (BLs), que são microrganismos Gram-positivo, não esporulantes, anaeróbios facultativos ou que crescem em microaerofilia. O grupo das BLs inclui espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Oliveira-Sequeira, Ribeiro e Gomes, 2008; Wang et al., 2016; Mokoena et al., 2017). Algumas linhagens pertencentes a estas espécies são consideradas organismos Geralmente Reconhecidos como Seguros (*Generally Recognized As Safe- GRAS*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), por terem sido usados por um longo período na história da humanidade para a produção ou conservação de inúmeros alimentos e por possuírem potenciais benefícios na manutenção da saúde do hospedeiro (Socol et al., 2010). Contudo, alguns microrganismos não pertencentes ao grupo das BLs também podem possuir esse *status* e serem estudados para aplicação como probióticos como *Propionibacterium freudenreichii* e *P. acidioripionici* utilizadas em produtos lácteos (Rabah et al., 2017) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* muito utilizada principalmente na fermentação de bebidas alcoólicas (Sampaolesi et al., 2019).

Dentre os efeitos exercidos por esses microrganismos se destacam a capacidade de manutenção e restauração da homeostase da microbiota intestinal (Shi et al., 2017), bem como estímulo à imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (Kaci et al., 2011; Hemarajata e Versalovic, 2013; Gao et al., 2015). Destaca-se também a atuação desses microrganismos na resistência gastrointestinal à colonização por patógenos (Halder et al., 2017), manutenção e reforço da barreira intestinal (Blackwood et al., 2017) e estimulação da produção de mucinas (Aliakbarpour et al., 2012). Também é relatada a produção de metabólitos que auxiliam no tratamento e

prevenção de infecções gastrointestinais e doenças autoimunes (Huebner e Surawicz, 2006; Plaza-Díaz et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

Para a categorização de um microrganismo como probiótico efetivo, ele deve cumprir uma série de requisitos, tais como: i) exercer efeito benéfico à saúde de seu hospedeiro; ii) não apresentar propriedades patogênicas; iii) persistir no ambiente gastrointestinal do hospedeiro, resistindo à presença de ácido e bile; iv) apresentar estabilidade nos processos de estocagem industrial, permanecendo viável até o consumo e v) modular o sistema imunológico (Owehand et al., 1999; Turner, Ferreria e Silva et. al., 2010, Tripathi et al., 2014).

1.2 MECANISMO DE AÇÃO

No que se refere aos mecanismos de ação dos probióticos, ainda há muito o que se investigar, uma vez que são muito diversificados. Estudos demonstraram que o seu consumo está diretamente atrelado à promoção de benefícios à saúde humana, atuando principalmente sobre o trato gastrointestinal (Rehman, Ateequr, et al., 2012, Shi et al., 2017) auxiliando na diminuição da intolerância à lactose (Oak et al., 2019), melhora da constipação e aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas importantes para o hospedeiro (Tuohy et al., 2003; Wang et al., 2017), tendo relação também com obesidade e diabetes tipo 2 (Wang et al., 2017; Hsieh et al., 2018), dermatite atópica (Rather et al., 2016), câncer (Zaharuddin et al., 2019), depressão (Wallace et al., 2020) e inflamações entéricas (Saez-Lara et al., 2015). Os principais mecanismos associados a estes benefícios até o momento são:

- I) Restabelecimento da homeostase da microbiota por aumentar a diversidade do microbioma intestinal juntamente com manutenção da estabilidade do mesmo, podendo reverter quadros de disbiose (desequilíbrio da microbiota intestinal que pode promover um desbalanço entre os constituintes da mesma e consequentemente causar aumento das bactérias potencialmente patogênicas) (Preidis et al., 2012; Wieërs et al., 2020). Tem sido observado que o consumo de *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) aumentou a abundância de algumas espécies de *Bifidobacterium* em crianças, gênero mais abundante em crianças saudáveis e alimentadas com leite materno que não sofrem de cólicas intestinais (Pärtty et al.,

2015). A administração de leite fermentado por microrganismos probióticos em alguns estudos foi associado não somente a uma maior estabilidade da microbiota, mas também ao aumento de vias enzimáticas envolvidas no metabolismo de carboidratos (Mcnulty et al., 2011; Veiga et al., 2014; Zmora et al., 2018).

- II) Exclusão de patógenos principalmente devido à produção de compostos antimicrobianos tais como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido láctico e acético que inibem o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas (Halder et al., 2017; Gaspar et al., 2018; De Castilho et al., 2019). Alguns desses compostos ou uma combinação dos mesmos são frequentemente associados a espécies de BLs, sendo muito visados em aplicações na indústria alimentícia como biopreservadores de alimentos, bem como na indústria farmacêutica devido ao seu potencial de inibir crescimento de organismos patogênicos, podendo servir como possível alternativa ao uso de antibióticos para combate de infecções causadas por microrganismos multirresistentes (Šušković et al., 2010). A adesão às células epiteliais também é outro mecanismo responsável por exclusão de patógenos por meio da competição por sítios (Lebeer et al., 2008)
- III) Produção de ácidos graxos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acids-SCFAs*) tais como acetato, propionato e butirato, que são importantes compostos atuantes na diferenciação e proliferação celular, bem como na sinalização de vias imunológicas, podendo também induzir expressão de citocinas anti-inflamatórias (Parada Venegas et al., 2019). O efeito anti-inflamatório desses compostos está ligado à regulação gênica através da inativação das histonas deacetilases (HDACs), ativando o gene dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) presentes em enterócitos e células do sistema imune, ativando vias intracelulares de transdução de sinais resultando na secreção de peptídeos intestinais que tem ação sobre o controle do metabolismo celular (Singh et al., 2014; Chang et al., 2014; Park et al., 2016). Também está relacionado à indução de prostaglandina E₂ e da expressão da citocina anti-inflamatória IL10 via ativação dos GPCRs, inibindo respostas inflamatórias em monócitos humanos (Cox et al., 2009). O efeito

inibitório sobre as HDACs também afeta a proliferação e diferenciação celular, contribuindo para a proteção contra cânceres (Boffa et al., 1978). Uma esquematização destes efeitos está representada na figura 1.

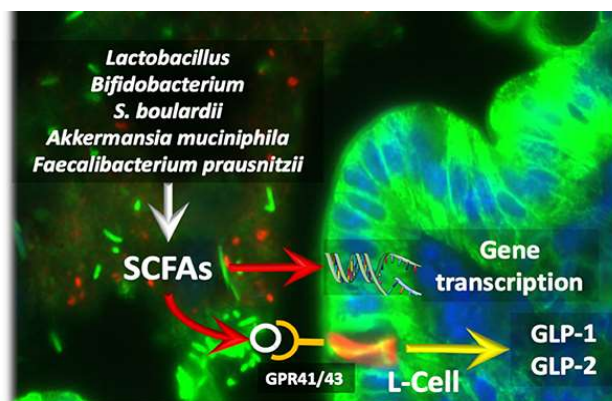


Figura 1 - Mecanismos de ação dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs): os SCFAs que são produzidos pela fermentação de fibras da dieta pela microbiota ativam receptores acoplados à proteína G (por exemplo, GPR41/43) expressas em células enteroendócrinas do intestino (células L), ativando a secreção de peptídeos envolvidos na regulação do metabolismo energético (peptídeos semelhantes ao glucagon- GLP1 e GLP-2) e na função da barreira celular. SCFAs podem também modular a expressão gênica por inibir a histona deacetilase (HDACs). Fonte: adaptado de Wieërs et al., 2020.

- IV) Proteção da barreira epitelial por induzir a produção de mucina e de células B produtoras de IgA secretória, atuando na defesa contra agente exógenos (Aliakbarpour et al., 2012, Blackwood et al., 2017). Além do mais, a administração de algumas linhagens probióticas aumentou a expressão de genes relacionados à formação das *tight junctions*, às proteínas ZO-1 e ocludina, que são componentes fundamentais na manutenção da barreira epitelial por reduzirem a permeabilidade intestinal (Ewaschuk et al., 2008; Lépine et al., 2008; Anderson et al., 2010).
- V) Modulação da resposta imune do hospedeiro por meio principalmente da interação e indução de células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos (Azad et al., 2018) e da inibição da ativação da via de sinalização NF- κ B (Kaci et al., 2011; Gao et al., 2015). Os probióticos tem a capacidade de interagir com as placas de Peyer e os enterócitos via receptor de reconhecimento de padrões (PRR), estimulando produção de citocinas e das células B produtoras de IgA bem como induzindo a migração de células T reguladoras intestinais (Perdigón & Holgado, 2000). Kwon e colaboradores (2010) relataram que uma

mistura de probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*), *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri*), *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*] foi capaz de aumentar a resposta de células T-regulatórias CD4⁺ forkhead p3 (FoxP3), a qual é crítica para manutenção da homeostase intestinal. Também foi verificado que esta mistura reduziu as citocinas das células Th1, Th2 e Th17 sem induzir a apoptose e aumentou a atividade supressora de células T-regulatórias CD4⁺CD25⁺, fundamentais para o controle da resposta imune adaptativa (Kwon et al., 2010).

Os principais mecanismos de ação dos probióticos estão esquematizados na figura 2 a seguir:

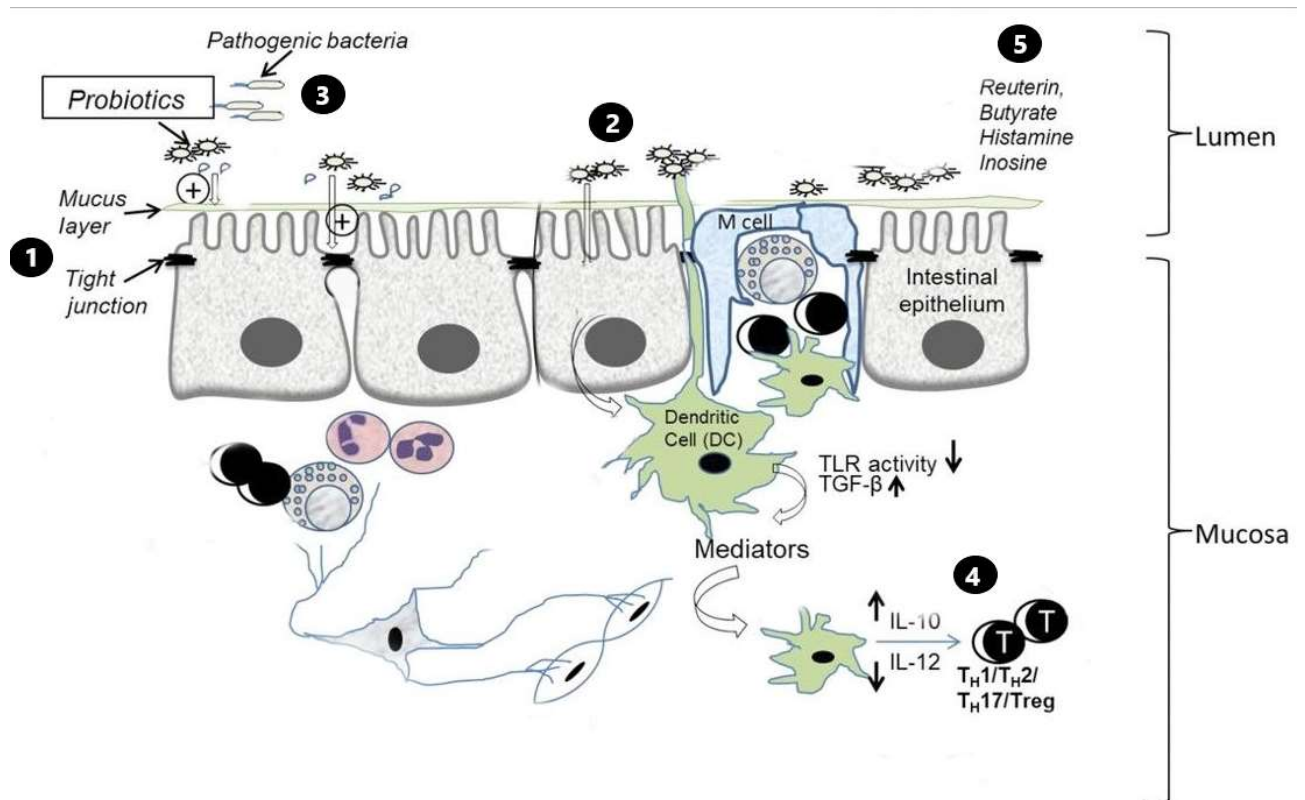


Figura 2: Mecanismos de ação de bactérias probióticas no organismo humano. Os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem: 1) homeostase intestinal e manutenção da barreira epitelial por meio do aumento das *tight junctions*, produção de mucinas e IgA secretória; 2) aumento da adesão à mucosa intestinal e inibição competitiva de patógenos; 3) produção de substâncias antimicrobianas; 4) modulação do sistema imunológico e 5) produção de ácidos graxos de cadeia curta. Fonte: adaptado de Liu et al., 2018

1.3 GÊNEROS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS IMPORTÂNCIA PROBIÓTICA

1.3.1 GÊNERO *Lactobacillus*

Dentre as BLs com características probióticas mais bem caracterizadas e utilizadas, deve-se destacar as do gênero *Lactobacillus*, pertencentes ao filo Firmicutes (Garrity; Bell; Lilburn, 2004). Os lactobacilos são microrganismos em forma de bastonetes ou cocobacilos, mesófilos, acidúricos e catalase negativos (Robinson, 2002). O gênero foi descrito a primeira vez em 1901 (Beijerinck et al., 1901) e até recentemente era composto por mais de 250 espécies definidas (Zhenget al., 2015, Salvetti et al., 2018, Parks et al., 2018). Em 2019, contudo, análises genômicas baseadas em marcadores envolvendo um grande número de espécies revelaram que vários membros do grupo estariam mais relacionados filogeneticamente com outros gêneros tais como *Pediococcus*, *Paralactobacillus* e *Leuconostoc*. Sendo assim, em abril de 2020 foi divulgada uma nova classificação da família *Lactobacillaceae* em *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus* e outros 23 gêneros, agrupando o gênero original em 38 espécies. As primeiras espécies do grupo descritas continuam pertencendo ao gênero *Lactobacillus*, sendo boa parte dos outros gêneros criados contendo ainda o basônimo original para facilitar a identificação, como por exemplo *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Levilactobacillus*, dentre outros (Zheng et al., 2020). Estes exemplares são provenientes de habitats heterogêneos, podendo ser encontrados em diversos nichos tais como na superfície de plantas, produtos alimentícios fermentados e em diversas partes do organismo de seres humanos e outros animais (Martino, et al., 2016; Duar et al., 2017).

Algumas características dos lactobacilos os fazem especialmente interessantes para aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, tais como a sua resistência aos sais biliares e ao pH ácido do trato gastrointestinal (Fuochi et al., 2015; Prete et al., 2020), capacidade antagonista (Servin et al., 2004; Prabhurajeshwar et al., 2017) e ação imunomodulatória (Wells et al., 2011; Cuffia et al., 2019). Dessa forma, os representantes deste grupo tem sido extensivamente direcionados a estudos utilizando animais ou ensaios clínicos em humanos para avaliação do seu potencial em reduzir ou amenizar distúrbios tais como Doença de Chrohn, mucosite intestinal, cânceres, colite ulcerativa, dentre outros (Abraham et al., 2017; Casas-Solis et al., 2019).

Algumas linhagens como *Lacticaseibacillus casei* BL23 (*Lactobacillus casei* BL23) e *L. casei* ATCC393 por exemplo, são muito conhecidas pela promoção de

efeitos anti-inflamatórios principalmente direcionado à doenças gastrointestinais, como também ações anticarcinogênicas (Rochat et al., 2007; Lee et al., 2015; Jacouton et al., 2017). Outras linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*) são estudadas há mais de trinta anos em função do seu potencial de proteção à mucosa por produção de biofilmes e também de compostos que impedem o crescimento de linhagens patogênicas, como proteínas tipo leticina 1 e 2 (Petrova et al., 2016), além da promoção de efeito protetor através do estímulo à imunidade de mucosa com aumento de IgA e balanço de citocinas IL10, IL12, IL23 e TNF (Veckman et al., 2004; Capurso et al., 2019). Adicionalmente, *L. plantarum* CECT 7527, *L. plantarum* CECT 7528, e *L. plantarum* CECT 7529 mostraram promissores resultados em estudos clínicos quanto ao potencial de reduzir os níveis de colesterol em pacientes com hipercolesterolemia e reduzir o risco cardiovascular (Fluentes et al., 2013). *L. plantarum* 299v é outra linhagem desta espécie muito estudada e relacionada a melhora de quadros envolvendo desordens intestinais como colite, diarreia e síndrome do intestino irritável (Niedzielin et al., 2001; Sen et al., 2002; Wullt et al., 2003). De fato, existe uma grande lista de linhagens estudadas e associadas a inúmeros benefícios. Alguns outros exemplos estão demonstrados na tabela 1:

Tabela 1: Linhagens de *Lactobacillus* com potenciais efeitos à saúde.

Espécie	Efeito à saúde	Mecanismo	Modelo	Referência
<i>L. pentosus</i> LPS16	Inibição de infecção por <i>Helicobacter pylori</i> multirresistente	Secreção de bacteriocinas contra <i>H. pylori</i> , inibição da capacidade de adesão do patógeno a células gástricas por competição e redução da inflamação.	Células de adenocarcinoma gástrico humano da linhagem AGS e MKN45	Zheng et al. (2014)
<i>L. plantarum</i> LTA	Manutenção da homeostase intestinal e redução de processos inflamatórios severos	Inibição da via NF- κ B e MAPKs	Células de linfoma humano da linhagem HT-29	Kim et al. (2012)
<i>L. casei</i> 393	Prevenção do câncer de cólon	Homeostase das citocinas IFN γ , TNF, IL10 e manutenção de	Camundongos BALB/c tratados com 1,2-	Casas-Solís et al. (2019)

		uma dinâmica de subpopulação saudável de células T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , e <i>natural killer</i> (T-NK).	dimetilhidrazina (DMH)	
<i>L. reuteri</i> A9 e <i>L. mucosae</i> A13	Redução nos níveis de colesterol em casos de hipercolesterolemia	Atividade da enzima BSH (hidrolase de sais biliares)	Ratos Wistar submetidos à dieta rica em colesterol	Jiang et al. (2019)
<i>L. delbrueckii</i> CIDCA 133	Efeito protetor contra mucosite intestinal	Redução do infiltrado inflamatório e da perda de células caliciformes, manutenção da permeabilidade e da razão vilosidades/criptas intestinais	Camundongos BALB/c tratados com 5-FU (300mg/Kg)	De Jesus et al. (2019)
Mistura de <i>L. acidophilus</i> com <i>B. lactis</i> ou <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i>	Efeito protetor contra mucosite intestinal	Aumento da proporção visolidades/criptas intestinais, redução do infiltrado inflamatório de leucócitos, redução de TNF e IL6 e manutenção da arquitetura intestinal	Camundongos Swiss tratados com 5-FU (450 mg/kg)	Quaresma et al. (2019)
<i>L. kefiranofaciens</i> P056	Melhoramento dos sintomas relacionados à colite	Manutenção da permeabilidade da barreira intestinal e aumento de autofagossomas	Ratos Wistar induzidos com DSS	Da Silva et al. (2020)

No que diz respeito ao seu uso comercial, o gênero *Lactobacillus* juntamente com *Bifidobacterium* são os que mais possuem representantes aprovados para o consumo humano sob forma de bebidas lácteas e alimentos funcionais, como nas preparações como Yakult e Sofyl (Yakult®) que apresenta *L. casei shirota*, Chamyto e Ninho Soleil (Nestlé®), com *L. paracasei*, Batavito (Batavo®) com *L. casei*, *L. acidophilus* e Nan Probio 2 (Nestlé®) com *B. longum* e *L. rhamnosus* (Granato et al., 2010; Pimentel et al., 2017). Esta abundância de linhagens nestas preparações revela

a importância do gênero não somente direcionada à saúde, mas também ao mercado de probióticos, que é um dos que mais cresce no mundo, movimentando cerca de 49,4 bilhões de dólares no ano de 2018, tendendo a atingir 69,3 bilhões de dólares até 2023 (Probiotics Market, 2020).

1.3.2 GÊNERO *Enterococcus*

Assim como os lactobacilos, algumas linhagens do gênero *Enterococcus* como *E. faecium*, *E. durans* e *E. faecalis* são pertencentes ao grupo das BLs; entretanto, ainda não possuem o *status* GRAS em função do gênero compreender tanto bactérias comensais simbióticas ou com efeito probiótico quanto algumas patogênicas oportunistas. De fato, algumas linhagens resistentes a antibióticos foram previamente identificadas em pacientes hospitalares com a imunidade comprometida, mas estudos indicam que elas apresentam baixo risco de infecção em seres humanos saudáveis (Sanders et al., 2010; Franz et al., 2011). Contudo, diversos enterococos estão envolvidos atualmente no processo de fermentação e desenvolvimento de odor e sabor em queijos e salsichas, além de possuírem compostos antimicrobianos fundamentais para a preservação de alimentos, mas uma possível patogenicidade deve ser minuciosamente estudada (Moreno et al., 2006, Barbosa et al., 2014).

Algumas linhagens são utilizadas com êxito como probióticos e estão presentes em preparações comerciais efetivas e seguras, como Cernivet® e FortiFlora® (Cerbios-Pharma SA, Suíça), que contém *E. faecium* SF68 e Symbioflor®1 (Symbiopharm, Herborn, Alemanha), que apresenta *E. faecalis* (Hanchi et al, 2018). Dentre os efeitos benéficos desse gênero já relatados na literatura se encontram o tratamento e prevenção de diarreias e incômodos associados a síndrome do intestino irritável (Surawicz et al., 2003; Bybee et al., 2011), redução nos níveis de colesterol LDL sérico (Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2019), produção de SCFAs com efeito anti-inflamatório (Avram-Hananel et al., 2010; Mishra et al., 2019), ação inibitória contra bactérias Gram-negativo, (Pieniz et al., 2014; Vimont et al., 2017), manutenção da integridade da barreira intestinal (Bednorz et al., 2013), dentre outros.

No que concerne a legislação, tendo em vista se tratar de um gênero com linhagens patogênicas e probióticas, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority- EFSA*) e outros órgãos regulatórios tais como o *Advisory Committee on Novel Foods and Processes-ACNFP* e o *Food Standards*

Agency, aprovam o uso de determinadas linhagens na alimentação contando que passem por uma avaliação de segurança extremamente criteriosa, excluindo riscos potenciais de cada linhagem especificamente (ACNFP, 1996; Franz et al., 2011; EFSA, 2012a). Análises genômicas devem ser conduzidas para avaliar ilhas de resistência a antibióticos e fatores de virulência (Brodmann et al., 2017).

Linhagens referentes a *E. faecium* e *E. faecalis* são as únicas usadas atualmente para fins alimentícios e/ou como probióticos (Franz et al., 2011), contudo muitos estudos estão atribuindo a outras espécies características promissoras à saúde, tais como *E. munditii* (Zyl et al., 2016), *E. lactis* (Nami et al., 2015) e *E. durans* (Nami et al., 2014).

1.3.3 GÊNERO *Pediococcus*

Dentre as BLs, as que se enquadram no gênero *Pediococcus* são as menos estudadas. Contudo, o crescente interesse pela elucidação de propriedades probióticas de diferentes linhagens de bactérias lácticas, têm impulsionado mais pesquisas envolvendo estes exemplares. As espécies mais comuns desse gênero e muito encontradas no trato gastrointestinal humano são *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* (Papagianni & Anastasiadou, 2009).

Pediococcus acidilactici possui propriedades de interesse farmacêutico e industrial, tais como resistência ao baixo pH, ao aquecimento e tratamentos proteolíticos e produção de peptídeos antimicrobianos, especialmente de bacteriocinas ou, mais especificamente, de pediocinas (Papagianni e Anastasiadou, 2009, Skariyachan et al., 2019). Nieto-Lozano e colaboradores (2010) relataram forte atividade da pediocina de *P. acidilactici* MCH14 na redução de 2 log de UFC/mL de *Listeria monocitogenes* e *Clostridium perfringens* em carnes e salsichas. Estudos avaliando a biopreservação por esta linhagem são vastos, compreendendo conservação de alimentos marinhos e peixes (Xu et al., 2010; Cosansu et al., 2010), vinhos (Díez et al., 2012), derivados lácteos (Silva et al., 2018; Skariyachan et al., 2019), dentre outros.

No ramo das aplicações clínicas, a alta atividade microbiana em decorrência da produção de pediocinas foram investigadas no controle de infecções vaginais por *L. monocitogenes* e concluiu-se que *Pediococcus* spp. poderia ser caracterizado como potencial probiótico de aplicação vaginal (Borges et al., 2016). Dentre as

linhagens de *Pediococcus*, *P. acidilactici* R037 apresentou promissores efeitos direcionados ao tratamento de encefalomielite autoimune ou esclerose múltipla por ter a capacidade de induzir a produção de células T produtoras de IL10, sendo um potencial terapêutico para a referida doença (Kazushiro Takata et al., 2011; Mizoguchi et al., 2017).

1.4 PROSPECÇÃO E REGULAMENTAÇÃO DO USO DE PROBIÓTICOS

Os probióticos devem exercer efeitos benéficos ao indivíduo por meio do seu crescimento e/ou atividade no organismo (Collins et al., 1998; Vandenplas; Huys; Daubec, 2015). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO*) (2002), não é puramente a sua origem que é importante, mas sim a especificidade da ação e, por isso, torna-se necessário o estabelecimento de guias para a definição de uma abordagem sistemática para avaliação do benefício e segurança do uso de probióticos (FAO, 2002). Portanto, a FAO, juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), fundamentaram diretrizes para definir os quesitos importantes para alegar com precisão que um microrganismo é um probiótico. Os critérios avaliados se pautam em três características principais: comprovação assertiva da identidade, da segurança e do efeito benéfico de cada linhagem específica de microrganismo (FAO/WHO, 2002; 2006).

No Brasil, a aprovação para o uso de probióticos para o consumo está sujeita a avaliação prévia da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), segundo a Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018, que também se fundamenta na avaliação da identidade, segurança e efeito benéfico, baseando-se nas orientações internacionais reconhecidas (Anvisa, 2019). A tabela 2 retirada do Guia Prático da ANVISA, sintetiza os requisitos necessários e os métodos considerados adequados para a apresentação de um dossiê científico visando a regulamentação do uso de determinado probiótico.

Tabela 2: componentes para apresentação do dossiê técnico-científico para avaliação de uma linhagem probiótica

APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ			
Identificar a linhagem do microrganismo e a alegação pretendida, informar o produto que será utilizado, o público alvo, a dose recomendada, as condições ou restrições de uso, as advertências e os potenciais efeitos adversos			
COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE -Nomenclatura -Depósito em coleção de cultura -Origem da linhagem -Identificação	COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA -Identificação da classe de risco -Histórico de uso -Revisão na literatura -Ensaio <i>in vitro</i> -Ensaio em animais -Ensaio em humanos -Vigilância pós mercado	COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO -Alegações de propriedade funcional ou à saúde -Estudos para caracterização da linhagem probiótica -Estudos para comprovação do benefício de uma alegação -Busca da totalidade de evidências -Avaliação da qualidade dos estudos -Avaliação da totalidade das evidências -Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos	CONCLUSÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO

Fonte: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/21.pdf/1c99eeb1-7143-469a-93ff-7b2b0f9187c0>

1.4.1 COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE

A identificação das linhagens a serem estudadas constituem o primeiro requisito para a avaliação de suas propriedades probióticas, sendo o ponto de partida de qualquer seleção. De acordo com a Anvisa, uma identificação assertiva do microrganismo está diretamente relacionado com a sua segurança, uma vez que dessa forma é possível prever características gerais do mesmo tomando como base grupos taxonomicamente relacionados já conhecidos, sendo possível avaliar provável produção de toxinas, fatores de virulência ou outros compostos nocivos à saúde

muitas vezes intrínsecos a um gênero ou espécie específicos (Anvisa, 2019). A identificação também pode auxiliar no processo de alegação de propriedades benéficas à saúde, uma vez que muitos probióticos compartilham grupos taxonômicos em comum. Entretanto, é imprescindível também a identificação da linhagem do microrganismo e o possível estudo genômico do mesmo, uma vez que os efeitos exercidos são linhagem-específicos (Jacobsen, 1999; Maasen et al., 2000).

A identificação de microrganismos em laboratórios de pesquisa tem sido desenvolvida pelo método do sequenciamento do genoma completo ou do rRNA 16S e 18S (FAO/WHO, 2006; Neelja Singhal et al., 2015). Embora essas técnicas sejam amplamente reconhecidas e as mais recomendadas, elas são normalmente demoradas e custosas. Dessa forma, nos últimos anos, a espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz- MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo-TOF (*Time-of-Flight*) emergiu como uma ferramenta potencial para identificação e diagnóstico microbiano, uma vez que requer preparação mínima da amostra e realiza a análise dos dados de forma direta, rápida e com bom custo benefício (Neelja Singhal et al., 2015; Hadi Maleki Kakelar et al., 2019). Esta técnica baseia-se na identificação de proteínas microbianas que são bem conservadas dentro de uma espécie, sendo um método com alto grau de confiança para discriminar espécies bacterianas intimamente relacionadas (Spanu et al., 2011; Bizinni et al., 2011).

1.4.2 COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA

Para avaliar indícios acerca da segurança de uma linhagem, inicialmente precisa ser feita uma busca na literatura para investigação da existência de seu status GRAS baseado no FDA e/ou QPS (*Qualified Presumption of Safe*), baseado na Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority-EFSA*) ou do enquadramento da linhagem em alguma classe de risco (ANVISA, 2019).

Testes *in vitro* são requisitos fundamentais e devem comprovar que a linhagem não possui genes de resistência a antibióticos, uma vez que os mesmos podem ser transferidos horizontalmente via plasmídeos, bacteriófagos ou transposons para outros microrganismos, incluindo patogênicos (EFSA, 2012; Shao et al., 2015).

Outro concernimento envolvendo a segurança do uso de probióticos se relaciona a presença de fatores de virulência normalmente comuns em organismos

patogênicos, como a produção de hemolisina que resulta em rompimento da membrana plasmática da hemácia, com consequente redução de aporte de oxigênio nos tecidos e liberação de hemoglobina no plasma, causando anemia e edema no hospedeiro (Husain et al., 2008; Giraffa, 2012). A β -hemólise leva ao rompimento total da hemácia, sendo, portanto, uma característica negativa em uma linhagem probiótica, enquanto a α -hemólise causa rompimento parcial e a γ -hemólise, nenhum rompimento (Giraffa, 2012). Estudos prévios demonstraram ausência de hemólise (γ -hemólise) em diversas linhagens probióticas de *Lactobacillus*, sendo considerada também a presença de α -hemólise como segura desde que realizados testes complementares de segurança para avaliar outros potenciais fatores de virulência (Argyri et al., 2013; Lee et al., 2017; Botta et al., 2014).

Ainda é importante também como critério de segurança avaliar a performance das linhagens potencialmente probióticas em relação à capacidade de degradar mucina, visto que este quesito é relacionado à virulência de alguns patógenos por propiciar danos à barreira da mucosa intestinal (Monteagudo-Mera et al., 2012).

Em conjunto, os testes que visam avaliar a susceptibilidade aos antibióticos, potencial hemolítico e de degradação da mucina fornecem indícios da confiabilidade do uso de determinado microrganismo para consumo. Contudo, não é apenas a ausência de riscos à saúde que determina um probiótico, mas também a comprovação da promoção de benefícios à saúde do hospedeiro, que compõe a terceira fase do processo de prospecção após comprovação da identidade e segurança (Anvisa, 2019).

1.4.3 COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA

Inicialmente, para se ter o benefício desejado, linhagens probióticas devem ser capazes de sobreviver às condições de estresse ácido e enzimas digestivas do estômago, e a bile no intestino delgado (FAO / WHO, 2002; Del Piano et al., 2008; Padmavathi et al., 2018). Dessa forma, a Anvisa postula como requisito fundamental nesse aspecto, a realização de testes que devem demonstrar a tolerância das linhagens a temperatura corporal do hospedeiro-alvo, resistência à acidez gástrica; resistência aos ácidos biliares e à lisozima. Adicionalmente, a quantidade mínima viável para estes probióticos exercerem seus efeitos deve estar situada preferencialmente na faixa de 10^9 UFC para consumo diário. Valores abaixo de 10^8

UFC são aceitos apenas com comprovação da sua eficácia nessa quantidade (Anvisa, 2008).

Além de sobreviver à passagem ao TGI, alguns probióticos podem apresentar preferencialmente a capacidade de aderir ao epitélio intestinal para prolongar o tempo da sua permanência no mesmo e assim, potencializar a sua ação e o estímulo ao sistema imunológico, apesar de não ser uma característica fundamentalmente indicativa de probiose (Tallon et al., 2007; Ranadheera et al., 2014; Monteagudo-Mera et al., 2019). Alguns ensaios *in vitro* de adesão à células intestinais podem revelar tal capacidade das bactérias potencialmente probióticas (Servin e Coconnier, 2003). O teste de aderência à células epiteliais normalmente é realizado com linhagens celulares com características morfofuncionais semelhantes às do intestino, tais como Caco-2 e HT-29, que expressam grande parte dos principais receptores e proteínas de membrana que enterócitos maduros (Sharma e Kanwar et. Al., 2017; Fatmawati et al., 2020).

A importância da adesão pode estar também relacionada à exclusão de prováveis organismos patogênicos por competição, sendo um critério desejável (Chapman et al., 2014; Van Zyl et al., 2020). Tem sido reportado que grande parte dos probióticos interagem com a parede intestinal, formando assim uma barreira de defesa contra potenciais patógenos invasores, protegendo o indivíduo de eventuais infecções (Ohland et al., 2010; Zaylaa et al., 2018). Alguns estudos tem demonstrado que a capacidade de adesão de linhagens de *Lactobacillus* juntamente com linhagens patogênicas tende a inibir a colonização do intestino por estes patógenos (Bao et al., 2010). Em trabalhos recentes, foi demonstrado que duas linhagens de BLs *Lactobacillus paracasei* KN19 (*Lactobacillus paracasei* KNI9) e *Lactiplantibacillus plantarum* L15 (*Lactobacillus plantarum* L15), foram capazes de inibir respectivamente a adesão de *Yersinia enterocolitica* (Damodharan, Karthiyaini, et al., 2019) e *Escherichia coli* (Behbahani, Behrooz Alizadeh et al., 2019) às células Caco-2.

Esta importante característica de um probiótico associada à exclusão de patógenos pode estar também relacionada a produção de substâncias antimicrobianas pelos mesmos, possibilitando aplicações direcionadas à terapia de infecções do trato gastrointestinal e do trato urinário (Nomoto et al., 2005; Falagas et al., 2006; Zhang et al., 2011), bem como auxiliando na conservação de alimentos por atuar no controle de bactérias indesejáveis (Havelaar et al., 2010) e também

exercendo ação análoga aos antibióticos, podendo ser usadas como alternativas ao mesmo (Halder et al., 2017).

1.5 ENSAIOS *IN VIVO*

Todas as etapas de prospecção *in vitro* apresentadas nos tópicos anteriores tem o intuito de fornecer indícios acerca do efeito benéfico de linhagens probióticas e de sua segurança para o consumo, visando uma melhor caracterização das mesmas para serem direcionadas aos ensaios utilizando modelos de doenças *in vivo*. Um dos focos principais de atuação dos probióticos é relacionado à doenças inflamatórias intestinais e existem diversos modelos animais para estudo das mesmas. Dentre estes, podemos citar o de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU). Estes ensaios ainda são requisitos fundamentais para o direcionamento das linhagens rumo ao início dos testes clínicos em humanos (Anvisa, 2019).

1.5.1 A MUCOSITE INTESTINAL

A mucosite intestinal é um dos efeitos colaterais decorrentes do tratamento radioterápico ou quimioterápico, sendo o 5-FU um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia para o tratamento de cânceres de cabeça e pescoço bem como de mama, colorretais e gástricos (Almokashfy et al., 2016; Thomas et al., 2016). Cerca de 20-40% dos pacientes submetidos a doses normais de 5-FU (12 mg/kg durante 3-4 dias por via intravenosa) apresentam este efeito colateral, enquanto 80-100% dos que são submetidos a doses maiores desenvolvem a doença (Cinausero et al., 2017). Os sintomas da mucosite que incluem perda de apetite, náusea, diarreia e intensas dores abdominais podem fazer com que muitos pacientes tenham que abandonar o tratamento ou mesmo reduzir a dosagem do 5-FU, comprometendo a eficácia do mesmo (Cinausero et al., 2017).

No nível celular, a mucosite intestinal acomete principalmente o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), induzindo um quadro inflamatório com comprometimento da barreira intestinal (e consequente predisposição a infecções por microrganismos oportunistas), danos às criptas e aos vasos da submucosa e encurtamento das vilosidades, afetando, assim, a absorção de nutrientes pelo intestino (Stringer et al., 2013; Lee et al., 2014). A decorrência da mucosite induzida

pela quimioterapia com 5-FU se dá em função do efeito apoptótico do fármaco, que acaba por acometer células saudáveis além das cancerosas (Almeida et al., 2005), seguindo uma sequência de eventos biológicos como descritos por Sonis (2004) (Figura 3):

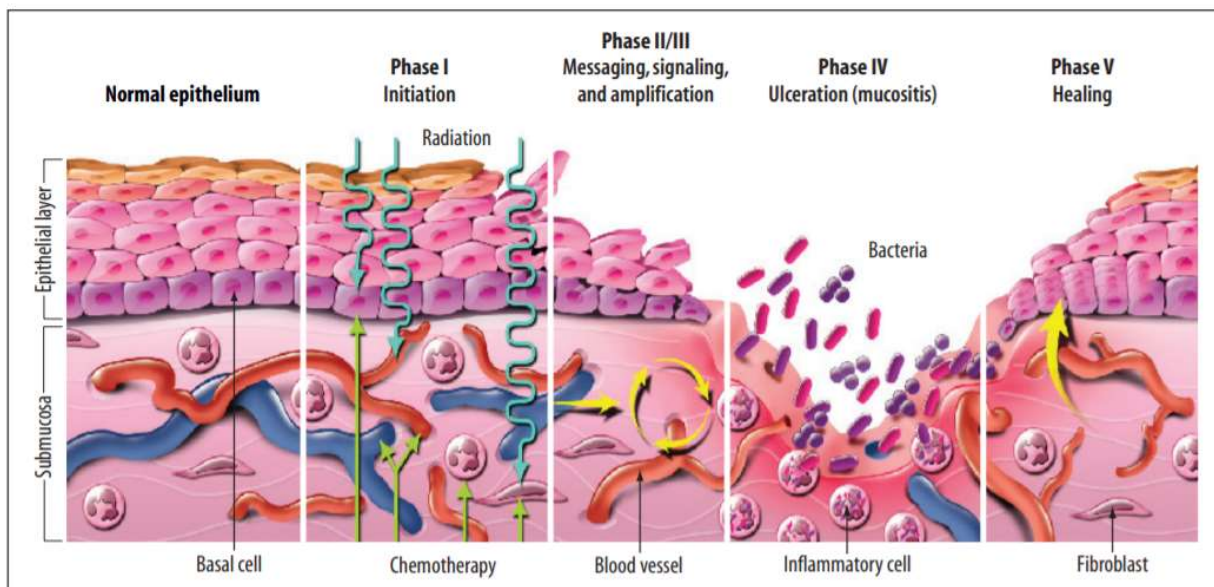


Figura 3: A sequência de eventos biológicos envolvidos na mucosite divididos em cinco fases: iniciação, resposta a danos primários e amplificação, ulceração e cicatrização. Iniciação (I) é caracterizada pelo dano ao DNA e/ou RNA e geração de ROS. Na fase de resposta aos danos primários (II) ocorre ativação de fatores de transcrição que por sua vez ativam genes envolvidos em processos inflamatórios, levando a apoptose e dano tecidual via mecanismo de feedback positivo, que amplificam a resposta inflamatória com a produção de mais citocinas, gerando também estresse oxidativo (III). Esta série de eventos leva a ulceração do tecido (IV), culminando em perda da integridade epitelial, podendo propiciar colonização por bactérias patogênicas ou translocação de microrganismos do lúmen para a corrente sanguínea. Por fim, a fase de cicatrização (V) se caracteriza por um processo espontâneo de reestruturação da arquitetura e função do epitélio intestinal. Fonte: Sonis, 2004

Fase de iniciação: após a administração do 5-FU, o fármaco entra na célula e é convertido em três principais metabólitos: fluourodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP) (Figura 4). O metabólito FdUMP liga-se e inibe a enzima timidilato sintase, diminuindo a concentração de desoxitimidina trifosfato (dTTP), que é importante para síntese e reparo do DNA e aumentando FdUTP e FUTP que se incorporam respectivamente no DNA e RNA da célula (Miura et al., 2010). Os danos a estrutura celular ocasionados em função da incorporação destes metabólitos na cadeia nucleotídica promovem também geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que culminam em dano tecidual e morte celular (Sonis, 2004; Cinausero et al., 2017).

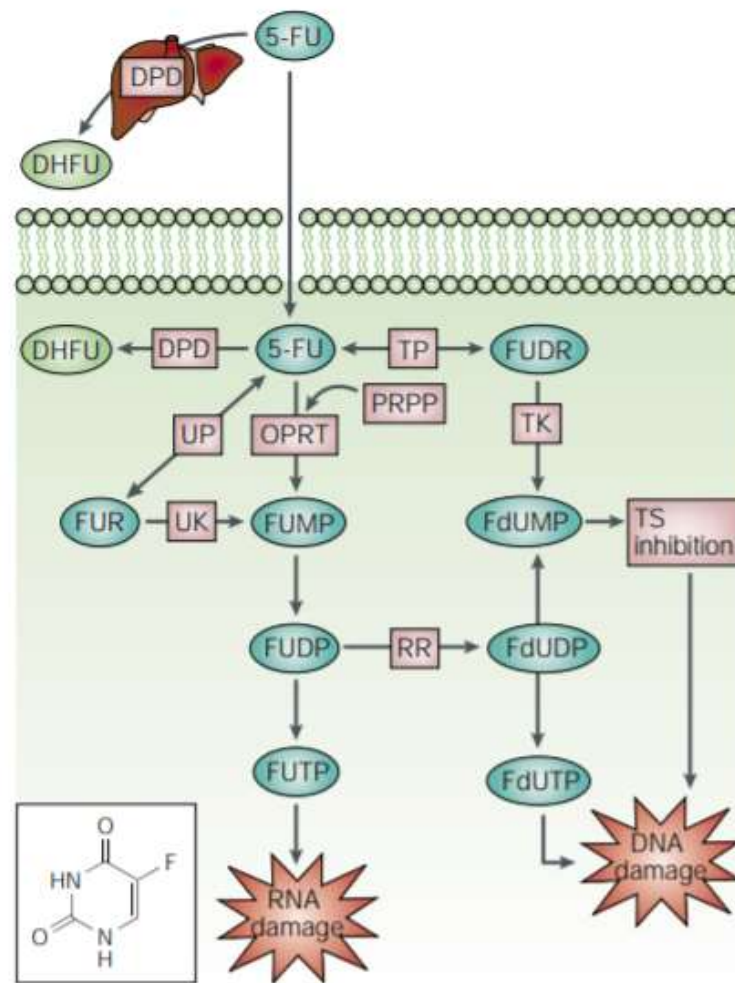


Figura 4: Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil no organismo e sua estrutura molecular. 5-FU é um antimetabólito análogo à uracila, sendo formado através da substituição do carbono 5 de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor (ver estrutura molecular no canto inferior esquerdo da figura). Este fármaco é convertido em três metabólitos principais: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). FdUMP se liga à enzima timidilato sintase, inibindo-a e ocasionando desbalanço no pool de nucleotídeos, inibindo a síntese de DNA ou causando danos. FUTP por sua vez é incorporado ao RNA, promovendo danos e ocasionando perda funcional com consequente morte celular. Fonte: Longley et al. (2003).

Fase de resposta a danos primários: após danos ao DNA que resultam em lesões celulares diretas e apoptose, na segunda fase ocorre ativação de vias de transdução de sinais, com expressão de diversos mediadores do processo de inflamação, tais como IL6, IL8, iNOS TNF, IL1 β , dentre outros, podendo causar dano a mucosa (Sonis, 2004).

Fase de amplificação do sinal: citocinas pró-inflamatórias produzidas na fase anterior agem via mecanismo de feedback positivo, aumentando a produção de mais

citocinas, iniciando um processo inflamatório agudo com mais danos teciduais e amplificação da lesão (Sonis, 2004).

Fase de ulceração: em decorrência dos danos gerados, ocorre perda da integridade da mucosa intestinal com a formação de ulcerações, encurtamento de vilosidades e aumento da profundidade das criptas, propiciando a colonização de bactérias patogênicas oportunistas e/ou a translocação das mesmas do lúmen para a corrente sanguínea (Cinausero et al., 2017). Adicionalmente ocorre um grande infiltrado inflamatório de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (Li et al., 2017).

Fase de cicatrização: após cerca de 3-4 dias após o final do tratamento, observa-se remissão espontânea das ulcerações e restauração das células do epitélio intestinal (Duncan e Grant, 2003; Sonis, 2004).

A gravidade da mucosite tem revelado estar diretamente relacionada a desbalanços nas linhagens comensais da microbiota intestinal, o que pode levar a um quadro de disbiose, caracterizado por perda da homeostase intestinal com redução da diversidade microbiana (Justino et al., 2014; Severance et al., 2016; Li et al., 2017). Alterações na microbiota foram observadas após experimentos com indução da mucosite com 5-FU em animais, com mudanças na composição dos gêneros como aumento de *Straphylococcus* e *Escherichia* e redução de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Stringer et al., 2007; Li et al., 2017).

Em condições normais, a manutenção da microbiota auxilia na integridade intestinal por meio da interação com receptores TLR (*Toll like receptors*) via padrões moleculares associados a patógenos (MAMPs) presentes na superfície bacteriana, ativando a via NF-kB para o desencadeamento de uma resposta imune inata que auxilia na manutenção da homeostase intestinal controlando reparos teciduais. Adicionalmente, a microbiota comensal ajuda a manter a permeabilidade intestinal por induzir a produção de uma camada de muco que reveste e protege o epitélio e expressão de proteínas *tight junctions* que mantêm a integridade intestinal (Figura 5) (Touchefeu et al., 2014).

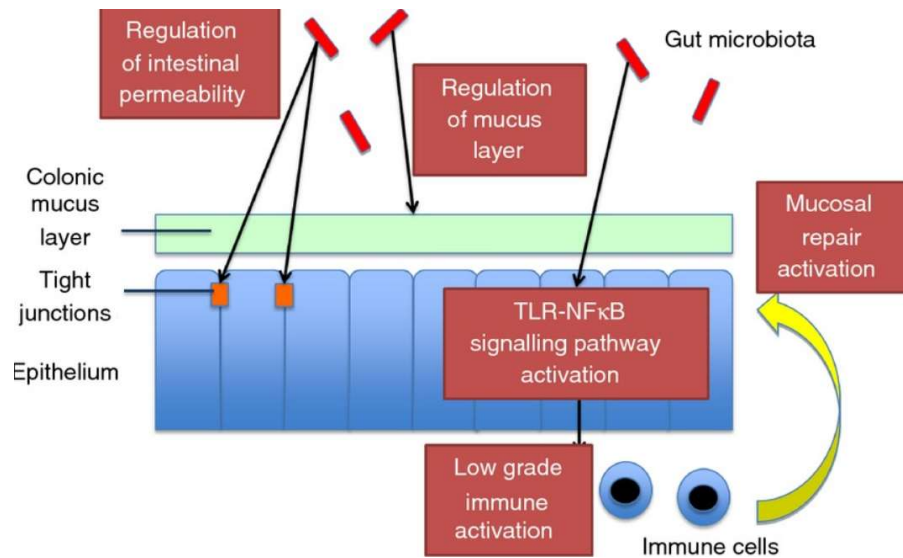


Figura 5: Ações da microbiota comensal sob a mucosa intestinal. Fonte: Touchefeu et al., (2014)

Portanto, no quadro da mucosite, no qual é observado um aumento da permeabilidade e comprometimento da arquitetura intestinal, a modulação da microbiota por meio da administração de probióticos é uma alternativa promissora (Touchefeu et al., 2014; Gori et al., 2019). Outras propriedades probióticas tais como a capacidade de inibir crescimento de determinadas bactérias potencialmente patogênicas pode ainda exercer efeito protetor contra prováveis infecções oportunistas ou até mesmo evitar riscos maiores como o de translocação bacteriana ocasionando sepse (Tomkovich et al., 2016).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A busca por linhagens de bactérias com propriedades benéficas tem sido foco de importantes pesquisas nas últimas décadas no campo da medicina, biotecnologia e indústria alimentícia (Sheridan et al., 2014; Wieërs et al., 2020). Foi demonstrado que alguns probióticos podem atuar na modulação da microbiota intestinal, bem como na promoção de resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, imunoestimulação, produção de vitaminas, inibição do desenvolvimento de determinados tipos de cânceres e de doenças inflamatórias intestinais, dentre outros benefícios (Holanda et al., 2008; Plaza-Diaz et al., 2017; Markowiak et al., 2017).

Para a caracterização segura de uma linhagem probiótica, a mesma deve cumprir com uma série de requisitos baseando-se nas diretrizes da Anvisa e FAO/WHO. Portanto, deve-se primeiramente conhecer a identidade do microrganismo, conduzir testes *in vitro* de segurança, funcionalidade e eficácia e posteriormente desenvolver um estudo *in vivo* em modelos experimentais para comprovação dos efeitos benéficos ao hospedeiro-alvo, antes de se direcionar seu uso em humanos (FAO, 2001; Anvisa, 2019).

Algumas doenças inflamatórias que impactam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, como é o caso da mucosite intestinal, ainda não possuem tratamento específico, e o uso de linhagens probióticas pode auxiliar muito no alívio dos sintomas relacionados a estes quadros clínicos (Justino et al., 2015; OH et al., 2017).

Uma vez que o quadro da mucosite está associado diretamente a pacientes sob o uso de quimioterápicos que já estão por sua vez com um quadro imunológico debilitado, a caracterização de linhagens a serem aplicadas como tratamento alternativo a esta doença deve ser minuciosa de forma a assegurar os menores riscos à saúde do indivíduo (Daliri et al., 2019, Picó-Monllor et al., 2019).

Embora exista atualmente muitas linhagens probióticas sendo estudadas, a avaliação dos benefícios específicos de novas bactérias ainda é um requisito importante, uma vez que a cada dia se conhecem propriedades inéditas de linhagens específicas que podem ser ainda mais benéficas no tratamento deste quadro sem apresentar risco ao paciente, culminando consequentemente em melhora da qualidade de vida.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma prospecção para avaliação de probiose de bactérias lácticas isoladas de diferentes habitats e, posteriormente, avaliar o efeito protetor em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar identificação taxonômica das linhagens por meio da técnica de MALDI-TOF;
2. Avaliar a segurança das linhagens por meio da análise de:
 - a) Perfil de resistência à antibióticos;
 - b) Potencial hemolítico;
 - c) Capacidade de degradar mucina.
3. Avaliar a eficácia das linhagens por meio da análise de:
 - a) Resistência ao suco gástrico artificial;
 - b) Resistência aos sais biliares;
 - c) Capacidade antagonista contra patógenos do trato gastrointestinal;
 - d) Adesão às células Caco-2;
 - e) Capacidade de imuno-estimulação de células Caco-2;
4. Estudar o efeito protetor de linhagens que apresentaram bons parâmetros na prospecção em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU por meio da análise de:
 - a) Variação da massa corporal dos animais, consumo hídrico e alimentar e comprimento intestinal;
 - b) Cálculo do índice de inflamação esplênico, hepático e intestinal;
 - c) Integridade da mucosa intestinal, por meio de análise de escores histopatológicos no íleo dos animais;
 - d) Avaliação histológica do comprimento das vilosidades e profundidade das criptas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O local de onde foram isoladas as linhagens utilizadas neste estudo, bem como o seu número de identificação adotado neste trabalho e sua identificação original estão retratados na tabela 3:

Tabela 3: fonte das respectivas linhagens isoladas.

Fonte	ID	ID (original)	Procedência
Beterraba- Feira de Santana - BA (feira livre)	1	BET9	LAMASP
Manteiga artesanal- Feira de Santana - BA (feira livre)	2	MT01	LAMASP
Mandioca - Feira de Santana - BA (feira livre)	3	PUB16	LAMASP
Caldo de cana – Feira de Santana - BA (ambulante)	4	CC09	LAMASP
Mandioca – Feira de Santana- BA (feira livre)	5	LVBg	LAMASP
Tomate – Feira de Santana- BA (feira livre)	6	TOM9	LAMASP
Repolho - Feira de Santana- BA (feira livre)	7	R2	LAMASP
Leite de cabra - Feira de Santana- BA	8	LCMH1	LAMASP
Leite de vaca – Fazenda em Ruy Barbosa – BA	9	LV.cr	LAMASP
Fezes de frango - Fazenda em Ruy Barbosa- BA	10	F11	LAMASP
Beterraba - Feira de Santana- BA (feira livre)	11	BET21	LAMASP
Leite materno após 3 dias do parto – BA	12	H1	LAMASP
Fezes de potro – Camacari (BA)	13	E13	LAMASP
Abacaxi – Feira de Santana- BA (feira livre)	14	ABX10.1	LAMASP
Leite de vaca – Ruy Barbosa-BA	15	LVBp1	LAMASP
Fezes de Bezerro – Ruy Barbosa-BA	16	B3.17	LAMASP
Leite de vaca – Feira de Santana- BA	17	LV13	LAMASP
Fezes de bebê de 3 dias – Feira de Santana- BA	18	H15	LAMASP
Fezes de bezerro- Fazenda em Ruy Barbosa- BA	19	B4.23	LAMASP
Bebida tradicional pulque- Morélia, México	20	aM	LANMDA
Microbiota vaginal de mulheres saudáveis	21	F-0774	LMA

LAMASP: Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública; LANMDA: Laboratório Nacional de Nutrigenômica e Microbiômica Digestiva Animal; LMA: Laboratório de Microbiologia Aplicada.

As amostras 1 a 19 foram provenientes do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), a amostra 20 do Laboratório Nacional de Nutrigenômica e Microbiômica Digestiva Animal (LANMDA) na Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, no México e 21, do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As bactérias foram recebidas em *stabs* contendo meio MRS (de Man, Ragosa & Sharpe). Para a ativação das mesmas, devido ao fato de serem provenientes de diferentes nichos, consequentemente com temperaturas de crescimento heterogêneas, todas elas foram inoculadas em meio líquido MRS (Difco™) e deixadas *overnight* em estufa bacteriológica em duas temperaturas: 30°C e 37°C. As culturas reativadas foram semeadas em placa de Petri com MRS (Difco™) acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico (Difco™), e deixadas em estufa bacteriológica. Posteriormente, uma única colônia de cada placa foi crescida em meio líquido MRS (Difco™) nas duas temperaturas e parte desse cultivo foi estocado com glicerol 15% a -80°C e guardado na bacterioteca do laboratório.

Foi sucedida uma cinética de crescimento para avaliar qual das temperaturas testadas seria mais promissora para o crescimento das linhagens. Para isso, pré-inóculos foram feitos adicionando-se 5 µL das amostras da bacterioteca a 5 mL de meio MRS líquido (Difco™). Os pré-inóculos foram mantidos na temperatura desejada *overnight*, em estufa bacteriológica. No dia seguinte a cada pré-inóculo, placas de 96 poços foram preparadas acrescentando 200 µL de meio MRS líquido (Difco™) (volume final) em cada poço. Os pré-inóculos foram então diluídos em cada um dos poços da placa de forma a se obter uma DO_{600nm} inicial de 0,04 para cada linhagem, de acordo com a fórmula 1:

Fórmula 1:

$$\text{Volume do pré inóculo a ser adicionado} = \frac{DO_{600nm} \text{ } 0,04 \times \text{volume final}}{DO_{600nm} \text{ } \textit{overnight}}$$

Após a diluição de todas as linhagens bacterianas dispostas nos poços da placa, prosseguiu-se com a incubação da mesma em incubadora e leitora automática para microplacas (Multiskan Spectrum - Thermo Scientific) a 30°C e a 37°C separadamente. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura da DO_{600nm} a

cada 1 h, durante 12 h para realização da curva de crescimento correspondente a cada linhagem estudada em cada temperatura correspondente. Os dados das curvas foram plotados no programa GraphPad Prism 8.0.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS

Para uma identificação taxonômica a nível de gênero e espécie, prosseguiu-se com a técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisado de tempo-de-voo (MALDI-TOF). A identificação biomolecular das bactérias lácticas estudadas no presente trabalho foi realizada no Laboratório Aquacen, da Escola de Veterinária da UFMG, sendo as mesmas analisadas de acordo com os valores de escore propostos pelo fabricante, como relatado a seguir.

Inicialmente foram obtidos os perfis proteicos das linhagens por meio do protocolo de extração com etanol/ácido fórmico de acordo com Sauer et al. (2008) e Freiwald & Sauer (2009) com algumas modificações. Para isso, foi feito um pré-inóculo adicionando-se 10 µL das culturas bacterianas estoque em 1 mL de meio MRS líquido (Difco™) e incubando a 37°C *overnight*. Posteriormente, todas as linhagens foram estriadas em placas de Petri contendo ágar MRS 1,5% (Difco™) e incubadas a 37°C por 24h. Uma colônia isolada de cada linhagem foi colhida do ágar com auxílio de uma alça de inoculação e foi adicionada a 300 µL de água Milli-Q (Millipore) estéril, seguida da adição de 900 µL de etanol absoluto (Synth) para inativação das bactérias, com posterior centrifugação a 13000 rpm por 2 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os tubos foram deixados abertos para secagem em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente foram adicionados 50 µL de ácido fórmico (70%) (Sigma-Aldrich) e 10 µL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich), sendo as amostras bem homogeneizadas com uma pipeta, em seguida centrifugadas a 13000 rpm por 2 min e 1 µL de cada sobrenadante foi aplicado em poços da placa de MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Em cada amostra foi adicionado 1 µL de ácido fórmico (70%) (Sigma-Aldrich) e 1 µL de matriz MS MALDI-TOF, constituída por uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinnâmica (HCCA) (Bruker Daltonics). Antes da leitura, aguardou-se a secagem do conteúdo em temperatura ambiente.

Os espectros foram adquiridos utilizando o espectrômetro de massa FlexControl Microflex LT (Bruker Daltonics) com um laser de nitrogênio de 60 Hz. Os

parâmetros do aparelho para a detecção de alcance em massa para permitir a identificação de 1,960 a 20,137 m/z foram: tensão da fonte IS1 de 19,99 kV, tensão da fonte IS2 de 18,24 kV e tensão de lentes de 6,0 kV. Os espectros de cada amostra foram processados através do software MALDI Biotyper versão 3 (Bruker Daltonics) e montados para gerar um Biblioteca Espectral Principal (MSP) para as linhagens que utilizam a norma de criação do BioTyper MSP.

Para a calibração, foi realizado um teste com amostra padronizada de *Escherichia coli* DH5 alfa (Bruker Daltonics). O critério do *score* de identificação em Tempo Real foi seguido de acordo com instruções do fabricante, sendo que uma pontuação acima de 2.000 indica uma identificação em nível de espécie, pontuação entre 1.700 e 2.000 indicam uma identificação em nível de gênero, e uma pontuação abaixo de 1.700 indica que não há qualquer identificação confiável. Comparações entre as identificações das amostras e o controle foram realizadas com o software R versão 3.0.1(R Core Team, 2013) com as taxas de acordo determinadas pelo Coeficiente Kappa, que avalia o grau de concordância e reprodutibilidade entre os resultados do conjunto de dados.

4.2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CADA LINHAGEM APÓS INCUBAÇÃO OVERNIGHT

Para realização dos testes de seleção bacteriana neste trabalho, é fundamental avaliar a quantidade de bactérias presentes após incubação *overnight* utilizadas no momento dos experimentos. Para isso, calcula-se a Unidade Formadora de Colônias por mililitro (UFC/mL) de cada bactéria após incubação como se segue: pré-inóculos das linhagens foram feitos adicionando-se 20 µL das culturas bacterianas estoque em 2 mL de meio MRS Líquido (Difco™) e mantidos *overnight* a 37°C, em estufa bacteriológica. No dia seguinte, diluições seriadas foram realizadas diluindo-se progressivamente cada inóculo em tubos contendo MRS Líquido (Difco™) como diluente, a fim de se obter uma diluição final de 10⁻⁸. Em seguida, 50 µL desta diluição foram então plaqueados em placas de Petri contendo MRS (Difco™) acrescido de 1,5% de ágar (Difco™) e a mesma foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Após o crescimento das colônias, a obtenção da UFC/mL se deu por meio da aplicação da fórmula 2 a seguir:

Fórmula 2:

$$UFC = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume (mL) plaqueado}}$$

4.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA

4.3.1 ANTIBIOGRAMA

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade a antimicrobianos por difusão da droga em discos, com algumas modificações (Charteris et al., 1998). Pré-inóculos das linhagens foram preparados adicionando 20 µL da cultura bacteriana estoque em 2 mL de MRS líquido (Difco™) e incubando-os em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*. Em seguida, utilizando-se cotonetes de haste flexível estéreis, os microrganismos foram inoculados sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar MRS (Difco™). Logo em seguida, foram distribuídos os discos (Cecon) contendo os antimicrobianos com suas concentrações predeterminadas de acordo com a orientação da Anvisa, 2005: clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), estreptomicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (10 µg) e cloranfenicol (30 µg) (Anvisa, 2005). As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h. Após este período, com auxílio de uma régua milimetrada, foram feitas as medições dos diâmetros dos halos de inibição.

As análises dos resultados obtidos foram realizadas de acordo com Charteris e colaboradores (1998) com algumas modificações, classificando as linhagens como como sensíveis ou resistentes às drogas antimicrobianas testadas, de acordo com a tabela 4 (Charteris et al., 1998).

Tabela 4: Agentes antimicrobianos e interpretação das suas respectivas zonas de inibição através do teste de susceptibilidade com discos de antibióticos.

Nome	Concentração (µg)	Zona de inibição	
		R	S
Clindamicina	2	≤8	>8
Eritromicina	15	≤13	>13
Gentamicina	10	≤12	>12
Estreptomicina	10	≤11	>11

Tetraciclina	30	≤14	>14
Vancomicina	30	≤14	>14
Ampicilina	10	≤12	>12
Cloranfenicol	30	≤13	>13

4.3.2 DEGRADAÇÃO DA MUCINA

O teste para avaliar a degradação da mucina pelas linhagens bacterianas foi realizado de acordo com o proposto por Zhou e colaboradores (2001) como segue: uma placa de LB (Luria Bertani- Sigma) foi preparada adicionando 1,5% de ágar (Kasvi) juntamente com 0,3% de mucina gástrica comercial tipo III (Sigma–Aldrich). Cinco µL de cada cultura previamente crescida foi inoculado na placa e também 5 µL de uma cultura de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 700931™ e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028™ como controle positivo. A placa foi incubada a 37°C por 48 h e, em seguida, 0,1% de amido black (Sigma-Aldrich) foi depositado na superfície da placa e espalhado cuidadosamente através de movimentos circulares, deixando em repouso por 30 min. Posteriormente a placa foi lavada com de ácido acético 1,2 M. Uma zona de inibição branca nas colônias revela degradação da mucina naquele entorno e prediz tal capacidade da linhagem (Zhou et al., 2001).

4.3.3 POTENCIAL HEMOLÍTICO

Para avaliar o potencial hemolítico das linhagens estudadas, placas de soja tríptica (Acumedia) foram preparadas com 1,5% de ágar (Difco), acrescentando-se 5% de sangue de carneiro desfibrinado após autoclavagem. Pré-inóculos das linhagens foram preparados adicionando 20 µL da cultura bacteriana estoque em 2 mL de MRS líquido (Difco™) e incubando-os em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*. Posteriormente, 5 µL de cada cultura foi depositado sobre a placa e também 5 µL de *Staphylococcus aureus* como controle positivo e aguardou-se 48 h. Após incubação, a atividade hemolítica foi analisada e classificada levando em consideração a presença de lise de hemácias ao entorno das colônias. Zonas verdes ao entorno das colônias revelam hemólise parcial (α-hemólise), enquanto zonas translúcidas revelam

hemólise total (β -hemólise) e nenhuma zona, ausência de hemólise (γ -hemólise) (Halder et al., 2017).

4.4 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE E EFICÁCIA

4.4.1 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO SUCO GÁSTRICO

O teste para verificação da resistência ao baixo pH do suco gástrico foi conduzido em triplicata por meio da técnica adaptada de Neumann (1991). Pré-inóculos de todas as linhagens foram feitos adicionando-se 20 μ L das culturas bacterianas estoque a 2 mL de meio MRS líquido (Difco™) em microtubos de 2 mL e incubando-os a 37°C *overnight* para o crescimento bacteriano. As culturas foram posteriormente diluídas a uma DO_{600nm} inicial de 0,04 em 1 mL de solução de NaCl 0,9% (Synth), pH 7,0 (controle) e em 1 mL de suco gástrico artificial composto por NaCl 2 g/L (Synth) e pepsina 3,2 g/L (Sigma-Aldrich), pH 2.5, de acordo com a fórmula 1, descrita no tópico 4.1.

Os microtubos foram incubados a 37°C por 3 h sob agitação de 150 rpm para simular a movimentação do suco gástrico e, posteriormente, foram centrifugados a 13000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 2 mL de meio MRS líquido (Difco™). Logo em seguida, foram aplicados 200 μ L de cada amostra (figura 6) em uma microplaca de 96 poços, a qual foi incubada em incubadora e leitora automática para microplacas (Multiskan Spectrum - Thermo Scientific) a 37°C, que realizou leituras por 12 h para avaliação das curvas de crescimento controles e após o estresse ao qual as linhagens foram submetidas. A absorbância do cultivo foi determinada (DO_{600nm}) a cada 1 h, durante todo o intervalo de 12 h.

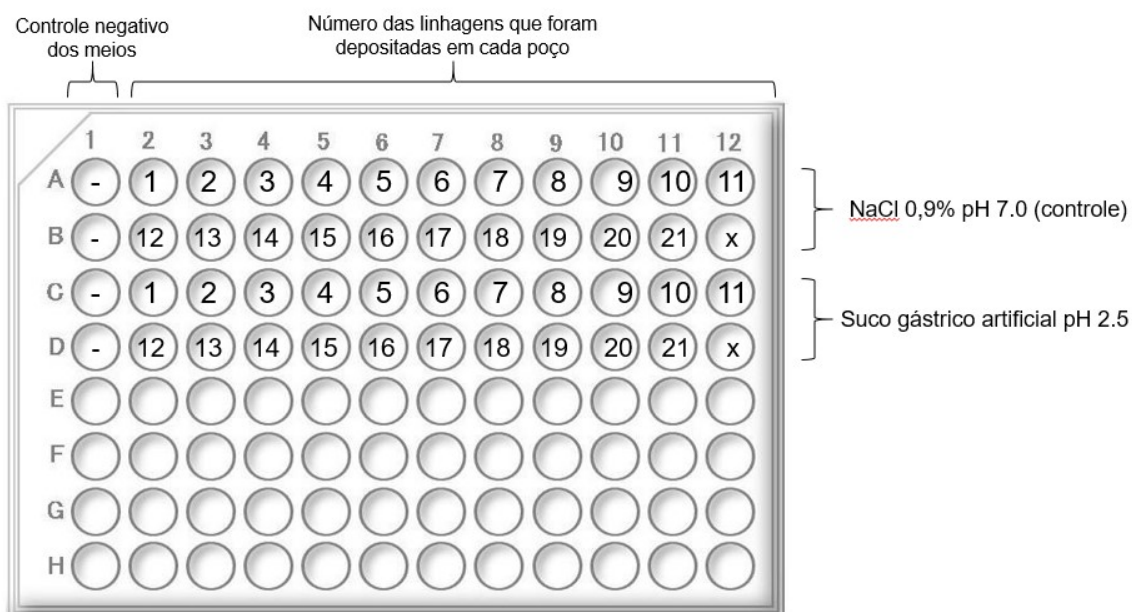


Figura 6: Esquema da placa montada para realização do teste de resistência ao baixo pH.

Gráficos das curvas de crescimento de cada linhagem foram plotados e a resistência ao suco gástrico foi avaliada por meio da análise da diferença da área do gráfico controle e o gráfico de crescimento com pH ácido utilizando o programa GraphPad Prism 7, de forma a obter a representação da diferença proporcional entre os crescimentos em meio com pH neutro (controle) e ácido durante todo o período avaliado (12 horas).

4.4.2 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

Os testes para avaliação da resistência das linhagens aos sais biliares foram conduzidos em triplicata de acordo com Walker e Gilliland (1993), com algumas modificações, utilizando bile desidratada (Oxgall-Sigma) para simulação das condições do ambiente intestinal proximal (duodeno). Três concentrações de sais biliares foram analisadas (0,3%, 0,7%, 1,0%). Para tanto, pré-inóculos de todas as linhagens foram feitos adicionando-se 20 μ L das culturas bacterianas estoque a 2 mL de meio MRS líquido (Difco™) em microtubos de 2 mL e incubados a 37°C *overnight* para o crescimento bacteriano. Após a incubação, uma placa de 96 poços foi preparada como segue: foi acrescentado aos poços para cada linhagem i) 200 μ L de meio MRS puro (controle), ii) MRS+0,3% Oxgall, iii) MRS+0,7% Oxgall e vi) MRS+1,0% Oxgall (Figura 7).

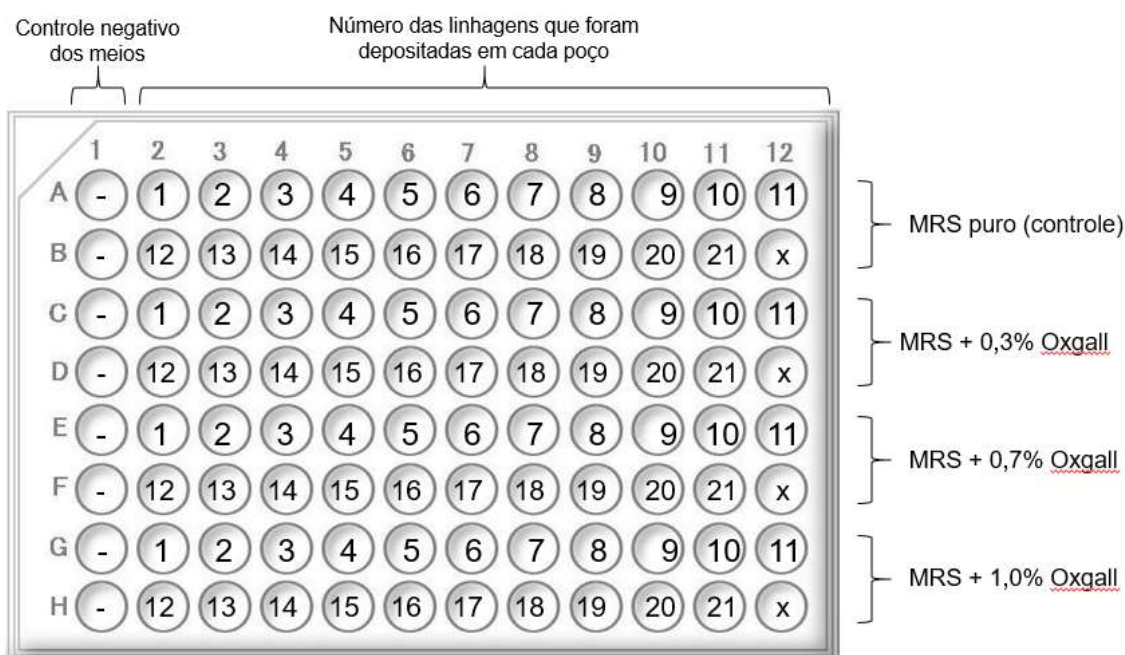


Figura 7: Esquema da placa montada para realização do teste de resistência aos sais biliares.

As culturas bacterianas crescidas foram acrescentadas a cada poço nas condições apresentadas de forma a atingir uma absorbância inicial de 0,04 (DO_{600nm}), de acordo com a fórmula 1 descrita anteriormente (tópico 4.1). Imediatamente após a inoculação das bactérias nos poços correspondentes, a placa foi incubada a 37°C em incubadora e leitora automática para microplacas (Multiskan Spectrum - Thermo Scientific) durante 12 h. A absorbância do cultivo (DO_{600nm}) foi determinada a cada 1 hora, durante o período de 12 h.

Gráficos das curvas de crescimento de cada linhagem foram plotados e a resistência aos sais biliares foi avaliada através da análise da diferença entre a área do gráfico controle e os gráficos para cada uma das concentrações de oxgall testadas utilizando o programa GraphPad Prism 7. As linhagens que apresentaram inibição $\leq 40\%$ para uma dada concentração foram consideradas como resistentes, como tolerantes aquelas que apresentaram inibição entre 40 e 75% e sensível, inibição $\geq 75\%$ (Alvim et al., 2011).

4.4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O ensaio para verificação da produção de compostos com efeito antagonista das linhagens bacterianas estudadas foi realizado em duplicata pela técnica de

difusão em sobrecamada de ágar, utilizando importantes patógenos que podem causar doenças do trato gastrointestinal, denominadas nesse estudo como linhagens reveladoras, as quais são retratadas na tabela 5 a seguir:

Tabela 5: Linhagens utilizadas como reveladoras e sua procedência.

Organismo	Procedência
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 11775
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC® 9290
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium	ATCC® 14028
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhi	ATCC® 70093
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 19433
<i>Listeria monocitogenes</i>	ATCC® 15313

Para tanto, placas de Petri contendo MRS-ágar 1,5% (Difco™) foram preparadas previamente e o pré-inóculo das linhagens foi feito adicionando 20 µL da cultura bacteriana estoque em 2 mL de MRS líquido (Difco™) e incubando-o em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*. No dia seguinte, 5 µL de cada uma das culturas foi depositado cuidadosamente na superfície do ágar MRS (*spot* de cultura bacteriana), deixando a placa aberta no fluxo laminar por 10 min para a secagem da cultura inoculada. As placas foram então incubadas a 37°C por um período de 24 h em estufa bacteriológica. Paralelamente, as linhagens patogênicas utilizadas como reveladoras foram ativadas em caldo BHI (“Brain Heart Infusion” – Acumedia) e crescidas *overnight* a 37°C em estufa bacteriológica.

No dia seguinte, as colônias crescidas em placa foram inativadas com clorofórmio para avaliar a produção de substâncias extracelulares capazes de se difundir no ágar e impedir o crescimento da bactéria patogênica adjacente (Pereira e Gómez, 2007). Para isso, as placas foram abertas em capela de fluxo laminar e as colônias foram expostas ao vapor de clorofórmio (Synth), pela adição de 1 mL do mesmo em papel filtro na tampa da placa e fechando a mesma de cabeça para baixo por 30 min para promover a morte das células. Em seguida, as placas foram abertas, ainda no fluxo, por mais 30 min, para evaporação do clorofórmio residual. Transcorrido esse tempo, 10 µL das amostras reveladoras previamente crescidas

(aproximadamente 10^9 UFC) foram adicionados a 8 mL de meio BHI ágar 1,5% (Acumedia) morno, e esta mistura foi vertida sobre cada placa contendo as linhagens de BLs e elas foram incubadas a 37°C por 24 h.

O halo de inibição formado ao redor do *spot* da cultura bacteriana foi medido em milímetros com o auxílio de uma régua milimetrada para avaliação da inibição do crescimento das linhagens potencialmente patogênicas adjacentes.

4.4.4 ENSAIOS DE ADESÃO E IMUNOESTIMULAÇÃO EM CÉLULAS CACO-2

Células eucarióticas humanas de adenocarcinoma colorretal obtidas no *American Type Culture Collection* (ATCC), de identificação Caco-2 (ATCC® HTB-37™), foram utilizadas neste trabalho. As células foram mantidas em vials com 10% do crioprotetor Dimetil Sulfóxido (DMSO - Synth) em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Inicialmente, as células foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 3 min e, em seguida, foram coletadas em um fluxo laminar com auxílio de uma pipeta de 1 mL e transferidas para garrafas T-75 cm² (TPP) contendo 15 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Sigma Aldrich) completo com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino- SFB (CultiLab) (DMEM+SFB). A garrafa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa de cultura celular (Thermo Electrone) e o meio foi renovado a cada 48 h de forma a garantir nutrição para as células neste período.

Para a expansão das células, após atingirem a confluência de 80-90% na garrafa de 75cm² (aproximadamente duas semanas), foi realizado o repique celular, que se refere à transferência das células para expansão em outras garrafas. Para isso, o meio de cultivo foi removido da garrafa e acrescentou-se delicadamente PBS 0,01 M estéril para lavagem das células. O PBS foi descartado e posteriormente adicionou-se à garrafa um volume de 1 mL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher), sendo então incubada em estufa a 37°C durante aproximadamente 5 min para a desaderência das células. Posteriormente, a solução de Tripsina foi neutralizada com a adição 5 mL de meio DMEM+SFB. A suspensão celular foi transferida para novas garrafas com uma razão de divisão de 1:5 a 1:8, isto é, o volume final obtido foi dividido de 5 a 8 vezes para repassar para outras garrafas de acordo com as orientações do ATCC, e posteriormente o volume para cada garrafa

foi completado para 15 mL com meio DMEM+SBF. As garrafas foram então incubadas a 37°C, 5% de CO₂.

Para a montagem das placas para os experimentos, após as células atingirem uma confluência de aproximadamente 80-90%, o meio de cultivo foi removido e adicionou-se à garrafa um volume de 1 mL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher) e a mesma foi incubada a 37°C até as células desaderirem (aproximadamente 5 min). Posteriormente, a solução de Tripsina foi neutralizada com a adição de um volume de 5 mL de DMEM+SFB. As células foram ressuspensas gentilmente e 10 µL da suspensão total foi removida para contagem e verificação da viabilidade celular. Para isso, adicionou-se a este volume mais 10 µL de azul de bromofenol (Synth) e a mistura foi depositada gentilmente sob uma Câmara de Neubauer para contagem, de acordo com a fórmula 3:

Fórmula 3:

$$N^{\circ} \text{ de células (mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células contadas}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{diluição} \times 10.000$$

Após a contagem, foram dispostas em cada poço 1x10⁵ células para o experimento de adesão e imunomodulação, com o meio DMEM+SFB. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C e com atmosfera de 5% de CO₂ em estufa para cultura celular até a formação de uma monocamada diferenciada (aproximadamente 21 dias), sendo o meio DMEM+SFB trocado a cada 2 ou 3 dias, de forma a garantir nutrição para as células neste período de tempo.

4.4.5 ENSAIO DE ADESÃO ÀS CÉLULAS CACO-2

O ensaio de adesão foi realizado como descrito por Jacobsen et al. (1999), com algumas modificações. Um dia antes da realização do experimento de adesão celular, o meio da cultura foi renovado e, paralelamente, as linhagens bacterianas a serem testadas foram ativadas a partir da cultura estoque em 5 mL de meio MRS líquido (Difco™) e incubadas *overnight* a 37°C em estufa bacteriológica.

No dia do experimento, as células foram lavadas duas vezes com PBS 0,01 M e 0,5 mL de DMEM sem SFB foi adicionado. Sucessivamente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa para cultura celular com atmosfera de 5% de CO₂. Neste

período, os inóculos de cada linhagem bacteriana foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min e ressuspensos em 5 mL de DMEM sem SFB. Posteriormente, os ressuspensos bacterianos correspondentes a 1 mL de cultura foram adicionados em cada poço da placa, sendo as mesmas incubadas em estufa para cultura celular nas condições citadas por 2 h. Após esse período, cada poço foi lavado individualmente por 5 vezes com PBS 0,01 M para a remoção das bactérias não aderidas.

Para análise do percentual de adesão, após a lavagem, as células foram desaderidas com 0,5 mL de Tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher) em cada poço e incubadas por 5 min a 37°C. O produto desta suspensão foi submetido a diluições seriadas e plaqueamento em pacas de Petri contendo MRS ágar 1,5% (Difco™) nas diluições de 10^{-4} e 10^{-6} . Os experimentos foram realizados em duplicata.

A taxa de adesão foi calculada após 48 h de incubação das placas a 37°C em estufa bacteriológica, comparando-se o número de bactérias aderentes com o número de bactérias de cada linhagem inicialmente inoculadas nas células (obtidas de acordo com o tópico 4.2.3), de acordo com a fórmula a seguir:

Fórmula 4:

$$\text{Taxa de adesão} = \frac{\text{UFC aderidas após a lavagem}}{\text{UFC inicial das bactérias}}$$

4.4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IMUNO-ESTIMULAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS *IN VITRO*

4.4.6.1 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS CACO-2 ÀS LINHAGENS AVALIADAS

Células Caco-2, em uma concentração de 10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 poços de acordo com o subtópico 4.4.4, por 21 dias até a completa diferenciação. O meio foi trocado a cada 2 dias e as células foram cultivadas até obter 80-90% de confluência.

Um dia antes do experimento, o meio de cultivo DMEM+SFB foi trocado e as linhagens bacterianas testadas foram incubadas *overnight*, isoladamente, a 37°C em estufa bacteriológica. No dia seguinte, as culturas das linhagens bacterianas foram centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min e ressuspensas em meio DMEM+SFB e a mistura foi depositada sobre a camada de células Caco-2, sendo incubada por um

período de 12 h a 37°C com 5% de CO₂. Para o controle negativo, foi adicionado somente meio DMEM+SFB às células. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0,01M para prosseguir com a extração do RNA.

4.4.6.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

O RNA total das células eucarióticas após serem incubadas com as linhagens bacterianas foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Para isso, 300 µL de TRIzol (Life Technologies) foi adicionado sobre a monocamada celular em cada poço, sendo ressuspensionado até a completa homogenização. Em seguida, o conteúdo foi transferido para microtubos de 1,5 mL e agitado em vórtex por 30s. Adicionou-se 60 µL de clorofórmio (Synth) por tubo e o conteúdo foi agitado vigorosamente no vórtex, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa (transparente superior) foi coletada em um novo tubo e à ela adicionou-se 100 µL de isopropanol (Synth) gelado, misturando-se bem em vórtex. Os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70% (Synth), centrifugando a 10.000 rpm por 7 min. Por fim, o precipitado formado foi secado em temperatura ambiente por 10 a 30 min e ressuspensionado em 30 µL de água Milli-Q estéril, incubando em banho maria a 60°C por 15 min para aumentar a solubilidade da amostra. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) em absorbância a 260 nm e 280 nm. Os valores de referência para verificar contaminação foram entre 1,8 e 2,0.

Para análise da qualidade amostras de RNA obtidas, 1 µL de cada uma foi adicionado a 3 µL de tampão de amostra (Glicerol 50%; azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X) e aplicadas em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM tris; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A corrida foi realizada a 100 V durante aproximadamente 20 min. O RNA foi visualizado no gel sobre um transiluminador de luz violeta a 320 nm (MultiDoc-It Digital Imaging System UVP). As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

Para a realização da síntese do cDNA, inicialmente as amostras de RNA quantificadas foram padronizadas em uma concentração de 2 µg/µL e 1 µL das mesmas foram purificadas pela adição de 1 µL de DNase Buffer RDD 10X (Qiagen) e

1 µL de DNaseI (Qiagen), completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q estéril. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e em seguida adicionou-se 2 µL do reagente inativador de DNase (Invitrogen), centrifugando logo em seguida a 10.000 rpm por 2 min e transferindo o sobrenadante para outro microtubo estéril. Feito isso, os 10 µL resultantes foram submetidos a ação da enzima transcriptase reversa, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). Para isso, foram adicionados aos microtubos 2 µL de Buffer RT 10X, 0,8 µL de DNTP MIX 25X (100mM), 2 µL de Primers RT 10X, 1 µL da enzima Transcriptase Reversa e 4,2 µL água Milli-Q estéril. A reação se deu em um termociclador (MyGene modelo MG96+, LongGene) seguindo as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. O cDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria utilizando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e a concentração foi padronizada para 2 µg/µL. Por fim, o cDNA foi diluído 5 vezes para dar prosseguimento a análise por q-PCR.

4.4.6.3 Q-PCR

A análise da expressão gênica por qPCR foi realizada utilizando primers RT qPCR (IDT) na concentração de uso de 10pMol, cuja sequência está retratada na tabela 6.

Tabela 6: Lista dos primers desenhados para o ensaio de RT-PCR

Alvo	Sequência	Referência
TNF	F: TCAATCGGCCCCGACTATCTC R: CAGGGCAATGATCCCAAAGT	Justino et al., 2020
TLR-2	F: TCCTGTGCCACCGTTTCC R: GCTTTCCTGGGCTTCCTTTT	Justino et al., 2020
IL6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC R: GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	Jung et al., 1995
IL10	F: ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA R: TCTCAAGGGGCTGGGTGAGCTATCCCA	Jung et al., 1995
18S	F: CGGCTACCACATCCAAGGAA R: GCTGGAATTACCGCGGCT	Justino et al., 2020

β-actina	F: TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA R: CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG	Jung et al., 1995
-----------------	---	-------------------

Para cada 2 µL do cDNA diluído foram adicionados 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 0,5 µL dos primers *forward* e *reverse* para cada gene analisado, completando o volume para 10 µL com água Milli-Q estéril. A reação se deu no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System nas seguintes condições: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os resultados foram acessados através do programa SD 2.4 e a expressão dos genes de interesse foram analisadas utilizando o método relativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). A normalização foi realizada utilizando-se os genes endógenos 18S e β-actina como referências e as análises conduzidas através do GraphPad Prism 8.

4.5 ANÁLISES *IN VIVO* EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

4.5.1 ANIMAIS

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos BALB/c, machos (20-25g), com idade de 6 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os mesmos foram mantidos em microisoladores nas seguintes condições: temperatura em torno de 21°C, ciclo de luz alternado 12 h claro/12 h escuro, alimentação e água *ad libitum* até o início dos experimentos, sendo a água posteriormente substituída por MRS (controles) ou MRS acrescido das linhagens bacterianas. Os protocolos experimentais utilizados foram realizados de forma a garantir o maior bem estar dos animais durante todo o período, de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMG (Protocolo CEUA 112/2020).

4.5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO

Os animais foram divididos em 10 grupos experimentais (n=5), sendo eles: CTRL: controle negativo tratado com MRS puro; MUC: controle positivo tratado com MRS puro com indução da mucosite através da administração de 300 mg/Kg de 5-FU; tratamento com MRS acrescido das 4 linhagens escolhidas sem indução da doença e tratamento com MRS acrescido das 4 linhagens escolhidas com indução da mucosite através da administração de 300 mg/Kg de 5-FU. Os grupos e seus tratamentos estão retratados na tabela 7:

Tabela 7: Grupos experimentais, tratamento realizado e via de administração.

Grupos experimentais	Tratamento/ indução	Administração
CTRL	MRS puro+Salina	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
CTRL+MUC	MRS puro+5-FU	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. paracasei</i> Lpa1	MRS+bactéria+Salina	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>E. faecalis</i> Efc15	MRS+bactéria+Salina	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. plantarum</i> Lpl19	MRS+bactéria+Salina	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. crispatus</i> Lc21	MRS+bactéria+Salina	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. paracasei</i> Lpa1+MUC	MRS+bactéria+5-FU	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>E. faecalis</i> Efc15+MUC	MRS+bactéria+5-FU	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. plantarum</i> Lpl19+MUC	MRS+bactéria+5-FU	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>
<i>L. crispatus</i> Lc21+MUC	MRS+bactéria+5-FU	<i>Continuous feeding+ Intraperitoneal</i>

O modelo de mucosite intestinal adotado neste trabalho foi realizado de acordo com Carvalho et al. (2017), a partir da administração intraperitoneal (i.p.) de uma única dose de 300 mg/kg de 5-FU (Fauldfluor®, lote 19H0666) no 10º dia de experimentação, com eutanásia ocorrendo 72 h após administração (Figura 8). Como controle, foi utilizada solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) estéril, pela mesma via.

inflamação intestinal, uma vez que alterações nessa taxa podem ser usadas como indicadores de inflamações. Baço e fígado também foram pesados e o peso de cada um foi dividido pela média do peso dos animais durante todo o período experimental para obtenção da taxa visceral de inflamação de acordo com Sanders et al. (2010) e Zhang et al. (2019). É esperada uma redução no índice destes órgãos em um modelo inflamatório como a mucosite.

4.5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

A secção intestinal correspondente aos 20% do íleo foi coletada e lavada sucessivas vezes com PBS 0,1 M para retirada das fezes e posteriormente enrolada no sentido proximal-distal, sendo cuidadosamente amarrada em uma linha e transferida para solução de formol tamponado 4%. O formol foi trocado após 24 h para o melhor processamento das amostras através de técnicas histológicas. Para avaliação do escore histopatológico das lâminas, foi utilizado o método previamente descrito por Howarth et al. (1996), que atribui um valor de 0 (normal) a 3 (máximo comprometimento) para cada um dos seguintes parâmetros: a) atrofia das vilosidades; b) destruição das bordas em escova na superfície dos enterócitos; c) redução das criptas e perda da arquitetura intestinal; d) infiltrado inflamatório de leucócitos e e) edema e consequente hiperplasia da submucosa e muscular.

Posteriormente, para cada lâmina, 20 campos histológicos foram capturados com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41; objetiva 40X) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5). As imagens foram analisadas por intermédio do software *ImageJ* (versão 1.51J8) para medição da altura das vilosidades e profundidade das criptas.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos neste trabalho foram avaliados quanto à normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram validados pelo teste ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey. Teste t foi conduzido para analisar médias de dois grupos amostrais. Todos os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0, sendo considerados valores estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS

As curvas de crescimento das linhagens estudadas, nas temperaturas de 30°C e 37°C, apresentam-se no apêndice I. Após 12 h de incubação, nenhuma temperatura de crescimento foi limitante para nenhuma linhagem, contudo, todas obtiveram maior crescimento a 37°C, sendo esta escolhida como padrão para prosseguimento dos experimentos. Os resultados correspondentes a UFC de cada linhagem após incubação *overnight* para serem utilizadas nos experimentos subsequentes estão retratados no apêndice II.

5.2 IDENTIFICAÇÃO

A tabela 8 a seguir representa a respectiva identificação de cada linhagem por MALDI-TOF e o escore atribuído a cada uma delas.

Tabela 8: Identificação por MALDI-TOF das linhagens de bactérias lácticas

	ID	Melhor identificação	Valor	2º melhor identificação	Valor
(+)	Lpa1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	1.997	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	1.783
(++)	Lpl2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.15
(++)	Lpl3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.221	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.165
(+++)	Lpl4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.316	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.316
(++)	Ed5	<i>Enterococcus durans</i>	2.081	Identificação não confiável	1.445
(++)	Efi6	<i>Enterococcus faecium</i>	2.174	<i>Enterococcus faecium</i>	2.134
(+)	Efc7	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.935	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.879
(++)	Pa8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.022	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.971

(+++)	Lpl9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.309	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.266
(++)	Efi10	<i>Enterococcus faecium</i>	2.221	<i>Enterococcus faecium</i>	2.062
(+++)	Lpl1 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.359	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.282
(+)	Lr12	<i>Lacticaseibacillus</i> <i>rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>)	1.797	<i>Lacticaseibacillus</i> <i>rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>)	1.771
(++)	Pa13	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.014	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.935
(+++)	Lpl1 4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.28
(+++)	Efc1 5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.349	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.235
(++)	Lpa1 6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	2.069	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	1.847
(++)	Lpl1 7	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.176	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.138
(++)	Lpl1 8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.203	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.139
(++)	Lpl1 9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.278	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.224
(++)	Lpl2 0	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.294	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2.263
(-)	Lc21	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1.662	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1.558

(+++): identificação mais provável de espécie em cinza escuro; (++) : identificação segura do gênero e provavelmente da espécie em cinza claro; (+): identificação de gênero; (-): identificação não confiável em branco. Em função da nova classificação do gênero *Lactobacillus*, as espécies antigas identificadas pelo MALDI-TOF encontram-se em parênteses, antecedidas pelas novas espécies *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Das 21 linhagens analisadas, dezoito (85,7%) obtiveram uma provável identificação de espécie (destacado em cinza escuro na tabela), enquanto três (14,2%) obtiveram identificação de gênero e provavelmente da espécie (destacado

em cinza claro) e apenas uma (4,7%) não obteve identificação confiável (em branco). Todas as linhagens identificadas se enquadram no grupo das BLs.

5.3 ANTIBIOGRAMA

Os resultados referentes ao antibiograma para oito antibióticos diferentes estão retratados na tabela 9, a seguir:

Tabela 9: Análise do perfil de resistência à antibióticos das linhagens estudadas a partir do tamanho do halo de inibição (mm).

Linhagem	CLI	ERI	CLO	AMP	TET	GEN	EST	VAN
<i>L. paracasei</i> Lpa1	24	18	19	14	15	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl2	13	17	19	21	12	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl3	18	19	25	17	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl4	10	19	20	23	14	0	0	0
<i>E. durans</i> Ed5	20	17	20	21	14	0	0	0
<i>E. faecium</i> Efi6	25	18	21	26	14	0	0	0
<i>E. faecalis</i> Efc7	16	18	23	21	12	0	6	0
<i>P. acidilactici</i> Pa8	28	21	22	25	11	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lp9	26	17	20	21	11	0	7	0
<i>E. faecium</i> Efi10	26	19	27	26	11	12	0	0
<i>L. plantarum</i> Lp11	26	18	21	24	11	0	0	0
<i>L. rhamnosus</i> Lr12	11	20	19	20	12	0	0	0
<i>P. acidilactici</i> Pa13	23	21	23	21	12	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl14	17	18	25	16	14	0	0	0
<i>E. faecalis</i> Efc15	28	25	26	24	21	10	0	0
<i>L. paracasei</i> Lpa16	26	16	20	26	12	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl17	22	20	16	24	10	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl18	11	18	22	20	11	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl19	25	14	23	29	10	0	0	0
<i>L. plantarum</i> Lpl20	17	18	17	25	12	0	0	0

<i>L. crispatus</i> Lc21	19	17	22	17	0	0	0	0
--------------------------	----	----	----	----	---	---	---	---

Em cinza, as linhagens que de acordo com o tamanho do halo formado foram susceptíveis a concentração dada de determinado antibiótico; em branco, resistentes. CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; CLO: cloranfenicol; AMP: ampicilina; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; EST; estreptomicina; VAN: vancomicina

Das linhagens analisadas, todas foram resistentes à gentamicina, estreptomicina e vancomicina, enquanto a maioria também foi resistente a tetraciclina, exceto *L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4, *E. durans* Ld5, *E. faecium* Lfi6, *L. plantarum* Lpl14 e *E. faecalis* Efc15, que foram susceptíveis. Todas foram susceptíveis à clindamicina, eritromicina, ampicilina e cloranfenicol.

5.4 DEGRADAÇÃO DA MUCINA

O teste para avaliar degradação da mucina revelou que, além do controle positivo, apenas a linhagem *P. acidilactici* Pa13 apresentou potencial de degradar a mucina, como observado na Figura 9 a seguir:

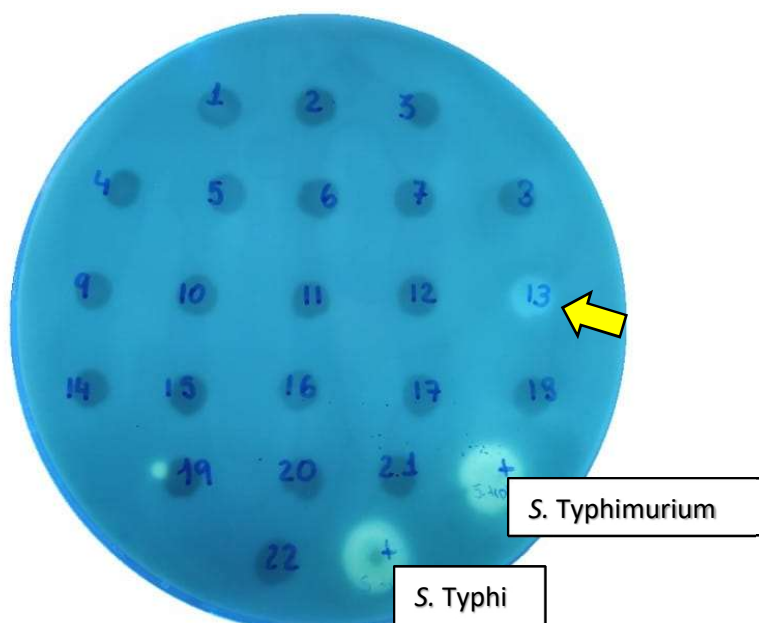


Figura 9: Avaliação da degradação da mucina por parte das linhagens testadas. As caixas brancas indicam as linhagens utilizadas como controle positivo e a seta amarela indica a única linhagem que apresentou degradação da mucina. Os números correspondem respectivamente às linhagens: *L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl2, *L. plantarum* Lpl3, *L. plantarum* Lpl4, *E. durans* Ed5, *E. faecium* Lfi6, *E. faecalis* Efc7, *P. acidilactici* Pa8, *L. plantarum* Lp9, *E. faecium* Efi10, *L. plantarum* Lp11, *L. rhamnosus* Lr12, *P. acidilactici* Pa13, *L. plantarum*

Lpl14, *E. faecalis* *Efc15*, *L. paracasei* *Lpa16*, *L. plantarum* *Lpl17*, *L. plantarum* *Lpl18*, *L. plantarum* *Lpl19*, *L. plantarum* *Lpl20* e *L. crispatus* *Lc21*.

5.5 POTENCIAL HEMOLÍTICO

O teste para avaliar o potencial hemolítico das linhagens revelou que *L. paracasei* *Lpa1*, *P. acidilactici* *Pa8*, *L. rhamnosus* *Lr12*, *P. acidilactici* *Pa13*, *E. faecalis* *Efc15* e *L. crispatus* *Lc21* apresentaram γ -hemólise, enquanto as demais apresentaram α -hemólise, sendo constatada β -hemólise apenas nos controles positivos de *S. aureus*, como esperado (Figura 10).

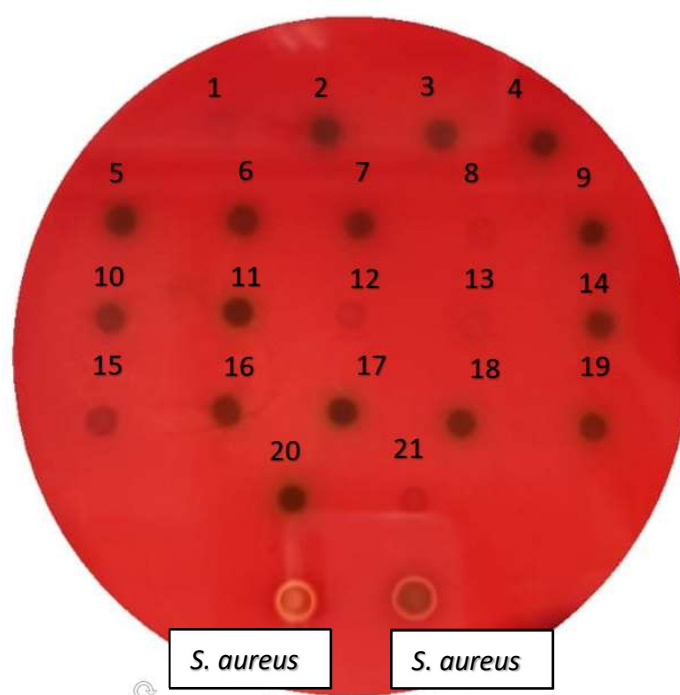


Figura 10: Análise do potencial hemolítico das linhagens testadas. As caixas brancas indicam as linhagens utilizadas como controle positivo. Os números correspondem respectivamente às linhagens: *L. paracasei* *Lpa1*, *L. plantarum* *Lpl2*, *L. plantarum* *Lpl3*, *L. plantarum* *Lpl4*, *E. durans* *Ed5*, *E. faecium* *Lfi6*, *E. faecalis* *Efc7*, *P. acidilactici* *Pa8*, *L. plantarum* *Lp9*, *E. faecium* *Efi10*, *L. plantarum* *Lp11*, *L. rhamnosus* *Lr12*, *P. acidilactici* *Pa13*, *L. plantarum* *Lpl14*, *E. faecalis* *Efc15*, *L. paracasei* *Lpa16*, *L. plantarum* *Lpl17*, *L. plantarum* *Lpl18*, *L. plantarum* *Lpl19*, *L. plantarum* *Lpl20* e *L. crispatus* *Lc21*.

5.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO SUCO GÁSTRICO

Uma cinética de crescimento bacteriano expressiu os resultados referentes à resistência ao suco gástrico das linhagens estudadas. Os dados da cinética foram plotados em gráficos (vide apêndice III) e a porcentagem de redução de crescimento

pelo baixo pH (2,5) em relação as amostras controle (linhagens incubadas em pH 7), foi calculada de acordo com o descrito no tópico 4.4.1 (tabela 10).

Tabela 10: Porcentagem de redução do crescimento das linhagens bacterianas na presença de suco gástrico artificial.

Linhagem	Inibição (%)	Linhagem	Inibição (%)
<i>L. paracasei</i> Lpa1	15,62	<i>L. plantarum</i> Lp11	8,01
<i>L. plantarum</i> Lpl2	14,76	<i>L. rhamnosus</i> Lr12	11,06
<i>L. plantarum</i> Lpl3	13,48	<i>P. acidilactici</i> Pa13	13,97
<i>L. plantarum</i> Lpl4	10,05	<i>L. plantarum</i> Lpl14	22,58
<i>E. durans</i> Ed5	9,90	<i>E. faecalis</i> Efa15	14,03
<i>E. faecium</i> Efi6	10,36	<i>L. paracasei</i> Lpa16	9,05
<i>E. faecalis</i> Efc7	8,54	<i>L. plantarum</i> Lpl17	10,89
<i>P. acidilactici</i> Pa8	4,55	<i>L. plantarum</i> Lpl18	7,19
<i>L. plantarum</i> Lp9	11,14	<i>L. plantarum</i> Lpl19	13,29
<i>E. faecium</i> Efi10	13,03	<i>L. plantarum</i> Lpl20	9,29
		<i>L. plantarum</i> Lp21	5,90

Todas as linhagens apresentaram percentuais de inibição baixos quando comparado ao crescimento padrão dos microrganismos. *P. acidilactici* Pa8 (4,55%), e *L. crispatus* Lc21 (5,90%) foram as linhagens que apresentaram menor percentagem de inibição ao estresse ácido. *L. plantarum* Lpl14 apresentou o maior percentual de inibição (22,58%), enquanto as demais linhagens obtiveram percentuais entre 7,19% a 15,62%.

5.7 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

Os resultados referentes à redução do crescimento das três concentrações testadas de sais biliares (oxgall 0,3% 0,7% e 1,0%) foram expressos em gráficos representando as cinéticas de crescimento obtidas para cada concentração (vide apêndice IV). A porcentagem de inibição para cada uma delas está representada na tabela 11.

Tabela 11: Porcentagem de inibição das linhagens bacterianas na presença de sais biliares

Linhagem	[] sais biliares			Linhagem	[] sais biliares		
	0,3%	0,7%	1,0%		0,3%	0,7%	1,0%
<i>L. paracasei</i> Lpa1	22,29	51,51	58,03	<i>L. plantarum</i> Lp11	-15,7	-10,1	14,40
<i>L. plantarum</i> Lpl2	17,22	30,22	34,98	<i>L. rhamnosus</i> Lr12	-6,19	-2,54	18,47
<i>L. plantarum</i> Lpl3	1,57	21,64	27,07	<i>P. acidilactici</i> Pa13	26,53	33,28	49,47
<i>L. plantarum</i> Lpl4	-3,02	41,23	45,03	<i>L. plantarum</i> Lpl14	11,30	15,71	20,44
<i>E. durans</i> Ed5	-3,53	1,706	19,70	<i>E. faecalis</i> Efc15	22,26	31,83	38,88
<i>E. faecium</i> Lfi6	-0,58	18,31	27,34	<i>L. paracasei</i> Lpa16	11,00	11,64	8,50
<i>E. faecalis</i> Efca7	6,44	21,04	28,88	<i>L. plantarum</i> Lpl17	6,10	18,10	24,99
<i>P. acidilactici</i> Pa8	17,89	46,69	52,76	<i>L. plantarum</i> Lpl18	9,71	8,81	3,40
<i>L. plantarum</i> Lp9	1,08	3,48	7,31	<i>L. plantarum</i> Lpl19	13,91	20,79	23,14
<i>E. faecium</i> Efi10	0,06	10,85	23,55	<i>L. plantarum</i> Lpl20	11,16	19,24	17,19
				<i>L. crispatus</i> Lc21	2,17	31,73	45,48

Todos os isolados obtiveram altos níveis de resistência aos sais biliares na concentração de 0,3% (inibição $\leq 40\%$). No entanto, inibições mais significativas foram verificadas quando concentrações maiores foram analisadas. Três isolados (*L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4 e *P. acidilactici* Pa8) apresentaram inibição moderada (entre 40 e 75%) em concentrações de 0,7% de oxgall. Sob concentrações de 1% de oxgall, cinco linhagens (*L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4, *P. acidilactici* Pa8, *P. acidilactici* Pa13 e *L. crispatus* Lc11) apresentaram inibição moderada e nenhuma foi classificada como altamente sensível aos sais biliares (inibição $\geq 75\%$).

5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O método de difusão em ágar para avaliar a atividade antagonista das linhagens estudadas (vide apêndice V) revelou vários tamanhos de halos, medidos em milímetros (mm) (tabela 12).

Tabela 12: Tamanho do halo de inibição em milímetros (mm)

Linhagem	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>S.Typhi-</i> <i>murium</i>	<i>S. sonei</i>	<i>L.mono-</i> <i>citogenes</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. paracasei</i> Lpa1	27	30	25	23	29	28
<i>L. plantarum</i> Lpl2	28	26	27	19	31	21
<i>L. plantarum</i> Lpl3	24	24	24	18	28	24
<i>L. plantarum</i> Lpl4	25	22	26	17	25	30
<i>E. durans</i> Ld5	29	30	24	27	35	28
<i>E. faecium</i> Lfi6	26	35	22	18	23	29
<i>E. faecalis</i> Efca7	30	27	30	12	37	24
<i>P. acidilactici</i> Pa8	22	33	28	13	25	17
<i>L. plantarum</i> Lp9	24	25	21	28	32	30
<i>E. faecium</i> Efi10	25	31	23	24	18	16
<i>L. plantarum</i> Lp11	25	26	22	26	23	24
<i>L. rhamnosus</i> Lr12	24	29	30	21	26	28
<i>P. acidilactici</i> Pa13	32	32	24	28	25	19
<i>L. plantarum</i> Lpl14	25	25	22	24	32	29
<i>E. faecalis</i> Efc15	30	30	26	28	26	20
<i>L. paracasei</i> Lpa16	24	26	24	27	34	32
<i>L. plantarum</i> Lpl17	28	23	24	25	27	22
<i>L. plantarum</i> Lpl18	25	28	24	18	35	30
<i>L. plantarum</i> Lpl19	25	28	24	13	32	27
<i>L. plantarum</i> Lpl20	30	24	25	27	36	20
<i>L. crispatus</i> Lc21	25	23	23	24	35	24

Todas as linhagens se mostraram eficazes em relação ao efeito inibitório de bactérias patogênicas, sendo o menor halo de inibição medindo 12mm e o maior, 37mm.

5.9 ADESÃO ÀS CÉLULAS EUCARIÓTICAS CACO-2

O percentual de adesão das linhagens estudadas está retratado no na figura 11:

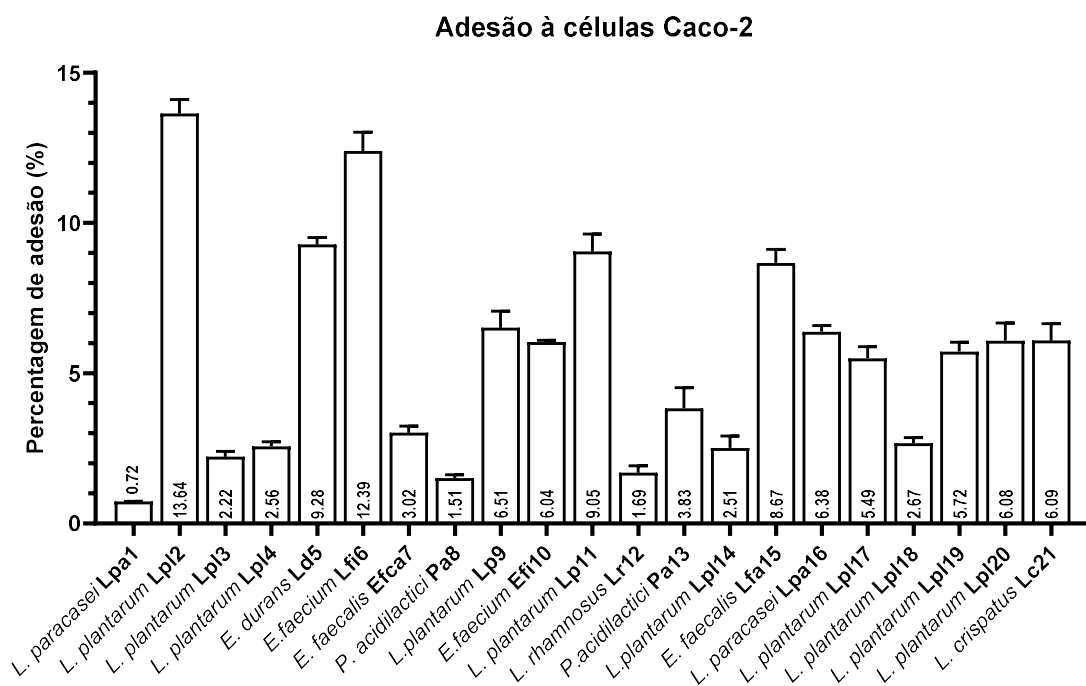


Figura11: percentual de adesão das linhagens testadas em células Caco-2

O percentual de adesão variou de 0,72-13,64%. As linhagens que apresentaram os maiores índices de adesão, acima de 5% foram respectivamente: *L. plantarum* Lpl2 (13,64%), *E. durans* Ld5 (9,28%), *E. faecium* Lfi6 (12,39%), *L. plantarum* Lp9 (6,51%), *E. faecium* Efi10 (6,04%), *L. plantarum* Lp11 (9,05%), *E. faecalis* Efc15 (8,67%), *L. paracasei* Lpa16 (6,38%), *L. plantarum* Lpl17 (5,49%), *L. plantarum* Lpl19 (5,72%), *L. plantarum* Lpl20 (6,08%) e *L. crispatus* Lc21 (6,09%).

5.10 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO EM CÉLULAS CACO-2

Os gráficos referentes à expressão de TLR-2, TNF, IL6 e IL10 estão representados na figura 12 a seguir:

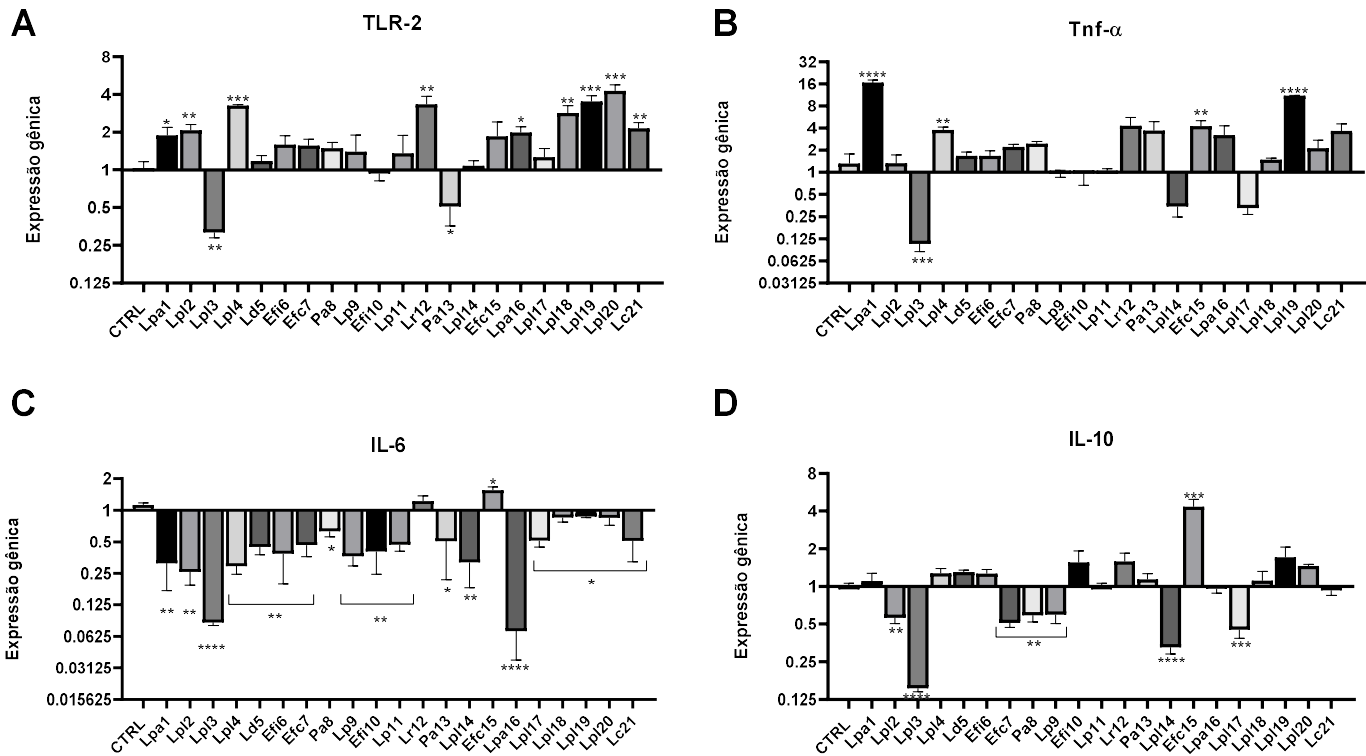


Figura 12: Análise da expressão gênica de TLR-2 (A), TNF (B), IL6 (D) e IL10 (E). Análise estatística realizada por meio de teste T não pareado. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$ *** indica $P < 0,001$ e **** indica $P < 0,0001$. As identificações no eixo x do gráfico correspondem respectivamente às linhagens: *L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl2, *L. plantarum* Lpl3, *L. plantarum* Lpl4, *E. durans* Ed5, *E. faecium* Lfi6, *E. faecalis* Efc7, *P. acidilactici* Pa8, *L. plantarum* Lp9, *E. faecium* Efi10, *L. plantarum* Lp11, *L. rhamnosus* Lr12, *P. acidilactici* Pa13, *L. plantarum* Lpl14, *E. faecalis* Efc15, *L. paracasei* Lpa16, *L. plantarum* Lpl17, *L. plantarum* Lpl18, *L. plantarum* Lpl19, *L. plantarum* Lpl20 e *L. crispatus* Lc21.

Foi possível observar que oito linhagens induziram aumento na expressão de TLR-2, sendo estas *L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl2, *L. plantarum* Lpl4, *L. rhamnosus* Lr12, *L. paracasei* Lpa16, *L. plantarum* Lpl18, *L. plantarum* Lpl19, *L. plantarum* Lpl20 e *L. crispatus* Lc21. Duas (*L. plantarum* Lpl3 e *P. acidilactici* Pa13) reduziram a expressão do mesmo. Quatro linhagens aumentaram a expressão de Tnf, sendo elas *L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4, *E. faecalis* Lfc15, *L. plantarum* Lpl19, enquanto *L. plantarum* Lpl3 reduziu a expressão desta citocina. Quanto à IL6, foi possível observar aumento significativo da expressão apenas para *E. faecalis* Efc15 e redução para todas as demais, com exceção de *L. rhamnosus* Lr12, que não apresentou diferença significativa para o controle. Por fim, apenas uma linhagem (*E. faecalis* Efc15) apresentou aumento na expressão de IL10, enquanto seis outras

apresentaram redução (*L. plantarum* Lpl2, *L. plantarum* Lpl3, *E. faecalis* Efc7, *P. acidilactici* Pa8, *L. plantarum* Lp9, *L. plantarum* Lpl14 *L. plantarum* Lpl17. A tabela 13 abaixo sumariza os resultados de maneira mais visual:

Tabela 13: Sumarização dos resultados obtidos através de RT-PCR referente à expressão gênica de TLR-2, TNF, IL6 e IL10.

Linhagem	TNF	TLR-2	IL6	IL10
<i>L. paracasei</i> Lpa1	**** +	* +	** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lpl2	Ns	** +	** -	** -
<i>L. plantarum</i> Lpl3	* -	** -	**** -	**** -
<i>L. plantarum</i> Lpl4	** +	*** +	** -	Ns
<i>E. durans</i> Ed5	Ns	Ns	** -	Ns
<i>E. faecium</i> Lfi6	Ns	Ns	** -	Ns
<i>E. faecalis</i> Efc7	Ns	Ns	** -	*** -
<i>P. acidilactici</i> Pa8	Ns	Ns	* -	** -
<i>L. plantarum</i> Lp9	Ns	Ns	** -	*** -
<i>E. faecium</i> Efi10	Ns	Ns	** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lp11	Ns	Ns	** -	Ns
<i>L. rhamnosus</i> Lr12	Ns	** +	Ns	Ns
<i>P. acidilactici</i> Pa13	Ns	* -	**** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lpl14	Ns	Ns	** -	**** -
<i>E. faecalis</i> Efc15	** +	Ns	* +	*** +
<i>L. paracasei</i> Lpa16	Ns	** +	**** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lpl17	Ns	Ns	* -	**** -
<i>L. plantarum</i> Lpl18	Ns	** +	** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lpl19	**** +	*** +	** -	Ns
<i>L. plantarum</i> Lpl20	Ns	*** +	** -	Ns
<i>L. crispatus</i> Lc21	Ns	** +	● -	Ns

Análise estatística realizada por meio de teste T não pareado. * indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$ *** indica $P < 0,001$ e **** indica $P < 0,0001$. Em cinza escuro, aumento significativo da expressão gênica (+); em cinza claro, redução significativa na expressão gênica (-); em branco, não houve diferença significativa do controle (Ns).

5.11 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO DAS LINHAGENS EM MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

5.11.1 ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS E CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR

A análise clínica dos animais revelou que nenhum apresentou mudança no seu comportamento natural ou na aparência e fisionomia durante todo o período experimental. Quanto à variação de peso, foi possível observar uma considerável variação negativa no peso dos animais que receberam o tratamento com o fármaco 5-FU (MUC) em relação ao controle (CTRL), condição que não foi revertida com o tratamento com as quatro bactérias administradas (Figura 13). Os animais que receberam a bactéria sozinha por sua vez, não apresentaram variação de peso considerável quando comparados ao controle.

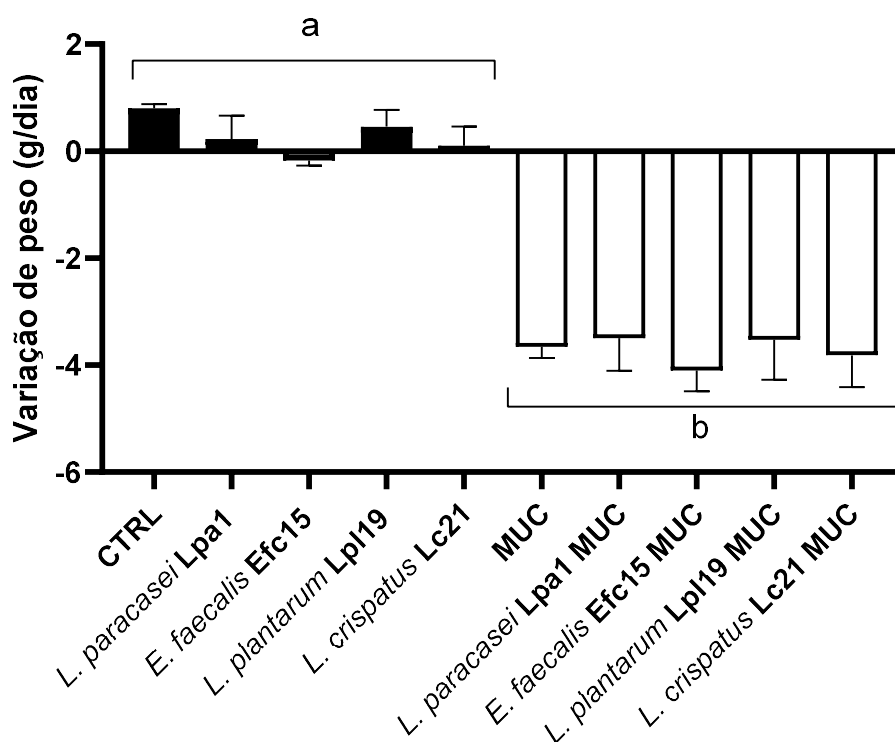


Figura 13: Variação do peso corporal durante o intervalo experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

A avaliação do consumo hídrico revelou que antes da mucosite, todos os grupos apresentaram taxas de consumo estatisticamente semelhantes (Figura 14, A). Entretanto, após a administração do 5-FU, apenas uma linhagem (*L. plantarum* Lpl19) foi capaz de reverter a redução no mesmo em relação ao grupo controle. Nenhum

grupo submetido ao tratamento com as linhagens separadas sem indução de mucosite apresentou redução estatística no consumo hídrico em relação ao grupo controle (Figura 14, B).

Quanto ao consumo alimentar, as análises revelaram que não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos antes da indução da mucosite, mas nenhuma bactéria conseguiu reverter a redução do consumo após indução da doença em relação ao controle (Figura 14, C e D).

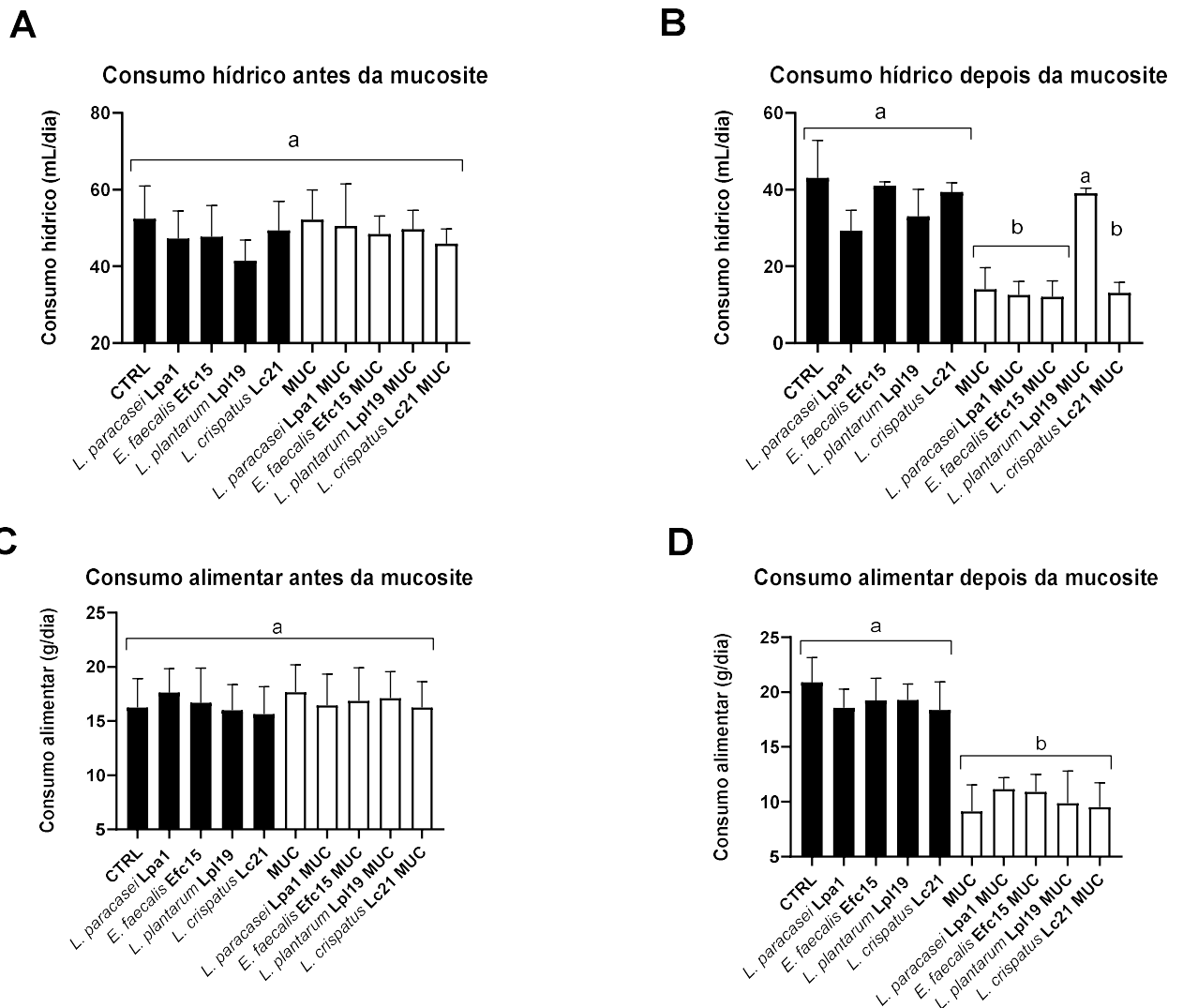


Figura 14: Avaliação do consumo hídrico e alimentar antes e depois da indução da mucosite (A-D). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

5.11.2 ANÁLISE DO COMPRIMENTO INTESTINAL E TAXA DE INFLAMAÇÃO

A avaliação do comprimento intestinal revelou que a administração das quatro linhagens não alterou significativamente a medida dele. Por sua vez, uma redução foi observada no grupo submetido a administração do 5-FU, condição a qual foi revertida pela administração das quatro linhagens nos grupos com mucosite, como mostrado na figura 15.

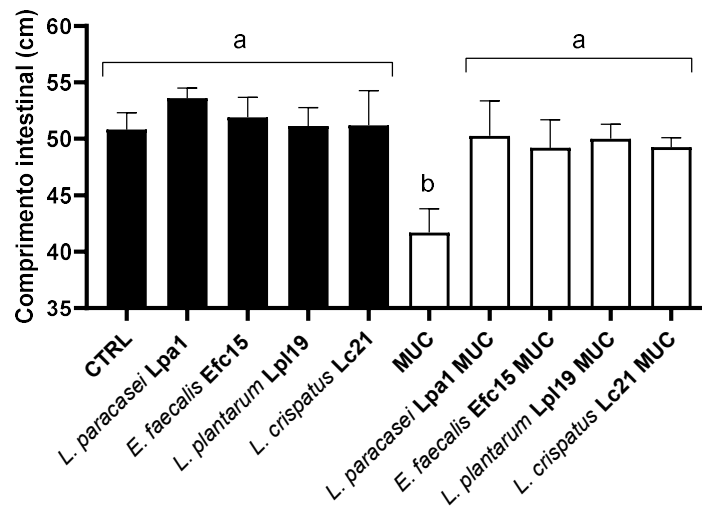


Figura 15: Avaliação do comprimento intestinal antes e após indução da mucosite. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

Adicionalmente, a análise do índice de inflamação visceral foi realizada e foi constatado que para os três órgãos avaliados (fígado, baço e intestino) não houveram diferenças significativas do controle quando as linhagens foram administradas separadamente. Contudo, após a indução da mucosite, nenhuma bactéria conseguiu reverter a redução do índice dos órgãos (Figura 16).

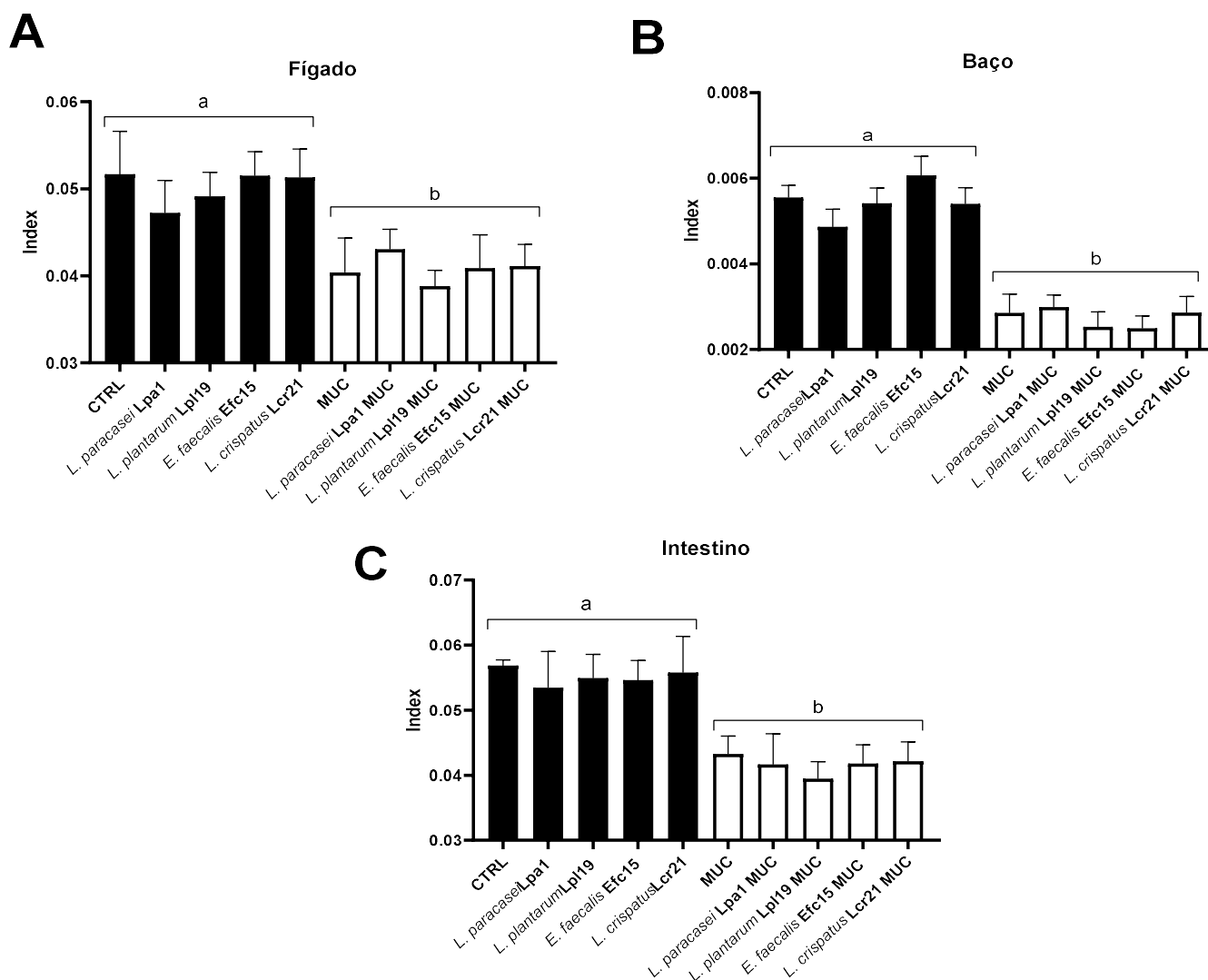


Figura 16: Índice visceral de inflamação do fígado (A), baço (B) e intestino (C) antes e após a indução da mucosite. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

5.10.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

A administração do fármaco 5-FU, provocou lesões notáveis no íleo dos animais (MUC), afetando diretamente a arquitetura da mucosa intestinal em relação

ao controle (CTRL). Foi possível observar no grupo afetado pela mucosite o encurtamento das vilosidades, infiltrado de células inflamatórias, comprometimento dos enterócitos na borda em escova e edema. As quatro linhagens administradas não alteraram de forma significativa a integridade epitelial, mantendo estável a arquitetura do intestino, assim como o grupo controle, como esperado. Por sua vez, o tratamento com as linhagens não atenuou o processo severo de mucosite induzida pelo 5-FU, sendo notável nos achados histopatológicos características semelhantes ao grupo MUC (Figura 17).

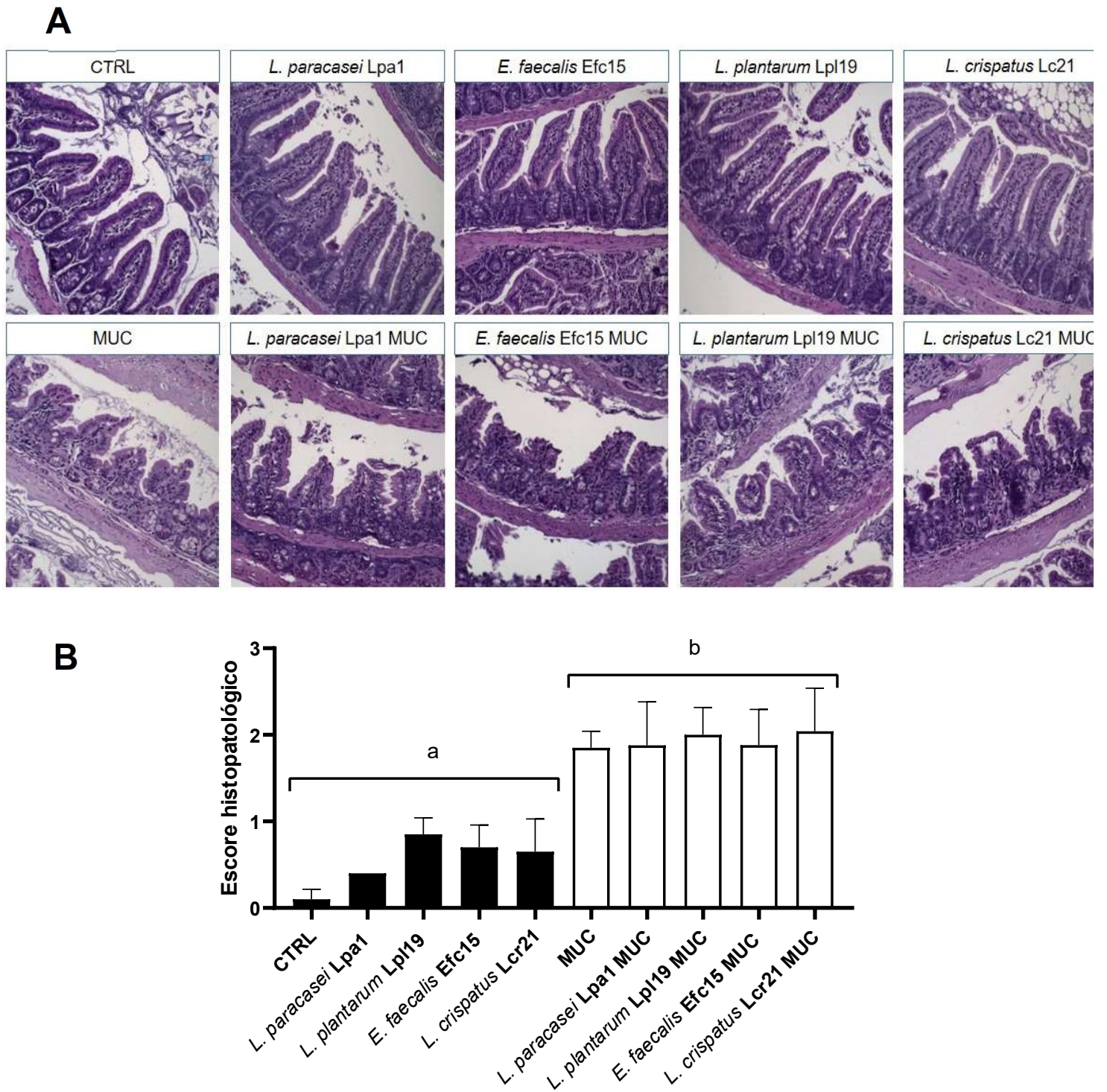


Figura 17: Análises histopatológicas do íleo dos animais dos diferentes grupos. (A) Achados histológicos dos grupos sem a indução da mucosite (linha superior) e com a indução através da administração de 5-FU (300mg/Kg). Aumento de 20X. (B) Escores histopatológicos atribuídos antes e após indução da mucosite. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

Corroborando com os achados histopatológicos, a medição das vilosidades comprovou que o tratamento com as linhagens após administração do 5-FU não

atenuou o processo de desestruturação da mucosa causado pela mucosite e refletido na redução das vilosidades. As linhagens administradas sem o tratamento com 5-FU não alteraram a medição destas em relação ao controle (CTRL). Quanto à medição das criptas, não houveram diferenças estatísticas significativas entre todos os grupos (Figura 18).

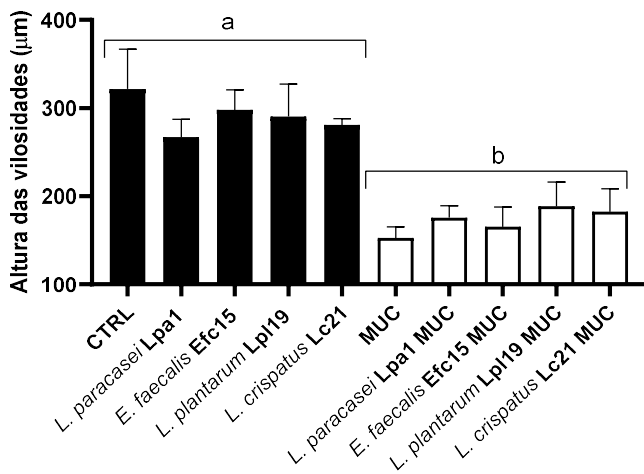
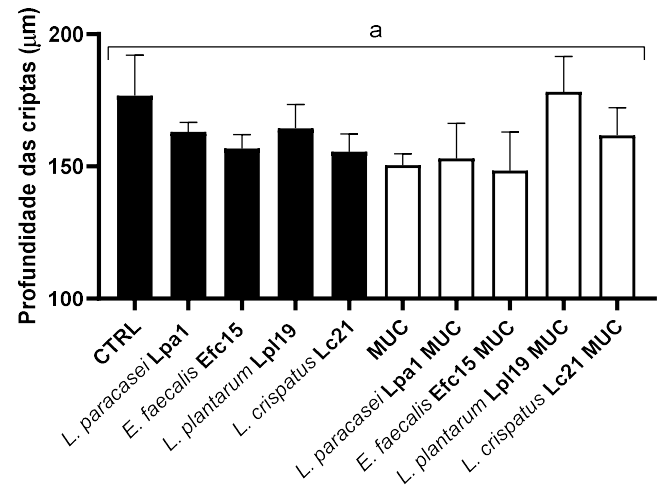
A**B**

Figura18: Análise morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Altura das vilosidades (A) e profundidade das criptas (B). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0.05$) por ANOVA, seguido pelo pós teste de comparações múltiplas de Tukey.

6. DISCUSSÃO

O conceito de probióticos envolve a alegação de efeitos benéficos à saúde para quem os utiliza (FAO/WHO, 2002; Hill et al, 2014). No Brasil, a aplicação dos mesmos para consumo humano requer avaliação da Anvisa, segundo a Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. O objetivo principal desta avaliação é garantir três requisitos fundamentais: a comprovação da identidade da linhagem do microrganismo, bem como sua segurança e seu efeito benéfico ao organismo alvo. Alguns especialistas alegam que a comprovação do benefício pode ser direcionada de forma abrangente a um gênero de microrganismos (Hill et al., 2014). Contudo, os requisitos abordados pela Anvisa e outras agências regulatórias internacionais, como FAO e EFSA, exigem a avaliação e demonstração do benefício para a linhagem específica (FAO/WHO, 2002; EFSA, 2012; Anvisa, 2019).

No intuito de caracterizar linhagens de bactérias que mais se adequam às características de um probiótico para futura aplicação terapêutica direcionada às doenças inflamatórias intestinais, no presente estudo foram inicialmente realizados testes de prospecção tomando como base diretrizes da Anvisa, EFSA, FAO e OMS. Devido ao fato de as linhagens utilizadas serem provenientes de ambientes heterogêneos, foi necessário avaliar uma temperatura de crescimento padrão para todo o conjunto delas. Todas obtiveram crescimento satisfatório a 37°C, temperatura que mais se assemelha a do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos e escolhida como padrão. Para a identificação das mesmas, foi utilizada a metodologia do MALTI-TOF, cuja limitação concerne a identificação apenas de microrganismos cultiváveis, o que restringe sua aplicação, visto que a grande maioria dos filos estimados atualmente não possuem representantes cultiváveis (Li et al., 2014). Contudo, em função da sua rápida e eficiente identificação, a aplicação do MALDI-TOF em laboratórios clínicos de microbiologia começou a ser regulamentada, com a aprovação do MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics Inc.) pelo FDA nos EUA para identificação de bactérias cultivadas a partir de amostras humanas. Na China, a aprovação foi em 2012 com o sistema bioMérieux VITEK MS para fins de diagnóstico in vitro (Luo et al., 2015) com posterior aprovação do Sistema Biotyper Bruker IVD MALDI para identificação de microrganismos isolados de amostras humanas (Singhal et al., 2015). Sendo a identificação assertiva do microrganismo uma parte fundamental no processo de prospecção para seleção de novos probióticos, além do MALDI-TOF,

análises filogenéticas completas também serão conduzidas com todas as 21 linhagens caracterizadas no presente trabalho e o sequenciamento das mesmas já se encontra em andamento. No geral, a princípio todas as amostras bacterianas analisadas se enquadraram como pertencente ao grupo das bactérias lácticas e prosseguiram nos testes de comprovação da segurança e eficácia.

O primeiro deles se refere a avaliação da resistência aos antibióticos, pois se por um lado a administração de probióticos vem sendo analisada como uma alternativa ao uso de antibióticos devido a sua capacidade de inibir bactérias patogênicas, o desenvolvimento da resistência entre estes microrganismos é uma grande preocupação na área da saúde nas últimas décadas (Hume et al., 2011; Smith et al., 2015). Algumas BLs de fato apresentam resistência a vários antibióticos, mas muitas vezes a natureza desta é intrínseca, sendo, portanto, codificada cromossomicamente, dificultando a transmissão para outras bactérias quando comparada com a presença de genes de resistência em elementos móveis do genoma (EFSA, 2012; Argyri et al., 2013). Cunha (2013) demonstrou que todas as linhagens estudadas de *Lactobacillus* spp. isoladas de leite fermentado eram altamente resistentes a vancomicina e sensíveis a eritromicina, clindamicina e tetraciclina, apresentando padrões diferentes de resistência à gentamicina e outros antimicrobianos (Cunha et al., 2013). Mandal et al. (2016) também observou que a maioria das linhagens de bactérias lácticas estudadas eram resistentes à kanamicina, gentamicina, vancomicina (Mandal et al., 2016). Esta resistência a gentamicina e vancomicina também observada nas linhagens aqui avaliadas pode ser codificada cromossomicamente, o que estudos genômicos poderão revelar com mais clareza (Argyri et al., 2013).

Adicionalmente, trabalhos na literatura indicaram que nutrientes presentes no meio MRS utilizado para cultivo de bactérias lácticas poderiam ter ação antagonista contra alguns antibióticos por meio de um mecanismo ainda não explicado (Mandal et al., 2016). Uma vez que o meio Mueller-Hinton que é mais indicado para o antibiograma não é recomendado para o crescimento de bactérias lácticas, o crescimento delas pode ser afetado não somente pelo antibiótico, mas pelos nutrientes fornecidos pelo meio em si. Segundo os resultados obtidos por Masafumi Noda e colaboradores (2019), quando antibióticos como estreptomicina, kanamicina e gentamicina são testados para avaliação da resistência à antibióticos por parte de bactérias lácticas, as concentrações de inibição aos antibióticos é maior quando usado

o meio MRS em relação ao Mueller–Hinton (Noda et al., 2019). Dessa forma, os testes in vitro de inibição aos antimicrobianos envolvendo bactérias lácticas podem ser bem controversos, uma vez que vem sendo estudado que o resultado pode ser afetado pela composição do meio de cultura. Em linhas gerais, adicionalmente aos testes in vitro, são necessárias análises genômicas para avaliação da presença de genes de resistência à antibióticos e sua natureza para uma análise mais segura e precisa, como ressalta o EFSA e a Anvisa (EFSA, 2012; Anvisa, 2019).

Ainda no quesito segurança, a avaliação da degradação da mucina e potencial hemolítico por parte das linhagens é fundamental no processo (Anvisa, 2019). Em relação ao primeiro, a mucosa intestinal é revestida por uma barreira de muco composta principalmente por uma glicoproteína de alto peso molecular ($\sim 10^3$ kDa), que é a mucina (Bansil et al., 2006). Esta camada forma uma barreira que ajuda na proteção das células epiteliais do intestino contra o pH ácido do duodeno e da bile (Allen et al., 1984), bem como contra a invasão por microrganismos potencialmente patogênicos (Cohen et al., 1995). Normalmente, bactérias da microbiota comensal podem penetrar essa barreira para aderir e colonizar o trato gastrointestinal, não proporcionando danos ao hospedeiro (Zhou et al., 2001). Contudo, mudanças graves na estrutura da barreira de muco pode afetar a função de proteção da mesma, aumentando o número de bactérias que podem ocasionalmente aderir à superfície entérica e, conseqüentemente, aumentar também as chances de translocação bacteriana (inclusive de bactérias patogênicas) para a corrente sanguínea (Ruseler-van Embeden et al., 1989).

No presente trabalho, das 21 linhagens analisadas, uma delas (*P. acidilactici* Pa13) apresentou moderado potencial de degradar mucina, ainda que muito menor do que o apresentado pelas linhagens utilizadas como controle positivo. Um estudo conduzido por Ruas-Madiedo (2008) demonstrou que mesmo algumas linhagens de *Bifidobacterium* que são comensais do trato gastrointestinal humano capazes de promover efeitos benéficos e utilizadas há décadas na indústria alimentícia, apresentaram potencial de degradar mucina in vitro, mostrando que provavelmente tal capacidade pode não ser indicadora de riscos em alguns casos. Além do mais, *Akkermansia muciniphila*, uma nova linhagem antes não cultivável que é capaz de degradar mucina foi isolada de fezes humanas e estudos indicaram que a prevalência da mesma no trato gastrointestinal é de mais de 1%, sendo um componente comum da microbiota (Derrien et al., 2008; Cani et al., 2017). Esta espécie não somente é

comensal do trato gastrointestinal como também tem sido estudada como um potencial candidato probiótico por competir contra patógenos também degradadores de mucina por sítios e nutrientes e por atuar em processos metabólicos e imunológicos no organismo, estando relacionada a melhora de doenças tais como obesidade, câncer de cólon e colite (Zhang et al., 2019). Por outro lado, muitos estudos envolvendo seleção de microrganismos probióticos demonstram a ausência de degradação da mucina por bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Pediococcus* (Zhou et al., 2001; Monteagudo-Mara et al., 2012; Muñoz-Atienza et al., 2013). Dois genes principais estão relacionados com essa capacidade, sendo eles o ngBF (endo- α -N-acetilgalactosaminidase) e afcA (1,2- α -L-fucosidase) e análises genômicas podem fornecer resultados ainda mais esclarecedores quanto a capacidade de degradar mucina por estas linhagens e a segurança relacionada a isso (Ruas-Madiedo et al. 2008).

Em relação ao potencial hemolítico, linhagens com atividade β -hemolítica produzem estreptolisina, uma exotoxina que causa a lise completa das hemácias, enquanto a α -hemólise é causada pela oxidação da hemoglobina por peróxido de hidrogênio produzido por algumas bactérias (Jeong et al., 2015). É reportado em alguns estudos de prospecção de probióticos na literatura, a capacidade α -hemolítica de algumas linhagens de BLs, sendo essa capacidade não considerada como um risco potencial ao consumo humano (Adimpong et al., 2012, Ruiz-Moyano et al., 2009). No presente trabalho, nenhuma linhagem apresentou atividade β -hemolítica, indicando ausência de hemólise total e sendo um caráter positivo para sua confiabilidade para uso.

Uma vez que avaliada a segurança no consumo das linhagens analisadas neste trabalho, deu-se continuidade à prospecção através da avaliação da funcionalidade e eficácia. O primeiro teste neste quesito foi referente à resistência ao pH ácido resultante da produção de ácido clorídrico no estômago, que é uma das primeiras barreiras fisiológicas que as bactérias enfrentam ao entrar no organismo pela via oral (Morelli et al., 2000, ANVISA 2019). Estudos *in vitro* de tolerância ao baixo pH têm sido utilizados com êxito como forma de pré-selecionar bactérias com potencial de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro (Anvisa et al., 2019).

Haghshenas e colaboradores (2017) avaliaram a resistência de 19 linhagens de BLs depois de 3 horas de incubação ao pH 2,5 e verificaram que todas se mantiveram viáveis após esse tempo. Linhagens de *Lactobacillus* sobreviveram cerca

de 71 a 76% e *Enterococcus* de 51% a 82% (Haghshenas et al., 2017). Outros estudos também demonstraram que linhagens deste grupo são geralmente tolerantes às condições ácidas, uma vez que já foi relatado resistência acima de 70% por *L. acidophilus* (Oliveira et al., 2007), 84.70% por *L. rhamnosus* (Goderska et al., 2003) e 64,1% por *B. lactis* (Heidebach et al., 2009).

Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que todas as 21 linhagens resistiram bem à exposição ao pH ácido do suco gástrico artificial ofertado, com a maioria apresentando resistência entre 84,3% a 92,8% e a menor delas 77,42% (*L. plantarum* Lpl12). Tal resistência observada pode estar relacionada com mecanismos de proteção desenvolvidos pelas bactérias lácticas pra enfrentar o influxo de ácido láctico para dentro da célula, que pode ocasionalmente ocorrer após a conversão da glicose, reduzindo o pH citoplasmático e podendo levar à lise celular (Koponen et al. 2012; Wang et al., 2018). Esta alta resistência avaliada nas linhagens estudadas se mostra extremamente vantajosa para a viabilidade das mesmas no trato gastrointestinal e em possíveis alimentos funcionais que podem servir como veículos de entrega destas bactérias (Lee et al., 1995). Atualmente, técnicas de microencapsulamento de probióticos têm sido aplicadas com êxito para transpor o obstáculo da redução da viabilidade em baixo pH em produtos comerciais (Anal et al., 2007; Karthikeyan, et al., 2013). Dessa forma, associar uma linhagem com boa capacidade intrínseca de resistência ao estresse ácido com técnicas complementares de proteção, pode colaborar ainda mais para a promoção de um maior efeito protetor da mesma.

Além da resistência ao pH ácido, a resistência aos sais biliares por parte das bactérias administradas oralmente é um outro critério de eficácia requisitado pela Anvisa, dado que a tolerância a este composto determina a maior viabilidade das mesmas (Lebeer et al., 2008, ANVISA 2008). Segundo Begley e colaboradores (2005), os efeitos da bile sobre bactérias probióticas são linhagem específicos, uma vez que diferenças dentro do mesmo gênero podem ser observadas e, portanto, este critério não deve ser generalizado, sendo necessária a análise de linhagens individuais, como foi feito neste trabalho (Begley et al., 2005).

De acordo com Stropfová e colaboradores (2006), a concentração aproximada de sais biliares encontrada no TGI humano é de 0,3% e, por isso, uma linhagem deve resistir à pelo menos esta concentração para exercer seus efeitos (Stropfová et al., 2006). Jacobsen e colaboradores (1999) compararam a resistência

de 47 linhagens de *Lactobacillus*, incluindo *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. casei* e *L. johnsonii* e observaram que a maioria delas apresentaram resistência relativamente alta aos sais biliares, com apenas uma linhagem sensível a incubação por 4h em 0,3% de oxgall. Contudo, no período que se estendeu após as 4h de incubação, apenas 16 linhagens do total apresentaram crescimento (Jacobsen et al., 1999). No presente trabalho, das 14 linhagens de *Lactobacillus* estudadas, todas foram tolerantes à concentração de 0,3%, atingindo crescimento próximo ou superior a 1,0 (DO_{600nm}) após 12 horas de incubação, sendo que destas, 11 não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação à curva controle (apenas com MRS). Em relação aos gêneros *Enterococcus* e *Pediococcus* também estudados, ambos foram tolerantes à concentrações de 0,3% de oxgall, corroborando com dados na literatura referentes à resistência aos sais biliares por linhagens de *Enterococcus* (Nueno-Palop et al., 2011; Pieniz et al., 2014) e *Pediococcus* (Lee et al. 2014; Gupta e Sharma, 2017) nessa concentração.

Contudo, Small e colaboradores (1972) relatam uma variação na concentração destes sais de 0,2-0,8% no intestino, levando em consideração que esta não é absoluta e tende a variar de pessoa para pessoa dependendo do consumo alimentar (Small et al., 1972). Assim, para uma análise mais refinada e próxima da realidade, foram utilizadas nesse trabalho, concentrações superiores de sais biliares (0,7 e 1,0%) para simular possíveis variações. Vinderola e colaboradores (2003) também analisaram concentrações de sais biliares superiores a 0,3% e observaram que linhagens de *L. acidophilus* conseguiram resistir bem a 1% de bile, com algumas apresentando inibição menor que 20%. Linhagens de *L. casei* e *L. rhamnosus*, também apresentaram boa resistência, com inibição chegando a 36% e 27% respectivamente (Vinderolla et al., 2003). No presente trabalho, na concentração de 1,0%, cinco apresentaram moderada resistência (*L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4, *P. acidilactici* Pa8, *P. acidilactici* Pa13 e *L. crispatus* Lc21), e as demais, alta resistência à bile. Em linhas gerais, mesmo em concentrações mais elevadas, as linhagens cumpriram com o requisito de resistência aos sais biliares. Segundo Sahadeva e colaboradores (2011), linhagens probióticas de fato tendem a apresentar excelente resistência à bile, podendo ser consequência da atividade da enzima hidrolase de sais biliares (BSH), presente em algumas delas (Shadeva et al., 2011).

Assim como a resistência aos sais biliares e ao pH baixo são características esperadas em uma linhagem probiótica, a atividade antimicrobiana da mesma também é um quesito desejável ao se fazer uma seleção (Anvisa, 2008). Estudos conduzidos previamente demonstram que linhagens de bactérias lácticas normalmente apresentam amplo espectro de inibição, como por exemplo contra infecção causada *S. sonnei* (Zhang et al., 2012), *L. monocitogenes* (Dos Santos et al., 2011) e *E. faecalis* patogênica (Velraeds et al. 1996). A capacidade de inibição de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii* e *Salmonella* Typhi por *Lactobacillus* também foram obtidos por Debashis Halder e colaboradores (2017), corroborando com os resultados aqui apresentados, uma vez que as linhagens deste gênero foram capazes de inibir fortemente ao menos cinco dos seis patógenos testados (Halder et al., 2017). Desta forma, o teste de inibição do crescimento de bactérias patogênicas na presença de possíveis candidatos probióticos realizado neste trabalho, nos fornece importantes resultados, dado que a maioria das linhagens testadas se mostrou extremamente eficaz em relação ao efeito inibitório de bactérias patogênicas, podendo ser devido à produção de H₂O₂, ácido láctico, bacteriocinas, antimicrobianos de amplo espectro como a reuterina ou uma combinação destes compostos e outros (Martins et al., 2010, Cazorla et al., 2018), propiciando sua aplicação seja na conservação de alimentos ou na medicina, como alternativa à antibióticos ou prevenção de infecções oportunistas (Fuller et al., 1995; Nami et al., 2005).

Seguindo as recomendações da Anvisa, ensaios de adesão a células epiteliais também foram realizados (Anvisa, 2008). De forma geral, é altamente desafiador generalizar um padrão de adesão bacteriana *in vitro*, uma vez que o ambiente *in vivo* do trato gastrointestinal apresenta maior dinâmica referente a competição com a microbiota, relação com o sistema imune, peristalse e outros fatores que podem modificar a adesão (Lebeer et al. 2008). Entretanto, os resultados aqui apresentados têm como objetivo fornecer indícios primários relativos às diferentes propriedades das linhagens estudadas. Sharma e colaboradores (2017) reportaram valores de adesão a células Caco-2 variando entre 2,45 a 9,55% ao estudar bactérias lácticas isoladas de alimentos fermentados (Sharma et al., 2017). Garcia-Ruiz e colaboradores (2014) também analisaram linhagens de bactérias isoladas de vinho e obtiveram níveis de adesão a células Caco-2 variando de 0,37% a 12,2% (Garcia-Ruiz et al., 2014). Ambos os estudos corroboram os resultados aqui obtidos, visto que a variação entre as taxas de adesão foi entre 0,72-13,64%. É importante ressaltar que a adesão não deve ser

apontada como um parâmetro excludente, visto que a administração de probióticos efetivos independem de uma boa aderência, uma vez que a recomendação de dose é diária (Vankerckhoven et al., 2005; Junior et al., 2019). Contudo, este é um quesito desejável, uma vez que pode estar relacionado à potencialização dos efeitos imunomodulatórios no organismo e à exclusão de bactérias patogênicas por proteção da barreira intestinal (Tallon et al. 2007; Anvisa, 2019).

Prosseguindo com a caracterização, foi avaliado *in vitro* o perfil imunoestimulatório de todas as linhagens. A estimulação do sistema imunológico é uma característica muitas vezes associada às BLs, estando ligada à prevenção de alergias, de danos à mucosa intestinal e gástrica e defesa contra invasão de patógenos (Tsai et al., 2012). Os efeitos direcionados ao sistema imune podem estar relacionados às respostas imunes inatas ou adaptativas, dependendo tanto da linhagem utilizada quanto também da dosagem administrada (Cross et al., 2002). Linhagens de *Lactobacillus* ativam o sistema imunológico principalmente pelo estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interferon-gama (IFN γ), e interleucina 12 (IL12) (Perdigón et al., 2002). Contudo, diferentes padrões de resposta são observados em diferentes linhagens de probióticos, sem existir um consenso claro sobre os mecanismos por trás destes efeitos (Rocha-Ramirez et al., 2017). Tais padrões podem estar relacionados às diferentes vias de internalização das BLs, uma vez que a interação destas bactérias com as células M presentes na mucosa intestinal induzem respostas imunes específicas e a interação com o epitélio associado ao folículo das placas de Peyer no intestino pode induzir respostas imunes inflamatórias ou não específicas (Perdigón et al, 2000; Perdigón et al., 2002).

Dada a vasta gama de respostas imunológicas desencadeadas pelos probióticos, em especial pelas BLs, estudar a atuação das mesmas sobre a imunidade do hospedeiro pode auxiliar o direcionamento e otimização de diferentes aplicações, seja no campo do tratamento de alergias (com aumento da produção de IL12 e IFN γ , fundamentais no controle destas reações), quanto na atenuação de inflamações intestinais (através da produção de citocinas e mediadores anti inflamatórios) ou também no ramo biotecnológico, como vetores de vacinas em função da ativação do sistema imune humoral e celular (Perdigón et al., 2002; Pochard et al., 2002).

Contudo, podem existir algumas dificuldades ao estudar o papel imunológico das BLs *in vitro*, uma vez que em humanos, o sistema biológico é muito mais robusto,

com a presença das placas de Peyer organizadas em nódulos linfáticos, cobertas por um epitélio intestinal contendo as células M, que são responsáveis por direcionar antígenos às células dentríticas apresentadoras de antígenos (CD), resultando em resposta imunológica e produção de IgA secretória (Wells et al., 2010). Nesse panorama, mesmo sendo modelos menos complexos, as células Caco-2 tem sido muito estudadas em análises *in vitro* de estrutura e função intestinal, sendo capazes de produzir diversas citocinas, tais como IL6, IL8, IL12 e TNF (Morita et al., 2002).

Sendo assim, o presente trabalho avaliou a atuação das 21 linhagens no que diz respeito à produção de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL6 e IL12) bem como a citocina anti-inflamatória IL10 e a ativação de *Toll like receptor 2* (TLR-2) em células Caco-2. Outros trabalhos *in vitro* utilizando estas células demonstraram a produção de citocinas pró inflamatórias IL1, TNF, IFN γ , e IL6 que cumprem um papel crucial nos mecanismos de defesa do organismo após exposição com a linhagem de levedura láctica potencialmente probiótica *Kluyveromyces marxianus* B0399 (Maccaferri et al., 2012). O contato de linhagens de *Bifidobacterium* em células Caco-2 também ocasionou em alguns casos um aumento nos níveis de expressão de IL6 e IL8, o qual não foi percebido após o contato com bactérias lácticas tais como *Lactobacillus*, revelando que o padrão de expressão de citocinas pró-inflamatórias por essas células é variável (Morita et al., 2002). Neste trabalho foi possível observar o aumento da expressão de TNF em quatro linhagens, estando associado com o aumento de TLR-2 em três delas (*L. paracasei* Lpa1, *L. plantarum* Lpl4 e *L. plantarum* Lpl19), podendo indicar potencial de imuno estimulação, uma vez que a ativação de TLR, resulta em uma cascata de sinais que promove a indução de diversas citocinas relacionadas por sua vez à vias de sinalizações, como NF- κ B (Rahman et al., 2011). Em relação à IL6, a maioria das linhagens reduziu a sua expressão de forma significativa comparada com as células Caco-2 não estimuladas com nenhuma bactéria, enquanto a produção da mesma teve aumento apenas em *E. faecalis* Efc15. Em organismos saudáveis, uma ativação controlada de IL6 é esperada após a administração de probióticos e pode estar associada a ativação do sistema imune (Galdeano et al., 2006). Contudo, existem inúmeras aplicações envolvendo a ação dos probióticos em reduzir níveis de IL6 direcionados principalmente ao tratamento de doença inflamatória intestinal (Matsumoto et al., 2005), colite ulcerativa (Hegazy et al., 2010) e mucosite intestinal (Yeung et al., 2015).

Por sua vez, a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL10 e IL4 também em modelos com células Caco-2 foi observada através do estímulo com *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *L. acidophilus* (Perdigón et al., 2002). Neste trabalho, apenas uma linhagem (*E. faecalis* Efc15) conseguiu aumentar a produção de IL10 de maneira significativa em um modelo de célula sem indução de inflamação, revelando potencial de promover ação homeostática e protetora, prevenindo danos ao hospedeiro (Martens et al., 2018).

O perfil *in vitro* de expressão de algumas citocinas relacionadas ao o papel dos probióticos traçado neste estudo, foi analisado como uma forma de obter mais dados preliminares referentes às linhagens, e não como um teste de exclusão. Diversas vias de sinalização podem estar presentes em um organismo complexo, modulando a ação da bactéria e promovendo diferentes efeitos. Sendo assim, a seleção das primeiras quatro bactérias para avançarem nos testes *in vivo* foi realizada de maneira a contemplar inicialmente espécies distintas que se mostraram seguras e promissoras para uso como probióticos nos testes de caracterização, e que sinalizaram, ainda que de maneira pouco conclusiva, uma estimulação ao sistema imune. Contudo, seus reais efeitos, visto a ainda carência de métodos alternativos eficazes neste ramo, pode ser demonstrada de maneira mais assertiva em modelos animais, que se caracterizou como a próxima fase deste estudo.

O modelo da mucosite intestinal induzida por 5-FU foi escolhido neste trabalho por se tratar de um modelo bem estabelecido, com sintomatologia semelhante a observada em seres humanos submetidos a este mesmo fármaco através do tratamento quimioterápico (Sonis et al., 1990; Sonis et al., 2004). É uma patologia ainda sem tratamento, fazendo com que a busca por métodos que visem melhorar a qualidade de vida dos pacientes quimioterápicos se torne essencial (Yeung et al., 2015). Além do mais, se trata de um modelo agressivo de doença inflamatória intestinal, o que possibilitaria observar efeitos protetores mais significativos promovidos pelas linhagens a serem testadas, caso se mostrassem capazes de promover tais.

Neste trabalho, a administração de 300 mg/Kg de 5-FU em camundongos Balb/c ocasionou efeitos ao organismo que estão em consonância com a patobiologia da mucosite de acordo com o observado em estudos prévios, sendo estes: perda de peso corpóreo, redução do consumo hídrico e alimentar, redução do comprimento intestinal, presença de infiltrado inflamatório, danos à integridade intestinal com

redução das vilosidades e destruição das células do epitélio de borda em escova (Yeung et al., 2015; Li et al., 2017; Carvalho et al., 2017). Observou-se que a administração das quatro linhagens não foi capaz de reverter os sintomas mais críticos da mucosite, tendo efeito apenas sobre o comprimento intestinal e, no caso de *L. plantaurum* Llp19, sobre o consumo hídrico, o que por si só não amenizou a perda de peso, com consequente redução da absorção de nutrientes.

Contudo, o estabelecimento de grupos com a administração das bactérias sem a indução da doença revela a ação das mesmas em um organismo saudável, sendo possível assim analisar eventuais efeitos tóxicos ou reações imunológicas exarcebadas estimuladas pela presença das linhagens. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros patobiológicos analisados nos grupos que receberam as bactérias sem a indução da mucosite em comparação com o grupo controle, sinalizando indícios de que de fato, como avaliado nos testes de caracterização, as linhagens não ocasionam aparentes riscos ao organismo.

Sendo assim, existe um leque de aplicações destas BLs em diferentes áreas, uma vez que são capazes de promover inibição de linhagens patogênicas, podendo ser utilizadas na indústria alimentícia ou no ramo da nutrição e prevenção de doenças, na indústria biotecnológica como vetores de vacinas ou também direcionadas para outros modelos experimentais. Referente aos modelos experimentais, De Sanctis e colaboradores (2019) conduziram um estudo clínico para avaliação do efeito de *Levilactobacillus brevis* CD2 (*Lactobacillus brevis* CD2) em pacientes com mucosite em função do tratamento quimioterápico e não houveram diferenças significativas entre o grupo tratamento e placebo (De Sanctis et al., 2019). Entretanto, quando a mesma linhagem foi analisada em um outro estudo clínico para avaliar saúde bucal e risco de cárie, a administração desta foi capaz de promover efeitos benéficos relacionados a redução de placa e sangramento e manutenção do pH (Campus et al., 2014), além de inibir a formação de biofilme de *Prevotella melaninogenica*, um dos agentes causadores da periodontite (Vuotto et al., 2014). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri*), uma linhagem normalmente utilizada amplamente como probiótico e com efeitos benéficos comprovados, é capaz de exarcebar a sintomatologia de modelos de esclerose múltipla em animais, demonstrando a complexa relação intestino-cérebro e também a variação de resultados em modelos experimentais distintos (Montgomery et al., 2020).

Sendo assim, uma mesma linhagem pode ser extremamente benéfica em algum modelo de doença, mas não ter a mesma eficácia quando aplicada em outro.

Por fim, uma alternativa seria a avaliação do efeito de uma mistura destas linhagens. Um estudo conduzido por Chapman e colaboradores (2011) avaliou se a junção de probióticos tinha mais ou menos efeito sobre diarreia, síndrome do intestino irritável, modulação da microbiota e do sistema imune, infecção por *Helicobacter pylori*, dentre outros. Foi concluído que na maioria dos casos a associação de linhagens era benéfica, entretanto, poucos estudos compararam a ação da mistura com a de seus componentes separadamente, mas quando o fizeram, em 75% dos casos a mistura foi mais eficaz (Chapman et al., 2011). Tendo em vista o impacto da modulação da microbiota no alívio dos sintomas da mucosite, a introdução de duas ou mais linhagens poderia potencializar este efeito.

Dessa forma, mesmo que no modelo de mucosite intestinal em específico, não tenha sido observado resultados animadores após a administração das linhagens, o trabalho de prospecção realizada no presente estudo fornece dados relacionados à aspectos importantes acerca da eficácia e segurança de diversas bactérias potencialmente probióticas, abrindo uma série de possibilidades de utilizações e modelos a serem explorados.

7. PERSPECTIVAS

Diante dos dados obtidos no presente trabalho, pode-se traçar um panorama com perspectivas a curto prazo e a longo prazo, como segue:

1. Perspectivas a curto prazo:

- Sequenciamento de todas as linhagens e montagem dos genomas;
- Análise genômica acerca da sua segurança e potencial benéfico, por meio da predição de ilhas genômicas (GEI), fagos; proteínas secretadas e natureza da resistência a antibióticos;
- Testes *in vivo* para avaliar o potencial terapêutico das demais linhagens em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliação da capacidade de produzir e degradar aminas biogênicas.

2. Perspectivas a longo prazo:

- Testar uma mistura com três ou mais linhagens em outros modelos de doenças;
- Avaliar o potencial das mesmas quanto às aplicações biotecnológicas como veículos de entrega de vacina de DNA;
- Avaliar o potencial das mesmas quanto a aplicação em alimentos funcionais para auxiliar na nutrição.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Bincy P.; QUIGLEY, Eamonn MM. Probiotics in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics**, v. 46, n. 4, p. 769-782, 2017.
- ACNFP, 1996. Report on Enterococcus faecium, strain K77D. MAFF Advisory Committee on Novel Foods and Processes, Report, Ergon House c/o Nobel House, 17 Smith Square, London SW1 3JR, UK.
- ADIMPONG, David B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 75, 2012.
- ALIAKBARPOUR, H.R et al. The Bacillus subtilis and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. *AsianAustralasian Journal of Animal Sciences*, v. 25, n. 9, p. 1285–1293, 2012.
- ALLEN, Adrian et al. Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. In: **Ciba Found Symp.** 1984. p. 137-156.
- ALMEIDA, V.L et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNAinteractive agents: an introduction. *Química. Nova*, vol.28, n.1, p.118-129, 2005.
- ALMOKASHFY, F.I.A et al. The Severity of 5-Fluorouracil Induced Gastrointestinal (Gi) Mucositis It's Impact on Treatment. *World Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 6, p. 293-300, 2016.
- ALVIM, Luíge Biciati. Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. 2011.
- ANAL, Anil Kumar; SINGH, Harjinder. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.
- ANDERSON, R et al. Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, vol. 10, n. 1, p. 1-11, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/21.pdf/1c99eeb1-7143-469a-93ff-7b2b0f9187c0>
- ARGYRI, Anthoula A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food microbiology**, v. 33, n. 2, p. 282-291, 2013.

- AVRAM-HANANEL, Liraz et al. E durans strain M4–5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation. **Diseases of the colon & rectum**, v. 53, n. 12, p. 1676-1686, 2010.
- AZAD, Md et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- BANSIL, Rama; TURNER, Bradley S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2-3, p. 164-170, 2006.
- BAO, Yan et al. Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 695-701, 2010.
- BARBOSA, Joana; BORGES, Sandra; TEIXEIRA, Paula. Selection of potential probiotic Enterococcus faecium isolated from Portuguese fermented food. **International journal of food microbiology**, v. 191, p. 144-148, 2014.
- BEDNORZ, Carmen et al. Feeding the probiotic Enterococcus faecium strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of Escherichia coli pathotypes that adhere to the gut mucosa. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7896-7904, 2013.
- BEGLEY, Máire; GAHAN, Cormac GM; HILL, Colin. The interaction between bacteria and bile. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.
- BEHBAHANI, Behrooz Alizadeh; NOSHAD, Mohammad; FALAH, Fereshteh. Inhibition of Escherichia coli adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate Lactobacillus plantarum strain L15. **Microbial pathogenesis**, v. 136, p. 103677, 2019.
- BERNARDEAU, Marion et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.
- BIZZINI, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 693-696, 2011.
- BLACKWOOD, B.P et al. Probiotic Lactobacillus Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Journal of Probiotics and Health**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2017.
- BOFFA, LIDIA C. et al. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 10, p. 3364-3366, 1978.
- BORGES, Sandra; BARBOSA, Joana; TEIXEIRA, Paula. Gynecological health and probiotics. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**, p. 741-52, 2016.
- BOTTA, Cristian et al. In vitro selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94457, 2014.

- BRODMANN, Theodor et al. Safety of novel microbes for human consumption: practical examples of assessment in the European Union. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1725, 2017.
- CAMPUS, Guglielmo et al. Effect of a daily dose of Lactobacillus brevis CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. **Clinical oral investigations**, v. 18, n. 2, p. 555-561, 2014.
- CANI, Patrice D.; DE VOS, Willem M. Next-generation beneficial microbes: the case of Akkermansia muciniphila. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1765, 2017.
- CAPURSO, Lucio. Thirty years of Lactobacillus rhamnosus GG: a review. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 53, p. S1-S41, 2019.
- CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CARVALHO, Rodrigo D. et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: a focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 800, 2017.
- CASAS-SOLÍS, Josefina et al. Immunomodulatory Effect of Lactobacillus casei in a Murine Model of Colon Carcinogenesis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2019.
- CAZORLA, Silvia I. et al. Oral administration of probiotics increases paneth cells and intestinal antimicrobial activity. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 736, 2018.
- CHANG, Pamela V. et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 2014.
- CHAPMAN, C. M. C.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. Effects of single-and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. **Anaerobe**, v. 27, p. 71-76, 2014.
- CHAPMAN, C. M. C.; GIBSON, Glen R.; ROWLAND, Ian. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?. **European journal of nutrition**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2011.
- CHARTERIS, William P. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species. **Journal of food protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.
- CINAUSERO, M et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 354, p. 1-17, 2017.
- COHEN, Paul S.; LAUX, David C. [24] Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1995. p. 309-314.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International dairy journal**, v. 8, n. 5-6, p. 487-490, 1998.

- COSANSU, Serap; MOL, Suhendan; ALAKAVUK, Didem Uçok. Effect of a *Pediococcus* Culture on the Sensory Properties and Ripening of Anchovy Marinade at 4 C and 16 C. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 10, n. 3, p. 373-380, 2010.
- COX, Mary Ann et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 44, p. 5549, 2009.
- CROSS, M. L. Immune-signalling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 17, n. 2, p. 127-134, 2004.
- CUFFIA, Facundo et al. In vivo study of the immunomodulatory capacity and the impact of probiotic strains on physicochemical and sensory characteristics: Case of pasta filata soft cheeses. **Food Research International**, v. 125, p. 108606, 2019.
- CUNHA, A. F. et al. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milks. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1876-1882, 2013.
- DA SILVA, K. N. et al. P056 Kefir (*Lactobacillus kefirianofaciens*) promotes autophagy and protects the intestinal barrier against DSS-induced colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. Supplement_1, p. S162-S163, 2020.
- DALIRI, Eric Banan-Mwine; LEE, Byong H.; OH, Deog H. Safety of probiotics in health and disease. In: **The Role of Functional Food Security in Global Health**. Academic Press, 2019. p. 603-622.
- DAMODHARAN, Karthiyaini et al. Probiotic characterization of *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* KNI9 inhibiting adherence of *Yersinia enterocolitica* on Caco-2 cells in vitro. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-8, 2019.
- DE CASTILHO, Natália Parma Augusto; NERO, Luís Augusto; TODOROV, Svetoslav Dimitrov. Molecular screening of beneficial and safety determinants from bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal calabresa. **Letters in applied microbiology**, v. 69, n. 3, p. 204-211, 2019.
- DE JESUS, Luís et al. Protective Effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. **Journal of functional foods**, 2018.
- DE SANCTIS, Vitaliana et al. *Lactobacillus brevis* CD2 for prevention of oral mucositis in patients with head and neck tumors: a multicentric randomized study. **Anticancer Research**, v. 39, n. 4, p. 1935-1942, 2019.
- DEL PIANO, Mario et al. In vitro sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, p. S170-S173, 2008.

- DERRIEN, Muriel et al. The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1646-1648, 2008.
- DÍEZ, Lorena et al. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 167-172, 2012.
- DOS SANTOS, Liliane Martins et al. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UHV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. **Medical microbiology and immunology**, v. 200, n. 1, p. 29-38, 2011.
- DUAR, Rebecca M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. Supp_1, p. S27-S48, 2017.
- DUNCAN, M; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v.18, n. 9, p. 853-74, 2003.
- EFSA PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2740, 2012.
- EWASCHUK J.B et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 295, n. 5, p. 1025-34, 2008.
- FALAGAS, Matthew E. et al. Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women. **Drugs**, v. 66, n. 9, p. 1253-1261, 2006.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canadá, p. 1 - 11. 2002.
- FAO/WHO. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and nutrition Paper n. 85. 2006.
- FATMAWATI, Ni Nengah Dwi et al. Caco-2 cells monolayer as an in-vitro model for probiotic strain translocation. **Bali Med J**, v. 9, n. 1, p. 137-142, 2020.
- FEDORAK, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., et al. (2015). The probiotic VSL has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 928–35.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.10.031.
- FERRARIS, Ronaldo P.; VINNAKOTA, Ravi R. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 8, p. 2172-2182, 1995.

FUENTES, Mari C. et al. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1866-1872, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION -FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf . Acessado em 9 de agosto de 2020.

FORBES J.D et al. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Frontiers in Microbiology*, vol.7, p. 1081, 2016

FRANZ, Charles MAP et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International journal of food microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125-140, 2011.

FREIWALD, Anja; SAUER, Sascha. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 4, n. 5, p. 732-742, 2009.

FULLER, R. et al. Probiotics: prospects of use in opportunistic infections. In: **Old Herborn University Seminar Monograph**. 1995. p. 185.

FUOCHI, Virginia et al. Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 426-433, 2015.

GALDEANO, C. Maldonado; PERDIGON, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 2, p. 219-226, 2006.

GAO, K et al. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of Microbiology Immunology Infection*, v. 14, n. 5, p. 1684-1182, 2015.

GARCÍA-RUIZ, Almudena et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy G. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. **New York**, 2004.

GASPAR, C. et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. **Amb Express**, v. 8, n. 1, p. 153, 2018.

GERHARD, Dayana et al. Probiotic therapy reduces inflammation and improves intestinal morphology in rats with induced oral mucositis. **Brazilian oral research**, v. 31, 2017.

GIRAFFA, Giorgio. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2012.

GODERSKA, Kamila et al. Characterisation of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* LR7 strain. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 12, n. 3, p. 21-24, 2003.

- GORI, Stefania et al. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 143, p. 139-147, 2019.
- GRANATO, Daniel et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.
- GUPTA, A.; SHARMA, N. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria *Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli a traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. **J. Food Microbiol. Saf. Hyg**, v. 2, n. 1, p. 119, 2017.
- HAGHSHENAS, Babak et al. Isolation and characterization of probiotics from dairies. **Iranian journal of microbiology**, v. 9, n. 4, p. 234, 2017.
- HALDER, Debashis et al. Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, p. 31, 2017.
- HANCHI, Hasna et al. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—An update. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1791, 2018.
- HAVELAAR, Arie H. et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S79-S94, 2010.
- HEGAZY, Sahar K.; EL-BEDEWY, Mohamed M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 33, p. 4145, 2010.
- HEIDEBACH, Thomas; FÖRST, Petra; KULOZIK, Ulrich. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1670-1677, 2009.
- HEMARAJATA, P; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.
- HILL, C et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, vol. 11, p. 506–514, 2014.
- HOWARTH, Gordon S. et al. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 10, p. 2519-2530, 1996.
- HSIEH, M. C., Tsai, W. H., Jheng, Y. P., Su, S. L., Wang, S. Y., Lin, C. C., et al. (2018). The beneficial effects of *Lactobacillus reuteri* ADR-1 or ADR-3 consumption on type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Sci. Rep.** 8, 16791. doi:10.1038/s41598-018-35014-1.

- HUEBNER, E.S; SURAWICZ, C.M. Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 35, n. 2, p. 355-65, 2006.
- HUME, M. E. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. ***Poultry science***, v. 90, n. 11, p. 2663-2669, 2011.
- HUSSAIN, Mushtaq et al. Technological characterization of indigenous enterococcal population for probiotic potential. ***Pak J Bot***, v. 40, n. 867, p. e75, 2008.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, Nov 1999.
- JEONG, Do-Won; LEE, Jong-Hoon. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. ***LWT-Food Science and Technology***, v. 64, n. 2, p. 1078-1084, 2015.
- JIANG, Jinchi et al. *Lactobacillus reuteri* A9 and *Lactobacillus mucosae* A13 isolated from Chinese superlongevity people modulate lipid metabolism in a hypercholesterolemia rat model. ***FEMS Microbiology Letters***, 2019.
- JUNG, Hyun Chae et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. ***The Journal of clinical investigation***, v. 95, n. 1, p. 55-65, 1995.
- JUNIOR, Wilson José Fernandes Lemos et al. Safety and stability of two potentially probiotic *Lactobacillus* strains after in vitro gastrointestinal transit. ***Probiotics and Antimicrobial Proteins***, p. 1-10, 2019.
- JUSTINO, Priscilla FC et al. Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- κ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. ***Cytokine***, v. 125, p. 154791, 2020.
- KACI, G et al. Inhibition of the NF- κ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 13, p. 4681–4684, 2011.
- KAKELAR, Hadi Maleki et al. Isolation and molecular identification of *Lactobacillus* with probiotic potential from abomasums driven rennet. ***Food chemistry***, v. 272, p. 709-714, 2019.
- KARTHIKEYAN, N. et al. Augmentation of probiotic viability in ice cream using microencapsulation technique. ***Journal of Advanced Veterinary and Animal Research***, v. 2, n. 1, p. 76-83, 2013.
- KAUR, Indu Pal; CHOPRA, Kanwaljit; SAINI, Amarpreet. Probiotics: potential pharmaceutical applications. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2002.

- KIM, Hangeun et al. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid alleviates TNF- α -induced inflammation in the HT-29 intestinal epithelial cell line. **Molecules and cells**, v. 33, n. 5, p. 479-486, 2012.
- KIRJAVAINEN, Pirkka V. et al. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS microbiology letters**, v. 167, n. 2, p. 185-189, 1998.
- KOPONEN, Johanna et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in Lactobacillus rhamnosus GG. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1357-1374, 2012.
- KWON, Ho-Keun et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺ Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2159-2164, 2010.
- LEBEER, Sarah; VANDERLEYDEN, Jos; DE KEERSMAECKER, Sigrid CJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.
- LEBEER, Sarah; VANDERLEYDEN, Jos; DE KEERSMAECKER, Sigrid CJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.
- LEE, C.S et al. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 14, p. 3751–3761, 2014.
- LEE, Kang Wook et al. Probiotic properties of Pediococcus strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. **Anaerobe**, v. 28, p. 199-206, 2014.
- LEE, Sangki et al. Probiotic characteristics of Bacillus strains isolated from Korean traditional soy sauce. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 518-524, 2017.
- LEE, Yuan-Kun; SALMINEN, Seppo. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.
- LÉPINE, F.A et al. Lactobacillus acidophilus attenuates Salmonella-induced stress of epithelial cells by modulating tight-junction genes and cytokine responses. *Frontiers in Microbiology*, 2018.
- LI, Laam et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 258, 2014.
- LI, Hong-Li et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 455, 2017.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LONGLEY, D.B et al. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 5, p. 330-338

- LUO, Yanping et al. Performance of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid bacterial identification in two diagnostic centres in China. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 1, p. 18-24, 2015.
- MAASSEN, Catharina BM et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. **Vaccine**, v. 18, n. 23, p. 2613-2623, 2000.
- MACCAFERRI, Simone et al. Potential probiotic Kluyveromyces marxianus B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, p. 956-964, 2012.
- MANDAL, Hemanti; JARIWALA, Ruchi; BAGCHI, Tamishraha. Isolation and characterization of lactobacilli from human faeces and indigenous fermented foods for their potential application as probiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 349-359, 2016.
- MANNING, T. S. et al. Prebiotics and lactic acid bacteria. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, v. 139, p. 407-418, 2004.
- MARKOWIAK, Paulina; ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.
- MARTENS, K. et al. Probiotics for the airways: Potential to improve epithelial and immune homeostasis. **Allergy**, v. 73, n. 10, p. 1954-1963, 2018.
- MARTINO, Maria Elena et al. Nomadic lifestyle of Lactobacillus plantarum revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 12, p. 4974-4989, 2016.
- MARTINS, Ariane KS et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of Bifidobacterium animalis var. lactis. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 12, p. 995-1003, 2010.
- 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. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 140, n. 3, p. 417-426, 2005.
- MCNULTY, N. P. et al. a, Knight R, Duncan AE, Bain JR, Muehlbauer MJ, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. **Sci Transl Med**, v. 3, 2011.
- MISHRA, Alok Kumar; KUMAR, Shravanthi S.; GHOSH, Asit Ranjan. Probiotic Enterococcus faecalis AG5 effectively assimilates cholesterol and produces fatty acids including propionate. **FEMS microbiology letters**, v. 366, n. 4, p. fnz039, 2019.
- MIURA, K et al. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, vol. 2, n. 3, p.1717-1730, 2010.

- MIZOGUCHI, Taiji et al. Oral administration of the lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* attenuates atherosclerosis in mice by inducing tolerogenic dendritic cells. **Heart and Vessels**, v. 32, n. 6, p. 768-776, 2017.
- MOKOENA, M.P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1-13, 2017.
- MONTEAGUDO-MERA, Andrea et al. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6463-6472, 2019.
- MONTEAGUDO-MERA, Andrea et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.
- MONTGOMERY, Theresa L. et al. Interactions between host genetics and gut microbiota determine susceptibility to CNS autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 44, p. 27516-27527, 2020.
- MORELLI, L. et al. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 59-67, 2000.
- MORENO, MR Foulquié et al. The role and application of enterococci in food and health. **International journal of food microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.
- MORITA, Hirotugu et al. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. **Microbiology and immunology**, v. 46, n. 4, p. 293-297, 2002.
- MUÑOZ-ATIENZA, Estefanía et al. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 15, 2013.
- NAMI, Yousef et al. Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 8, p. 1044-1051, 2014.
- NAMI, Yousef et al. The prophylactic effect of probiotic *Enterococcus lactis* IW5 against different human cancer cells. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1317, 2015.
- NEUMANN, Elisabeth. **"Comportamento" in vitro" de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo**. 1991. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- NIETO-LOZANO, Juan C. et al. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 679-685, 2010.
- NIEDZIELIN, Krzysztof et al. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 10, p. 1143-1147, 2001.

- NODA, Masafumi et al. Antibiotic susceptibility of plant-derived lactic acid bacteria conferring health benefits to human. **The Journal of antibiotics**, v. 72, n. 11, p. 834-842, 2019.
- NOMOTO, Koji. Prevention of infections by probiotics. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 583-592, 2005.
- NUENO-PALOP, Carmen; NARBAD, Arjan. Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. **International journal of food microbiology**, v. 145, n. 2-3, p. 390-394, 2011.
- OAK, Sophia J.; JHA, Rajesh. The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 11, p. 1675-1683, 2019.
- OHLAND, Christina L.; MACNAUGHTON, Wallace K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology**, v. 298, n. 6, p. G807-G819, 2010.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007.
- OLIVEIRA, G.L.V et al. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 1-12, 2017.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2670 - 2679, 2008.
- OUWEHAND, Arthur C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International dairy journal**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.
- PADMAVATHI, Tallapragada et al. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 357-362, 2018.
- PAPAGIANNI, Maria; ANASTASIADOU, Sofia. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2009.
- PARADA VENEGAS, Daniela et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 277, 2019.
- PARK, Jung-ha et al. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0156334, 2016.
- PÄRTTY, Anna et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG therapy and microbiological programming in infantile colic: a randomized, controlled trial. **Pediatric research**, v. 78, n. 4, p. 470-475, 2015.

- PERDIGON, G. et al. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 4, p. S21-S26, 2002.
- PERDIGON, G. et al. Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 141-150, 2000.
- PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000. p.213-233.
- PEREIRA, Valéria Garcia; GÓMEZ, Raul Jorge Hernan Castro. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-239, 2007.
- PETROVA, Mariya I. et al. Lectin-like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161337, 2016.
- PICÓ-MONLLOR, José Antonio; MINGOT-ASCENCAO, José Manuel. Search and selection of probiotics that improve mucositis symptoms in oncologic patients. A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2322, 2019.
- PIENIZ, Simone et al. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, p. 251-256, 2014.
- PIMENTEL, Tatiana C. et al. Brazilian yogurt-like products. In: **Yogurt in health and disease prevention**. Academic Press, 2017. p. 331-351.
- PLAZA-DÍAZ, J et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2017.
- POCHARD, Pierre et al. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 4, p. 617-623, 2002.
- PRABHURAJESHWAR, Chidre; CHANDRAKANTH, Revanasiddappa Kelmani. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. **biomedical journal**, v. 40, n. 5, p. 270-283, 2017.
- PREIDIS, Geoffrey A. et al. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 5, p. 1960-1969, 2012.
- PRETE, Roberta et al. Beneficial bile acid metabolism from *Lactobacillus plantarum* of food origin. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- QUARESMA, Marielle et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Nutrition and cancer**, v. 72, n. 8, p. 1355-1365, 2020.

- RABAH, Houem; ROSA DO CARMO, Fillipe Luiz; JAN, Gwénaél. Dairy propionibacteria: versatile probiotics. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 24, 2017.
- RAHMAN, Masmudur M.; MCFADDEN, Grant. Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 291-306, 2011.
- RANADHEERA, C. Senaka et al. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 18-25, 2014.
- RATHER, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K., and Park, Y.-H. (2016). Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00507.
- REHMAN, Ateequr et al. Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC microbiology*, v. 12, n. 1, p. 47, 2012.
- REID, Gregor. Safety of Lactobacillus strains as probiotic agents. **Clinical infectious diseases**, v. 35, n. 3, p. 349-350, 2002.
- ROBINSON, Richard K.; TAMIME, Adnan Y.; WSZOLEK, Monika. Microbiology of fermented milks. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**, p. 468, 2002.
- ROCHA-RAMÍREZ, L. M. et al. Probiotic Lactobacillus strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.
- RUAS-MADIEDO, Patricia et al. Mucin degradation by Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1936-1940, 2008.
- RUIZ-MOYANO, Santiago et al. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. **LWT**, v. 114, p. 108388, 2019.
- RUSELER-VAN EMBDEN, J. G. H.; VAN DER HELM, R.; VAN LIESHOUT, L. M. C. Degradation of intestinal glycoproteins by Bacteroides vulgatus. **FEMS microbiology letters**, v. 58, n. 1, p. 37-41, 1989.
- SAARELA, Maria et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.
- SAEZ-LARA, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/505878.
- SAHADEVA, R. P. K. et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, 2011.

- SAMPAOLESI, Sofia et al. Potentiality of yeasts obtained as beer fermentation residue to be used as probiotics. **LWT**, v. 113, p. 108251, 2019.
- SANDERS, Mary Ellen et al. Safety assessment of probiotics for human use. **Gut microbes**, v. 1, n. 3, p. 164-185, 2010.
- SANTOS, N.S., Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético. (Universidade Federal de Viçosa, 1984).
- SAUER, Sascha et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2843, 2008.
- SEN, S. et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, n. 11, p. 2615-2620, 2002.
- SERVIN, A. L., & Coconnier, M.-H. (2003). *Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741–754. doi:10.1016/s1521-6918(03)00052-0
- SERVIN, Alain L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 4, p. 405-440, 2004.
- SHAO, Y.; ZHANG, W.; GUO, H.; PAN, L.; ZHANG, H.; SUN, T. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, v. 50, n. 1, p. 250-258, 2015.
- SHERIDAN, Paul O. et al. Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for undernourished individuals?. 2014.
- SHI, Y et al. Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by *Lactobacillus* cocktails and fructooligosaccharides in a mouse model. *Microbiological Research*, v. 200, p. 14-24, 2017.
- SILVA, Célia CG; SILVA, Sofia PM; RIBEIRO, Susana C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.
- SINGH, Nagendra et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 128-139, 2014.
- SINGHAL, Neelja et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.
- SIPSAS, Nikolaos V.; ZONIOS, Dimitrios I.; KORDOSSIS, Theodore. Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. 1283-1284, 2002.
- SKARIYACHAN, Sinosh; GOVINDARAJAN, Sanjana. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in

- comparison with chemical preservatives. **International journal of food microbiology**, v. 291, p. 189-196, 2019.
- SMALL, Donald M.; DOWLING, Robert H.; REDINGER, Richard N. The enterohepatic circulation of bile salts. **Archives of internal medicine**, v. 130, n. 4, p. 552-573, 1972.
- SMITH, Rachel A.; M'IKANATHA, Nkuchia M.; READ, Andrew F. Antibiotic resistance: a primer and call to action. **Health communication**, v. 30, n. 3, p. 309-314, 2015.
- SOCOL, C.R et al. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 48, n. 4, p. 413–434, 2010.
- SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, vol.4, n. 4, p. 277-284, 2004.
- SONIS, Stephen T. et al. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 69, n. 4, p. 437-443, 1990.
- SPANU, Teresa et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 1, p. 44-49, 2011.
- STRINGER, A.M. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. *Nutrients*, v. 5, n. 5, p.1488-99, 2013.
- SURAWICZ, Christina M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 775-783, 2003.
- ŠUŠKOVIĆ, Jagoda et al. Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 296-307, 2010.
- TAKATA, Kazushiro et al. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27644, 2011.
- TALLON, R. et al. Strain-and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 442-451, 2007.
- TOMKOVICH, Sarah; JOBIN, Christian. Microbiota and host immune responses: a love–hate relationship. **Immunology**, v. 147, n. 1, p. 1-10, 2016.
- TRIPATHI, Manjul K.; GIRI, Saroj Kumar. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- TSAI, Yueh-Ting; CHENG, Po-Ching; PAN, Tzu-Ming. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 853-862, 2012.

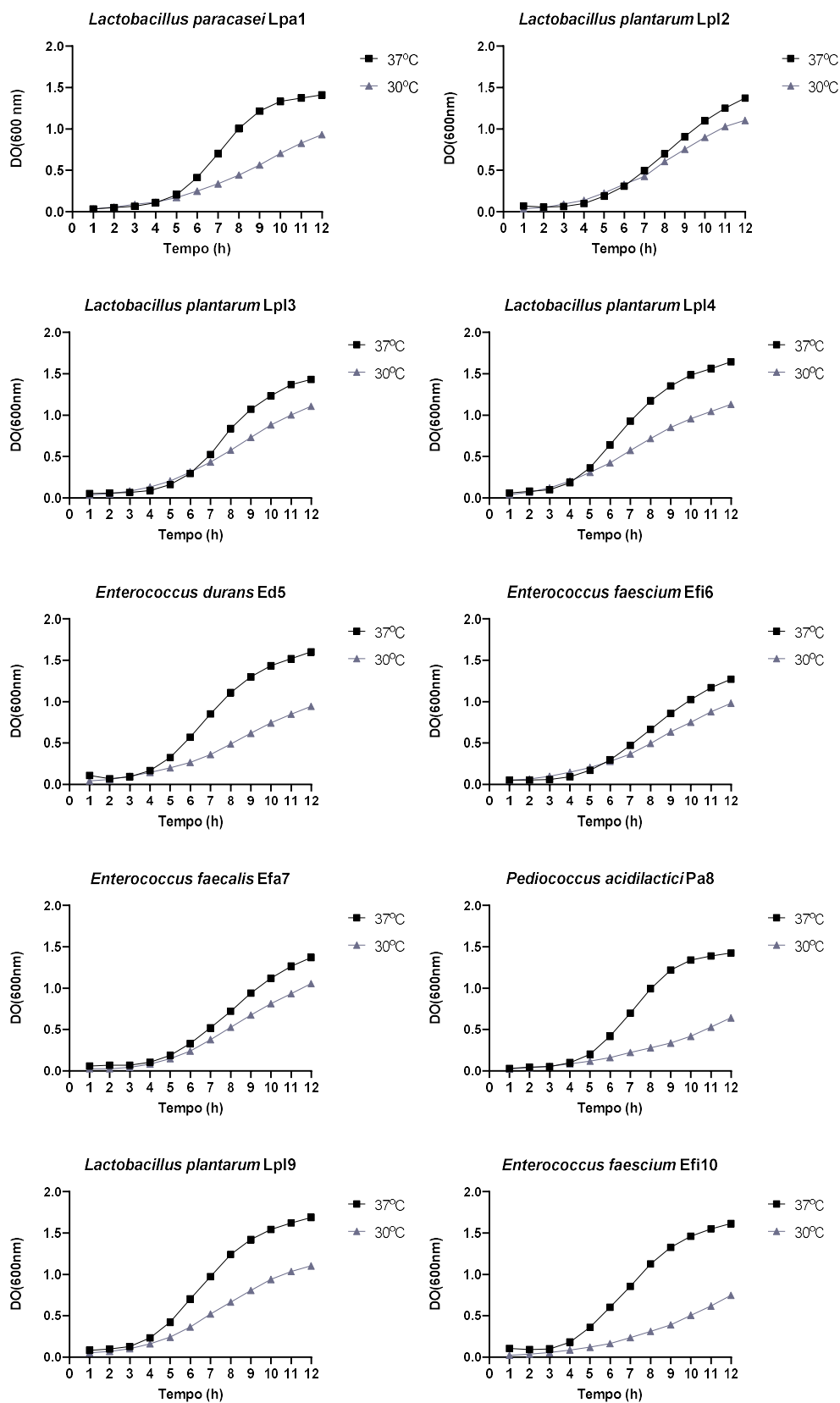
- TUOHY, Kieran M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug discovery today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.
- TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews: Immunology*, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009
- VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. Enterococcus mundtii ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 excludes Listeria monocytogenes from the GIT, as shown by bioluminescent studies in mice. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 2, p. 227-235, 2016.
- VAN ZYL, Winschau F.; DEANE, Shelly M.; DICKS, Leon MT. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1831339, 2020.
- VANDENPLAS, Yvan; HUYS, Geert; DAUBE, Georges. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria (Versão em português)**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.
- VANKERCKHOVEN, Vanessa et al. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 2, p. 102-114, 2008.
- VARTOUKIAN, Sonia R.; PALMER, Richard M.; WADE, William G. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 309, n. 1, p. 1-7, 2010.
- VECKMAN, Ville et al. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 5, p. 764-771, 2004.
- VEIGA, Patrick et al. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. **Scientific reports**, v. 4, p. 6328, 2014.
- VELRAEDS, M. M. et al. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic Enterococcus faecalis by biosurfactants from Lactobacillus isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1958-1963, 1996.
- VIMONT, Allison et al. Bacteriocin-producing Enterococcus faecium LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 865, 2017.
- VINDEROLA, Celso Gabriel; REINHEIMER, Jorge Alberto. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 895-904, 2003.
- VUOTTO, C. et al. Lactobacillus brevis CD 2 inhibits P revotella melaninogenica biofilm. **Oral diseases**, v. 20, n. 7, p. 668-674, 2014.
- WALKER, Derek K.; GILLILAND, Stanley E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 4, p. 956-961, 1993.

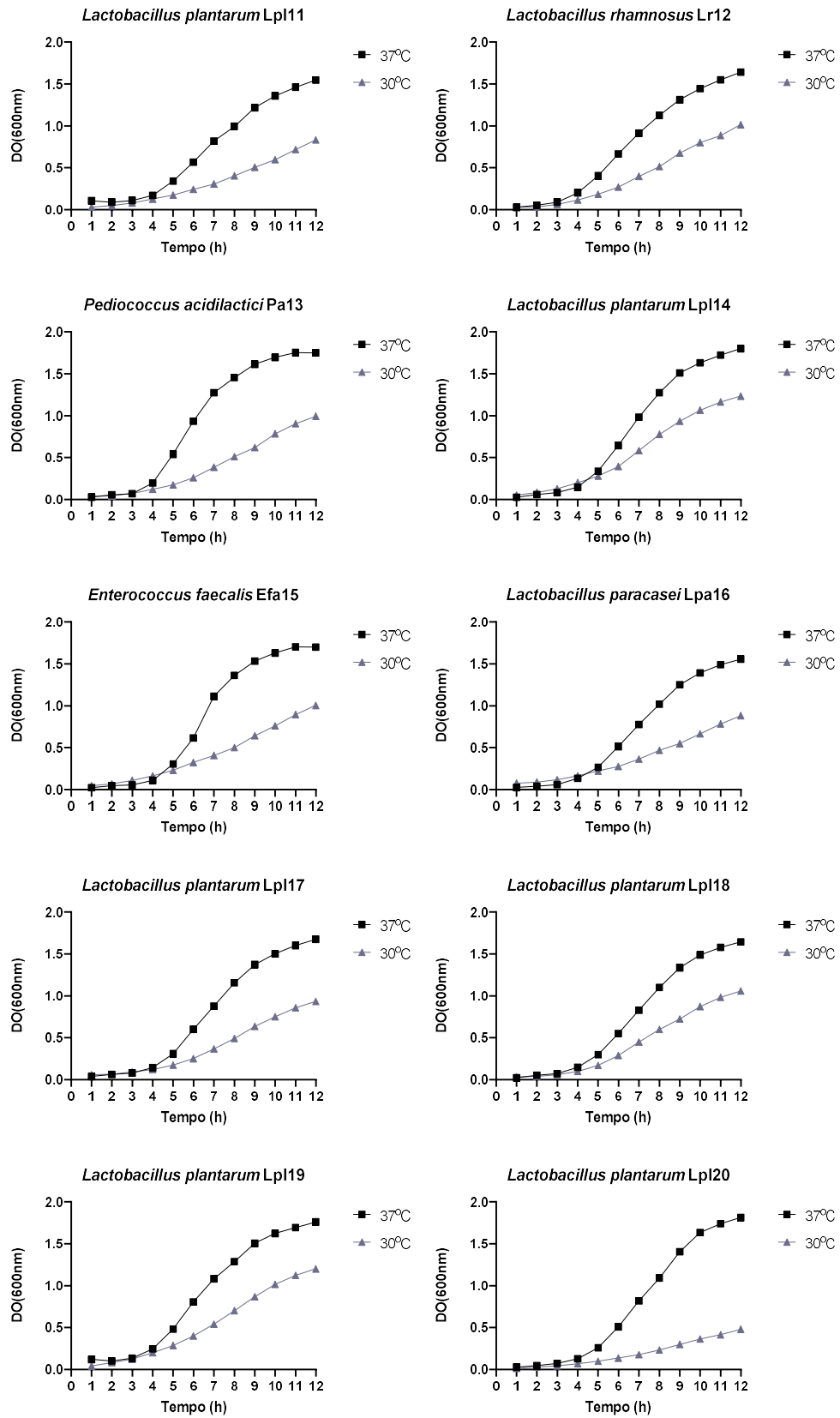
- WALLACE, C. J. K., Foster, J. A., Soares, C. N., and Milev, R. V. (2020). The Effects of Probiotics on Symptoms of Depression: Protocol for a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Neuropsychobiology* 79, 108–116. doi:10.1159/000496406.
- WANG, Chao; CUI, Yanhua; QU, Xiaojun. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. **Archives of microbiology**, v. 200, n. 2, p. 195-201, 2018.
- WANG, G., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., and Chen, W. (2017). *Lactobacillus casei* CCFM419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism. *Food Funct.* 8, 3155–3164. doi:10.1039/C7FO00593H.
- WANG, M et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 13, p. 5691-701, 2016.
- WANG, Yang et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 2017.
- WELLS, Jerry M. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. In: **Microbial cell factories**. BioMed Central, 2011. p. 1-15.
- WELLS, Jerry M.; LOONEN, Linda MP; KARCZEWSKI, Jurgen M. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 41-48, 2010.
- WIEËRS, Grégoire et al. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 454, 2020.
- WULLT, Marlene; HAGSLÄTT, Marie-louise Johansson; ODENHOLT, Inga. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 35, n. 6-7, p. 365-367, 2003.
- XU, Yanshun et al. Physical and chemical changes of silver carp sausages during fermentation with *Pediococcus pentosaceus*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 633-637, 2010.
- YEUNG, Chun-Yan et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138746, 2015.
- Zaharuddin, L., Mokhtar, N. M., Muhammad Nawawi, K. N., and Raja Ali, R. A. (2019). A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 19, 131. doi:10.1186/s12876-019-1047-4.
- ZAYLAA, Mazen et al. Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. **Journal of functional foods**, v. 47, p. 304-315, 2018.
- ZHANG, Fen et al. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 3, p. 1618-1628, 2017.

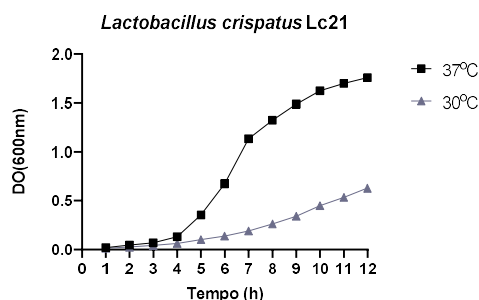
- ZHANG, Ling et al. Qingjie Fuzheng Granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109223, 2019.
- ZHANG, Yingchun et al. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. **Microbiological research**, v. 167, n. 1, p. 27-31, 2011.
- ZHANG, Ying-Chun et al. Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 498-503, 2012.
- ZHANG, Ting et al. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1109-1125, 2019.
- ZHENG, P.X.; FANG, H.Y.; YANG, H.B.; TIEN, N.Y.; WANG, M.C.; WU, J.J. Lactobacillus pentosus strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 14, p. 1-7, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.014>
- ZHOU, J. S.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1-2, p. 81-90, 2001.
- ZHU, Yuan et al. Beneficial effects of *Enterococcus faecalis* in hypercholesterolemic mice on cholesterol transportation and gut microbiota. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 3181-3191, 2019.
- ZMORA, Niv et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1388-1405. e21, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE I: CURVAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 37°C





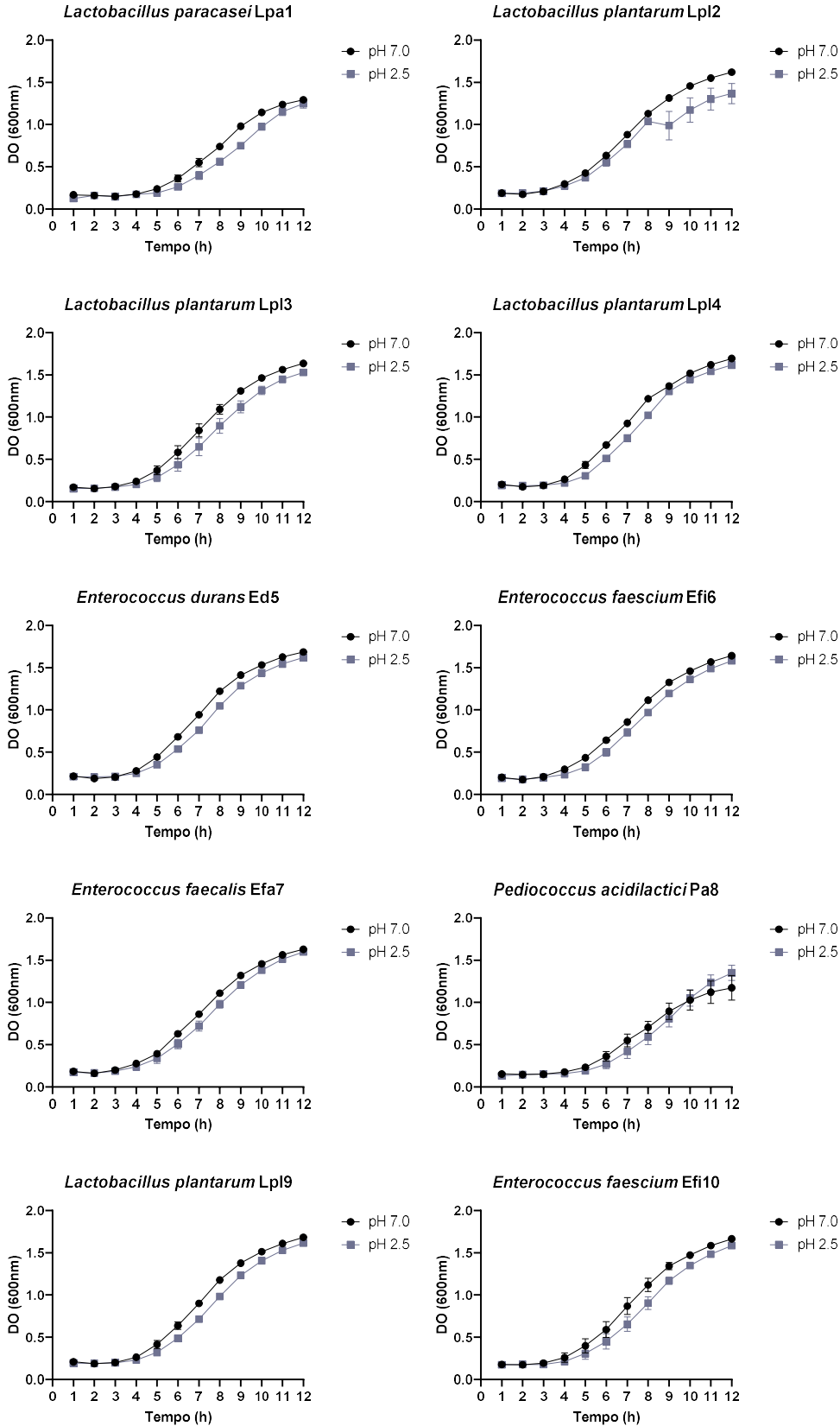


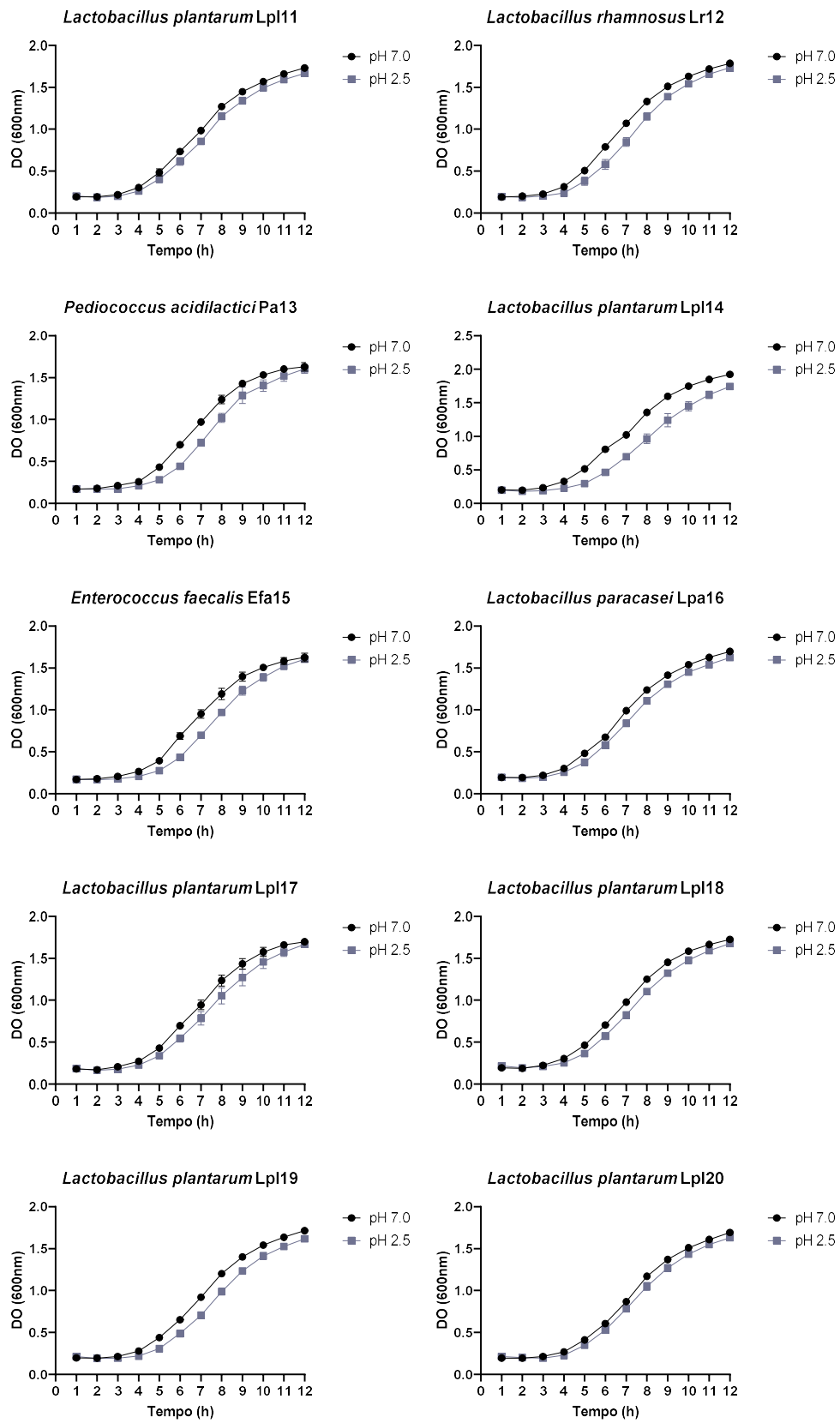
Curvas de crescimento obtidas para os isolados nas temperaturas de 30°C e 37°C

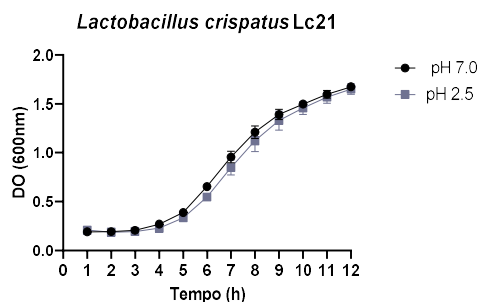
APÊNDICE II: RESULTADOS REFERENTES A UFC DE CADA LINHAGEM APÓS INCUBAÇÃO OVERNIGHT A 37°C

Linhagem	UFC	Linhagem	UFC
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> Lpa1 (<i>Lactobacillus paracasei</i> Lpa1)	1,1x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl11 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl11)	1,5x10 ¹⁰
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl2 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl2)	1,3x10 ¹⁰	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> Lr12 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr12)	3,0x10 ¹⁰
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl3 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl3)	2,4x10 ¹⁰	<i>Pediococcus acidilactici</i> Pa13	1,6x10 ¹⁰
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl4 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl4)	3,8x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl14 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl14)	3,3x10 ¹⁰
<i>Enterococcus durans</i> Ed5	1,3x10 ¹⁰	<i>Enterococcus faecalis</i> Efc15	1,1x10 ¹⁰
<i>Enterococcus faecium</i> Efi6	1,2x10 ¹⁰	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> Lpa16 (<i>Lactobacillus paracasei</i> Lpa16)	1,6x10 ¹⁰
<i>Enterococcus faecalis</i> Efa7	2,1x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl17 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl17)	2,9x10 ¹⁰
<i>Pediococcus acidilactici</i> Pa8	2,7x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl18 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl18)	4,9x10 ¹⁰
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl9 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl9)	1,7x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl19 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl19)	1,3x10 ¹⁰
<i>Enterococcus faecium</i> Efi10	1,9x10 ¹⁰	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lpl20 (<i>Lactobacillus plantarum</i> Lpl20)	1,7x10 ¹⁰
		<i>Lactobacillus crispatus</i> Lc21	1,5x10 ¹⁰

APÊNDICE III: RESISTÊNCIA AO SUCO GÁSTRICO

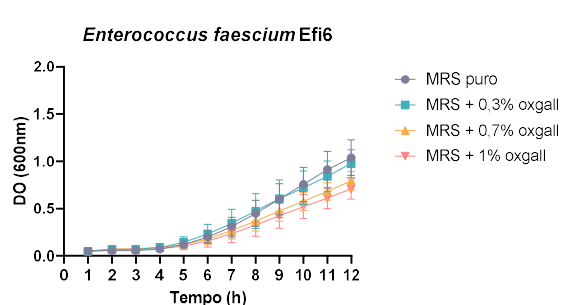
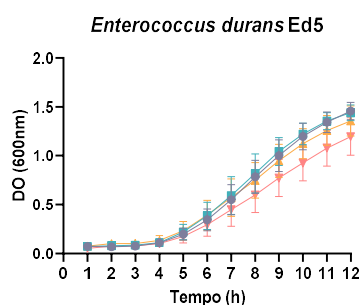
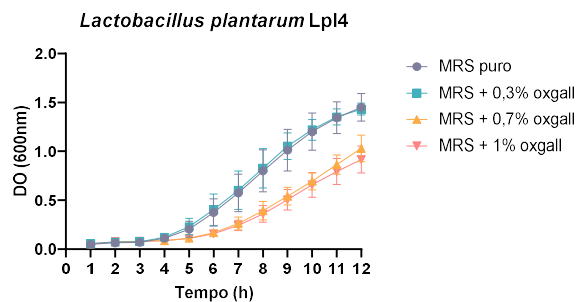
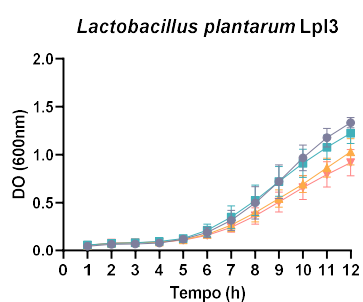
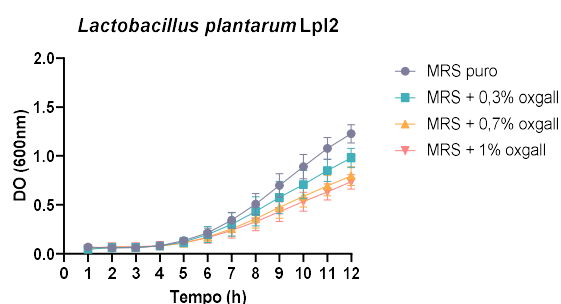
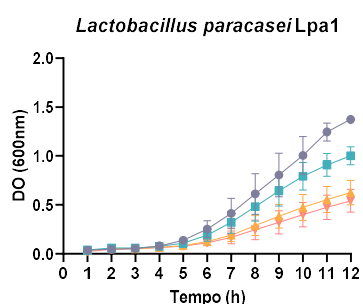


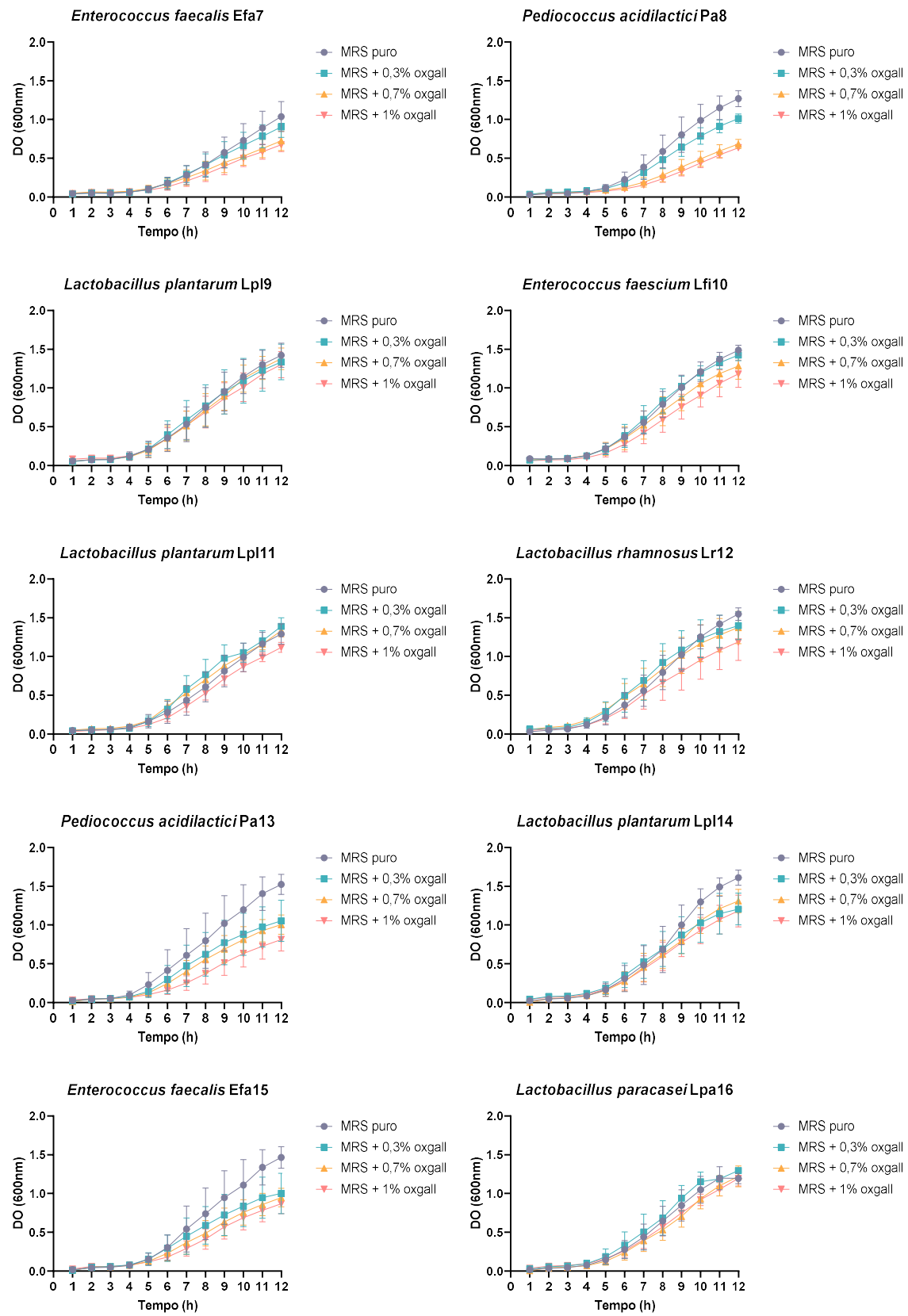


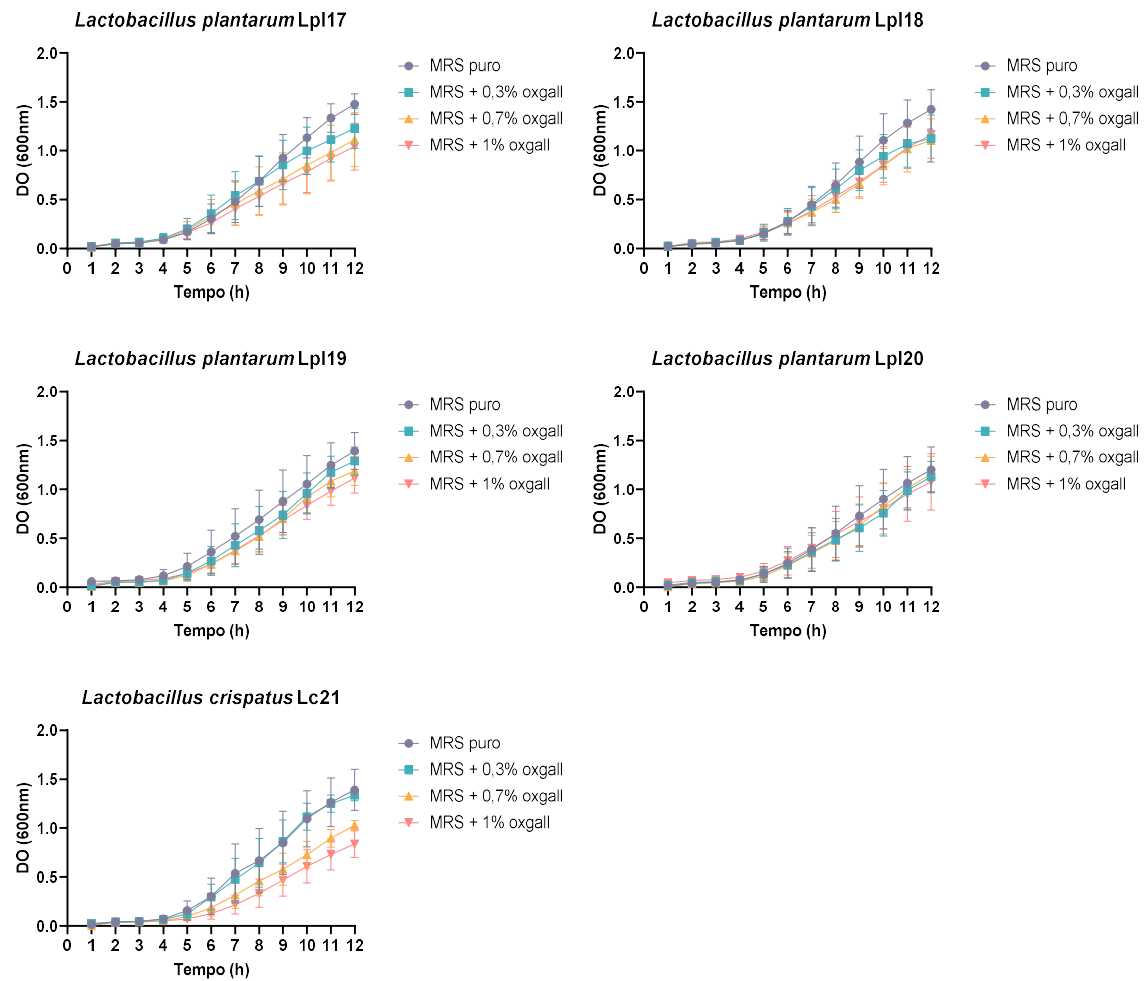


Curvas de crescimento obtidas para os isolados desafiados com suco gástrico artificial.

APÊNDICE IV: RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

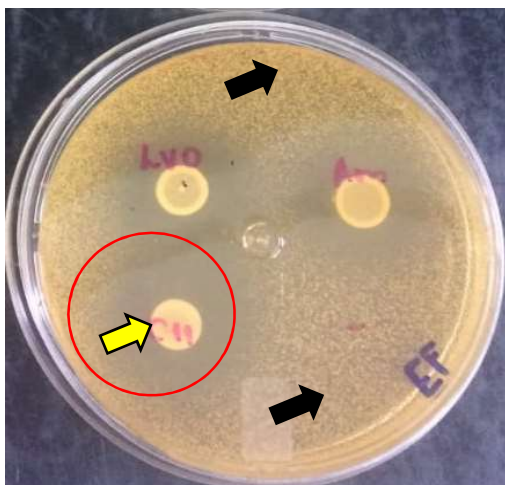






Curvas de crescimento obtidas para os isolados desafiados com diferentes concentrações de sais biliares.

APÊNDICE V: TESTE DE ANTAGONISMO



Representação do resultado do teste de antagonismo, demonstrando o halo de inibição (círculo vermelho) formado ao redor de *spots* das bactérias testadas (seta amarela) ao serem desafiadas com uma camada de ágar contendo a linhagem reveladora (seta preta).

ANEXOS

COELHO-ROCHA, Nina D. et al. Microencapsulation of lactic acid bacteria improves the gastrointestinal delivery and *in situ* expression of recombinant fluorescent protein. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2398, 2018.

Descrição: artigo fruto do Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas na UFMG da aluna Nina Dias Coelho Rocha do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da UFMG. Projeto o qual foi agraciado com prêmios, dentre os quais o de melhor pôster no IV Simpósio de Microbiologia da UFMG, “Relevância Acadêmica”, “Menção Honrosa” e “Grande Prêmio Conceição Ribeiro Machado”, na XXVII Semana do Conhecimento de Iniciação Científica da UFMG, em 2018. O trabalho é uma das bases para a presente dissertação de mestrado por abordar estratégias biotecnológicas envolvendo bactérias lácticas, as quais podem ser implementadas para as bactérias do estudo.



ORIGINAL RESEARCH
published: 05 October 2018
doi: 10.3389/fmicb.2018.02398



Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria Improves the Gastrointestinal Delivery and *in situ* Expression of Recombinant Fluorescent Protein

Nina D. Coelho-Rocha¹, Camila P. de Castro^{1,2}, Luis C. L. de Jesus¹,
Sophie Y. Leclercq³, Savio H. de Cicco Sandes⁴, Alvaro C. Nunes⁴, Vasco Azevedo^{1*},
Mariana M. Drumond^{1,5*} and Pamela Mancha-Agresti^{1**}

OPEN ACCESS

Edited by:

Alex Berlec,
Jozef Stefan Institute (SJS), Slovenia

Reviewed by:

¹ Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Kroton Educacional, Faculdade Pitágoras, Contagem, Brazil, ³ Laboratório de Inovação Biotecnológica, Fundação Esauquiel Dias, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Laboratório de Genética Molecular de Protocolos Parasitas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Coordenação de Ciências, Belo Horizonte, Brazil

BATISTA, Viviane Lima et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis Running head: Alternative treatment for Intestinal Mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2246, 2020.

Descrição: artigo de revisão desenvolvido conjuntamente com membros do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da UFMG, fruto do Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas da aluna Viviane Lima Batista na Faculdade Pitágoras e com coautoria da aluna Nina Dias Coelho Rocha. Artigo diretamente relacionado ao tema da presente dissertação por abordar o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos e paraprobióticos como estratégias alternativas para o tratamento da mucosite intestinal.



REVIEW
published: 17 September 2020
doi: 10.3389/fmicb.2020.544490



Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis

Viviane Lima Batista¹, Tales Fernando da Silva¹, Luís Cláudio Lima de Jesus¹, Nina Dias Coelho-Rocha¹, Fernanda Alvarenga Lima Barroso¹, Laís Macedo Tavares¹, Vasco Azevedo¹, Pamela Mancha-Agresti^{1,2*} and Mariana Martins Drumond^{1,3*}

¹ Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ² Faculdade de Minas, FAMINAS-BH, Belo Horizonte, Brazil, ³ Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Konstantinos Papadimitriou,
University of Peloponnese, Greece

Reviewed by:

Natasa Golc,
University of Belgrade, Serbia
Eric Claassen,
Vrije Universiteit Amsterdam,
Netherlands
Jia Yin,
Hunan Normal University, China

Intestinal mucositis, a cytotoxic side effect of the antineoplastic drug 5-fluorouracil (5-FU), is characterized by ulceration, inflammation, diarrhea, and intense abdominal pain, making it an important issue for clinical medicine. Given the seriousness of the problem, therapeutic alternatives have been sought as a means to ameliorate, prevent, and treat this condition. Among the alternatives available to address this side effect of treatment with 5-FU, the most promising has been the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics. This review addresses the administration of these “biotics” as a therapeutic alternative for intestinal mucositis caused by 5-FU. It describes the effects and benefits related to their use as well as their potential for patient care.

TAVARES, Laísa M., et al. Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol 8, 2020.

Descrição: artigo de revisão desenvolvido conjuntamente com membros do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da UFMG, com coautoria da aluna Nina Dias Coelho Rocha. Artigo relacionado ao tema da presente dissertação por abordar o uso biotecnológico de bactérias lácticas, no caso, *Lactococcus lactis*.



frontiers
in Bioengineering and Biotechnology

REVIEW

published: 04 November 2020
doi: 10.3389/fbioe.2020.517166



Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Gomes,
Universidade Católica Portuguesa,
Portugal

Reviewed by:

Noppol Lekasawadi,
Chiang Mai University, Thailand
José Carlos Andrade,
University Institute of Health Sciences,

Laísa M. Tavares¹, Luis C. L. de Jesus¹, Tales F. da Silva¹, Fernanda A. L. Barroso¹,
Viviane L. Batista¹, Nina D. Coelho-Rocha¹, Vasco Azevedo¹, Mariana M. Drumond^{1,2*}
and Pamela Mancha-Agresti^{1,3*}

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Genetics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Departamento de Ciências Biológicas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ FAMINAS - BH, Belo Horizonte, Brazil

DE JESUS, Luís Cláudio Lima et al. Recombinant Probiotics and Microbiota Modulation as a Good Therapy for Diseases Related to the GIT. In: **The Health Benefits of Foods-Current Knowledge and Further Development**. IntechOpen, 2019.

Descrição: capítulo desenvolvido conjuntamente com membros do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da UFMG, com coautoria da aluna Nina Dias Coelho Rocha. A escrita deste capítulo propiciou um melhor conhecimento sobre o tema acerca da utilização de microrganismos probióticos recombinante na manutenção da saúde intestinal e terapia para patologias relacionadas à este órgão.

Chapter 2

Recombinant Probiotics and Microbiota Modulation as a Good Therapy for Diseases Related to the GIT

*Luís Cláudio Lima de Jesus, Fernanda Alvarenga Lima,
Nina Dias Coelho-Rocha, Tales Fernando da Silva, Júlia Paz,
Vasco Azevedo, Pamela Mancha-Agresti
and Mariana Martins Drumond*

COELHO-ROCHA N.D. et al. Main Features of DNA-Based Vectors for Use in Lactic Acid Bacteria and Update Protocols. In: Sousa Â. (eds) DNA Vaccines. **Methods in Molecular Biology**, vol 2197. Humana, New York, NY, 2021.

Descrição: capítulo desenvolvido conjuntamente por membros do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), com autoria da aluna Nina Dias Coelho Rocha. Este capítulo se relaciona ao presente trabalho por abordar estratégias e metodologias de entrega de bactérias lácticas como vetores de vacinas de DNA, aplicação que é mencionada como uma possível aplicação futura para as linhagens analisadas neste estudo.



[DNA Vaccines](#) pp 285-304 | [Cite as](#)

Main Features of DNA-Based Vectors for Use in Lactic Acid Bacteria and Update Protocols

Authors

[Authors and affiliations](#)

Nina D. Coelho-Rocha, Fernanda A. L. Barroso, Laísa M. Tavares, Ester S. S. dos Santos, Vasco Azevedo, Mariana M. Drumond, Pamela Mancha-Agresti 

Protocol

First Online: 22 August 2020

437

Downloads

Part of the [Methods in Molecular Biology](#) book series (MIMB, volume 2197)

Abstract

DNA vaccines have been used as a promising strategy for delivery of immunogenic and immunomodulatory molecules into the host cells. Although, there are some obstacles involving the capability of the plasmid vector to reach the cell nucleus in great number to promote the expected benefits. In order to improve the delivery and, consequently, increase the expression levels of the target proteins carried by DNA vaccines, alternative methodologies have been explored, including the use of non-pathogenic bacteria as delivery vectors to carry, deliver, and protect the DNA from degradation, enhancing plasmid expression.