

**Leonardo Borges Acurcio**

**Tese de Doutorado**

Efeito protetor de lactobacilos isolados de queijo  
Minas artesanal na infecção experimental com  
*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar  
Typhimurium

**Belo Horizonte  
2016**

Leonardo Borges Acurcio

**Efeito protetor de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium**

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientador:**

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

**Co-orientador:**

Marcelo Resende de Souza (DTIPOA/EV/UFMG)

Belo Horizonte/MG  
2016

## AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas envolvidas nessa longa, desafiadora e gratificante jornada que, que espero conseguir agradecer devidamente a todos.

Em primeiro lugar, agradeço a meus pais, esse grandes modelos da minha vida. Ao meu pai por ser exatamente o como eu quero ser e me guiar nessa jornada para chegar lá. À minha mãe, por ser um exemplo de pessoa que conseguiu tudo do jeito que queria, sem comprometer sua paixão pelo que mais ama: a literatura e a educação! Como bônus, ainda são grandes amigos e companheiros!

Logo em seguida, tenho que agradecer a Polly, minha mulher e companheira da vida, pessoa que mais me entende, me acompanha, me acalma e, dessa forma, me orienta mais que qualquer um. E o que seria é de um acadêmico sem orientação... te amo!

Ao meu orientador, Jacques Nicoli, por ser também modelo para minha vida. Generosamente ele abriu suas portas para mim e me deu oportunidades para ampliar meu conhecimento nesse fantástico mundo da microbiologia. Como bônus, esse francês tornou-se também um grande amigo!

Ao meu outro orientador, Marcelo Resende de Souza, outro grande modelo para mim. Foi ele quem me abriu as portas para o mundo da pesquisa. Sem o seu incentivo, atenção e apoio, dificilmente estaria onde estou hoje. Apesar de atleticano, esse é mais um na coleção de amigos que adquiri ao longo dessa jornada.

Aos meus melhores amigos, BFFs, Madeixa e Flor, que trouxeram ao mundo meu mais novo melhor amigo, Dom! Essa família é um pilar essencial para minha sanidade e alegria, fazendo parte das conquistas da minha vida!

Agradeço aos meus dois pilares na UFMG, Rafa e Sávio, sem esses dois eu seria menos feliz e competente. Vocês são responsáveis por grande parte do conhecimento que conquistei nessa jornada.

Rafa, umas das pessoas mais inteligentes e engraçadas que conheço, sua capacidade de entender e extrapolar o projeto dos outros é um diferencial. Essa sua singular virtude, além de me provocar e estimular, me tornou um pesquisador mais curioso. Os dias no laboratório, com seu constante bom humor, foram sempre mais alegres. De brinde, ganhei um melhor amigo, desses pra vida toda!

Sávio, com sua paciência para me guiar pelos caminhos da biologia molecular sempre me ajudou muito. A nossa parceria, para mim, um grande aprendizado, tornou a jornada muito mais divertida. Você é meu amigo mais antigo da pós-graduação e será o meu grande amigo de cervejas artesanais para o resto da vida!

Agradeço ainda Silvinha e Felipe, o Geripe, amigos muito especiais que vou preservar para o resto da vida. O excelente apoio de vocês, especialmente nos momentos difíceis, foi fundamental. Companheiros indispensáveis para a alegria dentro e fora do laboratório!

À Mayra, a magrela, e à Yasmin, a branquela, apesar da distância no final da minha jornada, agradeço por terem sido e continuarem sendo imprescindíveis para mim.

À Clarice e Amanda, minhas mão direita e esquerdas atuais, minha oferendas prediletas! Serei sempre grato pela companhia, amizade e ajuda no laboratório. Espero que tenha ajudado na mesma proporção que vocês me ajudaram.

Não posso deixar de agradecer minhas antigas fiéis escudeiras, Andréa e Sheyla, coisa 1 e coisa 2, que foram essenciais nos primeiros passos da construção do meu projeto de doutorado e que me ensinaram a ser um melhor orientador. Obrigado pelo carinho, amizade e ajuda!

À turma do LEFM, meu querido laboratório, do presente e do passado: Adriano, Bárbara Barbritcha, Mário, Bruna BL, Katharina, Carol Laneva, Anna Karol, Karine (outra IC querida!), Felipão, Camila Camilation, Luciana Lu e professoras Beth e Silvinha.

À turma do Departamento, pessoas especiais para mim das antigas e das novas gerações: Maira, Silvinha Maria, Vitor Zazu, Lili, Ju, Rodrigo, Zélia, Renatinha, Lorena Doida, Noelly, Hellem, Bia, Marli, Thaysa Tatá, Anna Gabi Maluca e Pri.

À turma da pós-graduação da Genética e da Veterinária, meus outros departamentos e áreas de coração: Luige e professor Álvaro Cantini Nunes, Dalila, Renatinha, Nay, Let's, Gabi e professoras Cláudia e Mônica Pinho.

Aos meus grandes amigos: Fejão, Marcelo, Xande, Carol, Deco Nelson, Elisa, Bola, Jojo, Magaz, Marloes Marlúcia, Lelê, Catu, Brunão, Roney, Dudu, Ana, Gabi, Rios, Xan, Marco, Zaidan, Letícia, Gabiche e Cecília Cenecília.

À minha família, que tem grande destaque na minha vida e na jornada: Cris e Zé, casal de sogros mais bacanas do planeta, meus pais-estepe; Cacá, minha cunhada querida, e Solzinha, minha sobrinha lindíssima; meus tios e primos, Gera, Ju, Guto, Zé Pinto, Gabrielzin, Vivi, Humberto, Ori, Tio Augusto, Cristina, Dani, Deco, Marquim, Valéria, Pedro, Tuzão, Danilo, Luquinha, Bia, Fel e família, Zé Hugo, Sarinha, Diogão e Lula.

Ao laboratório parceiro e pesquisadores envolvidos no meu Doutorado Sanduíche, na Universiteit Antwerpen, na Bélgica: Camille, Dieter, Eline, Ilke, Ingmar, Marianne, Sander, Serena, Wenke e professora Sarah Lebeer. Thank you very much!

Ao laboratório parceiro LPC, Laboratório de Patologia Comparada, sob comando do professor Geovanni Dantas Cassali, pela sua ajuda e pelos valiosos ensinamentos e do doutorando Diego Carlos Reis, nas análises histopatológicas da minha pesquisa.

Às agências de fomento FAPEMIG e CNPq, pelo financiamento da minha pesquisa e pela concessão de bolsas no Brasil e no exterior, meu muito obrigado!

Muito obrigado a todos vocês! O trabalho foi árduo, porém gratificante!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1. Lactobacilos.....	Error! Bookmark not defined.
1.1.1. Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas .....	10
1.1.2. Relação da microbiota do queijo com a microbiota humana.....	11
1.1.3. Salmonelose .....	12
1.1.4. Ação probiótica contra <i>S. Typhimurium</i> .....	14
1.1.5. Leites fermentados probióticos.....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
4.1. Animais.....	22
4.1.1. Manejo dos animais e aspecto ético.....	23
4.2. Micro-organismos.....	23
4.2.1. Lactobacilos.....	23
4.2.2. Micro-organismos patogênicos .....	24
4.3. Desenvolvimento de um produto funcional .....	24
4.3.1. Preparo do leite fermentado .....	24
4.3.2. Análise sensorial do leite fermentado.....	25
4.3.3. Liofilização dos lactobacilos em matriz láctea .....	25
4.4. Ação probiótica frente à infecção por <i>S. Typhimurium</i> .....	26
4.4.1. Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>S. Typhimurium</i> .....	26
4.4.2. Experimentação <i>in vivo</i> .....	27
4.4.2.1. Tratamento dos animais convencionais, capacidade de monoassociação dos lactobacilos em animais isentos de germes e antagonismo <i>ex vivo</i> contra <i>S. Typhimurium</i> .....	288
4.4.2.2. Desafio com <i>S. Typhimurium</i> .....	30
4.4.2.3. Determinação da mortalidade e acompanhamento do desenvolvimento ponderal em decorrência da infecção experimental por <i>S. Typhimurium</i> em camundongos convencionais previamente tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal .....	30

4.4.2.4. Determinação da translocação de <i>S. Typhimurium</i> em animais isentos de germes monoassociados ou não e em animais convencionais tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal ou não .....	31
4.4.2.5. Avaliação histológica do íleo e fígado de animais isentos de germes monoassociados ou não, animais convencionais tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal ou não e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> ou não .....	31
4.4.2.6. Avaliação das citocinas, por meio da expressão relativa de mRNA em qPCR, envolvidas no efeito protetor local (íleo) por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal em uma infecção por <i>S. Typhimurium</i> .....	322
4.4.2.7. Análises da variação da microbiota do íleo de camundongos convencionais, nos diferentes grupos experimentais, por meio de metodologias de sequenciamento de nova geração e de quantificação por meio de qPCR.....	344
4.5. Análises estatísticas.....	388
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1. Desenvolvimento de um produto funcional .....	399
5.1.1. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite fermentado durante seu armazenamento .....	3939
5.1.2. Análise sensorial dos leites fermentados .....	43
5.1.3. Liofilização dos micro-organismos em matriz láctea.....	466
5.2. Ação probiótica de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal contra <i>S. Typhimurium</i> .....	478
5.2.1. Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>S. Typhimurium</i> .....	478
5.2.2. Experimentação <i>in vivo</i> .....	51
5.2.2.1. Capacidade de monoassociação e antagonismo <i>ex vivo</i> de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal contra <i>S. Typhimurium</i> em animais isentos de germes.....	51
5.2.2.2. Curva de sobrevivência, taxa de mortalidade e desenvolvimento ponderal de animais convencionais tratados com lactobacilos ou não e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> .....	53
5.2.2.3. Avaliação do efeito protetor dos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal contra a translocação para baço e fígado em animais convencionais e isentos de germes desafiados com <i>S. Typhimurium</i> .....	57
5.2.2.4. Histopatologia qualitativa e quantitativa do fígado e intestino de animais convencionais e isentos de germes tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> .....	61
5.2.2.5. Citocinas envolvidas no efeito protetor local (íleo) de camundongos tratados com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) em uma infecção por <i>S. Typhimurium</i> .....	73
5.2.2.6. Variação da microbiota do íleo de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais por meio de metodologias de sequenciamento de nova geração e quantificação por meio de qPCR .....	889
<b>6. RESUMO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>1145</b>

## RESUMO

Derivados de leite têm em comum com a microbiota intestinal humana a presença em dominância e sub-dominância de bactérias do filo Firmicutes, em particular do gênero *Lactobacillus*. Devido à sua segurança para o uso em humanos, espécies de lactobacilos têm sido avaliadas quanto ao potencial probiótico, sendo alguns destes microrganismos isolados de derivados lácteos, em razão de sua melhor adaptação a produtos funcionais como os leites fermentados. Nesse sentido, o potencial probiótico de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra foi avaliado a fim de se desenvolver um leite fermentado funcional, comparando os resultados encontrados com um lactobacilo probiótico isolado de um leite fermentado comercial com apelo funcional: *L. paracasei* (LP). Amostras de *L. casei* (B5), *L. plantarum* (B7) e *L. rhamnosus* (B4 e D1) foram testadas quanto ao seu potencial probiótico *in vitro*, contra *Salmonella* Typhimurium; e *in vivo* em camundongos isentos de germe, em experimentos de monoassociação com posterior desafio pelo patógeno ou não, assim como experimentos semelhantes foram conduzidos com camundongos convencionais BALB/c. Os testes incluíram avaliação da proteção obtida com a administração dos leites fermentados pelos lactobacilos em experimentos de sobrevivência, desenvolvimento ponderal, translocação a órgãos-alvo, imunomodulação (de citocinas) e modulação da microbiota local no íleo. A maior parte dos experimentos foi realizada em cinética, com pelos menos dois tempos de infecção e/ou administração do lactobacilo. O desenvolvimento de um alimento funcional também foi avaliado por meio de testes de aceitação dos leites fermentados em análise sensorial, avaliação da manutenção de características físico-químicas e microbiológicas ao longo do armazenamento refrigerado, e também, alternativas de armazenamento e comercialização dos lactobacilos: a liofilização. A partir desse conjunto de resultados, as amostras B7 de *L. plantarum* e D1 de *L. rhamnosus* apresentaram melhores resultados como probióticos para uso em leites fermentados funcionais. Tais resultados foram reforçados pela similaridade do desempenho destas amostras comparadas ao controle positivo.

**Palavras chave:** *Lactobacillus*, queijo Minas artesanal, probiótico, leite fermentado, *Salmonella* Typhimurium



## ABSTRACT

Dairy products have in common with human intestinal microbiota the presence, in dominant and sub-dominant levels, Firmicutes phylum bacteria, particularly those of the *Lactobacillus* genus. Due to its safety use in humans, lactobacilli samples have been characterized as probiotics after isolation from dairy products, due to its better adaptation to functional food products like fermented milks. In this manner, probiotic potential from “Minas” artisanal cheese was evaluated in order to develop functional fermented milks. Results were compared to those from a known probiotic *Lactobacillus paracasei* (LP), *L. casei* (B5), *L. plantarum* (B7) and *L. rhamnosus* (B4 e D1) samples were tested regarding its in vitro probiotic potential against *Salmonella* Typhimurium; and also *in vivo*, through a series of tests with germ free mice colonized with lactobacilli samples infected with *S. Typhimurium* and also similar tests with conventional BALB/c mice. Tests included the protective effect of lactobacilli administered through fermented milk evaluating mice: survival, weight loss, translocation to target organs, ileum’s cytokines immune and microbiota modulation. Germ free mice experiments also included lactobacilli’s colonizing ability and *ex vivo* antagonistic effect (after lactobacilli’s passage through mice intestinal tract). Most of the experiments were conducted in two time points of infection and *Lactobacillus* administration. Functional fermented milk was also developed by assessing its sensory acceptance, microbiological and physical-chemical properties along its refrigerated storage, and, an alternative of its delivery method was also tested: lyophilization. In conclusion, *L. plantarum* B7 and *L. rhamnosus* D1 samples presented themselves as the best probiotics candidates for a functional fermented milk development, especially if compared with the positive control, which presented similar results.

**Keywords:** *Lactobacillus*, “Minas” artisanal cheese, probiotic, fermented milk, *Salmonella* Typhimurium

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ANOVA – análise de variância

ARDRA – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

$\beta$ -actin – Beta Actina

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

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COEP -Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

Ct – “Cycle threshold” – limiar do ciclo

dNTP - deoxinucleotídeos

DTIPOA – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

EDTA –Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELMO1 – “Engulfment and Cell Motility Protein 1” – Proteína de Fagocitose e Motilidade Celular 1

EMP –Embden–Meyerhof–Parnas

ENdEMIC –“Environmental Ecology & Microbiology”

EtOH - Etanol

EV – Escola de Veterinária

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

FAO/WHO – “Food and Agricultural Organization/ World Health Organization” – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/ Organização Mundial da Saúde

FDA –“Food and Drug Administration” – Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos

FOSHU –“Foods for Specified Health Use” - Alimentos para Uso Específico de Saúde

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GRAS –“Generally Recognized as Safe” – Geralmente Reconhecido com Seguro

HCl – Ácido Clorídrico

HE - Hematoxilina-eosina

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IDF – “International Dairy Federation” – Federação Internacional de Lácteos

IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL – Interleucina  
LEFM – Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos  
LPC - Laboratório de Patologia Comparada  
MRS – de Man, Rogosa e Sharpe  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NIH – “National Institute of Health” – Instituto Nacional de Saúde  
OTU – “Operational Taxonomic Unit” – Unidade Taxonômica Operacional  
PCR – “Polymerase Chain Reaction” – Reação de Polimerase em Cadeia  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PRR – “Pattern Recognition Receptor” – Receptor de Reconhecimento de Padrões  
qPCR – PCR quantitativa  
Rac1 – “Rho GTPase Ras-related C3 botulinum toxin substrate1” - Substrato C3 da Toxina Botulínica Associado a Rho 1  
RTIQ - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade  
SPF – “Specific-Pathogen-Free” – Livre de Patógenos Específicos  
TGF- $\beta$  – “Transforming Growth Factor beta” – Fator de Transformação do Crescimento beta  
TNF- $\alpha$  – “Tumor Necrosis Factor alpha” – Fator de Necrose Tumoral alfa  
TLR – “Toll-like Receptor” – Receptor do Tipo Toll  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contagem média de micro-organismos em leite estéril com 10% de sacarose incubados a 37°C.....	40
Figura 2. Contagem média de micro-organismos em leite estéril com 10% de sacarose, após fermentação por 12 horas, ao longo do seu armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C).....	41
Figura 3. Acidez titulável média dos leites fermentados por 12 horas por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal em leite estéril com 10% de sacarose ao longo do seu armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C).....	41
Figura 4. Pontuação média obtida em escala hedônica (1-5) avaliando o sabor (A) e grau de aceitação (B) de leites fermentados (12horas) e armazenados sob refrigeração por 15 dias.....	43
Figura 5. pH médio de leites fermentados por <i>Lactobacillus</i> spp. durante 12 horas e armazenados sob refrigeração aos 15 dias.....	44
Figura 6. Pontuação média obtida em escala hedônica (1-5) avaliando o sabor (A) e grau de aceitação (B) de leites fermentados e armazenados sob refrigeração por 15 dias.....	45
Figura 7. Contagens médias de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal após liofilização com o criopreservador leite desnatado e armazenados sob refrigeração (4 a 7°C).....	46
Figura 8. Contagem média da população fecal dos lactobacilos ( $\log_{10}$ UFC/g de fezes) em animais monoassociados.....	51
Figura 9. Halo médio de inibição (mm) do antagonismo <i>ex vivo</i> frente a <i>S. Typhimurium</i> das fezes de animais monoassociados com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal.....	52

Figura 10. Sobrevivência (%) de animais tratados ou não durante sete dias com leites fermentados por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo intragástrico único de 10 <sup>6</sup> UFC).....	53
Figura 11. Translocação (log <sub>10</sub> UFC/g) cinco dias após o desafio para o baço (A) e fígado (B) de camundongos monoassociados com lactobacilos e desafiados cinco dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de 10 <sup>5</sup> UFC).....	56
Figura 12. Translocação (log <sub>10</sub> UFC/g) para o baço (A – 4 dias pós desafio, B – 6 dias pós desafio) e fígado (C – 6 dias pós desafio), de camundongos monoassociados com lactobacilos e desafiados cinco dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de 10 <sup>5</sup> UFC).....	58
Figura 13. Translocação (log <sub>10</sub> UFC/g) para o baço (A,C) e fígado (B,D), cinco e sete dias pós desafio com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de 10 <sup>6</sup> UFC), respectivamente, de camundongos tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal.....	59
Figura 14. Fotomicrografias de cortes histológicos do íleo de camundongos machos BALB/c tratados previamente (ou não) durante sete dias com leite fermentado pelas amostras B7 de <i>L. plantarum</i> ou LP de <i>L. paracasei</i> (controle positivo) e desafiados posteriormente (ou não) ao longo de cinco dias de infecção por <i>S. Typhimurium</i> .....	61
Figura 15. Altura média (mm) das vilosidades do íleo de camundongos machos BALB/c tratados previamente (ou não) durante sete dias com leite fermentado pelas amostras B7 de <i>L. plantarum</i> (A) ou LP de <i>L. paracasei</i> (controle positivo) (B) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por <i>S. Typhimurium</i> .....	62
Figura 16. Fotomicrografias de cortes histológicos do íleo de camundongos isentos de germes Swiss NIH monoassociados durante cinco dias com leite fermentado pelas amostras B7 de <i>L. plantarum</i> , D1 de <i>L. rhamnosus</i> e LP de <i>L. paracasei</i> (controle	

positivo) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*.....64

Figura 17. Altura média (mm) das vilosidades do íleo de camundongos isentos de germes, Swiss NIH, monoassociados durante cinco dias com leite fermentado pelas amostras B7 de *L. plantarum* (A), D1 de *L. rhamnosus* (B) ou LP de *L. paracasei* (controle positivo) (C) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*.....66

Figura 18. Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de camundongos machos convencionais BALB/c sem tratamento algum (A) e desafiado ao longo de cinco dias com *S. Typhimurium* (ST – B).....69

Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de camundongos isentos de germe Swiss NIH sem tratamento algum (A) e desafiado ao longo de cinco dias com *S. Typhimurium* (ST – B).....71

Figura 20. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra B7 de *L. plantarum*.....72

Figura 21. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra D1 de *L. rhamnosus*.....73

Figura 22. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra LP de *L. paracasei* (controle positivo).....74

Figura 23. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio

(durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra B7 de *L. plantarum*.....78

Figura 24. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra D1 de *L. rhamnosus*.....79

Figura 25. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra LP de *L. paracasei* (controle positivo).....80

Figura 26. Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. plantarum* B7 e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias.....83

Figura 27. Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. rhamnosus* D1 e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias.....84

Figura 28. Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. paracasei* LP e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias.....85

Figura 29. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de ordem, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados ou não com leite

fermentado por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....88

Figura 30. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....91

Figura 31. Abundância (%) dos 15 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....92

Figura 32. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....93

Figura 33. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....95

Figura 34. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).....95



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de iniciadores para citocinas murinas e outros fatores relacionados ao sistema imune.....	34
Tabela 2. Iniciadores para sequenciamento de nova geração da plataforma MiSeq Illumina®, consistindo do adaptador para a plataforma, uma sequência índice (index) de 8-nt, uma sequência “pad” de 10-nt e um par nt link, além do iniciador específico ao gene.....	36
Tabela 3. Iniciadores específicos para grupos de interesse do conteúdo intestinal de camundongos convencionais para 16S bacteriano.....	38
Tabela 4. Contagens médias de <i>S. Typhimurium</i> em ágar MacConkey ( $\log_{10}$ UFC/ml) em cultura pura ou em co-cultivo (18 horas) com cada lactobacilo em caldos BHI ou MRS (n=3).....	38
Tabela 5. Contagens médias ( $\log_{10}$ UFC/ml) em ágar MacConkey de <i>S. Typhimurium</i> após cultivo (18 horas) em sobrenadantes de meio MRS e BHI (n=3).....	39
Tabela 6. Taxa de mortalidade aos sete e dez dias pós-desafio com <i>S. Typhimurium</i> em camundongos BALB/c tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (n=12).....	55
Tabela 7. Desenvolvimento ponderal pela avaliação da variação do peso aos sete dias após desafio com <i>S. Typhimurium</i> em animais BALB/c tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (n=6).....	55
Tabela 8. Resumo dos resultados avaliados pelas amostras de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e controle positivo.....	98

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Lactobacilos

### 1.1.1. Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas dos lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe *Bacilli* (classe III), ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* e é normalmente enquadrado no grupo de bactérias ácido lácticas (usualmente abreviado como BAL) (Felis e Dellaglio, 2007). Este gênero compreende mais de 150 micro-organismos bastonetes e cocobacilos; com baixo conteúdo G+C; Gram positivo; geralmente catalase negativo, não esporulantes, acidúricos ou acidofílicos (pH ótimo entre 5,5 e 6,2), mesofílicos (com temperatura de crescimento ótima entre 30 e 40°C); tolerantes a oxigênio; anaeróbios facultativos, algumas vezes microaerófilos e obrigatoriamente sacaroclásticos, ou seja, com fermentação que tem como produto final pelo menos 50% de lactato (Hammes e Hertel, 2009).

O primeiro micro-organismo do gênero foi isolado e identificado por Moro, em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados com colostro materno. O nome inicial dado a essa bactéria foi *Bacillus acidophilus*, mudado posteriormente para *Lactobacillus acidophilus*. Atualmente, dentre as bactérias desse gênero já identificadas, aquelas de maior importância e uso na produção de alimentos (principalmente derivados lácteos), com apelo probiótico para o homem e também animais de produção, são: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *L. tolerans*. Muitas espécies foram e continuam sendo descritas quanto às suas características probióticas, porém, boa parte dos estudos que avaliam o potencial probiótico de um lactobacilo só se vale de recursos e metodologias *in vitro*. Por esse motivo, Moal e Servin (2014), em uma ampla revisão sobre o assunto, concluíram que somente seis amostras de lactobacilos apresentaram estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos suficientes para que fossem atestadamente probióticas, sendo elas: *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* LB, *L. johnsonii* NCC 533 (antiga La1), *L. casei* DN-114 001 e *L. reuteri* DSM 17938.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são encontradas em diversos nichos onde há disponibilidade de carboidratos fermentáveis, como trato gastrointestinal e vaginal de animais, além de solo e superfície de vegetais. Estes micro-organismos também estão

presentes em muitos tipos de alimentos lácteos, cárneos e seus respectivos derivados, assim como em alguns outros alimentos fermentados de certos vegetais ou bebidas fermentadas feitas a partir de frutas e/ou legumes (Felis e Dellaglio, 2007). Tais micro-organismos são encontrados nessa diversidade de habitats devido à sua capacidade de fermentar açúcares de forma obrigatoriamente homofermentativa – produzindo ácido láctico pela fermentação exclusiva de hexoses pela via Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) - ou heterofermentativa (via das pentoses), facultativa (que também utilizam a via EMP) ou obrigatória (que utiliza a via do fosfogliconato) - produzindo também outros compostos aromáticos como diacetil, etanol, gás carbônico e outros ácidos orgânicos como o acético, uma vez que possuem aldolases e fosfoctolases e são, portanto, capazes de utilizar pentoses e gliconatos em sua fermentação (Hammes e Hertel, 2009).

### **1.1.2. Relação da microbiota do queijo com a microbiota humana**

A microbiota intestinal de um ser humano adulto é, na maioria dos indivíduos, dominada majoritariamente por micro-organismos dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. O primeiro contato do neonato com micro-organismos do gênero *Lactobacillus* está muitas vezes associado ao parto natural, visto que vaginas de mães saudáveis são colonizadas de forma dominante por lactobacilos (microbiota de Doderlein). Apesar da dominância populacional intestinal em crianças recém-nascidas ser dada por bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp., diversas espécies de lactobacilos como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* podem ser encontradas em níveis subdominantes nesses indivíduos (Vaishampayan et al., 2010). Nos adultos, essa microbiota é complementada por micro-organismos das espécies *L. crispatus* e *L. ruminis* (Heilig et al., 2002).

Algumas espécies de lactobacilos são mais adaptadas geneticamente ao leite e seus derivados (como *L. delbrueckii* e *L. helveticus*), enquanto outras parecem mais adaptadas ao ambiente intestinal (como *L. johnsonii* e *L. salivarius*), o que não impede, necessariamente, a sua sobrevivência e participação no processo de maturação do queijo. Um exemplo clássico de micro-organismo que é adaptado ao ambiente intestinal e também é encontrado em queijo é *L. rhamnosus*. Este lactobacilo tem *loci* em seu genoma destinados à expressão de fímbrias cruciais para colonização e persistência no intestino (Kankainen et al., 2009) e também pode ser encontrado no

processo de fabricação de queijo desde o soro-fermento até o último estágio de maturação de queijos muito maturados (Pogacic et al., 2013). Outro interessante exemplo é *L. plantarum*, muito presente em diversas matrizes alimentares como grãos, legumes e vegetais, além de leite e seus derivados. Este micro-organismo produz pelo menos 12 proteínas, principalmente hidrolases e transglicosilases, envolvidas na aderência a componentes intestinais como a mucina e o colágeno (Boekhorst et al., 2006), assim como está presente e participa da maturação de queijos elaborados com leite de ovelha, aumentando os ácidos graxos de cadeia curta e sintetizando, a partir destes, butanoato e hexanoato de etila, importantes ésteres aromáticos (Albeijón Mukdsi et al., 2009).

Em estudos envolvendo a detecção de micro-organismos (com foco nas bactérias ácido lácticas) em queijos Minas artesanais, foram encontradas espécies de lactobacilos comumente associadas ao trato gastrointestinal humano. No trabalho de Lima et al. (2009), no qual a microbiota do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre de Minas Gerais foi avaliado, somente *L. plantarum* foi encontrado e em baixas proporções. Isso se deu, provavelmente, porque os métodos utilizados pelos autores não são os mais indicados para a identificação e caracterização de lactobacilos. Já Resende et al. (2011), avaliando a microbiota de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra de Minas Gerais, encontraram bactérias do gênero *Lactobacillus* (em maior prevalência que no trabalho citado anteriormente) das espécies *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Todas essas espécies, conforme previamente mencionado, fazem parte da microbiota intestinal subdominante de humanos adultos.

### **1.1.3. Salmonelose**

A salmonelose, uma enfermidade aguda, de distribuição mundial, apresenta-se como uma importante doença infecciosa com mais de 16 milhões de casos por ano, sendo que, aproximadamente, seis milhões desses evoluem para óbito. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ou *S. Typhimurium*) é uma bactéria patogênica, Gram negativo que, pela via oro-fecal, causa de uma a três das seguintes síndromes em camundongos de modo análogo ao que *S. Typhi* causa em humanos (exceto pela diarreia, que não é tão intensa e nem tão comum nas infecções por *S. Typhimurium*): febre entérica (tifoide), enterocolite (com diarreia) e/ou bacteremia (seguida ou não de septicemia); podendo, em alguns casos, ser fatal para o hospedeiro. A salmonela, ao atingir o intestino delgado do hospedeiro, adere e transloca

através do epitélio intestinal por três rotas: invasão ativa dos enterócitos, invasão das células M e por meio de células dendríticas (DC) ou macrófagos que intercalam as células epiteliais intestinais. A manifestação dos sinais clínicos e a gravidade da infecção dependem da susceptibilidade do hospedeiro (da situação do seu sistema imunológico) e da virulência do sorovar de *Salmonella* sp. infectante (Coburn et al., 2006).

*S. Typhimurium* se vale, em camundongos, da inflamação para exercer a sua patogênese. O experimento de Stecher et al. (2007) mostra isso de uma forma muito clara. Estes autores provaram que uma amostra de salmonela avirulenta consegue colonizar o intestino de camundongos que já possuem um processo de colite instalado (no caso, eles usaram um modelo de camundongo nocaute para expressão de IL-10 que desenvolve colite espontaneamente), assim como constataram que essa mesma salmonela não conseguia a mesma ação no modelo clássico de depleção da microbiota com estreptomicina (que normalmente favorece a virulência de *S. Typhimurium*). Dentre as hipóteses levantadas pelos autores do porque a inflamação favoreceria a colonização da *S. Typhimurium*, uma delas é a de que a secreção de substâncias antimicrobianas pelos enterócitos inflamados reduziria a população de micro-organismos que participam na manutenção da resistência à colonização. Stelter et al. (2011) também demonstraram como as salmonelas se aproveitam do estado inflamatório intestinal para favorecer a sua infectividade ao estimularem a secreção de uma lectina Reg-III $\beta$  pela mucosa intestinal, substância à qual elas são resistentes e muitos micro-organismos da microbiota residente não, reforçando assim os resultados apresentados por Stecher et al. (2007). Raffatelli et al. (2009) apontaram outro mecanismo do qual a *S. Typhimurium* se vale num ambiente de inflamação intestinal. Esse mecanismo envolve a lipocalina-2, um peptídeo liberado pelos enterócitos que evita a aquisição de ferro por diversos membros da microbiota, especialmente as enterobactérias, ao se ligar ao sideróforo enterobactina destas. A salmonela, todavia, possui também as salmoquelinas, um sideróforo resistente de lipocalina-2 que permite que o ferro seja aproveitado por este patógeno em um ambiente de estresse intestinal como a inflamação.

Além disso, *S. Typhimurium* ainda produz a bacteriocina colicina Ib que atua diretamente contra membros da família *Enterobacteriaceae*, favorecendo ainda mais sua vantagem competitiva no ambiente mencionado (Nedialkova et al., 2014). Adicionalmente, Winter et al. (2010) mostraram em seu trabalho mais um interessante mecanismo da *S. Typhimurium*: a sua habilidade de usar o tetrionato,

gerado a partir de tiosulfato endógeno pela ação de espécies reativas de oxigênio produzidas em resposta à infecção pela própria salmonela, como um acceptor final de elétrons para a respiração anaeróbica de uma forma que a maior parte da microbiota intestinal não é capaz.

O trabalho de Das et al. (2015), além de elucidar a importância da participação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , no estabelecimento da doença causada pela *S. Typhimurium*, explica detalhadamente como esse agente etiológico é capturado pelos macrófagos por meio dos receptores ELMO1 e Rac1 e desencadeia, a partir disso, a resposta inflamatória característica da doença. Os autores chegaram a essa conclusão ao observarem que macrófagos intestinais de animais nocaute para ELMO1 internalizavam uma quantidade menor de *S. Typhimurium*. A menor internalização desencadeava, por sua vez, uma reação inflamatória muito mais branda e uma translocação para fígado e baço significativamente menor, mostrando que sem a participação dessa proteína e sem a ativação da resposta pró-inflamatória, a infecção por salmonela não evolui. Nesse contexto, é interessante frisar que a invasão por salmonela é realizada por uma fração da população deste micro-organismo em uma infecção. A maior parte dessa população é responsável por manter um ambiente favorável à invasão, uma vez que a salmonela enfrentará um amplo arsenal bactericida intracelular a partir do momento que for internalizada para o tecido intestinal e outros tecidos para os quais eventualmente translocará (Santos et al., 2009).

#### **1.1.4. Ação probiótica contra *Salmonella Typhimurium***

O cientista russo Elie Metchnikoff, no início do século XX, introduziu a ideia de que a maior longevidade de camponeses búlgaros se devia ao hábito destes em consumir leites fermentados e ao consequente efeito benéfico que os micro-organismos presentes nesses produtos exerceriam. Sua teoria envolvia a redução de uma suposta intoxicação promovida pela microbiota intestinal dos seres humanos por meio da modulação desta pelas bactérias ácido lácticas do leite fermentado (Ceapa et al., 2013). Este efeito benéfico resultante da ingestão de bactérias vivas levou à criação do conceito de probiótico. Muitas definições para o conceito foram então formuladas até que se chegou à definição mais precisa e mundialmente aceita hoje, proposta pela FAO/WHO (2002): “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro”.

Os micro-organismos probióticos, depois de ingeridos, devem sobreviver às condições de estresse do trato gastrointestinal (quando destinados à utilização nesse sítio) como suco gástrico e enzimas gástricas, assim como sais biliares e enzimas intestinais. Dessa forma, mantêm-se viáveis e em quantidades desejáveis - população mínima de  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ml ou g - no seu local de ação específico - intestino delgado ou grosso - a fim de exercerem efeitos benéficos ao seu hospedeiro. Como os probióticos não são capazes de colonizar o trato digestivo de um indivíduo adulto saudável - mesmo após ingestão prolongada, uma vez que a microbiota residente, mesmo em desequilíbrio, não permite tal colonização - a ingestão diária de uma amostra de micro-organismo probiótico em quantidade adequada é indispensável para a manutenção de níveis elevados do micro-organismo na luz intestinal, permitindo assim que desenvolva o seu efeito benéfico. Para que isso ocorra, a concentração sugerida em células vivas do probiótico deve ser de pelo menos de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g ou ml de produto, pois as injúrias e as diluições promovidas pelos fluidos secretados na luz gastrointestinal reduzem, normalmente, em uma a duas escalas logarítmicas a concentração inicial ingerida de micro-organismos (Mohammadi e Mortazavian, 2011).

A ação destes micro-organismos com alegações probióticas tem uma série de mecanismos já estudados, sendo muitos deles elucidados. De acordo com Matsuguchi et al. (2003), a ação direta de lactobacilos probióticos no sistema imune é dada pela estimulação de macrófagos ao incremento da produção de TNF- $\alpha$ , aumentando assim a maturação de células dendríticas regulatórias, modulando, em especial, os processos alérgicos. No contexto de doenças infecciosas, amostras de lactobacilos e bifidobactérias foram capazes de otimizar a resposta de monócitos circulantes a *Candida albicans*, aumentando a expressão de citocinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) que favorecem a tolerância a esse patógeno simultaneamente ao controle da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias que exacerbariam a mencionada doença (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) (Plantiga et al., 2012). Outra ação dos probióticos em foco na atualidade é o efeito da sua administração na microbiota do consumidor, muitas vezes frente a estados de disbiose, como IBS (síndrome do intestino irritável) ou colite ulcerativa. Cha et al. (2012), em um estudo clínico com humanos sofrendo de IBS com diarreia, observaram que os pacientes que receberam probióticos (VSL#3, uma mistura de micro-organismos com conhecida ação probiótica) ao longo de dez semanas tiveram os seus sintomas melhorados em comparação com o grupo que recebeu placebo. Já Rautava et al. (2012), avaliando o efeito da administração de probióticos a gestantes duas semanas antes de parto eletivo

por cesariana, observaram a modulação da microbiota por um lactobacilo probiótico nos recém-nascidos assim como na placenta e líquido amniótico das mães, o que levou a um estado menos pró-inflamatório no soro das mães antes do parto. Outro estudo, realizado por Fichorova et al. (2011), também observou que certos micro-organismos presentes na placenta e no líquido amniótico levaram a um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, o que resultou em nascimento prematuro, confirmando que a modulação da microbiota da mãe e do seu feto por probióticos pode ser benéfica e muito importante para a saúde de ambos, especialmente a do bebê.

Um micro-organismo, para ser considerado probiótico, não deve ser patogênico; deve ser, de preferência, específico ao hospedeiro; estar, de preferência, viável e/ou estável em seu veículo, mantendo suas propriedades probióticas até a data final de validade do produto no qual é veiculado; e não ser capaz de transmitir genes de resistência a antimicrobianos a outros micro-organismos. Os micro-organismos probióticos são, preferencialmente, aqueles nativos ao consumidor alvo por serem assim mais compatíveis e com menor probabilidade de serem reconhecidos como antígenos pelo seu sistema imune (Nagpal et al., 2012). Além disso, existe uma exigência crescente pelas agências reguladoras de saúde e de alimentos e, até pelos consumidores, da eficácia comprovada em ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos, atestando o real potencial probiótico do micro-organismo pesquisado (Moal e Servin, 2014).

A utilização de micro-organismos probióticos tem atraído grande interesse na pesquisa de doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas. A maioria dos ensaios clínicos com esse enfoque tem como finalidade a prevenção e tratamento de doenças intestinais em adultos e crianças. Bactérias ácido lácticas têm demonstrado importantes efeitos contra os sintomas de doenças intestinais causadas por agentes patológicos ou por distúrbios na microbiota intestinal humana (Mohammadi e Mortazavian, 2011).

Amostras de lactobacilos probióticos têm sido eficazes na prevenção de doenças entéricas como as salmoneloses. A produção de substâncias antagonistas, a inibição da adesão ao epitélio, a manutenção da microbiota intestinal indígena e a modulação da imunidade inata e adaptativa são os principais mecanismos de ação dos probióticos no combate às patogenicidades entéricas. Os principais efeitos benéficos relacionados à modulação do sistema imune envolvem o aumento da produção de IgA secretória na luz intestinal – diminuindo assim a translocação da salmonela para linfonodos mesentéricos e, conseqüentemente, ao baço e fígado (LeBlanc et al., 2010); aumento do estímulo à fagocitose do patógeno – favorecendo a eliminação do patógeno, que se mantinha viável



intracelularmente no macrófago, impedindo mecanismos de lise e apoptose da célula infectada (Bermudez-Brito et al., 2012); modificação da expressão e produção de citocinas – reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias; como IL-6, e INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e aumentando níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ , mantendo, dessa forma, a integridade do epitélio intestinal (Castillo et al., 2011). O principal efeito benéfico não relacionado ao sistema imunológico é o antagonismo contra micro-organismos patogênicos, seja por competição por nutrientes, pelo efeito barreira contra a adesão e invasão do epitélio intestinal (Li et al., 2011) ou pela produção de substâncias antagonistas (como ácidos orgânicos, espécies reativas de oxigênio e bacteriocinas) (Hütt et al., 2006). Todos os efeitos mencionados anteriormente foram observados em experimentos com administração prévia de probióticos e infecção posterior por *S. Typhimurium* em modelo murino, evidenciando a importância do consumo diário e contínuo do micro-organismo probiótico em concentrações adequadas.

#### **1.1.5. Leites fermentados probióticos**

Uma importante forma de veiculação de *Lactobacillus* spp. probióticos é por meio de leites fermentados contendo micro-organismos do gênero, seja como a própria cultura fermentadora do leite ou como cultura probiótica adicionada ao produto final, como é o caso de iogurtes contendo micro-organismos probióticos que não necessariamente participam como cultura “starter”.

A utilização e divulgação de alimentos contendo micro-organismos probióticos teve destacado início no Japão, onde o FOSHU (“Foods For Specified Health Use”), um programa governamental, foi introduzido a fim de desvincular os alimentos funcionais dos produtos farmacêuticos e alopáticos. O FOSHU foi criado com o propósito de reduzir os gastos com saúde pública e conter, principalmente, o avanço de doenças crônico-degenerativas em idosos. Nesse contexto, o cientista Minoru Shirota, apoiado pelo presidente da Yakult, pôde colocar em prática sua máxima: “prevenir doenças mais do que tratá-las; um intestino saudável leva a uma vida longa” por meio da venda dos famosos leites fermentados que tem o primeiro nome do dono da empresa, Yakult Honsha. Um dos primordiais e mais famosos micro-organismos probióticos produtores de ácido láctico, *L. casei* Shirota, foi então apresentado comercialmente e conquistou um enorme sucesso que se mantém até a atualidade (Heasman e Mellentin, 2001). Os

micro-organismos mais frequentemente utilizados nos leites fermentados, atualmente, são as bactérias produtoras de ácido lático, as quais são encontradas em altos níveis populacionais no intestino do homem e de animais saudáveis e são consideradas pela “Food and Drug Administration” (FDA) como aquelas Geralmente Reconhecidas como Seguras - em tradução livre do termo “Generally Recognized as Safe” (GRAS). Fazem parte deste grupo, principalmente, espécies dos gêneros *Bifidobacterium* (que não pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas) – como *B. breve*, *B. bifidum*, *B. lactis* e *B. longum* – e *Lactobacillus* – como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, dentre outros utilizados menos frequentemente (Nagpal et al., 2012).

Diversos trabalhos avaliam o efeito protetor de lactobacilos veiculados por meio de leites fermentados, como Galdeano et al. (2015), que, frente à infecção por *S. Typhimurium*, observaram resposta protetora de uma amostra de *L. paracasei* em leite fermentado, sendo esta mediada pela o aumento na produção de IL-10 por macrófagos peritoneais e esplênicos. Resultado este que realça a importância da manutenção de um estado regulatório anti-inflamatório para a proteção frente ao patógeno mencionado, conforme já bem descrito em tópicos prévios. Essa resposta, de acordo com os autores, é mediada principalmente pela PRR TLR-2 e também, em alguma escala, pela TLR-4. Além disso, os autores mostraram que a expressão e liberação de IL-10 é dose dependente, sendo a dose mais eficaz  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml de leite fermentado.

No que diz respeito à legislação vigente no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) estipula que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa fornecedora do produto comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação de eficácia deve incluir laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade; teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares; quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo que deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação de funcionalidade.

A legislação ainda torna obrigatória a impressão do seguinte texto no rótulo dos referidos produtos: “O (indicar a espécie do micro-organismo probiótico) contribui para

o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. ”

Os micro-organismos *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* foram retirados da lista mostrada a seguir tendo em vista que, além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

A lista de micro-organismos probióticos prevista na legislação brasileira inclui: “*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus caseishirota*, *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* var. *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*. ”

O documento da ANVISA citado no texto foi publicado em 2008 e sofreu algumas atualizações desde então, porém, no que diz respeito aos probióticos, apresenta algumas informações desatualizadas principalmente no que diz respeito à taxonomia dos micro-organismos mencionados. *L. casei shirota* deveria ser *L. casei* Shirota ou shirota assim como *L. casei* var. *defensis* deveria ser *L. casei* Defensis ou defensis, visto que o último nome é uma denominação comercial (assim como o shirota) e não uma nomenclatura científica. *L. casei* var. *rhamnosus* é atualmente reconhecido como espécie *L. rhamnosus* (Pimentel, 2011). Além disso, outros micro-organismos com características probióticas comprovadas em estudos científicos e já citados no presente trabalho poderiam ter a sua inclusão considerada na lista como: *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus fermentum*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* e a levedura *Saccharomyces boulardii* (Migowski e Pugliese, 2009), sendo alguns desses inclusive já utilizados em produtos com alegações probióticas no Brasil.

## 2. JUSTIFICATIVA

Muita atenção tem sido dada aos efeitos benéficos vinculados ao consumo regular de produtos probióticos, principalmente no que diz respeito à manutenção de uma microbiota intestinal saudável e a consequente e desejável modulação do sistema imune. A utilização de micro-organismos que possuem eficácia comprovada é cada vez mais comum, especialmente quando são espécies pertencentes à microbiota, como é o caso dos lactobacilos. Estudos que documentam os benefícios dos probióticos têm

focalizado, dentre seus inúmeros benefícios, a prevenção e o tratamento de infecções gastrointestinais. Assim, evidências científicas comprovando o potencial dos probióticos na melhora da qualidade de vida de pessoas com distúrbios intestinais sustentam um tema promissor.

Atualmente, um dos principais veículos de micro-organismos probióticos são os derivados lácteos, como leites fermentados, iogurtes e queijos. Devido a algumas semelhanças entre as microbiotas do leite, seus derivados e aquela existente no trato gastrointestinal humano, pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando elucidar o potencial probiótico de micro-organismos isolados destes sítios. Essas pesquisas têm por objetivo desenvolver um produto não só com potencial probiótico, mas que também não apresente incompatibilidades tecnológicas com o derivado lácteo funcional a ser produzido e comercializado.

A salmonelose é um problema de saúde pública que representa um custo econômico e social significativo para muitos países, especialmente aqueles em desenvolvimento. Os transtornos causados por linhagens de *Salmonella* spp. resistentes a diversos antimicrobianos têm aumentado, tornando a sua erradicação cada vez mais complexa para a medicina. Um dos principais incentivos à pesquisa com probióticos é justamente compensar o crescente problema relacionado à antibioticoterapia, já que a sua utilização contribui para evitar a seleção de bactérias resistentes e, em muitos casos, previne a ação de agentes patogênicos, diminuindo a necessidade do emprego de antimicrobianos de última geração.

Nesse sentido, a criação de produtos com apelo probiótico contendo bactérias ácido lácticas isoladas de queijo Minas artesanal - como os lactobacilos – e veiculadas por meio de leites fermentados, apresenta-se como uma importante contribuição no enfrentamento do problema causado por doenças como a salmonelose, tendo em vista que essa é uma doença de relevância mundial entre os humanos e que o modelo murino, causado por *S. Typhimurium*, reproduz de forma fidedigna a doença humana causada por *S. Typhi*.

Além disso, as culturas probióticas hoje comercializadas no Brasil, especialmente aquelas para uso em alimentos funcionais, são comercializadas por empresas multinacionais que influenciam os preços, geralmente elevados, desses produtos. Então, a criação e desenvolvimento de culturas probióticas de origem brasileira apresenta-se como um importante fator de autonomia e equilíbrio nesse cenário

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra *in vitro* e *in vivo* em infecção experimental contra *S. Typhimurium* e produzir leites fermentados funcionais.

#### 3.2. Objetivos específicos

1 - Produzir leites fermentados contendo lactobacilos selecionados e compara-los por:

- a) análise sensorial após 15 dias (considerado uma validade de 30 dias para leites fermentados) de armazenamento sob refrigeração;
- b) viabilidade em outras apresentações comerciais, como a liofilização, durante três meses de armazenamento sob refrigeração.

2 - Avaliar a capacidade probiótica *in vitro* de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal.

3 - Avaliar a capacidade probiótica *in vivo* dos lactobacilos selecionados, em leite fermentado, determinando:

- a) a capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes e a manutenção do efeito antagonista após passagem pelo trato gastrointestinal;
- b) a taxa de mortalidade e o desenvolvimento ponderal em camundongos convencionais, tratados ou não com lactobacilos e desafiados com *Salmonella Typhimurium*;
- c) a intensidade da translocação da *Salmonella Typhimurium* para o baço e o fígado de camundongos isentos de germes convencionais, tratados ou não com lactobacilos e desafiado com o patógeno;
- d) a modulação das respostas inflamatórias (ou da regulação da inflamação) envolvidas no efeito protetor (ou não) local, no íleo, dos lactobacilos no modelo infeccioso estudado;

- e) a variação global da microbiota do fêto dos camundongos utilizados nos grupos experimentais anteriores, assim como a variação específica dos grupos: *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Typhimurium.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos isentos de germes e convencionais, de 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem SwissNIH (Taconic Farms, Germantown, EUA). Foram também utilizados camundongos da linhagem BALB/c, na condição de SPF (“specific pathogen free”), com a mesma idade e somente do sexo masculino. Os animais isentos de germes foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, EUA) e manuseados de acordo com técnicas já estabelecidas (Pleasant, 1974) e adaptadas às nossas condições (Silva, 1986). Os animais BALB/cconvencionais foram provenientes do Biotério Central da UFMG. Todos os animais convencionais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia (de nível NB2) em mini isoladores do modelo ALE.MIL.01.03 da marca Alesco (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil).

Os animais convencionais, durante a experimentação, receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água filtrada e foram mantidos em estante ventilada da marca Alesco com controle de umidade (60-80%), de temperatura (22-24°C) e com ciclo diurno/noturno de 12 horas. Para os experimentos com animais isentos de germes, os mesmos receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água, esterilizadas por calor úmido. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em mini isolador tipo II da marca UNO (Uno Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holanda) em estante ventilada da marca Alesco nas condições ambientais similares às dos animais convencionais.

#### **4.1.1. Manejo dos animais e aspecto ético**

A manutenção e a experimentação nos animais foram conduzidas respeitando as normas do “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006). A realização do presente trabalho de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 380/2013, com validade até 11/03/2019 (anexo 1).

#### **4.2. Micro-organismos**

##### **4.2.1. Lactobacilos**

As espécies de lactobacilos utilizadas neste estudo foram isoladas e caracterizadas no Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária (EV) da UFMG. Os lactobacilos foram isolados de queijo Minas artesanal do estado de Minas Gerais e identificadas por testes morfotintoriais e respiratórios seguidos de PCR ARDRA 16S-23S (Tannock et al., 1999) por Resende et al. (2011). As espécies de lactobacilos foram também pré-avaliadas quanto ao seu potencial probiótico *in vitro* por Costa et al. (2013) por meios dos testes de antagonismo contra micro-organismos patogênicos e não-patogênicos de referência pela técnica de difusão em camada dupla de ágar; susceptibilidade a antimicrobianos; sensibilidade ao suco gástrico e sais biliares. Dentre os micro-organismos isolados analisados, as amostras das seguintes espécies foram selecionadas: *Lactobacillus casei* B5, *Lactobacillus plantarum* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* B4 e D1. Como controle positivo, foi utilizada uma cultura conhecida probiótica da espécie *Lactobacillus paracasei* (identificada nesse trabalho com a sigla LP) isolada de um leite fermentado comercial. As culturas foram mantidas a -30°C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco, Detroit, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. As ativações foram feitas em caldo MRS, a 37°C, por 18 horas, em aerobiose. Após ativação, as culturas foram cultivadas em caldo MRS, a 37°C, por 18 horas, em aerobiose.

#### **4.2.2. Micro-organismos patogênicos**

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (*S. Typhimurium*), de origem humana, utilizada nas infecções experimentais nos camundongos, pertence ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM) do ICB/UFMG. As ativações foram feitas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia, Lasing, EUA), por 18 horas, a 37°C, em aerobiose.

### **4.3. Desenvolvimento de um produto funcional**

#### **4.3.1. Preparo do leite fermentado**

O leite em pó desnatado da marca Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil) foi reconstituído a 10% em água destilada, adicionado de sacarose a 10% e submetido a tratamento térmico a 121°C por 15 minutos. Os lactobacilos potencialmente probióticos foram então utilizados individualmente para a fermentação deste leite, sendo determinada a sua curva de fermentação por contagem de bactérias ácido-lácticas (UFC/ml) - em ágar MRS (Difco), incubadas a 37°C, em aerobiose, por 12 horas - em intervalos de seis horas, desde o tempo zero até a coagulação do leite.

Os lactobacilos utilizados individualmente para a fermentação do leite foram ativados duas vezes em 5ml de caldo MRS (Difco) a 37°C por 18 horas em aerobiose. Uma alíquota da cultura ativada (2%) foi então transferida para 700 ml de leite reconstituído e esterilizado, sendo em seguida incubado a 37°C, em aerobiose, por tempo necessário até a coagulação do leite, em geral 12 horas.

O leite fermentado foi então armazenado entre 4 e 7°C e foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas previstas no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados (Brasil, 2007). As análises físico-químicas realizadas foram: determinação de pH (com auxílio de pHmetro digital Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil) e determinação de acidez titulável (g/100g de ácido láctico, de acordo com IDF, 1991). As análises microbiológicas realizadas foram: enumeração (em triplicata) de micro-organismos ácido lácticos em ágar MRS (Acumedia) nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , após plaqueamento por “spread-plate” e incubação por 48 horas, 37°C, em aerobiose. Todas as análises foram realizadas em



triplicata nos dias um, sete e 15 de estocagem (adaptado de IDF, 1997). Também foram realizadas análises microbiológicas para avaliação da curva de crescimento dos lactobacilos a seis e 12 horas após adição do inóculo de lactobacilos em leite estéril, à semelhança do que foi descrito anteriormente.

#### **4.3.2. Análise sensorial do leite fermentado**

A avaliação sensorial dos leites fermentados individualmente por lactobacilos foi realizada por provadores não treinados e maiores de idade, como estudantes, professores e funcionários da UFMG, que tinham interesse e/ou hábito de consumir leite fermentado, de acordo com o realizado por Viegas et al. (2010). As amostras de leites fermentados aos 15 dias de estocagem, codificadas com sequências aleatórias de três dígitos, foram servidas aos provadores, dentro de cabines individuais, em porções de 30 ml em copos de plástico incolores a temperatura não superior a 10°C. Os provadores receberam ficha contendo escala hedônica de cinco pontos, na qual foi solicitada a expressão da opinião em termos de sabor de acordo com os seguintes critérios: 1 = Desgostei muito, 2 = Não gostei, 3 = Não gostei nem desgostei, 4 = Gostei, 5 = Gostei muito. Os provadores também foram solicitados a avaliar as amostras quanto à sua intenção de compra dos leites fermentados, indicando se comprariam ou não cada um dos produtos avaliados. Além disso, foi colocado um espaço para observações ao lado de cada uma das amostras que era de preenchimento opcional. A realização das análises sensoriais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob o número de parecer 551.074 (anexo 2).

#### **4.3.3. Liofilização dos lactobacilos em matriz láctea**

A técnica de liofilização utilizada foi adaptada do trabalho de Bolla et al. (2010). Cada cultura individual de lactobacilo duplamente ativada em 5ml de caldo MRS (Difco) foi centrifugada em tubo cônico plástico estéril por 10.000g por 10 minutos. Cada amostra foi lavada duas vezes com solução salina (NaCl 0,9%). Os precipitados foram então suspensos em 1ml de leite desnatado estéril (Skim milk, Difco) a 10%. As suspensões microbianas foram individualmente transferidas para frascos de vidro estéreis que foram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, desidratados em liofilizador (modelo K105, Liotop, Brasil) por 24 horas a uma

temperatura de -98°C e pressão de 10 mmHg. Finalizado o processo de liofilização, os frascos foram selados com tampa de borracha e lacre de alumínio. As amostras foram então armazenadas sob refrigeração entre 4 e 7°C. A viabilidade das culturas foi mensurada logo antes e logo depois da liofilização e, mensalmente, ao longo de três meses em armazenamento sob refrigeração. As contagens foram realizadas em triplicata, em ágar MRS (Acumedia) (nas diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) após plaqueamento em “spread-plate” e incubação por 48 horas, 37°C, em aerobiose.

#### **4.4. Ação probiótica frente à infecção por *S. Typhimurium***

##### **4.4.1. Antagonismo *in vitro* contra *S. Typhimurium***

As análises realizadas por Costa et al. (2013) contemplaram o antagonismo a patógenos de referência pela técnica de difusão em camada dupla de ágar proposta por Tagg et al. (1976). A fim de elucidar os mecanismos pelos quais os lactobacilos exercem antagonismo contra a amostra de salmonela utilizada para os testes *in vivo*, outros testes foram realizados.

O teste de atividade antimicrobiana dos lactobacilos contra salmonelas conhecido como teste de co-cultivo foi realizado para avaliar a capacidade de antagonismo direto da cultura produtora contra cultura reveladora. Diferentemente da técnica de difusão em camada dupla de ágar, na qual somente o antagonismo por substâncias produzidas pela cultura produtora contra culturas reveladoras pode ser observado, o método em questão, proposto por Hütt et al. (2006), consiste em cultivar as amostras de lactobacilos e salmonela previamente ativadas (caldo MRS - Difco, para lactobacilos, 24 horas, e BHI - Acumedia, para salmonela, a 37°C, 24 horas, em aerobiose), em inóculos de 1%, em caldos MRS e BHI por 18 horas. Após esse período, alíquotas de 100 µl das diluições seriadas de cada produto de co-cultivo são semeadas por técnica de “spread plate” em ágar MacConkey (Acumedia) e incubam-se as placas por 24 horas, a 37°C, em aerobiose. O resultado dessa incubação foi então comparado com o resultado do crescimento controle da salmonela que não foi submetida ao co-cultivo com as culturas produtoras de lactobacilos.

O teste de antagonismo pelo sobrenadante das culturas, também proposto por Hütt et al. (2006), visou avaliar a importância de substâncias produzidas pelas culturas de lactobacilos no antagonismo contra patógenos. Esse teste consistiu na centrifugação

(5.000g por cinco minutos) de uma cultura duplamente ativada, coleta do líquido sobrenadante e esterilização por filtração em 0,22µm utilizando filtros Millex (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). O micro-organismo revelador (*S. Typhimurium*) foi adicionado em um inóculo de 1% (após dupla ativação) a esse sobrenadante e incubado por 18 horas. Suas diluições seriadas foram semeadas (por “spread-plate” em alíquotas de 100 µl) em ágar MacConkey (Acumedia) e as placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C, em aerobiose. Os sobrenadantes dos cultivos de lactobacilos foram produzidos em meio neutro BHI, Acumedia), à semelhança da metodologia executada em meio MRS (Difco), para avaliara influência do ácido no antagonismo dos lactobacilos contra salmonela. Tal tipo de avaliação não é possível ser realizada no antagonismo pelo teste de difusão em camada dupla de ágar. Os experimentos foram realizados em duas repetições e cada uma delas em triplicata.

#### **4.4.2. Experimentação *in vivo***

##### **Delineamento experimental**

Animais BALB/c convencionais (machos, 3-4 semanas de vida)

1. Sacrifício (por deslocamento cervical) no dia zero dos animais controle para a sua utilização em todos os experimentos abaixo citados;
2. Tratamento diário (intragástrico) com leite fermentado (por amostras de *Lactobacillus*) diário ( $10^8$  UFC) – dia um ao dia sete;
3. Sacrifício (por deslocamento cervical) nos dias três e sete para análises citadas nos itens 8, 9 e 10 abaixo citados;
4. Infecção intragástrica com *S. Typhimurium* ( $10^6$  UFC) – dia sete;
5. Tratamento diário (intragástrico) com leite fermentado (por amostras de *Lactobacillus*) diário ( $10^8$  UFC) – dia oito até o final do experimento;
6. Sacrifício (por deslocamento cervical) nos diastreze (cinco dias de desafio) e quinze (sete dias de desafio) para as análises dos itens 7, 8, 9 e 10;
7. Avaliação da translocação para baço e fígado;
8. Avaliação qualitativa e quantitativa de histologia do fígado e íleo (em rocambole);
9. Avaliação da expressão relativa (mRNA) das citocinas no íleo por qPCR;

10. Avaliação da microbiota do conteúdo do íleo por métodos de sequenciamento de nova geração (Illumina MiSeq) do DNA total das fezes;
11. Avaliação da mortalidade – dos dias oito ao 28;
12. Avaliação do desenvolvimento ponderal – dos dias oito ao quinze.

Animais Swiss NIH isentos de germes (machos, 3-4 semanas de vida)

1. Sacrifício (por deslocamento cervical) no dia zero dos animais controle para a sua utilização em todos os experimentos abaixo citados;
2. Monoassociação (intragástrica) com leite fermentado (por amostras de *Lactobacillus*) ( $10^8$  UFC) nodia um;
3. Sacrifício (por deslocamento cervical) no diaseis para análises citadas nos itens 4, 8 e 9 abaixo citados;
4. Acompanhamento da eficiência da monocolonização e do antagonismo ex-vivo;
5. Infecção intragástrica com *S. Typhimurium* ( $10^5$  UFC) – dia sete;
6. Sacrifício (por deslocamento cervical) nos dias doze (quatro dias de desafio), treze (cinco dias de desafio) e quatorze (seis dias de desafio) para avaliação para análises citadas nos itens 7, 8, 9 e 10 abaixo citados;
7. Avaliação da translocação para baço e fígado;
8. Avaliação qualitativa e quantitativa de histologia do fígado e íleo (em rocambole);
9. Avaliação da expressão relativa (mRNA) das citocinas no íleo por qPCR;

#### **4.4.2.1. Tratamento dos animais convencionais, capacidade de monoassociação dos lactobacilos em animais isentos de germese antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium***

Os animais convencionais (da linhagem BALB/c) receberam inóculo diário de 0,1ml do leite fermentado de cada lactobacilo contendo  $10^9$  UFC/ml e os animais do grupo controle receberam 0,1ml de leite estéril não fermentado, via intragástrica (por gavagem), desde sete dias antes do desafio com a bactéria patogênica e até o final do período experimental (Martins et al., 2010).

Os animais isentos de germes (Swiss NIH) receberam inóculo único de 0,1ml do leite fermentado de cada lactobacilo contendo  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por ml. O sucesso da monoassociação foi avaliado pela determinação do nível populacional dos lactobacilos nas fezes dos camundongos cinco dias após a monoassociação. As fezes foram colhidas por estimulação anal, pesadas e submetidas a diluições decimais em salina peptonada (NaCl 0,9%; Peptona Bacteriológica 0,1%) esterilizada. As diluições selecionadas foram semeadas (alíquotas de 100 $\mu$ l) em ágar MRS (Acumedia) para enumeração bacteriana, por “spread plate”, sendo as placas incubadas em aerobiose, a 37°C, por até 48 horas. Os resultados foram expressos como média do  $\log_{10}$  do número de UFC por grama de fezes de três animais de cada grupo experimental (Martins et al., 2010).

Todos os experimentos, exceto o de mortalidade, desenvolvimento ponderal e translocação, tiveram um grupo somente tratado com (ou monoassociado a partir de) leite fermentado pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) por sete dias, para avaliação do efeito isolado da administração de cada um destes micro-organismos potencialmente probióticos nos diversos experimentos *in vivo*. Os experimentos de microbiota contaram com um grupo experimental para cada lactobacilo testado que recebeu somente por três dias o leite fermentado, a fim de se avaliar um possível efeito precoce da administração destes micro-organismos. O número de animais para cada grupo citado acima foi de três.

O antagonismo *ex vivo* foi realizado com as fezes dos animais monoassociados de acordo com o proposto por Alvim et al. (2016). Uma amostra de fezes (com aproximadamente 50mg de fezes) de cada um dos animais foi inserida individualmente no centro da gelose de uma placa com ágar MRS (Acumedia). As placas com as fezes foram incubadas a 4°C durante 24 horas para que as substâncias pudessem se difundir no ágar não permitindo o crescimento exagerado dos lactobacilos. Após esse período, as fezes foram tratadas com vapor de clorofórmio por 30 minutos para eliminar qualquer micro-organismo das fezes e da superfície do ágar. Um cultivo recente de *S. Typhimurium* foi então vertido sobre a superfície do ágar em meio BHI (Acumedia) semissólido (0,75%) contendo  $10^6$  UFC (em alíquota de 10 $\mu$ l em 4 ml de meio semissólido). As placas foram então incubadas a 37°C, por 24 horas, em aerobiose e, ao final desse período, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo (São Paulo, Brasil). Os experimentos foram realizados em duas repetições.

#### **4.4.2.2. Desafio com *S. Typhimurium***

O inóculo de *S. Typhimurium* foi feito a partir de uma cultura crescida em caldo BHI por 18 horas a 37°C, submetida ou não a diluições sucessivas em salina tamponada esterilizada, sendo a concentração alcançada  $10^8$  UFC/ml. Os animais dos grupos controle e experimentais receberam, no dia do desafio, um inóculo de 0,1 ml contendo  $10^6$  (BALB/c) ou  $10^5$  (isentos de germes) UFC, por via intragástrica. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas das fezes dos animais foram feitas em ágar MacConkey (Acumedia) após até 24 horas de incubação a 37°C, em aerobiose (Martins et al., 2010).

Os grupos experimentais tiveram três animais por grupo, exceto nos experimentos de mortalidade e desenvolvimento ponderal, que tiveram 12 animais por grupo. Os desafios consistiram de uma dose única do patógeno, sendo os efeitos da doença, com ou sem tratamento prévio de leites fermentados por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal, avaliados, para animais convencionais BALB/c, cinco ou sete dias após o início da infecção. Para os animais Swiss NIH isentos de germes, essa avaliação foi realizada nos dias quatro, cinco e seis após o início da infecção.

Os inóculos e tempos de avaliação do efeito da doença após desafio foram diferentes para animais convencionais e isentos de germes devido à experiência do nosso grupo com esses distintos modelos experimentais, onde a doença se manifesta de forma mais intensa e aguda nos animais isentos de germe quando comparados aos animais convencionais (Mendonça et al., 2014).

#### **4.4.2.3. Determinação da mortalidade e acompanhamento do desenvolvimento ponderal em decorrência da infecção experimental por *S. Typhimurium* em camundongos convencionais previamente tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal**

Os lactobacilos foram testados quanto à sua capacidade de proteger camundongos convencionais em desafio experimental contra *S. Typhimurium*. A mortalidade devido à inóculos intragástricos de *S. Typhimurium* foi determinada em animais convencionais desafiados no sétimo dia após o tratamento com leites fermentados (individualmente por cada uma das amostras de lactobacilos). Cada grupo

foi constituído de 12 animais e o desenvolvimento ponderal entre o primeiro e o sétimo dia pós-desafio também foi avaliado (Silva et al., 2004).

#### **4.4.2.4. Determinação da translocação de *S. Typhimurium* em animais isentos de germes monoassociados ou não e em animais convencionais tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal ou não**

Amostras de baço e fígado foram pesadas e submetidas a diluições decimais em salina peptonada esterilizada. Alíquotas de 0,1ml das diluições selecionadas foram semeadas em ágar MacConkey (Acumedia) e as placas foram incubadas por até 24 horas de incubação a 37°C, em aerobiose, para enumeração de *S. Typhimurium* nos dias quatro, cinco e seis após o desafio com *S. Typhimurium*. Os resultados foram expressos como média do log<sub>10</sub> do número de UFC por grama de fezes de três animais de cada grupo experimental (Martins et al., 2007).

Protocolo semelhante foi executado com os animais convencionais. Porém, os animais machos BALB/c receberam leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) diariamente, sete dias antes do desafio e nos dias subsequentes ao desafio, que foram cinco e sete neste modelo experimental.

#### **4.4.2.5. Avaliação histológica do íleo e fígado de animais isentos de germes monoassociados ou não, animais convencionais tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal ou não e desafiados com *S. Typhimurium* ou não**

Amostras do fígado e do íleo (em “rocambolé”) dos camundongos convencionais isentos de germes experimentais e controles (positivo e negativo) foram submetidas a um exame histológico. Os camundongos pertencentes a cada um dos grupos foram sacrificados por deslocamento cervical no dia cinco após o desafio com *S. Typhimurium* em animais isentos de germe e em camundongos BALB/c convencionais. As amostras foram fixadas em formaldeído 4% tamponado e processadas para inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de 3 a 5 µm de espessura e os fragmentos assim obtidos foram corados em hematoxilina-eosina (HE). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente por um mesmo patologista do laboratório do Prof. Geovanni Cassali Datas, do Laboratório de Patologia

Comparada (LPC), do Departamento de Patologia Geral (DPG) do ICB (UFMG), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pelo patologista (Gulbinowicz et al., 2004).

Análises quantitativas também foram realizadas. A morfometria foi avaliada por meio da medição da altura de 30 vilosidades em três campos no aumento 10x de cada animal de cada grupo, totalizando nove campos por animal, por grupo experimental (totalizando ao menos 180 medições por grupo), de acordo com o proposto por Gulbinowicz et al. (2004). No fígado, os focos inflamatórios foram contados em dez campos de cada animal, totalizando ao menos 30 campos por grupo. Focos inflamatórios são definidos como: acúmulos de células inflamatórias em número maior que dez acompanhados ou não de alterações necróticas no parênquima (Mendonça et al., 2014).

#### **4.4.2.6. Avaliação das citocinas, por meio da expressão relativa de mRNA em qPCR, envolvidas no efeito protetor local (íleo) por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal em uma infecção por *S. Typhimurium***

Fragmentos proximais, mediais e distais do intestino delgado dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coletados imediatamente após a eutanásia e foram armazenados em RNAlater (Ambion, Austin, TX, EUA), na proporção de 1:5, em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração de RNA e análise por qPCR.

A extração do RNA total seguiu o protocolo de Steinberg et al. (2014). As amostras de tecido foram lavadas com água ultrapura Milli-Q® (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para remoção do RNAlater e em seguida, homogeneizadas a 500µl de trizol com auxílio de um “ultra-turrax” T10 (IKA, Guangzhou, China). As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e adicionadas de 100µl de clorofórmio P.A. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e agitadas em “vortex” até que fosse formada uma única e homogênea fase. As amostras foram então centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante contendo o RNA foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo microtubo. O sobrenadante coletado foi então adicionado de 250µl de isopropanol (2-propanol) de alta pureza (Sigma-Aldrich) seguido de incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Nova centrifugação foi executada, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e adicionado de 500µl de etanol 70% (solução com EtOH absoluto, Sigma-Aldrich, e água para biologia molecular, Sigma-Aldrich) ao “pellet” mantido ao fundo do



microtubo. Novas homogeneização e centrifugação foram conduzidas, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram mantidos abertos em estufa a 37°C para secagem de qualquer resíduo de etanol. Por fim, as amostras foram suspensas em 50µl com água ultrapura (Sigma-Aldrich) e mantidas a 60°C por 30 minutos para melhorar a homogeneização da amostra, que foi armazenada em seguida a -20°C.

O RNA total foi então tratado para remoção de DNA com o kit “DNase Turbo® I” (Ambion) na proporção de 1µg de RNA para 1 unidade da enzima em um volume final de 50µl. As amostras foram incubadas a 37°C em termociclador “Veriti® 96 Well Thermal Cycler” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) por 30 minutos, seguido de inativação da DNase com 2µl de solução de 15mM de EDTA e incubação, também em termociclador, a 75°C por 10 minutos. As amostras foram então ajustadas com água ultrapura (Sigma-Aldrich) para que fosse mantida a concentração de 100µg/µl e armazenadas a -20°C.

O cDNA das amostras foi produzido com o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). A quantidade de RNA utilizada foi de 1µg em uma solução de volume final de 20µl (2µl de Tampão 10x fornecido pelo fabricante, 0,8µl de mix de dNTPs 25x a 100mM, 2µl de iniciadores Aleatórios 10x, 1µl de Transcriptase reversa a 1UI/µl, 4,2µl de água para biologia molecular e 10µl de amostra). As amostras foram incubadas em termociclador com o seguinte programa: 25°C, 10 minutos – 37°C, 120 minutos (90 minutos + 30 minutos) – 85°C, 5 minutos. Por fim, 20µl de água ultrapura (Sigma-Aldrich) foram adicionadas às amostras, sendo armazenadas a -20°C.

A avaliação da quantidade relativa da expressão gênica das citocinas IL-6, IL-10, IFN-γ, TGF-β e TNF-α; a partir dos cDNA obtidos das amostras foi realizada com o kit “Quantitect SYBR® Green PCR” da Qiagen (Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante em um “ABI Prism®7900 HT Sequencing Detection System” (Applied Biosystems). Os iniciadores para detecção dos genes das citocinas mencionadas, assim como para os genes constitutivos de referência GAPDH e β-Actin, foram estabelecidos por Giulietti et al. (2001) e estão especificados na tabela 1.

**Tabela 1. Sequências de iniciadores para citocinas murinas e outros fatores relacionados ao sistema imune**

<b>Alvo</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
<b>IL-6</b>	FW GAGGATACCACTCCCAACAGACC	141
	RV AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	
<b>IL-10</b>	FW GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	191
	RV ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	FW TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	92
	RV TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FW CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	175
	RV TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	FW TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	170
	RV GGTTTCATGTCATGGATGGTGC	
<b>GAPDH</b>	FW TCACCACCATGGAGAAGGC	168
	RV GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	
<b><math>\beta</math>-actin</b>	FW AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	138
	RV CAATAGTGATGACCTGGCCGT	

#### **4.4.2.7. Análises da variação da microbiota do íleo de camundongos convencionais, nos diferentes grupos experimentais, por meio de metodologias de sequenciamento de nova geração e de quantificação por meio de qPCR**

Toda a análise (teórica e prática) do sequenciamento de nova geração foi desenvolvida em parceria com o laboratório de microbiologia aplicada ENdEMIC da Universidade da Antuérpia (UA), sob supervisão da Professora Sarah Lebeer e com auxílio dos alunos de doutorado Eline Oerlemans, Sander Wuyts e Wenke Smets. Essa análise foi possível graças a esforços conjuntos da equipe mencionada e do financiamento do meu doutorado sanduíche pela agência de fomento FAPEMIG, realizado em 2015 com duração de três meses. Agradecemos, mais uma vez, a todos os envolvidos que possibilitaram essa iniciativa.

As análises da microbiota do íleo foram realizadas com o DNA total extraído por meio do kit “Power Soil<sup>®</sup> DNA Isolation” (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA). A plataforma selecionada foi a MiSeq da Illumina<sup>®</sup> (San Diego, CA, EUA), em que a região V4 do gene 16S rRNA foi avaliada, gerando produtos de 250bp. Inicialmente, foi

feita uma reação de PCR 16S convencional usando “Phusion<sup>®</sup> High Fidelity DNA Polimerase” (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), garantindo uma amplificação de alta fidelidade, e também iniciadores modelados especificamente para os adaptadores do kit Illumina<sup>®</sup>, conforme pode ser conferido na tabela 2 (de acordo com Kozich et al., 2013). A eficiência da reação foi confirmada em corrida em gel de agarose a 1%. As amostras foram então purificadas e normalizadas com o kit “SequalPrep<sup>®</sup> Normalization Plate” (Invitrogen, ThermoFischer) de acordo com as recomendações do fabricante. Um “pool” de todas as amostras foi corrido em gel de agarose 1% e, após aparecimento de banda com 250bp, a banda foi cortada e purificada com o kit “NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-Up” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). A quantidade de produto amplificado (em ng/ml) foi medida com auxílio de um “QuBit<sup>®</sup> 3.0 Fluorometer” (Invitrogen, ThermoFischer) e a amostra foi então padronizada para uma solução final a 2nmol. A avaliação da eficácia da reação foi verificada com diluições (1:10.000 e 1:100.000) da amostra final e diluições de outras reações que já foram realizadas com sucesso na plataforma MiSeq da Illumina<sup>®</sup> por meio do kit “Kapa Library Quantification for NGS”, de acordo com instruções do fabricante. Por fim, as amostras foram carregadas para leitura no MiSeq da Illumina<sup>®</sup> utilizando o kit “MiSeq Reagent V2” (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Os dados obtidos foram analisados com o software Mothur de acordo com o tutorial disponibilizado pela própria equipe que desenvolveu o software em [http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP). Análises complementares e subsequentes foram realizadas no software livre R (disponível em <https://www.r-project.org/>) com “script” pertencente ao laboratório ENdEMIC da Universidade da Antuérpia, Bélgica, desenvolvido pelo estudante de doutorado Sander Wuyts, ao qual somos especialmente gratos.

**Tabela 2. Iniciadores para sequenciamento de nova geração da plataforma MiSeq Illumina<sup>®</sup>, consistindo do adaptador para a plataforma, uma sequência índice (“index”) de 8-nt, uma sequência “pad” de 10-nt e um par nt “link”, além do iniciador específico ao gene**

<b>Função</b>	<b>Sequência</b>
<b>Adaptador Fw (região V4)</b>	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
<b>Adaptador Rv (região V4)</b>	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
<b>Pad Fw</b>	TATGGTAATT
<b>Pad Rv</b>	AGTCAGTCAG
<b>Link Fw (V4)</b>	GT
<b>Link Rv (V4)</b>	CC
<b>Iniciadores i5 Fw utilizados</b>	
SA501	ATCGTACG
SA502	ACTATCTG
SA503	TAGCGAGT
SA504	CTGCGTGT
SA505	TCATCGAG
SA506	CGTGAGTG
SA507	GGATATCT
SA508	GACACCGT
SB501	CTACTATA
SB502	CGTTACTA
SB503	AGAGTCAC
SB504	TACGAGAC
SB505	ACGTCTCG
SB506	TCGACGAG
SB507	GATCGTGT
SB508	GTCAGATA
<b>Iniciadores i7 Rv utilizados</b>	
SA701	AACTCTCG
SA702	ACTATGTC

SA703	AGTAGCGT
SA704	CAGTGAGT
SA705	CGTACTCA
SA706	CTACGCAG
SA707	GGAGACTA
SA708	GTCGCTCG
SA709	GTCGTAGT
SA710	TAGCAGAC
SA711	TCATAGAC
SA712	TCGCTATA

A quantificação por meio de qPCR foi realizada de acordo com o proposto por Rinttilä et al. (2004) e Barman et al. (2007). Inicialmente, foi feita a extração do DNA total do conteúdo do íleo dos camundongos convencionais com o kit “QIAmp DNA stool Mini” (Qiagen). O DNA total de cada amostra foi quantificado com o “NanoDrop 2000” (ThermoFisher). A extração do padrão de referência de uma amostra de *L. rhamnosus* D1 e da *S. Typhimurium* foi realizado com auxílio do kit “Wizard® Genomic DNA Purification” (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Ambas amostras foram ativadas e quantificadas (UFC/ml) conforme metodologias descritas anteriormente. As amostras de DNA total foram padronizadas para cinco, sete ou 10ng/μl e as referências foram padronizadas em diluições decimais a partir de uma solução inicial contendo 10ng. Estas escolhas foram baseadas nas quantificações encontradas nas amostras e na eficiência relatada pelos autores que descreveram o protocolo, no qual, em concentrações acima de 10ng, começa-se a perder a eficiência da reação. As análises foram realizadas com o “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega Corporation), de acordo com as instruções do fabricante, em um “ABI Prism® 7900 HT Sequencing Detection System” (Applied Biosystems) com os iniciadores descritos na tabela 3. Os resultados foram ajustados de acordo com o “Cycle threshold” (Ct) encontrado para cada amostra, quantificando o UFC de acordo com a quantidade (ng) colocado na placa e a sua equivalência de acordo com a curva padrão. A curva padrão foi feita a partir do número de cópias correspondentes a cada ng da amostra padrão e a relação desta com o Ct encontrado para cada diluição aplicada na placa.

**Tabela 3. Iniciadores específicos para grupos de interesse do conteúdo intestinal de camundongos convencionais para DNA 16S bacteriano**

<b>Grupo Alvo</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
<i>Lactobacillus sp.</i>	Fw: AGCAGTAGGGAATCTTCCA Rv: CACCGCTACACATGGAG
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Fw: TGTTGTGGTTAATAACCGCA Rv: GACTACCAGGGTATCTAATCC

#### **4.5. Análises estatísticas**

O programa “GraphPad Prism 6.0” (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas:

A maioria das comparações das médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, em nível de significância mínimo de 5% (0,05).

Outras análises estatísticas foram realizadas com os resultados obtidos e incluíram: teste Chi-quadrado, para avaliação da aceitação dos leites fermentados pelas diferentes amostras de lactobacilos em análise sensorial; teste Gehan-Breslow-Wilcoxon (Mantel-Cox) para a comparação das curvas de sobrevivência dos animais tratados com leite fermentado por cada uma das amostras de lactobacilos ou não e desafiados com *S. Typhimurium*; teste Two-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, para avaliação dos testes de antagonismo *in vitro* e também do desenvolvimento ponderal ao primeiro e sétimo dia pós-desafio dos grupos citados; teste exato de Fisher para comparação entre a frequência de infiltrados inflamatórios nos fígados dos diversos grupos experimentais de camundongos convencionais e isentos de germes; teste One-way ANOVA, com pós-teste de Sidak, para comparação das citocinas dos grupos convencionais somente com seus semelhantes isentos de germes para todas as citocinas testadas e mensuradas; e teste Metastats para comparação da abundância dos OTUs na avaliação do microbioma do íleo dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

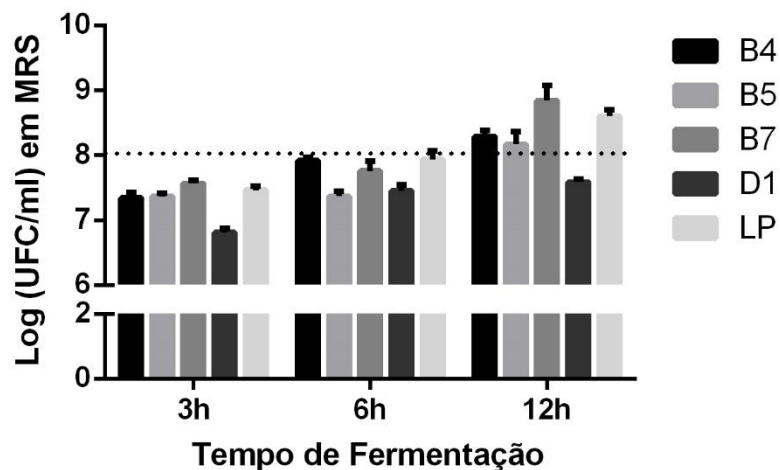
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Desenvolvimento de um produto funcional**

#### **5.1.1. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite fermentado durante seu armazenamento**

Antes do preparo dos leites fermentados, os lotes de leite em pó utilizados foram avaliados quanto aos seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos e não apresentaram, em nenhuma das análises, resultados fora do recomendado e imposto pela legislação vigente (Brasil, 1996). Situação semelhante foi observada para os leites fermentados produzidos, que mantiveram-se dentro do padrão ideal de qualidade de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2007) (dados não mostrados).

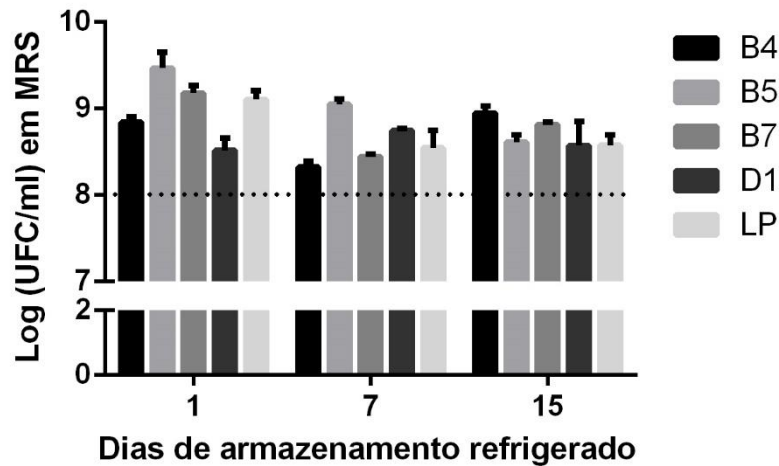
A curva de crescimento dos micro-organismos em leite estéril adicionado de 10% de sacarose mostrou que, ao final de 12 horas, todos atingiram valores superiores (exceto pela amostra D1, que atingiu valor próximo, porém não superior) a  $10^8$  UFC/ml (como pode ser visto na figura 1) o que é desejável para um produto com apelo funcional, segundo a legislação vigente (mencionada acima) e artigos de referência (Hill et al., 2014) sobre micro-organismos probióticos.



**Figura 1. Contagem média de micro-organismos em leite estéril com 10% de sacarose incubados a 37°C.** B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=3).

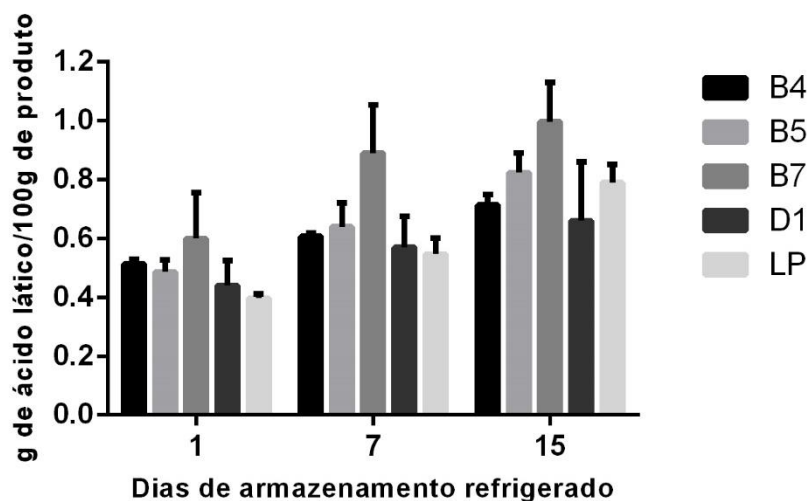
A contagem de lactobacilos viáveis durante o armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C) também foi avaliada para verificar a capacidade dos micro-organismos testados em se manter viáveis ao longo de 15 dias. A figura 2 mostra como os lactobacilos, em sua totalidade, mantiveram-se viáveis e em concentrações adequadas durante todo o período experimental.





**Figura 2.** Contagem média de micro-organismos em leite estéril com 10% de sacarose, após fermentação por 12 horas, ao longo do seu armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C). B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=3).

A acidez titulável também foi mensurada ao longo do armazenamento, a fim de se avaliar a pós-acidificação causada pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e também do controle positivo (*L. paracasei*) em matriz láctea. Os resultados podem ser observados na figura 3.



**Figura 3.** Acidez titulável média dos leites fermentados por 12 horas por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal em leite estéril com 10% de sacarose ao longo do seu armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C). B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=3).

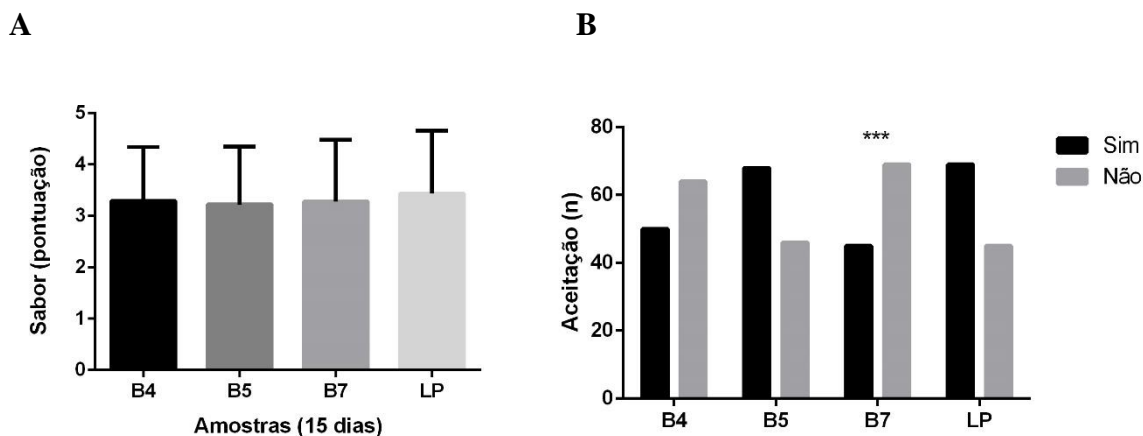
Os resultados físico-químicos e microbiológicos da avaliação do leite fermentado mostram que, conforme esperado, os micro-organismos se comportaram adequadamente em uma matriz láctea, visto que foram isolados de queijo Minas artesanal.

Os ensaios microbiológicos mostraram que os lactobacilos se mantiveram em concentrações adequadas e desejáveis para sua utilização como probióticos em alimentos funcionais de matriz láctea. Um painel de especialistas em probióticos reuniu-se em 2013 para atualizar as definições acerca do tema e estabeleceu que a dose diária de  $10^9$  UFC de micro-organismos viáveis é a recomendada para um produto com alegações funcionais (Hill et al., 2014). Os leites fermentados são geralmente comercializados em doses de 100 ml, o que conferiria, no caso de um hipotético produto com nossos lactobacilos, uma dose de  $10^9$ - $10^{10}$  UFC por dia, em concordância com o proposto pelo painel de especialistas supracitado.

Os ensaios físico-químicos mostram uma pós-acidificação elevada, mas ainda dentro de margens aceitáveis e acompanhando o controle positivo utilizado, um lactobacilo conhecidamente probiótico isolado de um leite fermentado funcional. Essa pós-acidificação pode ser justificada pela manutenção da viabilidade (em contagens acima de  $10^8$  UFC/ml) das amostras, em leite fermentado, sob armazenamento refrigerado (figura 2). O trabalho de Mendes et al. (2014) mostrou uma pós-acidificação por lactobacilos em uma matriz láctea (sob refrigeração, durante 15 dias) com valores de acidez titulável próximos de 0,7g por 100g de produto. Já o trabalho de Gueimonde et al. (2004) avaliou a acidez titulável de leites fermentados comerciais contendo *L. casei* ou *L. johnsonii* e encontrou valores entre 0,79 e 1,15g por 100g de produto. Dessa forma, pode-se inferir que a maioria das amostras apresentou-se em uma faixa de pós-acidificação próxima ao que é encontrado na literatura, além do fato de que estão dentro da faixa pré-determinada pela legislação vigente (Brasil, 2007), que preconiza que os leites fermentados apresentem de 0,6 e 2,0g de ácido láctico por 100 g de produto.

### 5.1.2. Análise sensorial dos leites fermentados

Os resultados da primeira análise sensorial realizada com leites fermentados armazenados durante 15 dias sob refrigeração (4 a 7°C) podem ser observados na figura 4.

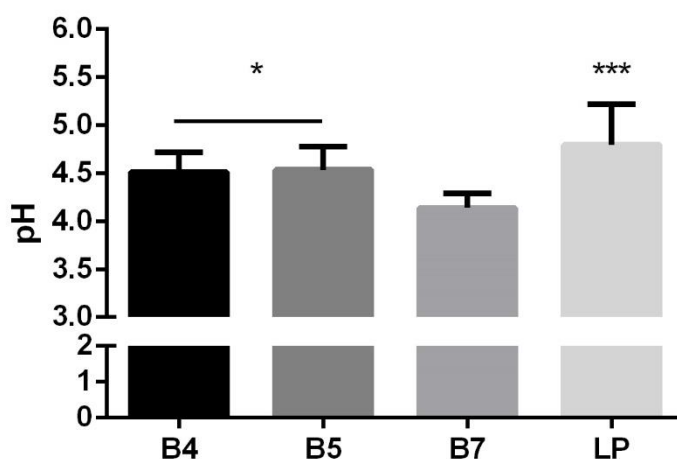


**Figura 4. Pontuação média obtida em escala hedônica (1-5) avaliando o sabor (A) e grau de aceitação (B) de leites fermentados (12 horas) e armazenados sob refrigeração por 15 dias. B4: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo). \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Teste: Chi-quadrado ( $n = 114$ ).**

Os resultados observados na análise sensorial com 15 dias de armazenamento mostraram uma similaridade ( $p > 0,05$ ) entre as amostras no que diz respeito à avaliação de sabor dos produtos apresentados a 114 provadores leigos. As amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal, nas condições experimentais do presente trabalho, equipararam-se ao controle positivo, um lactobacilo isolado de um leite fermentado funcional, em avaliação por escala hedônica de cinco pontos. Já na aceitação do produto, a amostra de leite fermentado pelo *L. plantarum* (B7), teve sua aceitação estatisticamente inferior ( $p < 0,001$ ) à de todas as outras amostras de leite fermentado, que apresentaram aceitação estatisticamente semelhante entre si ( $p > 0,05$ ).

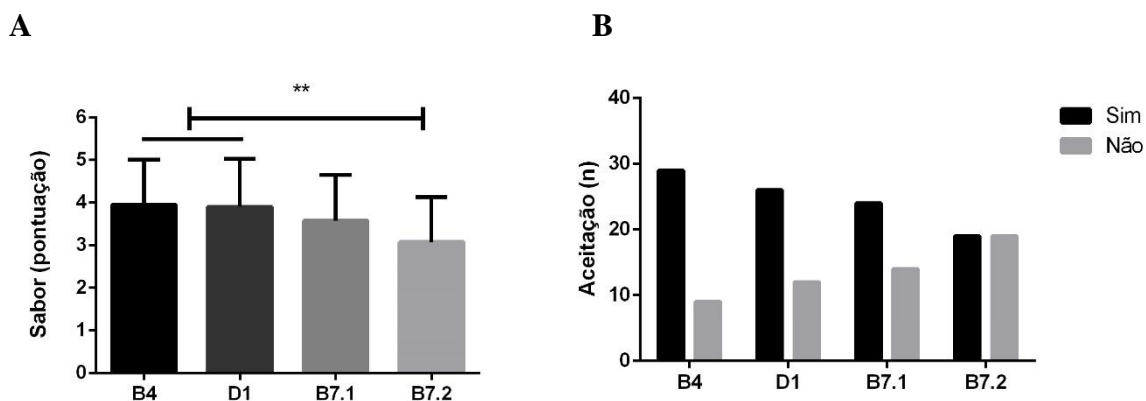
De acordo com Ott et al. (2000), a acidez tem uma forte influência sobre a percepção do sabor em leites fermentados, sendo pouco influente sobre compostos aromáticos, mas muito influente em sabores importantes que caracterizam o leite fermentado como cítrico, amargo e até mesmo doce. Esses mesmos autores afirmam que uma diferença de 0,4 no valor de pH dos leites fermentados é capaz de influenciar a percepção da maioria dos sabores presentes nos leites fermentados, como aqueles

citados anteriormente, assim como outros sabores: de leite, de queijo, amanteigado e rançoso. Na figura 5, pode-se observar que as amostras de leites fermentados pelos lactobacilos de amostras B4 e B5 isoladas de queijo Minas artesanal, assim como a amostra controle positivo LP, apresentaram valores estatisticamente superiores ( $p < 0,001$ ) de pH quando comparadas à amostra B7 de *L. plantarum*. Esta diferença entre o pH das amostras provavelmente influenciou a diferente aceitação entre os leites fermentados mencionadas no parágrafo anterior.



**Figura 5. pH médio de leites fermentados por *Lactobacillus* spp. durante 12 horas e armazenados sob refrigeração aos 15 dias.** B4: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo).\*( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Teste: One-way anova, pós-teste de Tukey (n=4).

A partir dos resultados encontrados, uma nova análise sensorial foi conduzida alterando-se os tempos de fermentação da amostra B7 em matriz láctea, uma vez que sua acidificação se dá de forma mais intensa que de outras amostras, assim como sua pós-acidificação. Outra amostra, *L. rhamnosus* (D1), também foi testada nessa análise sensorial. Os resultados podem ser observados na figura 6.

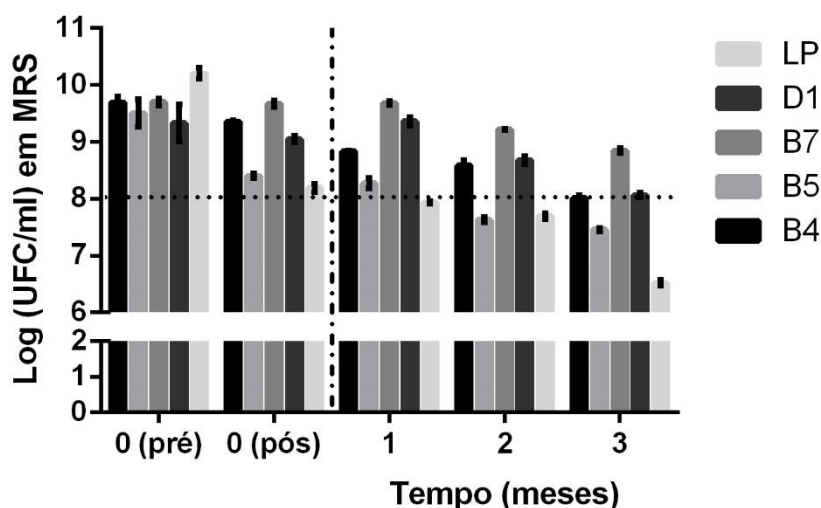


**Figura 6. Pontuação média obtida em escala hedônica (1-5) avaliando o sabor (A) e grau de aceitação (B) de leites fermentados e armazenados sob refrigeração por 15 dias.** B4 e D1: *L. rhamnosus* (fermentação de 12horas), B7.1: *L. plantarum*(fermentação de 6horas), B7.2: *L. plantarum* (fermentação de 12horas).\*\*(p<0,01). Teste: One-way anova, pós-teste de Tukey (n=38).

A alteração nos tempos de fermentação da amostra B7 mudou a sua nota média em sabor fornecida por provadores leigos, enquanto a nota média do leite fermentado por esta amostra de *L. plantarum* com tempo de fermentação igual ao tempo das demais amostras manteve-se inferior (p<0,001). Curiosamente, o pH entre as amostras não foi diferente (dados não mostrados), o que leva a crer que outros compostos produzidos pela amostra B7, visto que a amostra é de uma espécie de lactobacilo heterofermentadora, devem ser os prováveis responsáveis por essas notas inferiores na análise sensorial. A ficha de análise sensorial utilizada dispunha de um espaço de preenchimento opcional para possíveis observações sobre cada amostra. A amostra B7.2 apresentou a crítica de ser muito “azedada” e/ou “ácida” relacionado a baixas notas dadas pelos provadores. Isso se deu, provavelmente, pelas maiores proporções de acetato na amostra, provenientes da metabolização do piruvato pela degradação da lactose (Leroy e De Vuyst, 2004). Ainda referente a essa análise sensorial, não houve diferença (p>0,05) entre a aceitação das amostras analisadas, apesar de uma visível inferioridade numérica na aceitação da amostra B7.2. Possivelmente, um número maior de provadores (ou um painel sensorial formado por provadores treinados) mostraria uma diferença estatística referente a essa aceitação. Análises avaliando o perfil de componentes aromáticos produzidos na fermentação do leite pelas amostras mencionadas poderia enriquecer a discussão dos resultados quanto ao porque da melhor ou pior aceitação por provadores leigos a cada uma das amostras.

### 5.1.3. Liofilização dos micro-organismos em matriz láctea

Além do desenvolvimento de um leite fermentado funcional, os micro-organismos potencialmente probióticos isolados de queijo Minas artesanal (e controle positivo) também foram testados quanto à sua resistência a outras formas de armazenamento e utilização tecnológica qual esse tipo de micro-organismo é normalmente veiculado: a liofilização. A liofilização é normalmente uma opção considerada para a manutenção de micro-organismos em formulações farmacêuticas, como pílulas e sachês, de produtos com apelo funcional que tenham o propósito de veicular micro-organismos vivos.



**Figura 7.** Contagens médias de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal após liofilização com o criopreservador leite desnatado e armazenados sob refrigeração (4 a 7°C). B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=2).

A liofilização, no presente trabalho, foi testada exclusivamente com o crioprotetor leite desnatado (“skim milk”), devido à melhor adaptação dos nossos lactobacilos a uma matriz láctea e pelo fato de ser um crioprotetor comumente usado nesta técnica, sendo também conhecidamente eficaz. Os resultados da viabilidade dos lactobacilos após liofilização e armazenamento sob refrigeração (4 a 7°C) podem ser observados na figura 7.

A amostra B5 de *L. casei* apresentou o pior desempenho ao longo do armazenamento; sendo inferior ( $p < 0,01$ ) às demais amostras após três meses de armazenamento; enquanto a amostra B7 de *L. plantarum* apresentou o melhor desempenho, mantendo-se ao longo de todo o período de armazenamento sob refrigeração, contagens superiores ( $p < 0,01$ ) às demais amostras. As diferenças estatísticas mencionadas foram observadas de acordo com o teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. A amostra controle positivo mostrou que nem todas as amostras utilizadas comercialmente para elaboração de leites fermentados também apresentam tolerância tecnológica adequada quando submetidas a processamentos como a liofilização, visto que o seu desempenho foi semelhante ( $p > 0,05$ ) ao resultado da pior amostra, a B5. As amostras B4 e D1 de *L. rhamnosus* apresentaram desempenho intermediário, mas ainda favorável, visto que mantiveram contagens superiores a  $10^8$  UFC/ml após liofilização e três meses de armazenamento refrigerado.

O trabalho de Zárate e Nader-Macias (2006) observou, assim como no presente trabalho, uma variação da viabilidade entre as amostras testadas, sendo a sua melhor amostra um *L. acidophilus*, que também manteve-se com contagem de  $10^8$  UFC/ml de micro-organismos viáveis após liofilização e três meses de armazenamento sob refrigeração, e uma de suas piores amostras, assim como no presente estudo, uma amostra da espécie *L. paracasei*. Já Otero et al. (2007), avaliando a viabilidade de uma amostra de *L. gasseri* potencialmente probiótica sob condições semelhantes ao presente trabalho, observaram quedas de 1-2 logs após três meses de armazenamento pós-liofilização, ainda que mantendo níveis adequados de lactobacilos viáveis (acima de  $10^8$  UFC/ml). A literatura científica reforça, então, que dentro das condições experimentais deste estudo, algumas amostras de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal apresentam viabilidade adequada após liofilização e armazenamento sob refrigeração, sendo este processo físico uma possibilidade de conservação destas amostras, de forma viável, em formulações farmacêuticas com apelo funcional, como pílulas e sachês, por exemplo.

## **5.2. Ação probiótica de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal frente à infecção por *S. Typhimurium***

### **5.2.1. Antagonismo *in vitro* contra *S. Typhimurium***

Os resultados do teste de co-cultivo de lactobacilos com *S. Typhimurium* podem ser observados na tabela 4.

**Tabela 4. Contagens médias de *S. Typhimurium* em ágar MacConkey ( $\log_{10}$  UFC/ml) em cultura pura ou em co-cultivo (18horas) com cada lactobacilo em caldos BHI ou MRS (n=3)**

Micro-organismo	Meio de co-cultivo	pH	Log UFC/ml
<i>L. rhamnosus</i> B4	MRS	3,80±0,05 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,48±0,35 <sup>c</sup>	8,61±0,01 <sup>b</sup>
<i>L. casei</i> B5	MRS	3,76±0,02 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,56±0,27 <sup>c</sup>	8,63±0,02 <sup>b</sup>
<i>L. plantarum</i> B7	MRS	3,79±0,09 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,56±0,24 <sup>c</sup>	8,54±0,03 <sup>b</sup>
<i>L. rhamnosus</i> D1	MRS	3,80±0,07 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,46±0,31 <sup>c</sup>	8,56±0,06 <sup>b</sup>
<i>L. paracasei</i> LP (C+)	MRS	3,82±0,07 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,47±0,33 <sup>c</sup>	8,61±0,02 <sup>b</sup>
<i>S. Typhimurium</i> (C-)	MRS	5,77±0,33 <sup>b</sup>	8,69±0,02 <sup>b</sup>
	BHI	6,56±0,24 <sup>c</sup>	8,51±0,35 <sup>b</sup>

Legenda: C+: controle positivo, C-: controle negativo. Letras distintas representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,01$ ) em uma mesma coluna. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Conforme pode ser observado na tabela 4, os lactobacilos, quando em meio com maior capacidade de acidificação (MRS), produzem substâncias (possivelmente ácidos orgânicos) com habilidade de antagonizar *S. Typhimurium*, visto que, quando em meio com menor capacidade de acidificação (BHI), os lactobacilos não foram capazes de inibir o crescimento do patógeno. Em experimento semelhante de Hütt et al. (2006), diversas amostras de lactobacilos conhecidamente probióticas apresentaram, de acordo com uma escala elaborada pelos próprios autores, atividade antagonista média no teste de co-cultivo (representada por uma redução na contagem média de salmonela em até 5,9 ciclos log). Todas as amostras testadas no presente trabalho apresentaram atividade antagonista significativa no teste de co-cultivo, quando em meio MRS, por reduzirem em até 5,0 ciclos log a contagem de *S. Typhimurium*.



Os resultados do teste de antagonismo por sobrenadante de lactobacilos contra *S. Typhimurium* podem ser observados na tabela 5.

**Tabela 5. Contagens médias ( $\log_{10}$  UFC/ml) em ágar MacConkey de *S. Typhimurium* após cultivo (18horas) em sobrenadantes de meio MRS e BHI (n=3)**

Micro-organismo	Meio do Sobrenadante	pH	Log UFC/ml
<i>L. rhamnosus</i> B4	MRS	4,08±0,11 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,31±0,37 <sup>b</sup>	8,66±0,04 <sup>c</sup>
<i>L. casei</i> B5	MRS	4,00±0,13 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	5,89±0,13 <sup>b</sup>	8,67±0,01 <sup>c</sup>
<i>L. plantarum</i> B7	MRS	4,04±0,16 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,25±0,67 <sup>b</sup>	8,62±0,03 <sup>c</sup>
<i>L. rhamnosus</i> D1	MRS	3,96±0,01 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	6,35±0,28 <sup>b</sup>	8,65±0,04 <sup>c</sup>
<i>L. paracasei</i> LP (C+)	MRS	4,04±0,12 <sup>a</sup>	<4,00 <sup>a</sup>
	BHI	5,92±0,27 <sup>b</sup>	7,88±0,02 <sup>b</sup>
<i>S. Typhimurium</i> (C-)	MRS	5,77±0,33 <sup>b</sup>	8,69±0,02 <sup>c</sup>
	BHI	6,56±0,24 <sup>b</sup>	8,51±0,35 <sup>c</sup>

Legenda: C+: controle positivo, C-: controle negativo. Letras distintas representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,01$ ) em uma mesma coluna. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

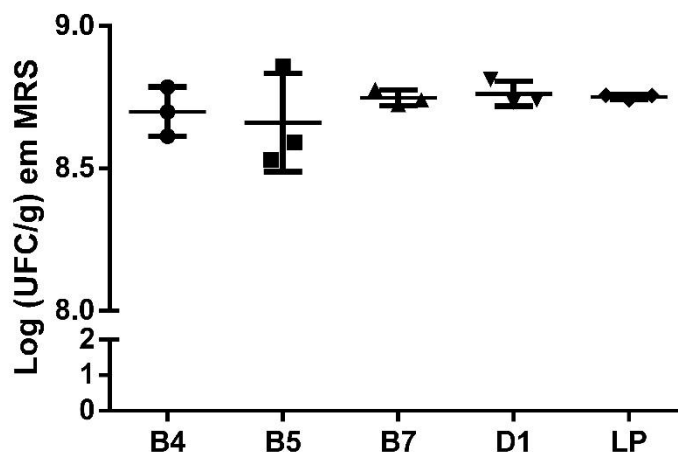
Os resultados do teste de antagonismo por sobrenadante de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (e controle positivo) frente a *S. Typhimurium* evidenciam o efeito antagônico direto dos ácidos orgânicos produzidos (como o ácido lático) pelas bactérias ácido lácticas contra o enteropatógeno em questão. Em trabalho semelhante, Hütt et al. (2006) observaram correlação positiva entre o antagonismo a enteropatógenos e a produção de ácido lático, assim como correlação negativa entre o valor de pH do sobrenadante com a atividade antagonista, confirmando os resultados aqui observados e demonstrados. Fayol-Messaoudi et al. (2005), avaliaram a ação isolada de ácido lático contra *S. Typhimurium* assim como a ação de sobrenadantes de lactobacilos probióticos comercialmente conhecidos em meio MRS. Semelhantemente a presente estudo, o pH médio desses sobrenadantes foi próximo de 4,0 e o decréscimo em log na contagem de salmonela foi de aproximadamente 5,0 ciclos. Esses

pesquisadores ainda mostraram que, na temperatura de incubação a 37°C, esse efeito antagonico é otimizado, sendo essa a temperatura de incubação escolhida para as nossas culturas. Além disso, os pesquisadores observaram que em meios com pH acima de 6,0, que foi o pH médio dos sobrenadantes em BHI no presente estudo, não havia redução significativa nas contagens de *S. Typhimurium*.

## **5.2.2. Experimentação *in vivo***

### **5.2.2.1. Capacidade de monoassociação e antagonismo *ex vivo* de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal contra *S. Typhimurium* em animais isentos de germes**

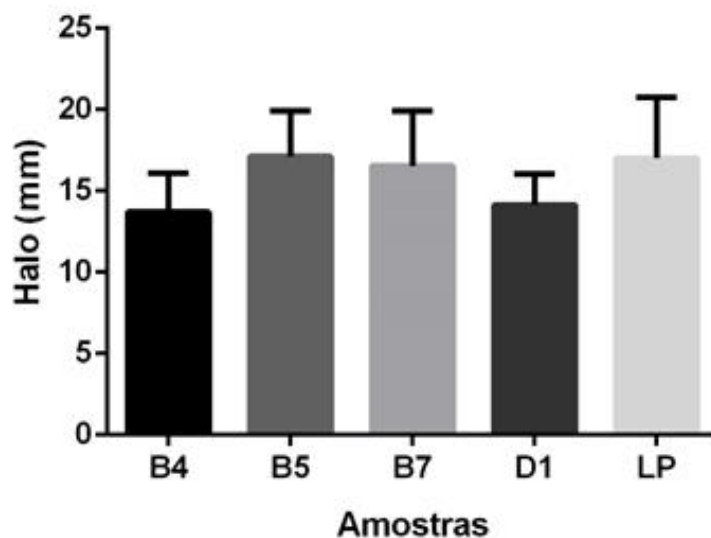
Todos os lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal colonizaram os camundongos após cinco dias de inóculo único intragástrico (por gavagem). Os resultados das contagens nas fezes de animais isentos de germes monoassociados estão apresentados na figura 8.



**Figura 8. Contagem média da população fecal dos lactobacilos ( $\log_{10}$  UFC/g de fezes) em animais monoassociados.** B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=3).

Os resultados da avaliação da capacidade da monoassociação mostram uma excelente habilidade de colonizar animais isentos de germes pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal. Isso se confirma pelo fato de que no quinto dia os lactobacilos utilizados atingiram níveis satisfatórios de colonização, alcançando populações acima de  $10^8$  UFC/g de conteúdo, o que indica que esses micro-organismos estão em uma condição de população dominante no ambiente intestinal dos camundongos avaliados. Resultados semelhantes foram observados por Neumann et al. (1998) ao associarem camundongos isentos de germe com *L. acidophilus* potencialmente probiótico e observarem, após sete dias de associação, níveis populacionais de lactobacilos acima de  $10^8$  UFC/g de fezes, confirmando a colonização pelo lactobacilo em questão. No presente trabalho, como no trabalho citado, os animais monoassociados eram perfeitamente saudáveis, não apresentando sinais clínicos de uma possível patogenicidade causada pelos lactobacilos.

As fezes dos animais monoassociadas foram então coletadas para o teste de antagonismo *ex-vivo*. Os resultados podem ser vistos na figura 9.

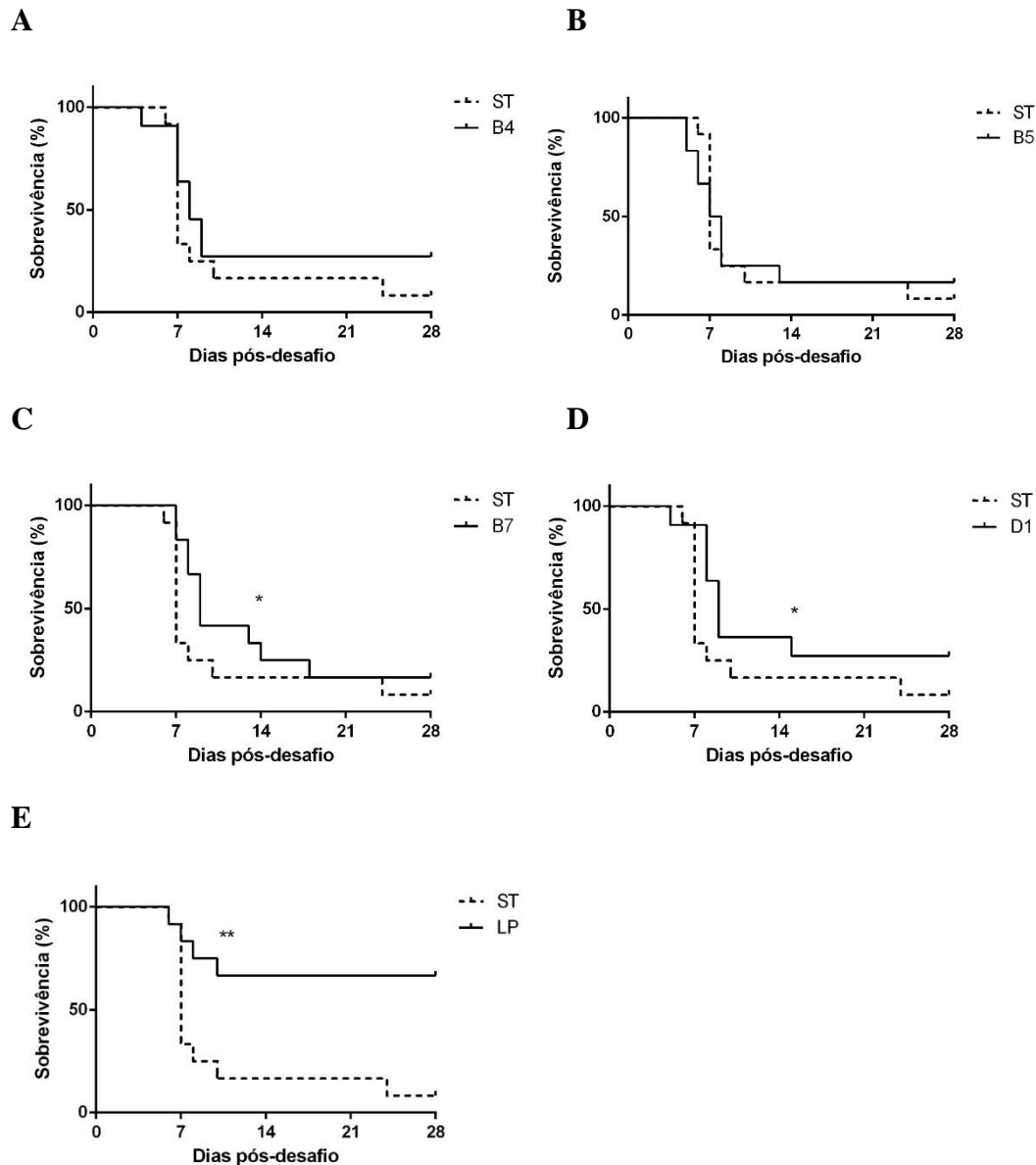


**Figura 9.** Halo médio de inibição (mm) do antagonismo *ex vivo* frente a *S. Typhimurium* das fezes de animais monoassociados com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal. B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo) (n=3).

Os resultados de antagonismo *ex vivo* confirmam que todos os lactobacilos testados mantêm a sua ação antagônica mesmo após a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, indicando que eles provavelmente serão capazes de exercer esse antagonismo, em menor escala (devido à competição com a microbiota intestinal), em animais convencionais. Alvim et al. (2016) também observaram halos de inibição de uma amostra de *Weissella paramesenteroides* probiótica contra *S. Typhimurium* em teste de antagonismo *ex-vivo* com animais isentos de germes monoassociados. Da mesma forma, Vasconcelos et al. (2003) observaram halos de inibição em experimento semelhante; porém, avaliando o efeito de resistência à colonização exercido por uma amostra de *L. murinus*.

#### **5.2.2.2. Curva de sobrevivência, taxa de mortalidade e desenvolvimento ponderal de animais convencionais tratados com lactobacilos ou não e desafiados com *S. Typhimurium***

As curvas de sobrevivência dos animais tratados ou não com lactobacilos e desafiados com *S. Typhimurium* podem ser observadas na figura 10.



**Figura 10.** Sobrevivência (%) de camundongos machos BALB/c tratados ou não durante sete dias com leites fermentados por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados com *S. Typhimurium* (inóculo intragástricoúnico de  $10^6$ UFC). B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Teste Gehan-Breslow-Wilcoxon (Mantel-Cox) ( $n=12$ ).

Os resultados das curvas desobrevida apresentados na figura 10 demonstram que o efeito protetor das amostras de lactobacilos veiculadas diariamente pela via intragástrica por meio de leite fermentado é bem diversificado. As amostras B7 e D1 apresentaram um moderado e significativo aumento na sobrevida dos animais quando

comparado ao grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. Já os grupos tratados pelos leites fermentados das amostras B4 e B5 apresentaram o pior desempenho, especialmente se comparados com o grupo tratado com o controle positivo LP, que apresentou uma maior sobrevivência, quando comparada ao grupo somente tratado com o patógeno, estatisticamente mais significativa que a de todos os outros grupos experimentais. Castillo et al. (2012) observaram taxas de mortalidade aos sete dias e dez dias pós-infecção com *S. Typhimurium* variando de 0 a 20% e 7 a 80%, respectivamente, em modelo experimental semelhante ao presente estudo. Nossas melhores amostras apresentaram taxas de mortalidade também satisfatórias, principalmente aos sete dias pós-desafio com *S. Typhimurium*. Essa afirmativa é baseada no critério utilizado pelo trabalho mencionado, que considera uma amostra com efeito protetor quando ela reduz em 50% a mortalidade comparada ao grupo somente infectado. Baseado nisso, as amostras B7, D1 e LP apresentaram efeito protetor, como pode ser visto na tabela 6. Uma vez que o presente trabalho apresentou taxa de mortalidade de 67% nos animais somente tratados com o patógeno enquanto o grupo de estudos argentino observou apenas 27% de mortalidade no mesmo período, pode-se inferir que, por se tratar de um patógeno mais agressivo no nosso estudo, os resultados entre os dois grupos de estudo são próximos. Aos dez dias pós-infecção, ambos os trabalhos apresentaram 73% de mortalidade para o grupo controle, e nesse quesito, somente nosso controle positivo apresentou resultados satisfatórios.

**Tabela 6. Taxa de mortalidade aos sete e dez dias pós-desafio com *S. Typhimurium* em camundongos BALB/c tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (n=12).**

Grupo Experimental	Mortalidade (%)	
	7 dias pós desafio	10 dias pós desafio
ST	67	73
B4	36	73
B5	50	75
B7	17*	58
D1	10*	73
LP	17*	33*

Legenda: B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. \*Redução em 50% da mortalidade comparada ao grupo ST (de acordo com Castillo et al., 2012).

A variação de peso dos grupos experimentais aos sete dias pós-infecção ( $10^6$  UFC por via intragástrica) com *S. Typhimurium* podem ser observadas na tabela 7.

**Tabela 7. Desenvolvimento ponderal pela avaliação da variação do peso após sete dias após desafio com *S. Typhimurium* em animais BALBc tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (n=6).**

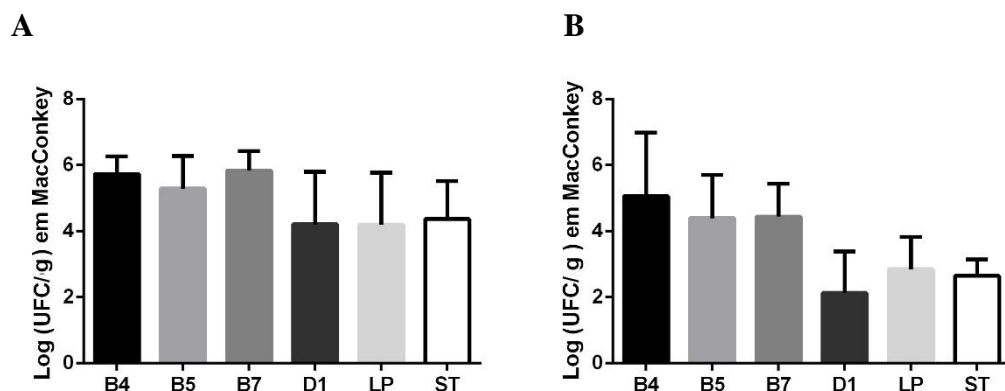
Grupo Experimental	Peso (g)	
	Dia 1 pós-infecção	Dia 7 pós-infecção
ST	21,35±1,15	19,75±2,12 <sup>d</sup>
B4	20,52±1,31	19,88±1,64 <sup>c</sup>
B5	29,84±1,46	24,82±1,95 <sup>e</sup>
B7	21,56±1,31	21,55±1,55 <sup>b</sup>
D1	17,84±0,86	20,40±0,76 <sup>a</sup>
LP	20,63±0,73	20,95±0,67 <sup>b</sup>

Legenda: B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. Letras distintas representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) relativos à variação percentual nos pesos dos grupos pelo teste de Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

A avaliação da variação de peso após sete dias pós-desafio com *S. Typhimurium* enfatizou a superioridade do tratamento com o leite fermentado pela amostra B7 de *L. plantarum* e especialmente pela amostra D1 de *L. rhamnosus*, uma vez que apresentaram resultados superiores ( $p < 0,05$ ) aos das demais amostras de lactobacilos e semelhantes ao do controle positivo. A amostra D1 apresentou-se superior ( $p < 0,05$ ) inclusive ao controle positivo (LP: *Lactobacillus paracasei*, um micro-organismo comercialmente disponível e com seu potencial probiótico consolidado).

### 5.2.2.3. Avaliação do efeito protetor dos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal contra a translocação para baço e fígado em animais convencionais e isentos de germes desafiados com *S. Typhimurium*

As contagens de *S. Typhimurium* em meio seletivo e diferencial, ágar MacConkey, aos cinco dias pós-desafio, no fígado e baço de animais monoassociados ou não com leite fermentado por lactobacilos potencialmente probióticos podem ser avaliados na figura 11.

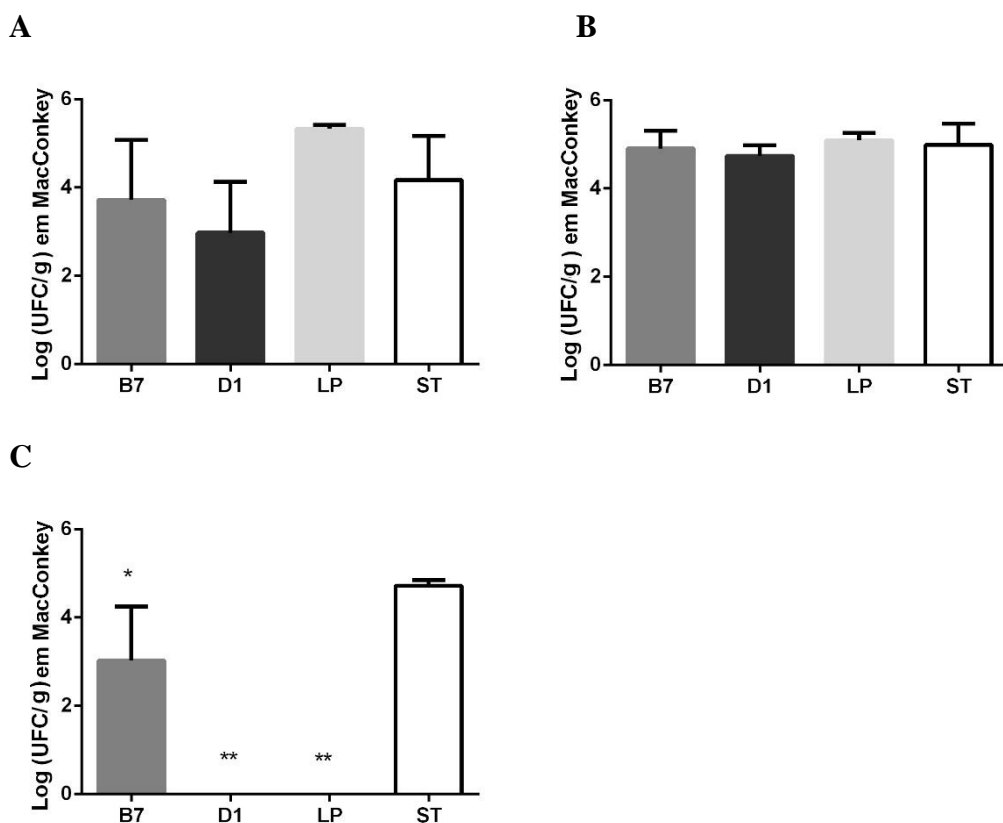


**Figura 11.** Translocação (log<sub>10</sub> UFC/g) cinco dias após o desafio para o baço (A) e fígado (B) de camundongos monoassociados com lactobacilos e desafiados cinco dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de 10<sup>5</sup> UFC). B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (n=3).

Os resultados da translocação para baço e fígado de animais isentos de germes monoassociados com os leites fermentados pelos lactobacilos e desafiados cinco dias depois com *S. Typhimurium* mostraram que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na translocação para os órgãos mencionados quando comparados ao controle negativo, que



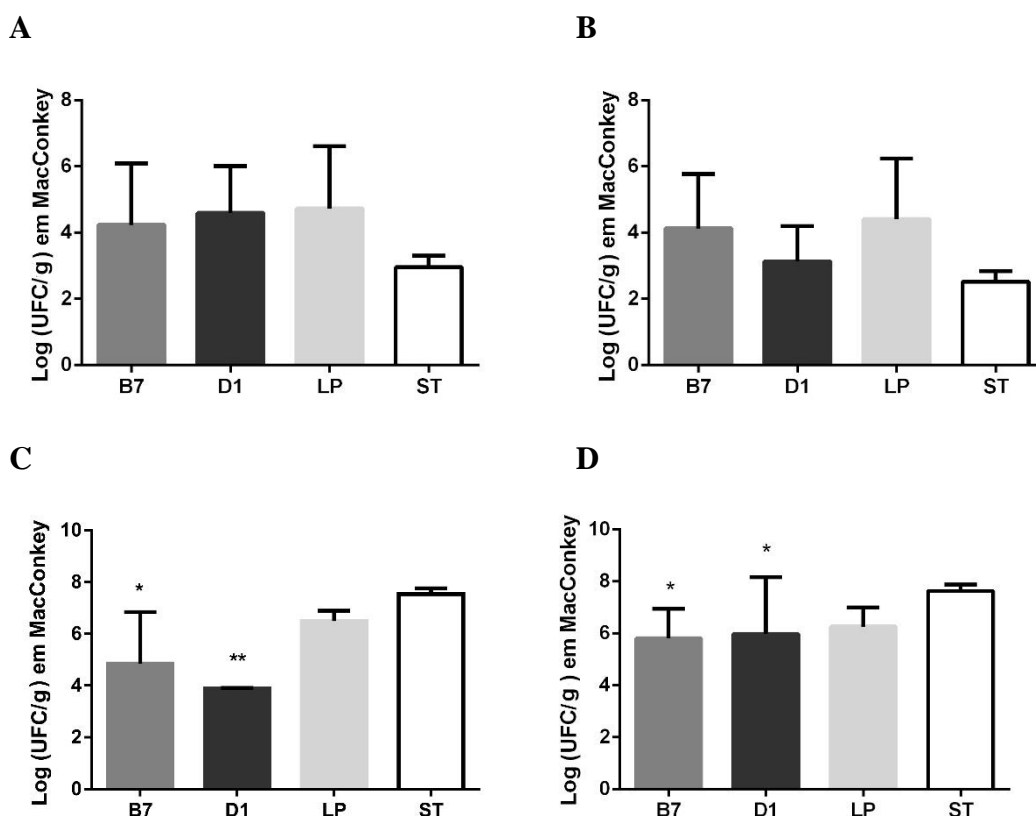
somente recebeu o inóculo de *S. Typhimurium*, apesar de os grupos colonizados com as amostras D1 e LP apresentarem valores numericamente inferiores aos demais grupos ou valores próximos daqueles verificados no controle negativo. O fato de as amostras B4 e B5 não apresentarem evidências de um efeito protetor na avaliação da curva de sobrevivência e também no desenvolvimento ponderal (especialmente a B5), fez com que ambas fossem retiradas dos experimentos subsequentes, visto que seus valores numéricos para a translocação (observados na figura 11), reforçam a ausência de um efeito protetor no modelo estudado no presente trabalho. Martins et al. (2007) também avaliaram a translocação em animais isentos de germes monoassociados com uma levedura potencialmente probiótica após três e cinco dias de infecção com *S. Typhimurium* (em dose menor que a utilizada no presente estudo). Os autores observaram um discreto efeito protetor da sua amostra probiótica contra a translocação de *S. Typhimurium* aos 3 dias pós-desafio e um importante efeito protetor aos cinco dias pós-desafio. Dessa forma, decidiu-se fazer a avaliação da translocação nos dias quatro e seis após o desafio com o patógeno (devido ao nosso maior inóculo de *S. Typhimurium*), para observar possíveis variações na relação dos lactobacilos potencialmente probióticos com a salmonela. Os resultados desse experimento podem ser observados na figura 12.



**Figura 12.** Translocação ( $\log_{10}$  UFC/g) para o baço (A – 4 dias pós desafio, B – 6 dias pós desafio) e fígado (C – 6 dias pós desafio) de camundongos monoassociados com lactobacilos e desafiados cinco dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). B7: *L. plantarum*, D1: *L. rhamnosus*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,01$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) ( $n=3$ ).

A translocação para o baço não apresentou variação em todos os tempos experimentais (quatro, cinco e seis dias após desafio com *S. Typhimurium*), revelando que, ou esta não é uma análise adequada para avaliar o efeito protetor de lactobacilos no modelo experimental, ou que nossas amostras não apresentam efeito protetor para a translocação a esse órgão. Já para o fígado, as amostras de lactobacilos testadas foram superiores em reduzir a translocação ( $p < 0,05$ ), quando comparadas ao controle negativo, aos seis dias após a infecção, mostrando que o efeito protetor nesse órgão ocorre mais tardiamente que o avaliado na literatura, uma vez que aos quatro dias pós-desafio, não foram detectadas contagens mínimas de salmonela em todos os grupos experimentais, inclusive o controle negativo.

Os animais convencionais receberam uma dose do patógeno um pouco maior que os animais isentos de germes e os tempos avaliados de translocação pós-desafio foram cinco e sete dias, pois o controle negativo, somente tratado com *S. Typhimurium*, apresentou mais de 50% de mortalidade aos sete dias pós-infecção (conforme pode ser visto na tabela 6). Os resultados da translocação para baço e fígado podem ser observados na figura 13.



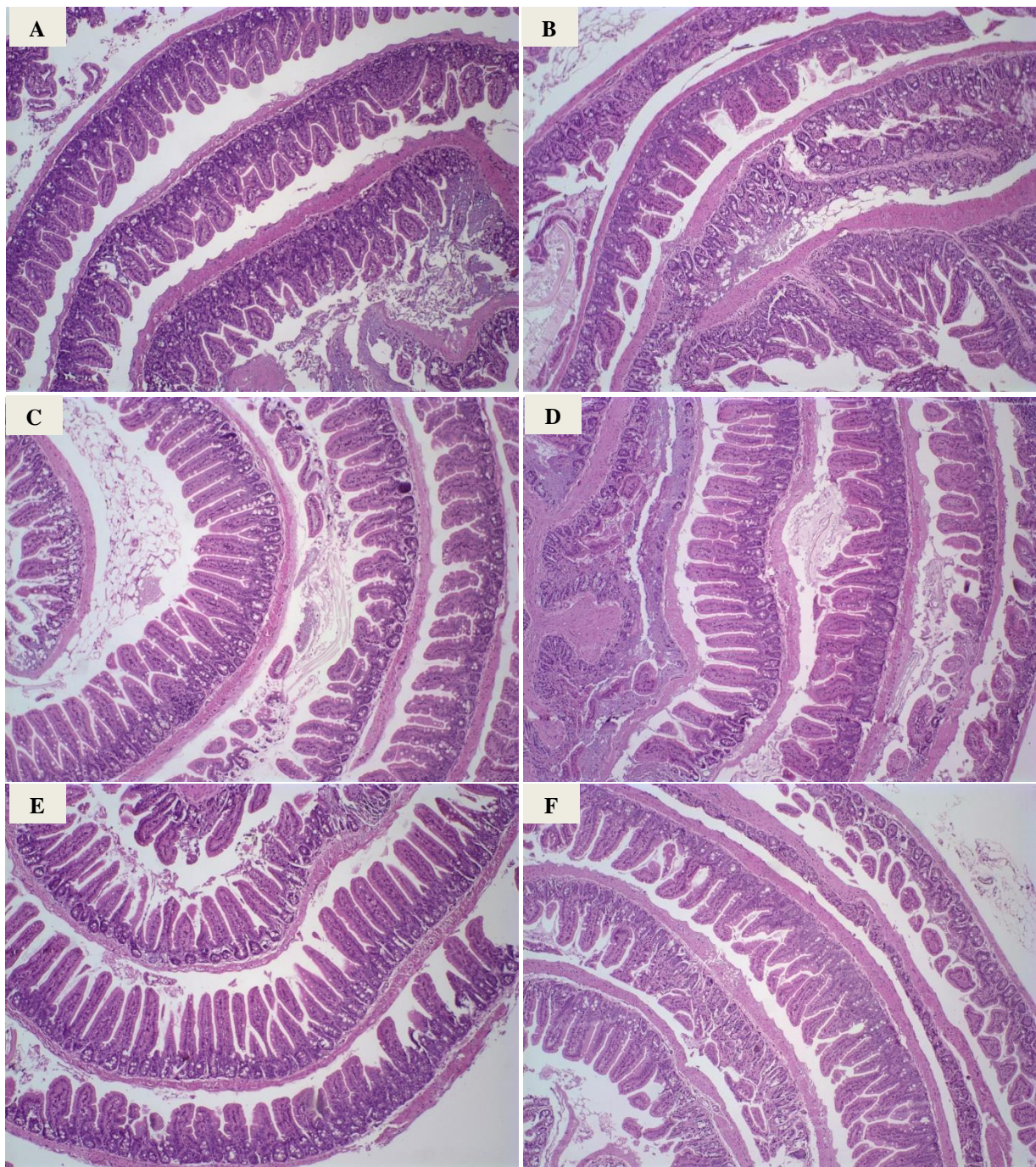
**Figura 13.** Translocação ( $\log_{10}$  UFC/g) para o baço (A,C) e fígado (B,D), cinco e sete dias pós desafio com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC), respectivamente, de camundongos tratados com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal. B7: *L. plantarum*, D1: *L. rhamnosus*, LP: *L. paracasei* (controle positivo), ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium*. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,01$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) ( $n=3$ ).

A translocação para baço e fígado, cinco dias após o desafio com *S. Typhimurium*, em animais convencionais tratados ou não com o leite fermentado com lactobacilos potencialmente probióticos foi estatisticamente igual para todos os grupos: experimentais, controle positivo (LP) e controle negativo (ST). Já aos sete dias, data na

qual morreram mais da metade dos indivíduos do controle negativo no experimento de curva de sobrevivência, observamos uma redução estatisticamente significativa nas contagens do patógeno em ambos os órgãos nos grupos experimentais B7 e D1, quando comparados ao controle negativo. Curiosamente, o controle positivo apresentou-se estatisticamente semelhante ao controle negativo nos resultados de translocação para baço e fígado, apesar de seu resultado diferenciado no experimento de curva de sobrevivência. Dessa forma, comparado com a literatura, nossas amostras B7 e D1 de lactobacilos apresentam um grau satisfatório de proteção frente à translocação para órgãos-alvo, baço e fígado, em uma infecção por *S. Typhimurium* em camundongos machos convencionais BALB/c.

#### **5.2.2.4. Histopatologia qualitativa e quantitativa do fígado e intestino de animais convencionais e isentos de germes tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) e desafiados com *S. Typhimurium***

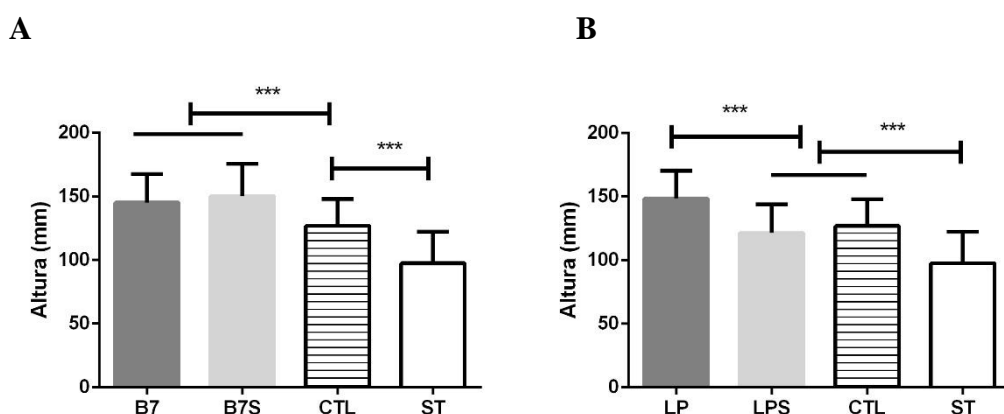
Cortes histológicos do íleo de camundongos tratados ou não com leite fermentado por cada um dos lactobacilos (experimental, B7, ou controle positivo, LP) e desafiados ou não com *S. Typhimurium* podem ser observados na figura 14.



**Figura 14. Fotomicrografias de cortes histológicos do íleo de camundongos machos BALB/c tratados previamente (ou não) durante sete dias com leite fermentado pelas amostras B7 de *L. plantarum* ou LP de *L. paracasei* (controle positivo) e desafiados posteriormente (ou não) ao longo de cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. (A) CTL: grupo sem tratamento; (B) ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); (C) B7: grupo somente tratado com leite fermentado pela amostra B7; (D) B7S: grupo B7 mais desafio com *S. Typhimurium*; (E)**

LP: grupo somente tratado com leite fermentado pela amostra LP (controle positivo);  
(F) LPS: grupo LP mais desafio com *S. Typhimurium*. X10, H&E.

As fotomicrografias evidenciam o efeito protetor das duas amostras de lactobacilos testadas, pois revelaram uma manutenção da integridade das vilosidades (evidenciada principalmente pela altura e estrutura destas) semelhante ou até superior (de forma qualitativa) ao grupo sem tratamento e ao controle negativo. Este grupo, somente desafiado com a salmonela, apresenta um íleo que tem, em diversos pontos, a perda da integridade das vilosidades assim como uma redução da altura das vilosidades (onde estas ainda não sofreram danos consideráveis pela infecção por *S. Typhimurium*). A análise qualitativa aqui descrita pode ser confirmada pela análise quantitativa apresentada na figura a seguir, na qual a altura média das vilosidades de cada um dos grupos analisados foi comparada.



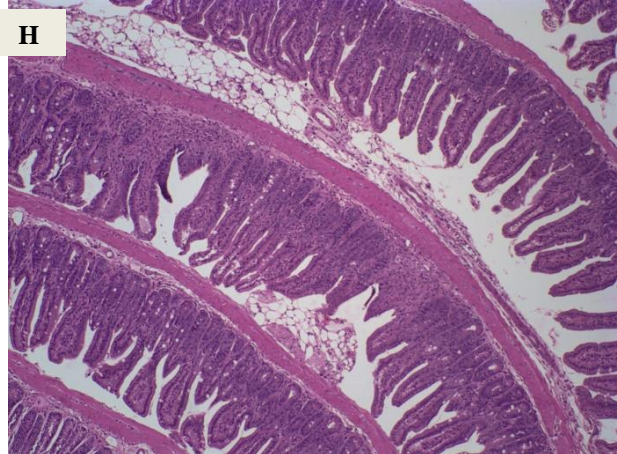
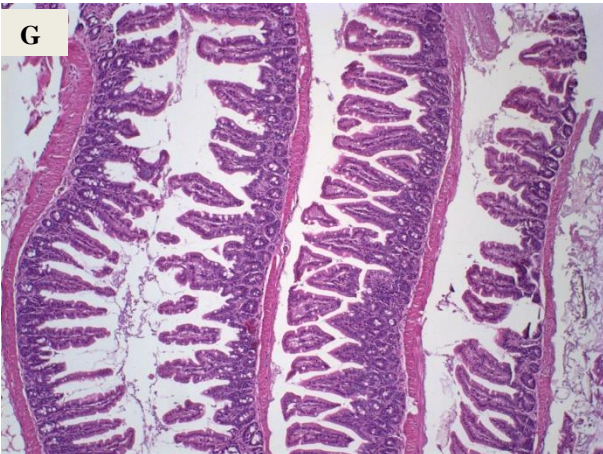
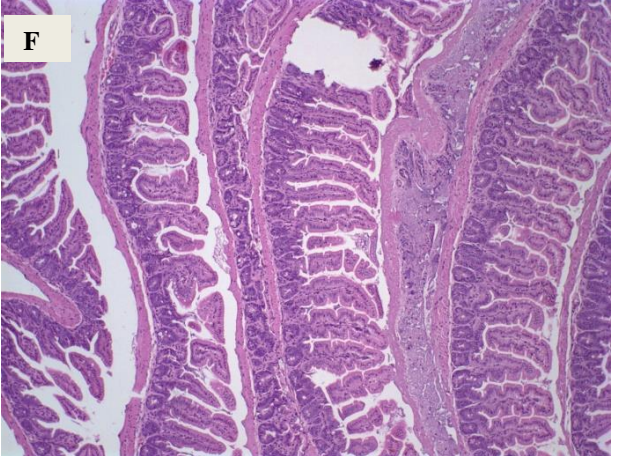
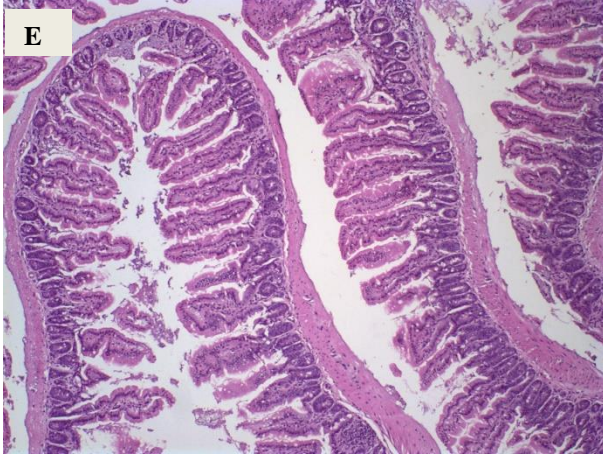
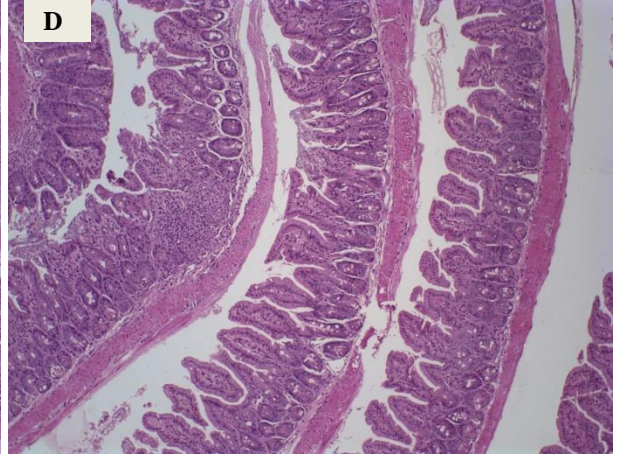
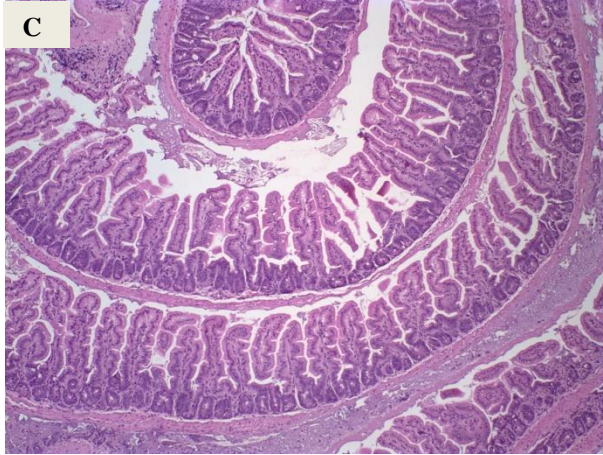
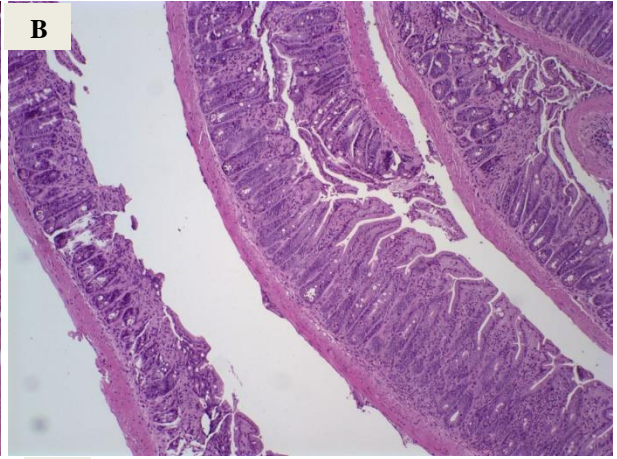
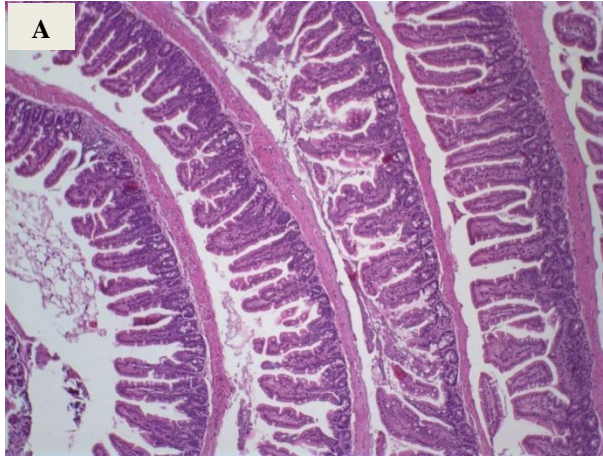
**Figura 15. Altura média (mm) das vilosidades do íleo de camundongos machos BALB/c tratados previamente (ou não) durante sete dias com leite fermentado pelas amostras B7 de *L. plantarum*(A) ou LP de *L. paracasei* (controle positivo) (B) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. CTL: grupo sem tratamento; ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); B7: grupo somente tratado com leite fermentado pela amostra B7; B7S: grupo B7 mais desafio com *S. Typhimurium*; LP: grupo somente tratado com leite fermentado pela amostra LP (controle positivo); LPS: grupo LP mais desafio com *S. Typhimurium*. \*\*\*( $P<0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).**

A superioridade ( $p<0,001$ ) demonstrada pelos grupos somente tratados com os leites fermentados pelos lactobacilos ou também desafiados após esse tratamento,

quando comparada com o controle negativo, ou seja, o grupo somente desafiado com o patógeno, reforça o efeito protetor das amostras testadas. A única diferença observada entre os grupos é que a amostra B7 foi superior ( $p < 0,001$ ) inclusive ao grupo CTL (sem tratamento), enquanto isso não ocorreu para a amostra LP, que é nosso controle positivo. Este fato reforça ainda mais o potencial probiótico da amostra de *L. plantarum* isolada de queijo Minas artesanal. Estudos envolvendo agressão por quimioterápicos (mucosite causada por 5-fluoracil) às vilosidades intestinais também avaliaram o efeito protetor de micro-organismos probióticos frente à diminuição da lesão nos grupos tratados com um lactobacilo probiótico (Yeung et al., 2015) ou uma conhecida levedura probiótica (Justino et al., 2014), confirmando, em modelo similar (porém não igual, por ser bem mais agressivo que o modelo aqui estudado), que micro-organismos probióticos podem abrandar as lesões intestinais. Nosso grupo de pesquisa também já observou resultados semelhantes com outros micro-organismos potencialmente probióticos, como no trabalho de Tiago et al. (2015), no qual *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 conferiu efeito protetor em modelo murino de inflamação intestinal. No presente trabalho, observamos resultados similares em um modelo infeccioso e inflamatório de salmonelose.

Infelizmente, a amostra D1 não pode ser avaliada no modelo de tratamento com leite fermentado e posterior desafio com salmonela em animais convencionais, porque, como foi mencionado na seção “Material e métodos”, um animal que tem seu material intestinal (do íleo) coletado para as análises de microbiota não pode ser utilizado para as análises histológicas.

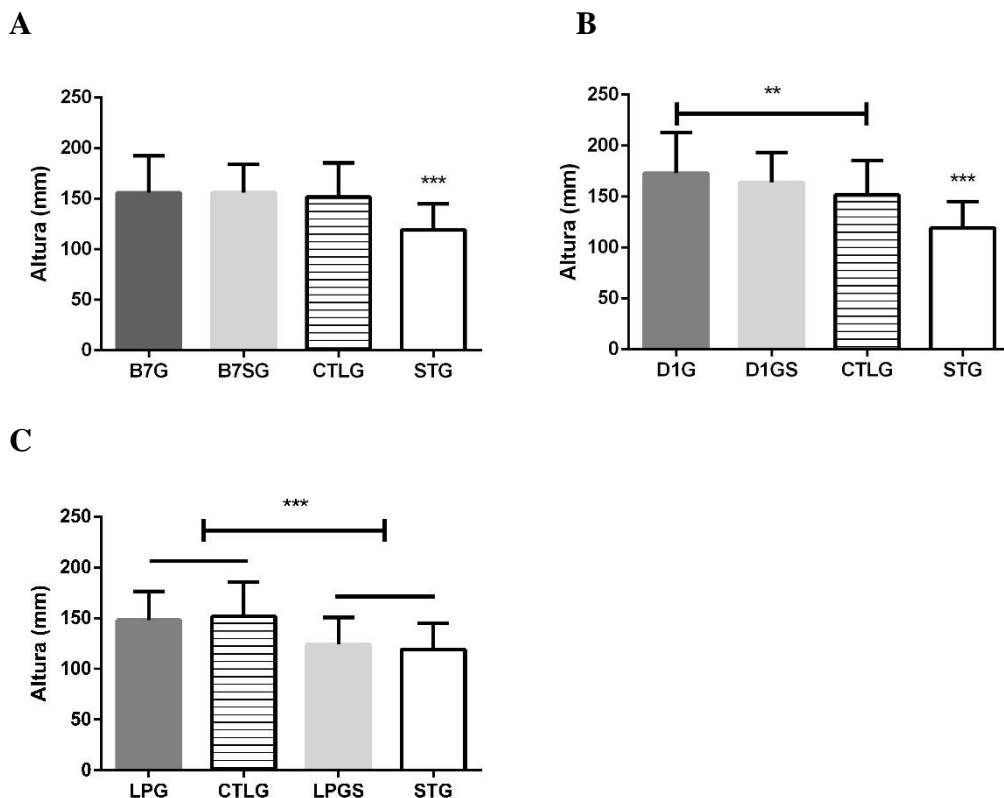
Em seguida, foram analisados cortes histológicos do íleo de camundongos isentos de germes monoassociados ou não com leite fermentado por cada um dos lactobacilos (experimentais, B7 e D1, ou controle positivo, LP) e desafiados ou não com *S. Typhimurium*, a fim de se observar o efeito direto dos lactobacilos sobre o epitélio intestinal, assim como a proteção à infecção pelo patógeno sem a interferência da microbiota. Os resultados podem ser vistos na figura 16.





**Figura 16. Fotomicrografias de cortes histológicos do íleo de camundongos de animais isentos de germes Swiss NIH monoassociados durante cinco dias com leite fermentado pelas amostras B7 de *L. plantarum*, D1 de *L. rhamnosus* e LP de *L. paracasei* (controle positivo) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. (A) CTLG: grupo sem tratamento; (B) STG: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); (C) B7G: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra B7; (D) B7SG: grupo B7G mais desafio com *S. Typhimurium*; (E) D1G: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra D1; (F) D1SG: grupo D1G mais desafio com *S. Typhimurium*. (G) LPG: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra LP (controle positivo); (H) LPSG: grupo LP mais desafio com *S. Typhimurium*. X10, H&E.**

As fotomicrografias da figura 16 mostram diferenças claras na interação dos lactobacilos diretamente com um intestino até então isento de germes. De uma forma geral, as vilosidades são maiores, mais alongadas e mais sinuosas, especialmente nos animais somente monoassociados com lactobacilos. Já os animais somente desafiados com *S. Typhimurium*, do grupo STG (da figura B), apresentam grande quantidade de infiltrados inflamatórios, descaracterização da estrutura de vilosidade e cripta do epitélio intestinal, além da redução da altura das vilosidades em alguns pontos. Em relação à proteção que a monoassociação oferece aos grupos desafiados, *L. plantarum* B7 deixou o íleo dos animais mais similar aos animais do grupo sem tratamento (CTLG), mesmo após desafio com a salmonela ao longo de cinco dias. Por outro lado, o controle positivo LP deixou o íleo dos animais após o desafio com *S. Typhimurium* mais semelhantes ao controle negativo, somente desafiado, como pode ser observado na figura H do grupo LPSG. Também foi feita uma análise quantitativa a fim de se averiguar se as observações descritas são pontuais ou se são estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais. Os resultados podem ser vistos na figura 17.



**Figura 17.** Altura média (mm) das vilosidades do íleo de camundongos isentos de germe, Swiss NIH, monoassociados durante cinco dias com leite fermentado pelas amostras B7 de *L. plantarum* (A), D1 de *L. rhamnosus*(B) ou LP de *L. paracasei* (controle positivo) (C) e desafiados posteriormente (ou não) com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. CTLG: grupo sem tratamento; STG: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); B7G: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra B7; B7SG: grupo B7G mais desafio com *S. Typhimurium*; D1G: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra D1; (F) D1SG: grupo D1G mais desafio com *S. Typhimurium*; LPG: grupo somente monoassociado com leite fermentado pela amostra LP (controle positivo); LPSG: grupo LPG mais desafio com *S. Typhimurium*. \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) ( $n=3$ ).

Nos animais isentos de germes monoassociados com os lactobacilos e posteriormente desafiados com salmonela, a análise quantitativa da altura das vilosidades demonstrou resultado parecido com o que ocorreu com o experimento com animais convencionais. O grupo somente colonizado por *L. plantarum* B7, assim como

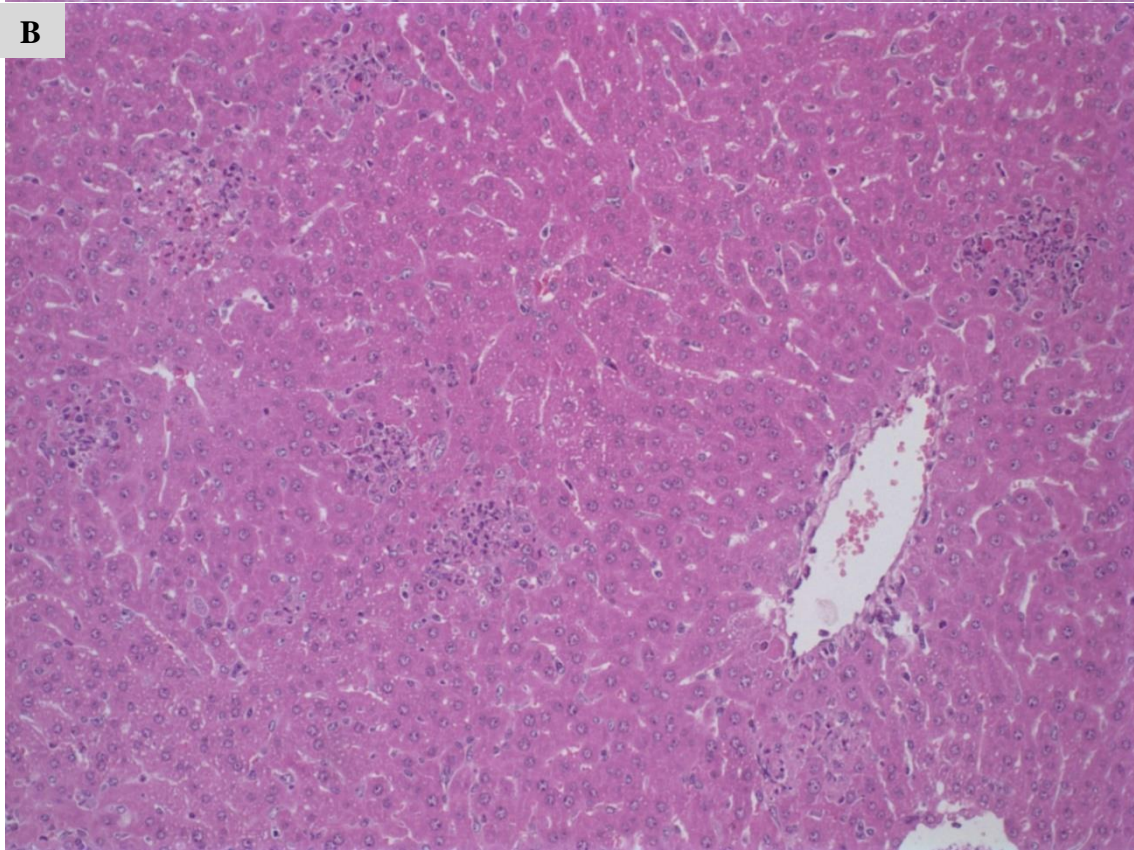
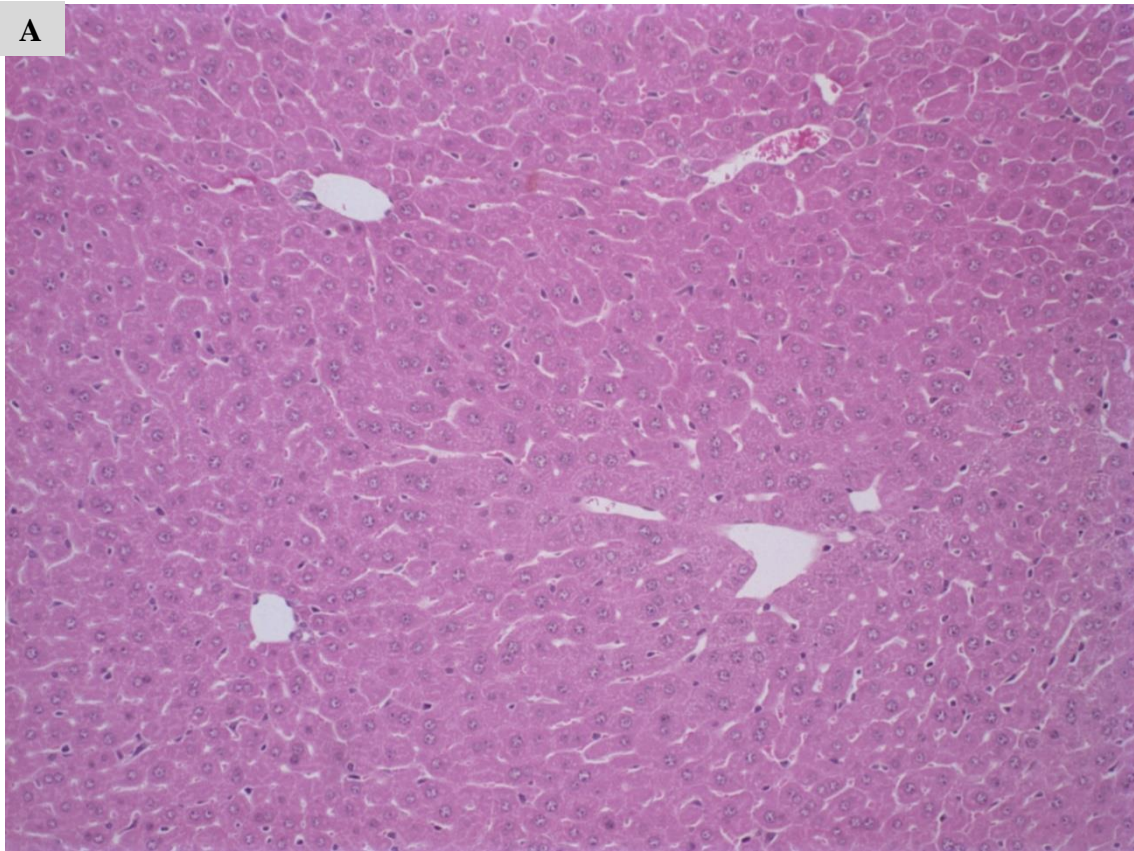
o grupo desafiado com o patógeno após a colonização, mantiveram-se semelhantes ( $p > 0,05$ ) ao grupo sem tratamento (CTLG) e igualmente superiores estatisticamente ao grupo somente desafiado, realçando mais uma vez o efeito protetor desta amostra em relação à manutenção da estrutura e saúde do íleo dos animais. A amostra D1, de *L. rhamnosus*, por sua vez, apresentou resultado semelhante e ainda um pouco superior, visto que o grupo somente colonizado por este lactobacilo apresentou-se também superior ( $p < 0,01$ ) aos grupos CLTG e D1SG, como pode ser observado na figura B da figura 17. Já o grupo colonizado pelo controle positivo LP, mostrou mais uma vez que a manutenção da integridade do íleo não é o seu principal mecanismo de defesa frente à infecção por salmonela, pois no modelo com animais isentos de germes seus resultados também foram os mais discretos.

O trabalho de Kozakova et al. (2015), avaliando o efeito da barreira intestinal em animais monoassociados ou não com um mix de lactobacilos probióticos, percebeu que tal barreira, nos animais colonizados, era muito mais madura e próxima à de um animal convencional em sua ultraestrutura (os autores avaliaram microvilosidades, zonas de oclusão e arranjo citoesquelético das vilosidades intestinais). As informações apresentadas pelos autores convergem com as apresentadas aqui, porém, dados avaliando a ultraestrutura das vilosidades nos permitira confirmar a defesa direta e/ou indireta promovida pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal ao íleo dos camundongos. O aumento no tamanho das vilosidades intestinais também foi observado em outros estudos que colonizaram camundongos isentos de germes com conhecidas amostras probióticas de lactobacilos (Chen e Chen, 2013 e Preidis et al., 2012). Esses estudos observaram que os probióticos parecem ser capazes de estimular a proliferação e migração de enterócitos da cripta para a vilosidade. Além disso, Chen e Chen (2013) também constataram que, via estimulação de TLR2, houve aumento do número de células calciformes nos animais monoassociados com *L. kefiranofaciens*. O aumento no número deste tipo de célula aumenta o efeito protetor do lactobacilo ao estimular uma produção de muco pelo epitélio intestinal, promovendo o efeito barreira contra microorganismos patógenos. Tal evento também pode ter ocorrido nos animais monoassociados com os lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal, favorecendo assim seu efeito protetor na infecção subsequente por *S. Typhimurium*.

Os fígados dos camundongos convencionais pertencentes aos grupos experimentais já mencionados também foram avaliados histopatologicamente, qualitativamente e quantitativamente, verificando-se a quantidade de infiltrados

inflamatórios nas fotomicrografias. Tal medição avalia, indiretamente, a quantidade de bactéria translocada para o órgão. A representação qualitativa na figura 18, mostrando o grupo controle sem tratamento (CTL) e o controle negativo (ST, somente desafiado com *S. Typhimurium*), evidencia a ausência de infiltrados inflamatórios nos animais que não foram infectados e a presença de muitos infiltrados inflamatórios no grupo desafiado, apesar da estrutura do fígado, de uma forma geral, não ter sido comprometida. Para a avaliação quantitativa, foi mensurada a frequência da aparição de infiltrados inflamatórios nas 30 fotomicrografias de cada grupo experimental, seja tratado com leite fermentado durante sete dias e desafiado posteriormente com o patógeno ou somente desafiado posteriormente com o patógeno (controle negativo). Todos os grupos experimentais apresentaram frequência de infiltrados inflamatórios no fígado inferiores ao grupo controle negativo, sendo o grupo tratado com a amostra LP o que apresentou o melhor efeito protetor ( $p=0,03$ ), o grupo tratado com a amostra B7 o resultado mais discreto ( $p=0,05$ ), e aquele com D1 ( $p=0,04$ ), um efeito moderado. Apesar das diferenças, todas as comparações foram estatisticamente relevantes.

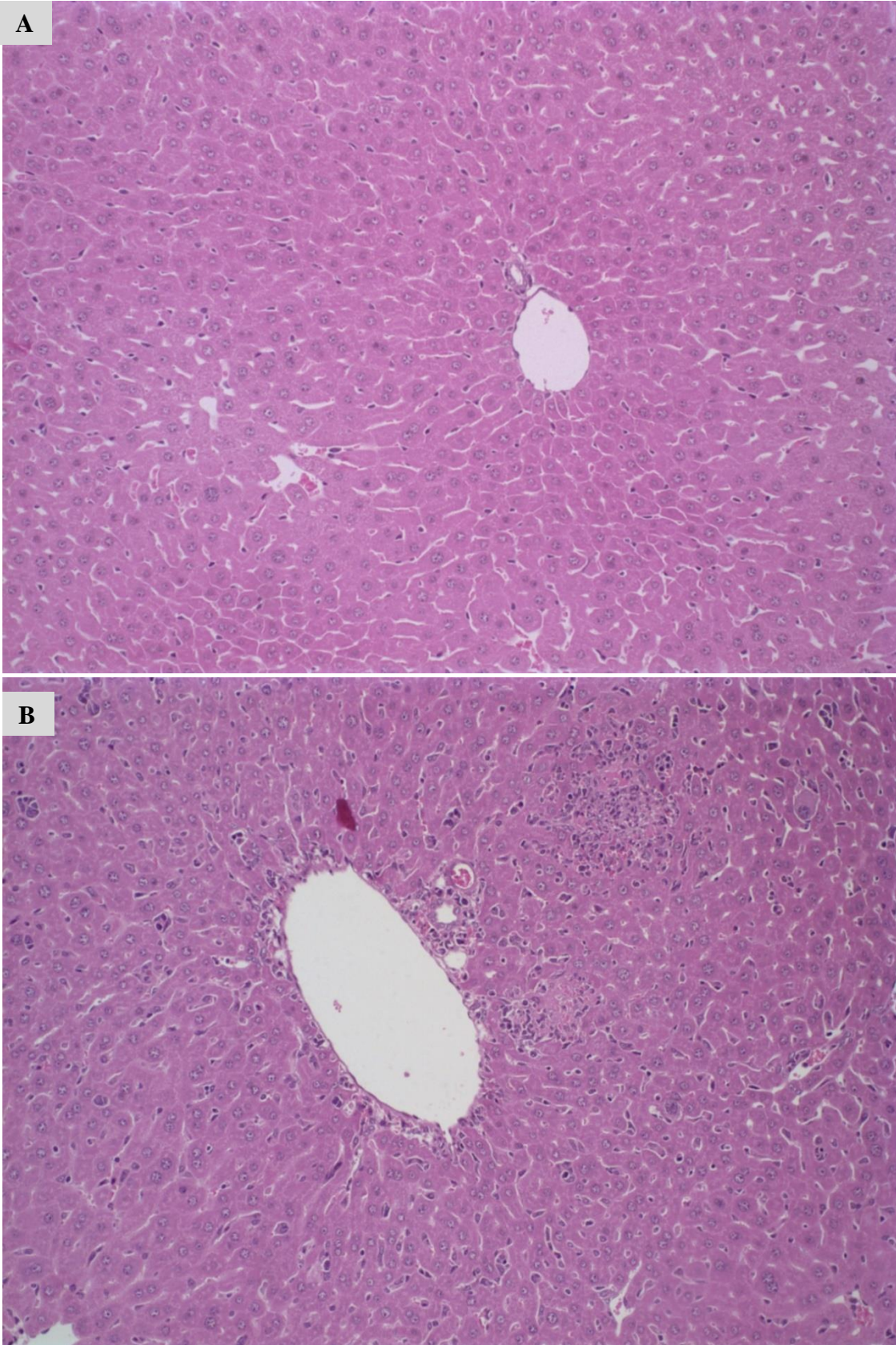
Chiva et al. (2002), em modelo de cirrose hepática em ratos, observaram a proteção de uma amostra de *L. johnsonii* probiótica e, dentre as hipóteses levantadas pelos autores para justificar esta proteção, a mais relevante é a de que a modulação da microbiota destes animais pelos lactobacilos probióticos reduziria a carga de patógenos no intestino. Esta redução, além de aumentar a saúde do intestino delgado (pela redução do estresse causado por espécies reativas de oxigênio produzidas pelos enterócitos), também reduziria a capacidade de translocação de micro-organismos do trato gastrointestinal para outros órgãos. Os autores também constaram que a proteção observada foi dada, em parte, pela modulação inflamatória do epitélio intestinal, mudando o tipo de resposta (local e sistêmica) de pró-inflamatória para regulatória (e/ou anti-inflamatória). Adawi et al. (2001), avaliando, em modelo similar ao de Chiva et al. (2002), a proteção de diversas amostras de lactobacilos probióticos contra danos ao fígado de ratos, também observaram uma redução significativa da translocação de bactérias intestinais nos animais previamente tratados com os mencionados lactobacilos. Os autores ainda ressaltaram, a partir dos seus resultados, a importância da imunomodulação e o favorecimento à proliferação e desenvolvimento do epitélio intestinal como as principais causas da proteção contra danos hepáticos promovida por esses micro-organismos probióticos.



**Figura 18. Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de camundongos**

**machos convencionais BALB/csem tratamento algum (A) e desafiado ao longo de cinco dias com *S. Typhimurium* (ST – B).X20, H&E.**

Experimento semelhante foi realizado com camundongos isentos de germe monoassociados com lactobacilos experimentais ou controle positivo LP e desafiados com *S. Typhimurium* ao longo de cinco dias. No presente experimento também foram avaliados qualitativa e quantitativamente o fígado de todos os animais de todos os grupos experimentais. A representação qualitativa na figura 19, à semelhança do que é apresentado na figura 18, mostra o grupo sem tratamento algum (CTLG) e o grupo somente desafiado com a salmonela (STG – controle negativo), evidenciando que, devido à ausência de uma microbiota, a translocação se dá de forma mais intensa nos animais desafiados com *S. Typhimurium*. Além disso, nos animais isentos de germes desafiados, observou-se a presença de megacariócitos e área com tecido fibrosado (indicando a ocorrência de necrose), reforçando a gravidade da infecção nestes animais. A avaliação quantitativa foi realizada à semelhança da análise para os grupos experimentais com animais convencionais. Os resultados foram semelhantes aos observados no experimento com os animais convencionais, visto que, ao comparar a frequência da presença de infiltrados inflamatórios nas fotomicrografias do controle negativo com os grupos previamente monoassociados e depois desafiados, foi observada uma superioridade do grupo colonizado pela amostra de *L. paracasei* LP ( $p=0,02$ ), seguida de uma resposta desejável pelo grupo colonizado pela D1 ( $p=0,04$ ) e uma resposta inferior pelos animais tratados pela *L. plantarum* B7 ( $p>0,05$ ). Curiosamente, a proteção conferida ao intestino dos camundongos pela amostra de *L. plantarum* isolado de queijo Minas artesanal não refletiu em uma proteção significativa, no que diz respeito à frequência de infiltrados inflamatórios, ao fígado. Os dados observados para a proteção frente à translocação de *S. Typhimurium* em animais monoassociados com essa mesma amostra B7, apesar de significativamente superiores ao controle negativo, foram inferiores ( $p<0,01$ ) quando comparados aos grupos tratados com as amostras D1 e LP (controle positivo) (figura 12), confirmando que a amostra de *L. plantarum*, em modelo com animal isento de germes monoassociado e posteriormente desafiado com o patógeno, não exerce uma proteção tão expressiva quanto às demais amostras avaliadas no presente estudo, no que diz respeito à integridade hepática.



**Figura 19.** Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de camundongos isentos de germe Swiss NIH sem tratamento algum (A) e desafiado ao longo de cinco dias com *S. Typhimurium* (ST - B). X20, H&E.

### 5.2.2.5. Citocinas envolvidas no efeito protetor local (íleo) de camundongos tratados com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) em uma infecção por *S. Typhimurium*

Os níveis de expressão de citocinas envolvidos no íleo de camundongos machos BALB/c com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pelas amostras de lactobacilos experimentais, ou controle positivo, podem ser observados nas figuras 20, 21 e 22.

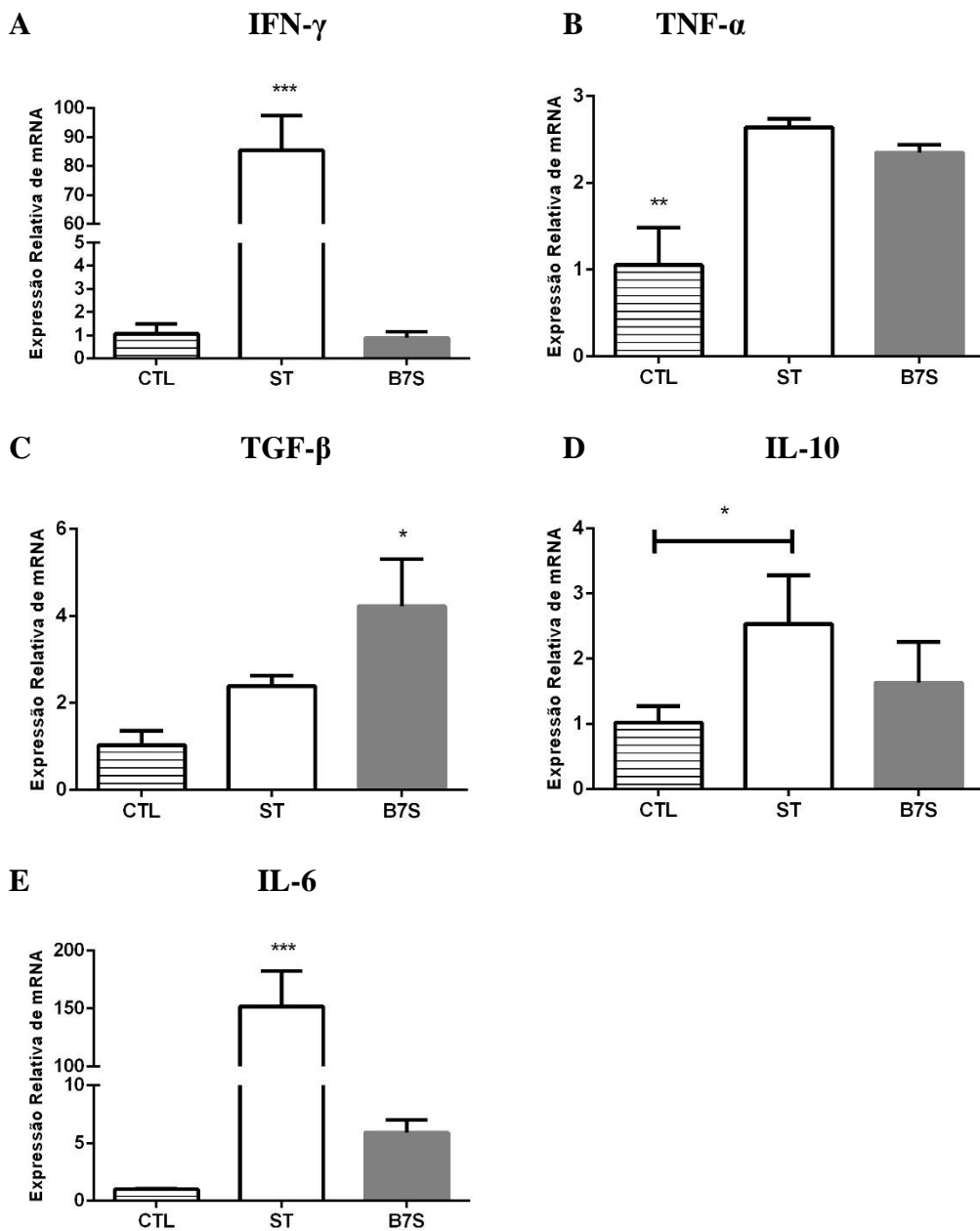
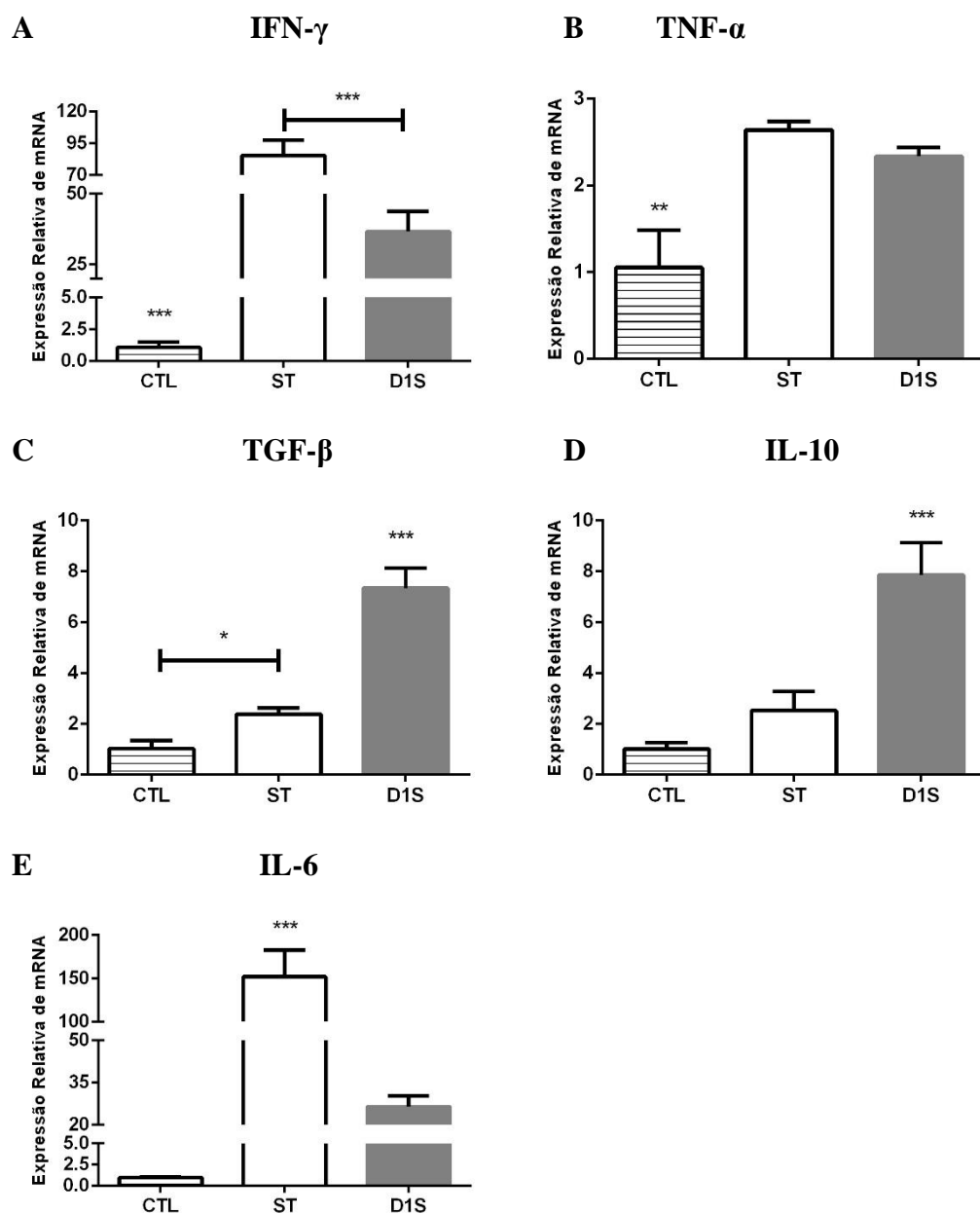


Figura 20. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento

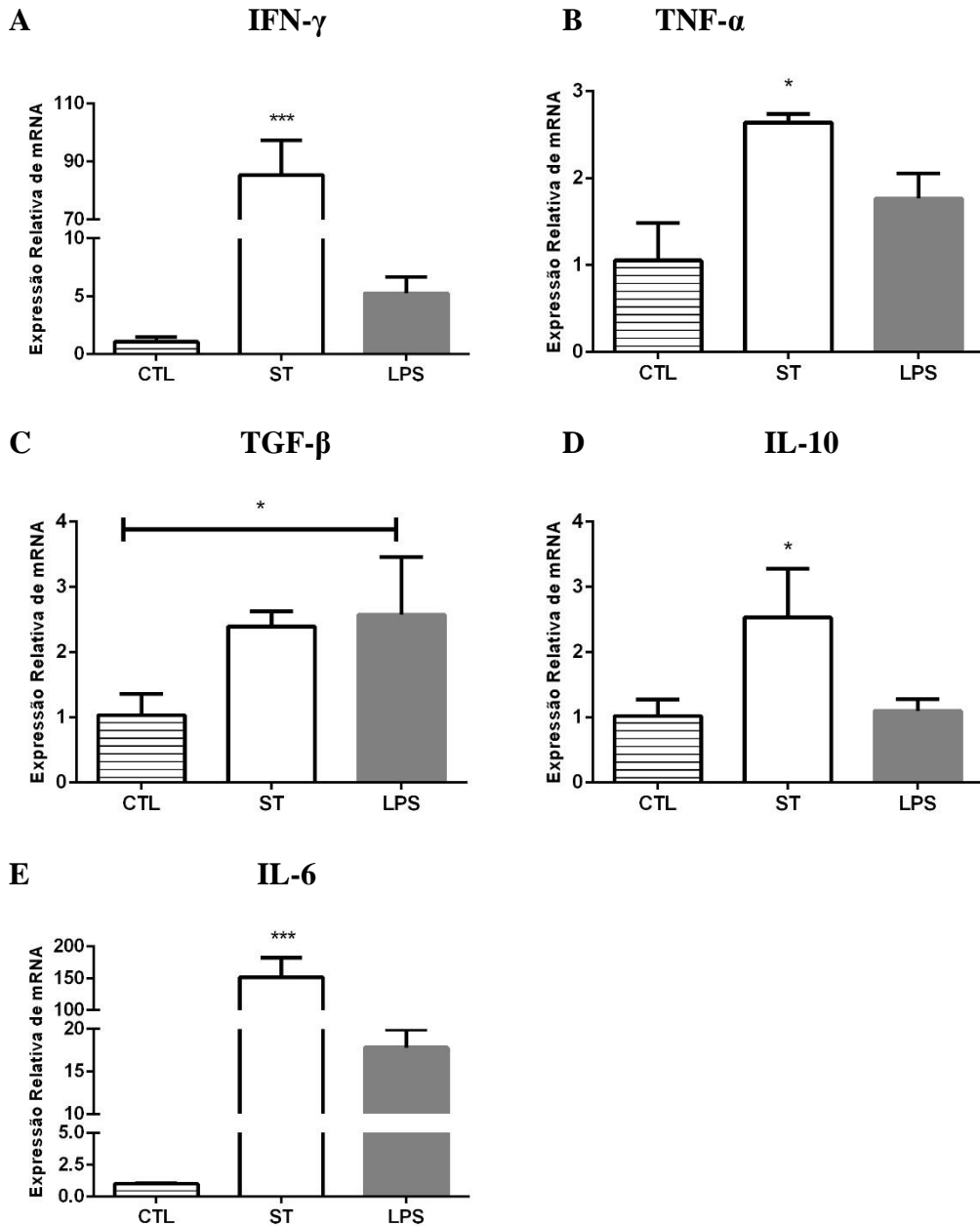


prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra B7 de *L. plantarum*. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. B7S: grupo que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); CTL: grupo sem tratamento. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,01$ ) \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).



**Figura 21.** Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra D1 de *L. rhamnosus*. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. D1S: grupo que

recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); CTL: grupo sem tratamento. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,01$ ) \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).



**Figura 22.** Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não pelo leite fermentado pela amostra LP de *L. paracasei* (controle positivo). (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. LPS: que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo

somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo); CTL: grupo sem tratamento. \*( $p < 0,05$ ) \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).

Avaliando a modulação da resposta inflamatória no íleo dos camundongos dos diferentes grupos experimentais (tratados com lactobacilos e desafiados com o enteropatógeno), aos cinco dias pós-desafio com *S. Typhimurium*, pode-se observar a redução, para todos os grupos, da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-6 em relação ao grupo somente desafiado. A infecção por salmonela, tanto murina quanto humana, induz uma potente inflamação intestinal a fim de favorecer a sua translocação. O impedimento da instalação desse estado inflamatório é uma das conhecidas ações dos probióticos, visto que promove a redução de IFN- $\gamma$ , um importante agente regulador da resposta pró-inflamatória por meio da ativação de macrófagos. Conseqüentemente à redução na ativação de macrófagos, haverá a redução desta importante via de translocação (que se dá por meio do sistema secretor tipo III, um importante fator de virulência das salmonelas). Resultados semelhantes foram observados em modelos murinos inflamatórios que avaliaram o perfil de citocinas, em experimento celular, de desafio com *S. Typhimurium* após tratamento *in vivo* com amostras probióticas (McCarthy et al., 2003; Sheil et al., 2006). Estes estudos mostraram uma redução das citocinas pró-inflamatórias (principalmente IFN- $\gamma$ ) em esplenócitos (*in vitro*) de animais que receberam tratamento com amostra probiótica, em concordância com o que foi observado no presente estudo. Porém, outros autores enfatizam a importância do IFN- $\gamma$  no início da infecção por *S. Typhimurium*, afirmando que é um importante agente na eliminação intracelular (em macrófagos, principalmente) do patógeno, e que o seu aumento deveria ser buscado na escolha de um probiótico, desde que em níveis adequados (Castillo et al., 2012). Neste contexto, a amostra D1 apresentou a modulação da citocina IFN- $\gamma$  no íleo mais desejável entre todas as amostras avaliadas, visto que a expressão dessa citocina foi superior ( $p < 0,001$ ) ao grupo sem tratamento (CTL) e inferior ao controle negativo (ST – somente infectado com *S. Typhimurium*). No presente trabalho, usamos como respaldo os outros resultados para afirmar o efeito protetor da modulação, no íleo, do estado pró-inflamatório para o regulatório (e/ou anti-inflamatório), pois o presente estudo não tem resultados *in vitro* com macrófagos para avaliar a importância ou não dessas citocinas neste contexto. Ademais, conforme foi ressaltado na introdução ao tema, *S. Typhimurium* se vale de um ambiente inflamado

intestinal para o sucesso da sua infecção. Desta forma, a modulação a um estado anti-inflamatório ou regulatório é desejável para a redução da gravidade desta doença.

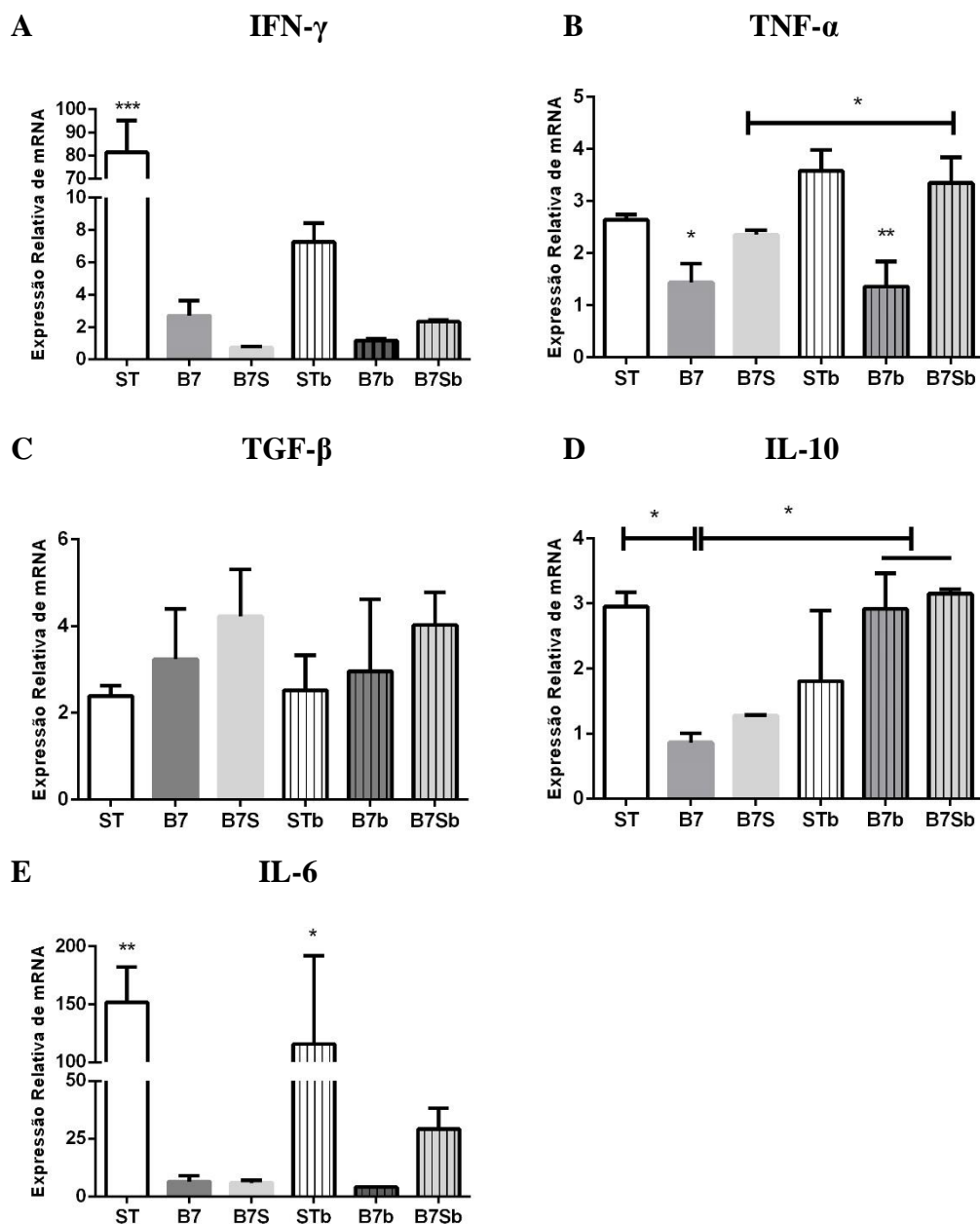
A citocina TNF- $\alpha$ , assim como IFN- $\gamma$ , tem a sua expressão estimulada pela infecção por *S. Typhimurium*. As respostas observadas foram variadas, mas, fundamentalmente, somente o controle positivo, *L. paracasei* (LP) conseguiu reduzir, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), os níveis dessa citocina no íleo dos camundongos que receberam seu tratamento e foram posteriormente desafiados, quando comparados com os camundongos somente desafiados (ST). Assim, não se pode incluir a participação dessa citocina, pelo menos aos cinco dias de infecção com salmonela no nosso modelo experimental, como parte do efeito protetor das nossas amostras experimentais. No entanto, a ausência de modulação dessa citocina não implica em dizer que ela não tenha importância na patogênese da *S. Typhimurium*, visto que o controle positivo, quando comparado ao controle negativo, modulou a redução na expressão dos níveis dessa citocina no nosso modelo experimental de salmonelose murina.

A resposta pró-inflamatória supracitada tem outro importante agente, a IL-6, uma das principais interleucinas pró-inflamatórias produzidas pelas células da lâmina própria intestinal, também envolvida na manutenção da inflamação no intestino desafiado com *S. Typhimurium*, que, como já dito anteriormente, é desejável para a instalação e manutenção de sua patogenia. Trabalhos como o de Castillo et al. (2011) e Ferreira et al. (2011), assim como o presente estudo, mostraram o aumento e a participação dessa interleucina em modelos de colite causados por *S. Typhimurium*. No contexto do efeito protetor de um micro-organismo pela redução dos níveis de IL-6 em uma salmonelose, em modelo murino, Castillo et al. (2011) observaram a redução desta com a administração de um *L. casei* (CRL 431) potencialmente probiótico, assim como foi observado no nosso estudo para todos os grupos que receberam lactobacilos e foram posteriormente infectados com o patógeno. O trabalho de Matsumoto et al. (2005) mostrou claramente a inibição por um *L. casei* (Shirota) probiótico, em um modelo de colite murina, da produção de IL-6, mediada pela produção de IL-10 e TGF- $\beta$ .

As citocinas TGF- $\beta$  e IL-10, por sua vez, participam da regulação da resposta inflamatória, com consequente instalação de um estado anti-inflamatório. Nesse contexto, cada um dos lactobacilos utilizados neste estudo apresentou uma resposta diferente, o que pode justificar parte da diferença entre os efeitos protetores oferecidos mediante suas administrações. A amostra B7(*L. plantarum*) proporcionou, ao grupo ao qual foi administrada, somente o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de TGF- $\beta$  quando

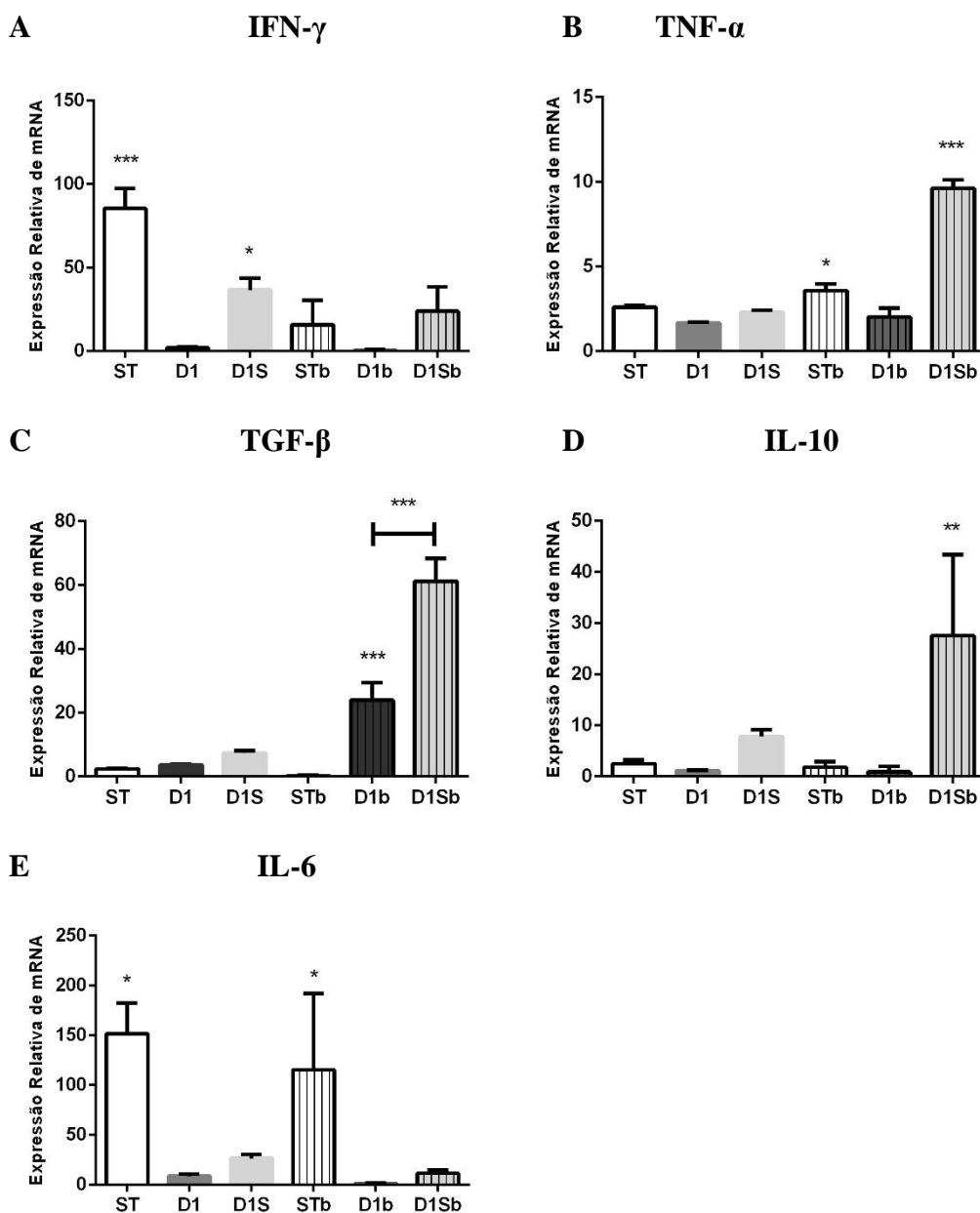
comparado ao grupo somente desafiado com salmonela, ST – controle negativo). A amostra D1 de *L. rhamnosus* apresentou os resultados mais interessantes nos grupos aos quais foi administrada. A produção de TGF- $\beta$  foi superior ( $p < 0,001$ ) (aos grupos controle negativo e CTL (sem tratamento) assim como a produção de IL-10 no grupo D1S (grupo tratado e desafiado com o patógeno). Isso demonstra, em conjunto com os outros resultados já apresentados para essa amostra, o seu importante efeito protetor na modulação do sistema imune localmente. O controle positivo, LP, por sua vez, apresentou os resultados mais discretos no que tange a expressão e possível produção de citocinas anti-inflamatórias e/ou regulatórias, evidenciando que estas não são tão importantes para o efeito protetor promovido pelo probiótico *L. paracasei*. O experimento de Di Giacinto et al. (2005) também observou efeito protetor de um composto com vários micro-organismos probióticos (VSL#3) em um modelo murino inflamatório intestinal (colite) associado a aumento nos níveis de IL-10 e redução concomitante de IFN- $\gamma$ , o que também foi observado no presente trabalho, em diferentes escalas, com as amostras potencialmente probióticas de lactobacilos utilizadas. Estes autores também constataram a importância do aumento de TGF- $\beta$ , de forma até mais relevante que a participação de IL-10, no abrandamento de processos inflamatórios intestinais. Tal afirmativa foi justificada pela observação da maior participação de células T CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (envolvidas na estimulação da secreção de TGF- $\beta$  por macrófagos e portadoras de tal citocina de forma latente em sua superfície celular) como importantes efetores dessa ação anti-inflamatória no intestino dos camundongos desafiados. Provavelmente, a indução ao estado anti-inflamatório e efeito protetor observado nos grupos experimentais que receberam os leites fermentados probióticos no presente estudo foi devido ao envolvimento destas citocinas (IL-10 e TGF- $\beta$ ), assim como, possivelmente, das células imunitárias associadas à mucosa intestinal.

A participação das citocinas mencionadas também foi avaliada no íleo dos camundongos dos grupos experimentais após sete dias de infecção por *S. Typhimurium*. Estes resultados foram comparados com os resultados já apresentados a fim de se observar a ocorrência ou não de mudanças nas citocinas envolvidas assim como de na intensidade da resposta mediada por essas citocinas. Também foi avaliado o efeito isolado dos lactobacilos após três e sete dias de administração, para observação das citocinas envolvidas no estado pré-desafio e de quão rápida é a ação dessa modulação promovida por estes lactobacilos. Os resultados podem ser avaliados nas figuras 23, 24 e 25.



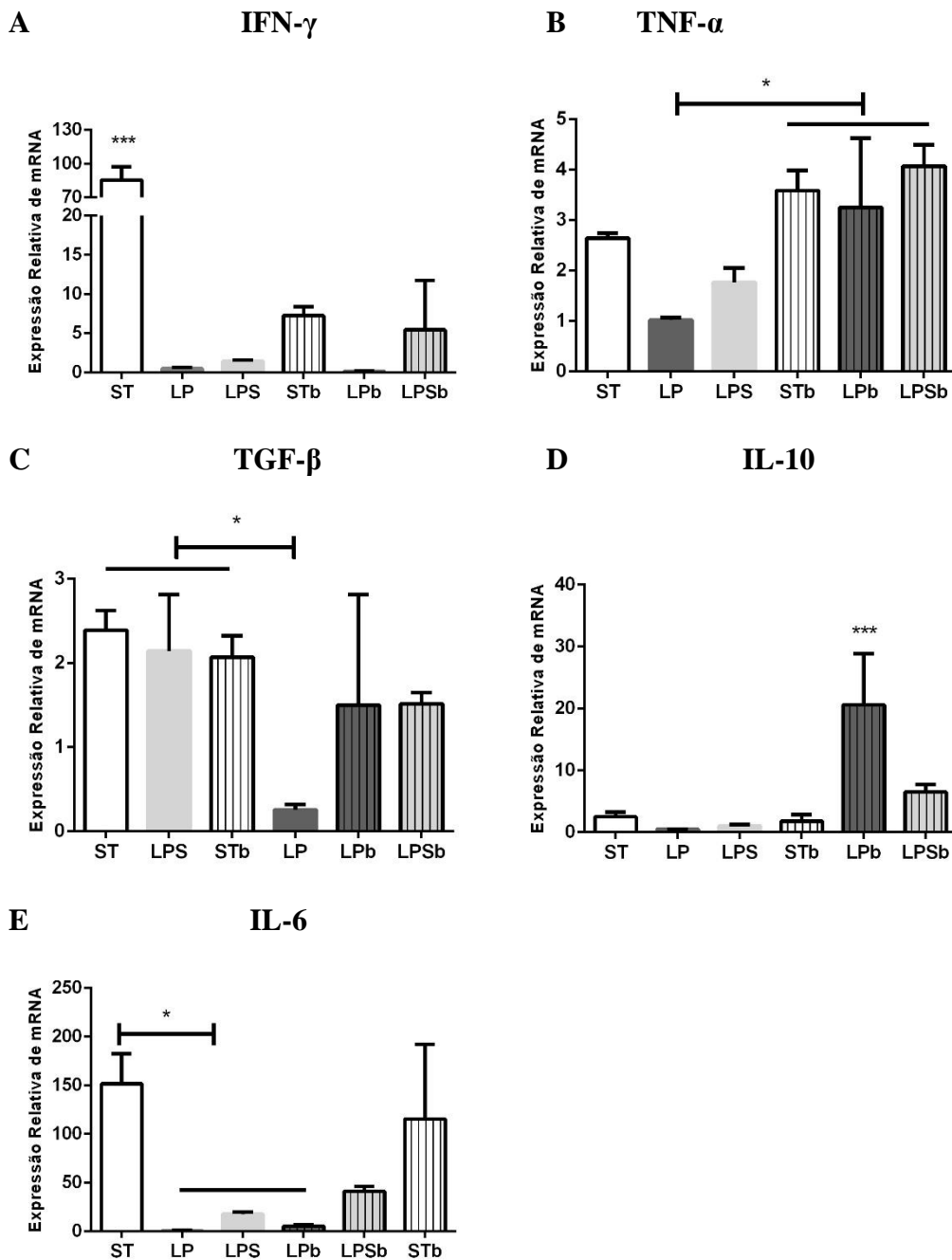
**Figura 23.** Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra B7 de *L. plantarum*. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. B7: grupo que somente recebeu leite fermentado por *L. plantarum* por três dias; B7S: grupo que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) e sacrificado após cinco dias de infecção. Os grupos com a letra b representam o tempo dois do experimento, ou seja, sete dias de tratamento somente com leite fermentado (B7b) ou sete dias de infecção

(B7Sb e STb).\*(p<0,05) \*\*(P<0,01) \*\*\*(P<0,001). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).



**Figura 24. Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra D1 de *L. rhamnosus*. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. D1: grupo que somente recebeu leite fermentado por *L. rhamnosus* por três dias; D1S: grupo que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) e sacrificado após cinco dias de infecção. Os grupos com a letra b representam o tempo dois do experimento, ou seja,**

sete dias de tratamento somente com leite fermentado (D1b) ou sete dias de infecção (D1Sb e STb). \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,01$ )\*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).



**Figura 25.** Perfil de citocinas no íleo de camundongos machos BALB/c, avaliados por qPCR, com cinco e sete dias de infecção por *S. Typhimurium*, com tratamento prévio (durante sete dias) ou não por leite fermentado pela amostra LP de *L. paracasei* (controle positivo). (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. LP: grupo que somente recebeu leite fermentado por *L. paracasei* por três dias; LPS: grupo que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; ST: grupo



somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) e sacrificado após cinco dias de infecção. Os grupos com a letra b representam o tempo dois do experimento, ou seja, sete dias de tratamento somente com leite fermentado (LPb) ou sete dias de infecção (LPSb e STb). \*( $p < 0,05$ ) \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Tukey) (n=3).

Após sete dias de infecção, nos grupos com tratamento prévio com leite fermentado pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e controle positivo (LP) durante sete dias, algumas mudanças puderam ser percebidas na dinâmica das citocinas envolvidas nesta nova condição experimental. Muotiala e Mäkelä (1993), avaliando a participação de IFN- $\gamma$  em diversos pontos de uma salmonelose murina, mostraram que tal citocina não tem participação tão ativa a partir do sétimo dia de infecção, visto que os parâmetros da patogênese da doença avaliada pelos autores não se modificaram a partir do sétimo dia mediante o tratamento com anti-IFN- $\gamma$ . Tal informação está de acordo com os resultados aqui encontrados e apresentados. No que diz respeito à resposta pró-inflamatória, observou-se que a sua participação é bem menos intensa e, doravante, menos importante nesse segundo momento da infecção por *S. Typhimurium*. Isto talvez seja consequência, em parte, do deslocamento da infecção do intestino para o fígado. A IL-6, por sua vez, continua presente nos grupos somente infectados com o patógeno em níveis superiores ( $p < 0,05$ ) aos grupos tratados com leite fermentado e posteriormente desafiados (exceto para o LP, controle positivo), evidenciado que as amostras B7 e D1 continuam exercendo seu efeito protetor ao manter a redução da inflamação no tempo dois (sete dias pós-desafio com *S. Typhimurium*) do nosso modelo experimental.

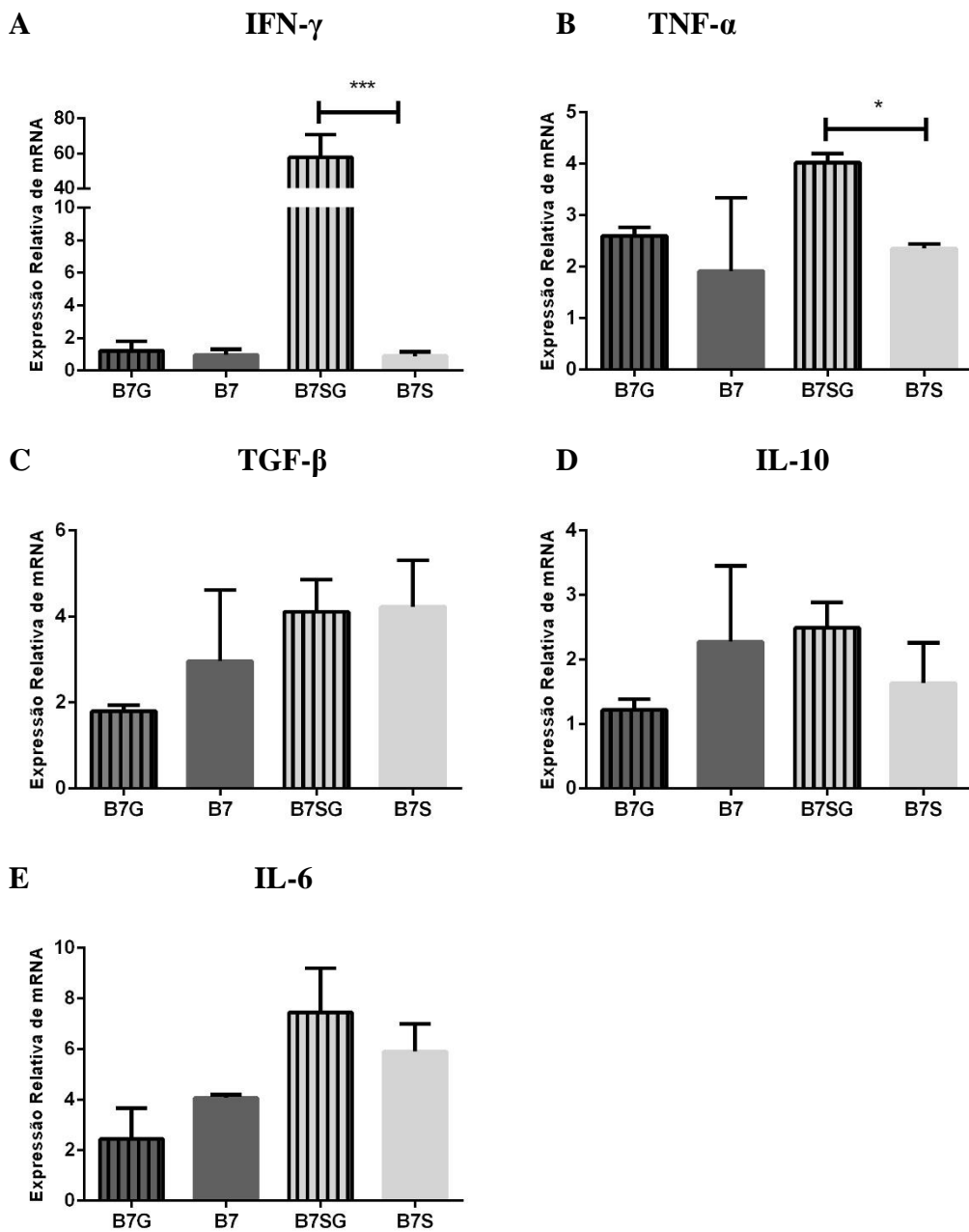
A participação de TNF- $\alpha$  no tempo dois do experimento também apresentou um comportamento bem variado entre os diferentes grupos, mas, de uma forma geral, foi observado um aumento nessa participação (a expressão dessa citocina foi maior ou igual ao grupo somente infectado do tempo dois, assim como a expressão dessa citocina apresentou-se aumentada, de uma forma geral, no tempo dois quando comparado ao tempo um – sete dias de tratamento com leite fermentado e cinco dias de infecção). Zaki et al. (2013), correlacionaram, também em salmonelose murina experimental, o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  a uma maior sobrevivência e menor gravidade da doença, ao comparar um grupo com animais nocaute para um receptor do tipo NOD altamente associado ao reconhecimento da *S. Typhimurium* nos enterócitos de camundongos.

Apesar disso, somente o grupo D1 mostraria um real efeito protetor considerando essa informação, visto que foi o único grupo que apresentou níveis estatisticamente superiores de TNF- $\alpha$  no grupo tratado e desafiado quando comparado ao grupo somente desafiado com o patógeno por sete dias (STb).

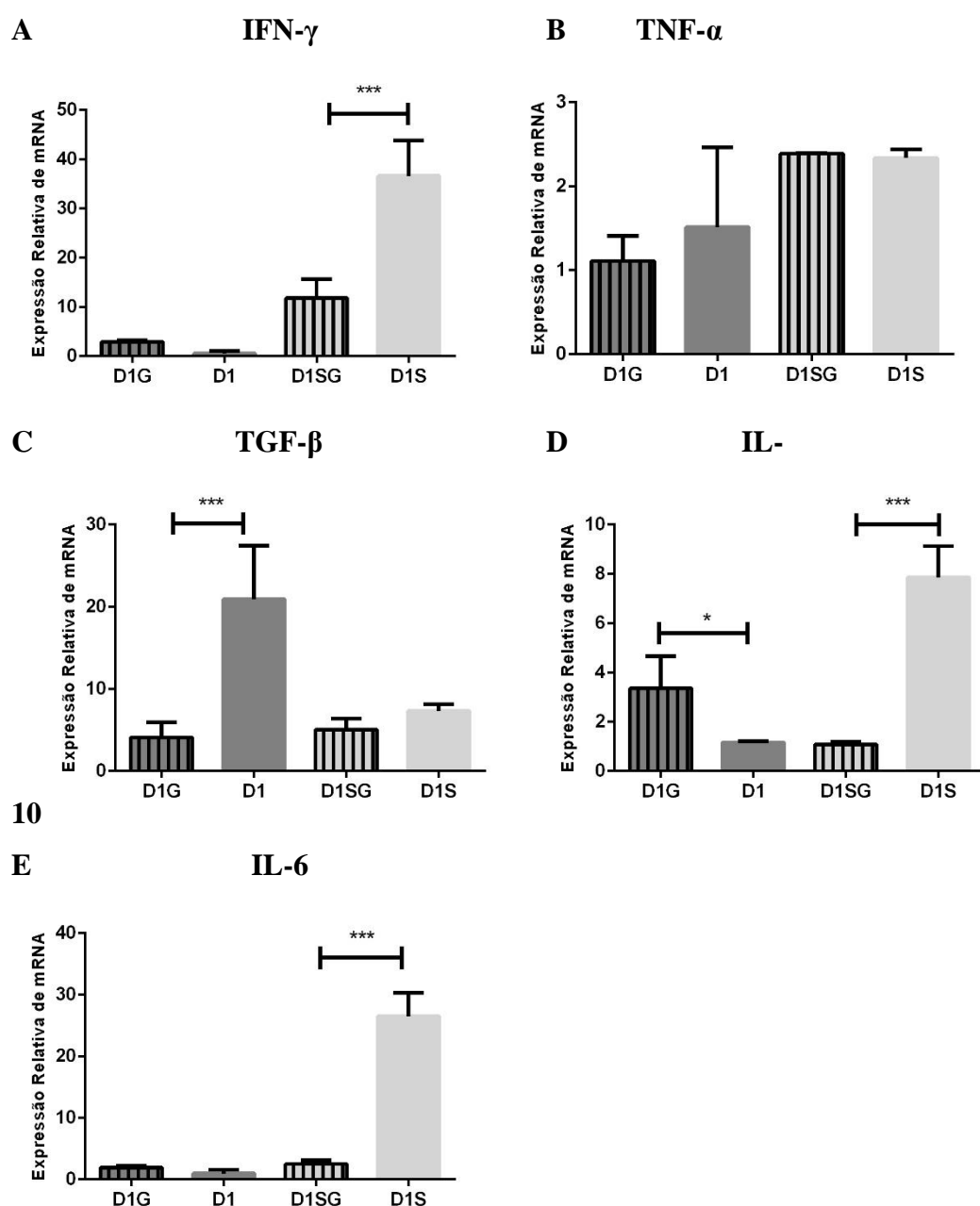
As citocinas envolvidas nas respostas regulatórias e/ou anti-inflamatórias avaliadas após sete dias de infecção também apresentaram variações entre os diferentes grupos experimentais (sejam relacionados a um mesmo lactobacilo, comparando os dois tempos experimentais diferentes, ou entre lactobacilos diferentes). Os grupos tratados com o *L. plantarum* B7 apresentaram somente uma tendência a manter elevados níveis de IL-10 no tempo dois do nosso modelo experimental, apesar de que estes níveis não se mostraram superiores ( $p > 0,05$ ) ao grupo somente desafiado com o patógeno por sete dias. Por outro lado, a amostra D1, de *L. rhamnosus*, induziu um aumento, muito superior estatisticamente, de TGF- $\beta$  e IL-10 quando comparado aos grupos somente desafiados com *S. Typhimurium* (ST – 5 dias pós-desafio e STb - 7 dias pós-desafio). Isso ocorreu tanto para o grupo somente tratado com leite fermentado (D1Gb) (só para a expressão de TGF- $\beta$ ) como também para o grupo desafiado após este tratamento (D1GSb), ambos no tempo dois do nosso modelo de infecção. *L. paracasei*, nosso controle positivo, apresentou, assim como no tempo um (5 dias pós-desafio), os resultados mais discretos na modulação da resposta anti-inflamatória na avaliação dos diferentes grupos experimentais no tempo dois. Conforme mencionado anteriormente, a participação do TGF- $\beta$  localmente (no íleo dos camundongos) reduz processos inflamatórios e favorece a manutenção de um intestino saudável, reduzindo a fragilidade e vulnerabilidade à disbioses intestinais e possíveis agravamentos da infecção causada pela salmonela. Outros trabalhos também observaram a importante participação no efeito protetor de lactobacilos probióticos em infecção tifoide murina, como o *L. salivarius* (Sheil et al., 2004). O estudo de Juarez et al. (2013) avaliou a participação das citocinas em um modelo de septicemia (similar ao que aconteceria na salmonelose após translocação do agente etiológico para órgãos-alvo como fígado e baço) induzida por LPS, lipopolissacarídeo da membrana externa de bactérias Gram negativos. Este estudo observou uma dinâmica das citocinas envolvidas no processo que envolveu o tratamento prévio com uma amostra de *L. reuteri* semelhante ao que foi observado nos grupos tratados com a nossa amostra de *L. rhamnosus* D1 (considerando as variações de citocinas avaliadas). Em ambos os trabalhos, houve um aumento nos níveis observados

de IL-10 associado a uma diminuição nos níveis IL-6, o que gerou um desejável efeito protetor.

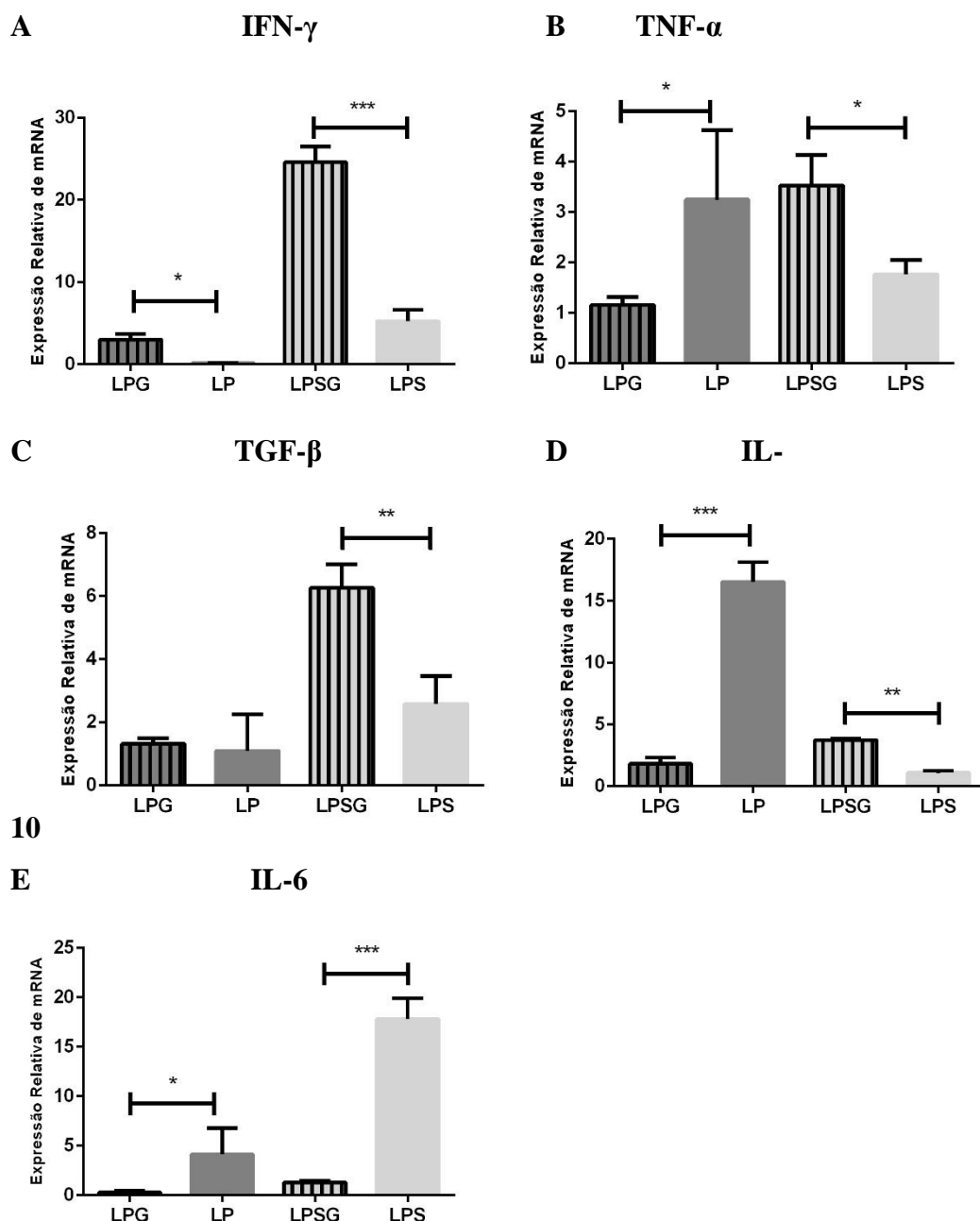
Por fim, foram analisadas as diferenças na expressão de citocinas no íleo de animais convencionais, com os tratamentos descritos, comparados com animais isentos de germe monoassociados com os lactobacilos e desafiados com o patógeno. O objetivo dessa parte do experimento foi observar a interferência de uma microbiota presente na expressão das citocinas assim como avaliar o quanto os lactobacilos estimulam o sistema imune sem a participação da microbiota. Os resultados destes experimentos podem ser observados nas figuras 26, 27 e 28.



**Figura 26.** Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. plantarum* B7 e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. (B7) grupo CV que somente recebeu leite fermentado por B7; (B7G) grupo IG monoassociado com B7; (B7S) grupo CV que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; (B7SG) grupo IG monoassociado com B7 e infectado. \*( $P < 0,05$ ) \*\*\*( $P < 0,001$ ). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Sidak, que compara somente o grupo de animais convencionais com o seu semelhante isento de germes) (n=3).



**Figura 27. Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. rhamnosus* D1 e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. (D1) grupo CV que somente recebeu leite fermentado por D1; (D1G) grupo IG monoassociado com D1; (D1S) grupo CV que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; (D1SG) grupo IG monoassociado com D1 e infectado. \*(P<0,05) \*\*\*(P<0,001). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Sidak, que compara somente o grupo de animais convencionais com o seu semelhante isento de germes) (n=3).**



10

**Figura 28. Comparação do perfil de citocinas, avaliados por qPCR, no íleo de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (IG) com tratamento prévio com leite fermentado (durante sete dias) ou monoassociação (cinco dias) com *L. paracasei* LP e desafiados ou não por *S. Typhimurium* durante cinco dias. (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10; (E) IL-6. (LP) grupo CV que somente recebeu leite fermentado por LP; (LPG) grupo IG monoassociado com LP; (LPS) grupo CV que recebeu leite fermentado e foi infectado com *S. Typhimurium*; (LPSG) grupo IG monoassociado com LP e infectado. \*(P<0,05) \*\* (P<0,01) \*\*\* (P<0,001). Teste One-way ANOVA (pós-teste de Sidak, que compara somente o grupo de animais convencionais com o seu semelhante isento de germes) (n=3).**

Mais uma vez pudemos observar, agora em animais isentos de germes quando comparados com animais convencionais, como é variada a expressão de citocinas no íleo dos camundongos frente aos diferentes tratamentos. Na resposta em que as citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas, vemos um perfil bem similar entre os grupos colonizados com as amostras B7 e LP (controle positivo), nos quais a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  parece estar aumentada nos animais isentos de germes que foram monoassociados, cada um com seu lactobacilo, e depois desafiados com a *S. Typhimurium*; quando comparados com seu semelhante convencional (tratado com leite fermentado ao invés de monoassociados com o mesmo). Isto se deu, provavelmente, pela resposta inflamatória exagerada em animais recentemente colonizados e estimulados tanto por bactérias tanto Gram positivo como Gram negativo, tendo os mecanismos regulatórios ainda não totalmente estabelecido. Sabe-se que os animais isentos de germes têm uma resposta inflamatória deficiente, não sendo capazes de responder com citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 frente a uma infecção ou mesmo exposição a estímulo microbiano, de acordo com Ganal et al. (2012). Estes mesmos autores demonstraram que o estímulo prévio com ASF (flora alterada de Schaedler, composta por oito micro-organismos, sendo dois deles lactobacilos e quatro fusobactérias, que são comumente utilizadas para avaliar o efeito do LPS de bactérias Gram negativo em modelos de colonização) mudou drasticamente a capacidade de resposta inflamatória dos animais isentos de germes, o que parece ser algo similar ao que ocorreu no nosso experimento, com o estímulo de colonização por um lactobacilo seguido por um segundo estímulo pela Gram negativo *S. Typhimurium*.

O perfil de IL-6, especialmente para os grupos colonizados com as amostras D1 e LP, mostra um padrão invertido do esperado, em que a expressão supostamente deveria ser estatisticamente maior nos grupos convencionais (tratados com lactobacilos e desafiados com salmonela) do que nos grupos semelhantes monoassociados com os mesmos lactobacilos. Ganal et al. (2012) propuseram várias teorias para explicar o porque da resposta reduzida e tardia para esta citocina (IL-6) e a hipótese mais próxima foi a de que as vias de sinalização intracelular para reconhecimento de patógenos e indução da produção de IFN tipo I é deficiente na ausência do estímulo por microbiota. É curioso observar que a exposição a micro-organismos não reverteu o fenótipo para a produção de IL-6 nos grupos mencionados enquanto o oposto ocorreu para a expressão das outras citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

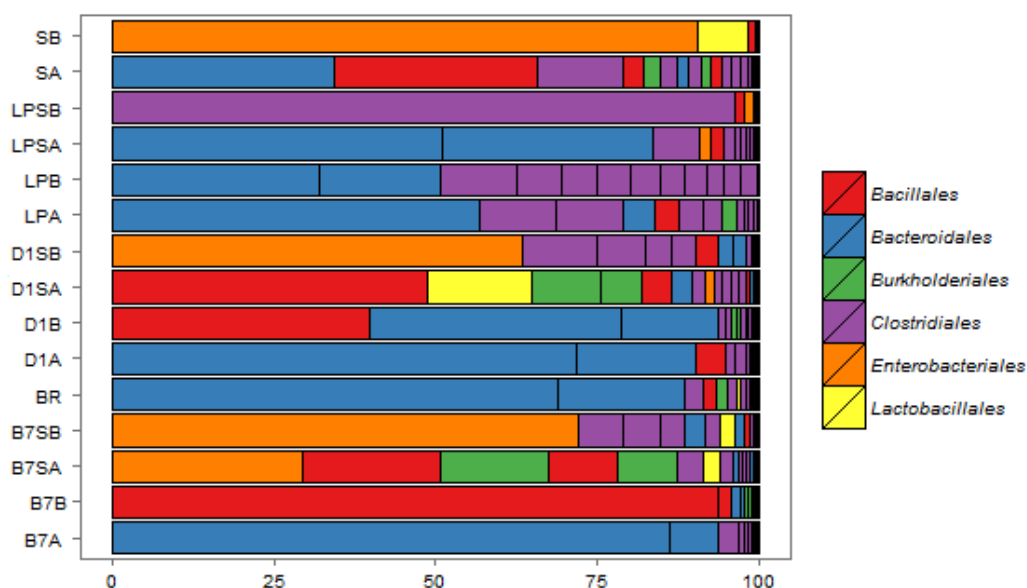
A explicação para os maiores níveis expressos de citocinas anti-inflamatórias ou regulatórias nos grupos monoassociados com o controle positivo *L. paracasei* e desafiados com o patógeno, quando comparados com seus similares convencionais, pode ser elucidada pela teoria de Hrcir et al. (2008). Tais autores afirmaram que a maturação e a funcionalidade de células T CD4<sup>+</sup> é reduzida em animais isentos de germe, e, com a presença de uma microbiota, a mesma é estabelecida a níveis normais, balanceando e equilibrando a resposta imune. Souza et al. (2004) observaram que a redução da resposta regulatória é promovida de forma gradual após associação de animais isentos de germes com uma microbiota de camundongo convencional. Em seu trabalho, somente após 14 dias foi observada a reversão do quadro de resposta pró-inflamatória deficiente para normal, sendo esse quadro revertido principalmente pela redução de expressão exagerada da citocina regulatória IL-10. O tempo mostrado pelos autores pode justificar a presença ainda elevada de IL-10 no grupo monoassociado com a amostra LP e depois desafiado com o patógeno em comparação ao seu grupo convencional semelhante, uma vez que o período experimental total do estudo com animais isentos de germes no presente trabalho é menor que 14 dias.

O grupo D1, por sua vez, apresentou resultados interessantes e diferentes dos outros dois grupos experimentais mencionados. Para IFN- $\gamma$  (e também IL-6, já discutido acima), o grupo monoassociado e desafiado apresentou expressão menor que seu semelhante convencional, o que nos leva a inferir que a modulação de uma resposta anti-inflamatória no íleo dos animais tratados com essa amostra de *L. rhamnosus* é realmente intensa. A esse fato, soma-se a maior expressão de IL-10 do grupo somente monoassociado com a amostra D1 em comparação com o grupo convencional somente

tratado com leite fermentado. Desta forma, parece que a amostra D1 é a que tem o efeito mais expressivo na modulação anti-inflamatória no íleo de camundongos, visto que sua ação em animais isentos de germes foi ainda maior do que em animais convencionais, mostrando um potencial efeito imunomodulador deste lactobacilo.

#### 5.2.2.6. Variação da microbiota do íleo de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais por meio de metodologias de sequenciamento de nova geração e quantificação por meio de qPCR

A abundância relativa dos 20 OTUs (“Operation Taxonomical Unit” ou Unidade Taxonômica Operacional) dominantes pela análise na plataforma Illumina®Miseq, em nível de ordem (taxonomia em que todos os OTUs apresentaram identificação conhecida), no conteúdo do íleo dos animais BALB/c, tratados ou não com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal (ou controle positivo) e desafiado com *S. Typhimurium*, pode ser observada na figura 29.



**Figura 29.** Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de ordem, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados ou não com leite fermentado por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC). B7: *L. plantarum*, D1: *L. rhamnosus*, LP: *L. paracasei* (controle positivo). A: três dias de administração prévia de leite fermentado pelos lactobacilos. B: sete dias de administração prévia de leite fermentado pelos lactobacilos. S: grupo



somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo). Sacrifício após cinco dias (SA) e sete dias (SB) da infecção com salmonela. BR: Grupo sem tratamento (n=3).

As análises dos OTUs dominantes em cada um dos grupos experimentais nos mostra que o grupo sem tratamento algum tem uma predominância de micro-organismos da ordem *Bacteroidales*. Kaiser et al. (2013), analisando microbiota fecal de camundongos BALB/c machos, também encontraram em seu grupo sem tratamento predominância de OTUs do filo Bacteroidetes, corroborando parcialmente os resultados encontrados neste estudo. Parcialmente porque estes autores também encontraram uma predominância de OTUs do filo Firmicutes, o que não foi observado no presente trabalho. Isto se deu, provavelmente, pelo fato de analisar o conteúdo do íleo, enquanto a maioria dos trabalhos encontrados na literatura avalia a microbiota do conteúdo do cólon, ceco e/ou das fezes. Já Lluch et al. (2015), avaliando a microbiota do íleo, assim como o presente estudo, encontraram uma predominância de OTUs da família *Porphyromonadaceae*, que pertence à ordem *Bacteroidales*, indo ao encontro dos resultados aqui apresentados.

Os grupos somente tratados com leites fermentados pelas amostras B7 e D1 de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, respectivamente, mostraram perfis muito semelhantes ao do grupo sem tratamento após três dias. Porém, após sete dias de administração do leite fermentado, ambos os grupos mostraram um aumento na predominância de micro-organismos da ordem *Bacillales*, especialmente os animais do grupo B7. O grupo somente infectado com *S. Typhimurium* e sacrificado cinco dias após o desafio mostra uma tendência similar, porém com a participação também da ordem *Clostridiales*, o que não foi observado nos grupos somente previamente tratados com os leites fermentados das amostras B7 e D1. Já nas amostras tratadas pelo leite fermentado pelo *L. paracasei* (nosso controle positivo - LP), há um predomínio de micro-organismos das ordens *Bacteroidales* e *Clostridiales* em ambos os tempos, resultado diferente ao de todos os outros grupos, especialmente se considerarmos o tempo de sete dias de tratamento prévio com leite fermentado (LPB).

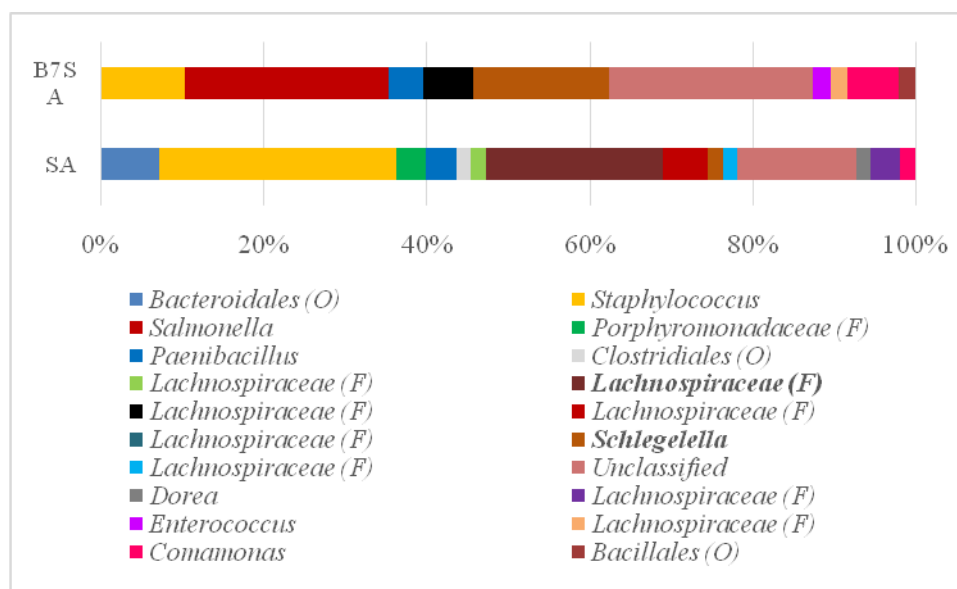
Poucos trabalhos na literatura avaliaram a variação da microbiota em camundongos após tratamento com probióticos, e constam, menos ainda, trabalhos que avaliaram a cinética dessa administração de probióticos, por isso, nosso trabalho apresenta um caráter inédito nesse quesito. Alguns trabalhos que avaliaram o efeito de probióticos na microbiota intestinal, como o de Degirolamo et al. (2014), que analisou a

sua variação após a administração prévia durante 21 dias com VLS#3 (uma conhecida apresentação farmacológica com uma gama de culturas probióticas conhecidas). Os autores observaram apenas pequena variação na dinâmica de micro-organismos dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, algo muito diferente do que foi visto no nosso trabalho.

A variação entre os grupos tratados ou não durante sete dias com leites fermentados pelos lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados com *S. Typhimurium*, sendo sacrificados após cinco (SA) e sete (SB) dias após o desafio, mostra uma grande diferença entre os grupos experimentais. Os grupos SA, sacrificados cinco dias após o desafio com o patógeno, mostraram: no grupo somente desafio com a salmonela (SA), aumento na predominância de micro-organismos das ordens *Bacillales* (principalmente) e *Clostridiales*; no grupo previamente tratado com *L. rhamnosus* D1 (D1SA), aumento na predominância de *Bacillales* (principalmente) e também, diferentemente do grupo SA, de micro-organismos da ordem *Lactobacillales* (provavelmente o próprio *L. rhamnosus* D1) e *Burkholderiales*; no grupo previamente tratado com a amostra B7, vimos perfil semelhante, porém com a representatividade da ordem *Enterobacteriales* (representado pela *S. Typhimurium*) no lugar da *Lactobacillales*, mostrando, no que diz respeito à variação da microbiota, um efeito protetor menos eficaz do *L. plantarum* B7 quando comparado com a amostra D1; por fim, no grupo previamente tratado com nosso controle positivo, LPSA, há uma manutenção da predominância de micro-organismos da ordem *Bacteroidales*, mostrando uma manutenção de um estado próximo ao do animal sem tratamento. Isso indica um maior efeito protetor dessa amostra, quando avaliando a variação da microbiota, em comparação com o efeito das amostras de lactobacilos isoladas de queijo Minas artesanal. Nos grupos SB, há um predomínio do OTU do gênero *Salmonella*, representando pela ordem *Enterobacteriales*, à qual esta espécie pertence, variando os grupos tratados com lactobacilos do controle negativo principalmente quanto à presença da ordem *Clostridiales* nos grupos tratados e, estranhamente, da ordem *Lactobacillales* no controle negativo (SB). Mais uma vez, o grupo tratado com o controle positivo (LPSB) mostra uma superioridade no seu efeito protetor, visto que não apresenta o OTU de *Enterobacteriales* e sim uma predominância de um OTU da ordem *Clostridiales* (não tendo qualquer identificação filogenética conhecida além da ordem à qual pertence).

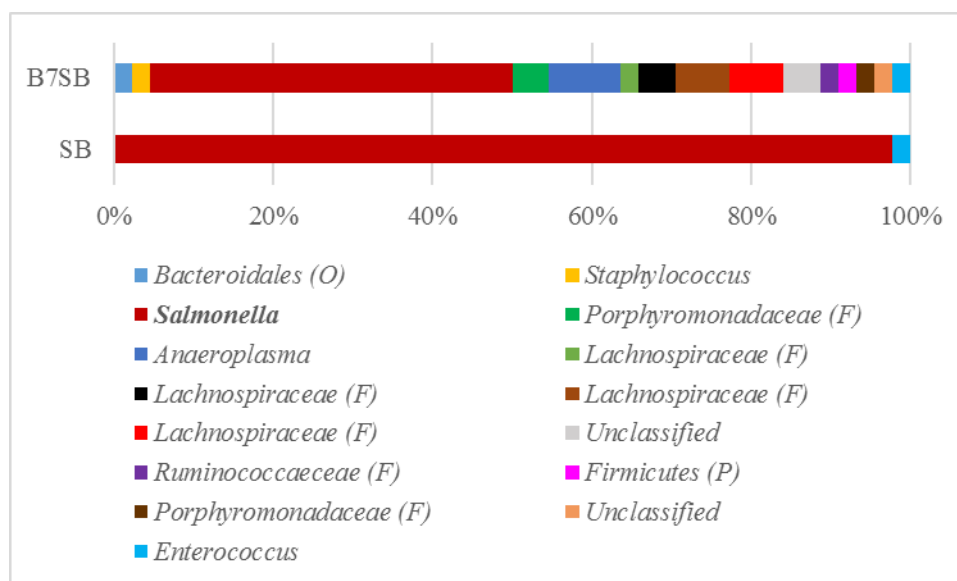
Avaliando as variações por análises de “metastats”, que comparam, por meio de testes de T não paramétricos, a abundância dos OTUs a um nível de significância de 0,05, observamos alguns OTUs que apresentaram variação significativa entre os grupos

analisados. A comparação entre os grupos B7SA e SA apresentam dois OTUs variando significativamente em abundância, um da ordem *Clostridiales* significativamente maior no grupo SA, sendo identificado como pertencente à família *Lachnospiraceae*, e um significativamente maior no grupo B7SA do gênero *Schlegelella*, representando a ordem *Burkholderiales*, como pode ser observado na figura 30.



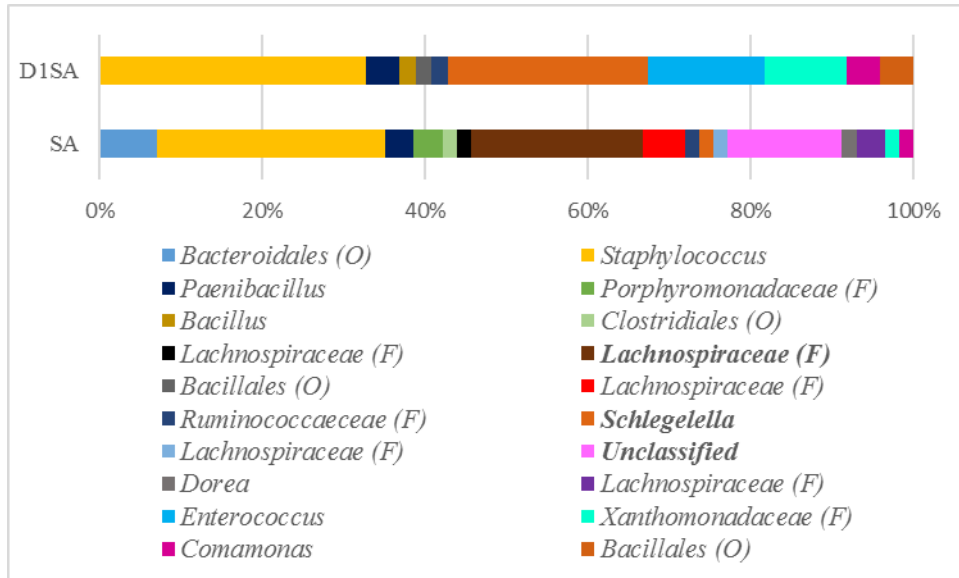
**Figura 30. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC). B7SA: grupo com sete dias de administração prévia de leite fermentado pela amostra de *L. plantarum* e sacrifício após cinco dias da infecção com salmonela, SA: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) (n=6). (p<0,05) para grupos realçados em negrito na legenda. Teste Metastats (n=3). Obs: amostra seguidas de ( ) e letra indicam o nível taxonômico mínimo de identificação pelas ferramentas de análise utilizadas, sendo O: ordem e F: família.**

A comparação entre os grupos B7SB e SB mostrou uma diferença estatística (p<0,05) no OTU representado pelo gênero *Salmonella*, onde a abundância foi estatisticamente maior no grupo somente desafiado com o patógeno mencionado, evidenciando algum fator protetor, no que diz respeito à variação da microbiota, da amostra B7 na infecção por *S. Typhimurium*, como pode ser observado na figura 31.



**Figura 31. Abundância (%) dos 15 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC). B7SB: grupo com sete dias de administração prévia de leite fermentado pela amostra de *L. plantarum* e sacrifício após sete dias da infecção com salmonela, SB: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) (n=3). (p<0,05) para grupos realçados em negrito na legenda. Teste Metastats (n=6). Obs: amostra seguidas de ( ) e letra indicam o nível taxonômico mínimo de identificação pelas ferramentas de análise utilizadas, sendo O: ordem e F: família.**

Os grupos D1SA e SA diferiram de forma semelhante aos grupos B7SA e SA, exceto pelo fato de um OTU não classificado, nem em nível de filo, ter se apresentado, no grupo SA, nessa comparação, estatisticamente mais abundante que no grupo D1SA, como pode ser observado na figura 32. Os grupos D1SB e SB apresentaram perfis muito semelhantes aos dos grupos B7SB e SB, tendo um aumento estatisticamente significativo na abundância do OTU do gênero *Salmonella* no grupo somente desafiado com o patógeno, evidenciando o mesmo efeito protetor da amostra D1 que o promovido pela amostra B7 (dados não mostrados).

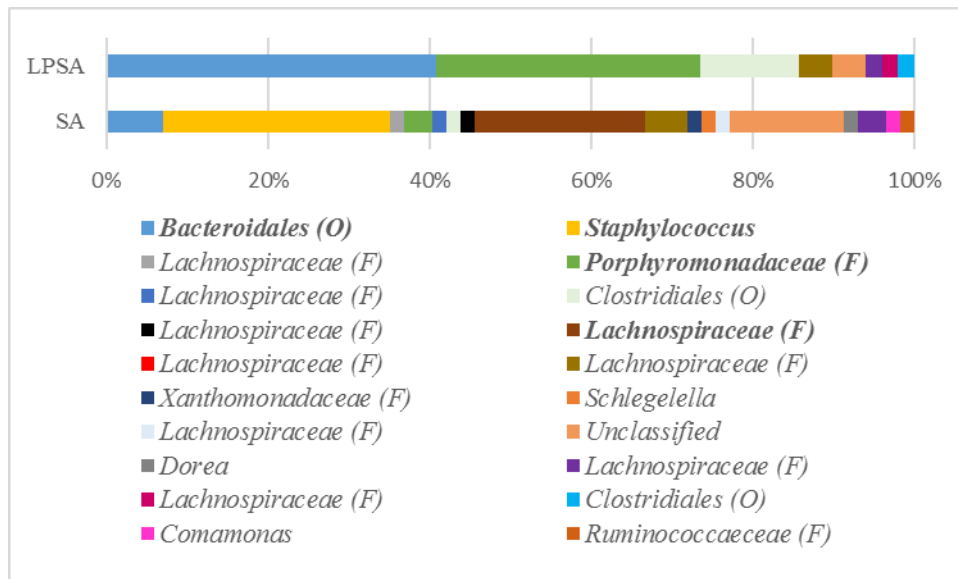


**Figura 32. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC). D1SA: grupo com sete dias de administração prévia de leite fermentado pela amostra de *L. rhamnosus* e sacrifício após cinco dias da infecção com salmonela, SA: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) (n=3). (p<0,05) para grupos realçados em negrito na legenda. Teste Metastats (n=3). Obs: amostra seguidas de ( ) e letra indicam o nível taxonômico mínimo de identificação pelas ferramentas de análise utilizadas, sendo O: ordem e F: família.**

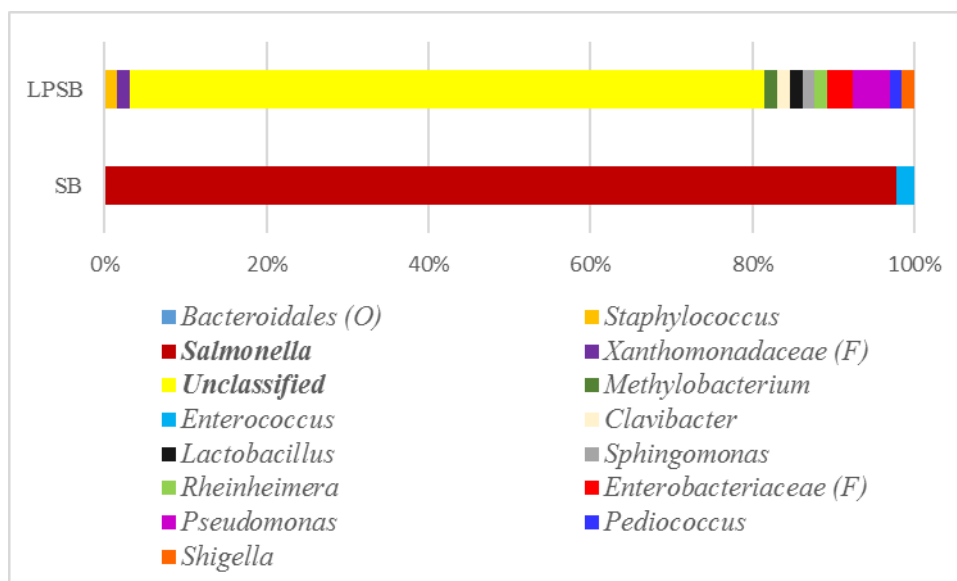
O trabalho de Ferreira et al. (2011), mostrou, assim como o presente trabalho, variação na abundância de OTUs da família *Lachnospiraceae* na microbiota intestinal de camundongos com colite associada à salmonelose experimental. Já o trabalho de Gill et al. (2012), explica melhor a relação desta família com a salmonelose. Os autores desse trabalho evidenciaram que há uma redução nos micro-organismos da família *Lachnospiraceae* na infecção por *S. Typhimurium* devido ao recrutamento de neutrófilos e a produção de elastase por estes. Com base nesses dados, podemos inferir que os grupos previamente tratados com lactobacilos estão atrasando ou abrandando a infecção, pois estes grupos provavelmente não estão ainda respondendo à infecção por salmonela pelo aumento de agentes da microbiota envolvidos na tentativa de proteção à infecção. Porém, para se afirmar isso, necessitaríamos de experimentos em cinética e/ou que fosse avaliada a participação da elastase dos neutrófilos recrutados na infecção,

como fizeram os autores no estudo mencionado. Ferreira et al. (2011) constataram, além da variação na abundância de micro-organismos da família *Lachnospiraceae*, uma redução na diversidade da microbiota intestinal à medida que a doença progredia, o que também foi observado no presente estudo. O trabalho de Ng et al., (2013), que avaliou a variação da microbiota intestinal em uma conhecida condição de disbiose, a IBS (síndrome do intestino irritável), mostrou, assim como no nosso trabalho, participação de OTUs do gênero *Schlegelella*, pertencente à classe *Beta-Proteobacteria* e ordem *Burkholderiales*. Os autores mostraram a redução desse gênero na condição estudada por eles enquanto observou-se, no presente estudo, o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na abundância desse OTU nos grupos previamente tratados com lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e posteriormente desafiados com *S. Typhimurium* quando comparados ao controle negativo, somente desafiado com o patógeno. Portanto, a variação nesses OTUs parece indicar possível efeito protetor das amostras de lactobacilos B7 e D1 (por meio da modulação de agentes envolvidos na disbiose intestinal) frente à infecção por *S. Typhimurium*.

O perfil microbiano do grupo LPSA é bastante diferente do perfil observado nos grupos tratados com leites fermentados por lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados com *S. Typhimurium*, como pode ser observado na figura 33. É interessante observar que a abundância do OTU representado pela ordem *Bacteroidales* foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo LPSA quando comparado ao controle negativo SA, mostrando uma maior resistência à colonização por parte do *L. paracasei* (controle positivo), visto que tende a manter a microbiota mais semelhante à do grupo sem tratamento algum. Além disso, o aumento na abundância de OTU representando a família *Porhyromonadaceae*, reforça o efeito protetor do controle positivo, uma vez que essa família, em estudos envolvendo a microbiota, normalmente está relacionada com MIB (*Bacteroides* intestinal murino, em tradução livre), um agente comumente associado à redução dos efeitos da salmonelose no ambiente intestinal (Ferreira et al., 2011).



**Figura 33. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos machos convencionais (BALB/c) tratados com leites fermentados por lactobacilos e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de 10<sup>6</sup> UFC). LPSA: grupo com sete dias de administração prévia de leite fermentado pela amostra de *L. paracasei*(controle positivo) e sacrifício após cinco dias da infecção com salmonela, SA: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) (n=3). (p<0,05) para grupos realçados em negrito na legenda. Teste Metastats (n=6). Obs: amostra seguidas de ( ) e letra indicam a taxonomia máxima identificada pelas ferramentas de análise utilizadas, sendo O: ordem e F: família.**



**Figura 34. Abundância (%) dos 20 OTUs dominantes, em nível de gênero, no conteúdo do íleo camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e desafiados ou não com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^6$  UFC).LPSB: grupo com sete dias de administração prévia de leite fermentado pela amostra de *L. paracasei*(controle positivo) e sacrifício após sete dias da infecção com salmonela, SB: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (controle negativo) e sacrificado após sete dias (n=6). (p<0,05) para grupos realçados em negrito na legenda. Teste Metastats (n=6). Obs: amostra seguidas de ( ) e letra indicam o nível taxonômico mínimo de identificação pelas ferramentas de análise utilizadas, sendo O: ordem e F: família.**

A comparação entre os grupos LPSB e SB na figura 34 mostram aumento de um OTU estatisticamente diferente no grupo LPSB, além do efeito protetor devido à redução estatisticamente significativa na abundância do OTU representando o gênero *Salmonella* no grupo previamente tratado com o lactobacilo em comparação ao grupo somente desafiado. O OTU em questão não tem uma identificação conhecida nas bases de dados atuais da região V4 do gene 16s r RNA, portanto, o que pode ser afirmado a respeito desse OTU, por ora, é que ele possivelmente está envolvido no efeito protetor do controle positivo em um modelo murino experimental de salmonelose.

Uma vez que, ao contrário do esperado, nem mesmo a família *Lactobacillaceae* apareceu nos grupos tratados previamente com leite fermentado por lactobacilos, avaliamos a abundância do gênero *Lactobacillus* por técnicas de qPCR e os resultados da quantificação de UFC baseado nos valores de Ct encontrados. Curiosamente, em grupos experimentais semelhantes aos utilizados para as análises por sequenciamento de nova geração, onde o conteúdo intestinal foi coletado 24 horas após a última administração de leite fermentado por lactobacilos, somente os grupos (sem tratamento algum), B7SA e D1SA apresentaram contagens médias de lactobacilos ( $\pm$  desvio padrão) de, respectivamente,  $9,73 \pm 0,18$ ;  $9,88 \pm 0,14$  e  $9,59 \pm 0,16$   $\log_{10}$  UFC/g de conteúdo intestinal, não havendo diferença (p>0,05) entre os grupos. Os grupos LPSA e SA não apresentaram quantidades detectáveis por essa técnica de lactobacilos no conteúdo do íleo de camundongos. Para avaliar o tempo de permanência dos lactobacilos no íleo dos camundongos, outro experimento foi desenvolvido, no qual grupos semelhantes foram sacrificados 2 horas após o fornecimento de leite fermentado ao invés de 24 horas. Nesta análise, todos os grupos, inclusive o LPSA, apresentaram



contagens médias de lactobacilos ( $\pm$  desvio padrão):  $10,19 \pm 0,52$ ,  $9,93 \pm 0,11$  e  $9,96 \pm 0,11 \log_{10}$  UFC/g de conteúdo intestinal para B7SA, D1SA e LPSA, respectivamente, todos semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos grupos que tiveram seu conteúdo do íleo avaliado após 24 horas da administração dos leites fermentados, assim como o grupo sem tratamento.

As análises por qPCR confirmou o que as análises pela plataforma MiSeq Illumina® já evidenciaram: os lactobacilos não têm uma atuação direta sobre os níveis populacionais do íleo de camundongos, mas parecem ser capazes de modificar a microbiota deste local. Esta modulação da microbiota provavelmente está ligada à redução dos danos causados pela salmonelose, assim como a todas as transformações indesejáveis que esta causa diretamente ao epitélio intestinal local, de acordo com os resultados observados nos outros experimentos previamente mostrados.

Um par de iniciadores para mensurar a abundância do gênero *Salmonella* por técnicas de qPCR também foi utilizado, mas nenhum dos grupos apresentou quantidades detectáveis de bactérias deste gênero no conteúdo do íleo dos camundongos desafiados por esta técnica. Isto indica que esta técnica é provavelmente ineficaz para a detecção de *Salmonella* no íleo, visto que a técnica de sequenciamento de nova geração utilizada conseguiu detectar, no íleo de camundongos de grupos experimentais semelhantes, níveis consideráveis de bactérias deste gênero. Para confirmar o observado, outro par de iniciadores específico para *S. Typhimurium* (dados não mostrados) foi utilizado e ainda assim não houve detecção em nenhum dos grupos experimentais, inclusive o grupo somente desafiado com o patógeno, evidenciando que esta não é a técnica mais adequada para detecção de *S. Typhimurium*, pelo menos não no conteúdo do íleo de camundongos machos BALB/c.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

A tabela 8 apresenta um compilado de todos os resultados, indicando se as amostras avaliadas apresentaram resultado desejável (mostrando, inclusive, a intensidade da resposta observada) ou não paracada um dos testes realizados ao longo do presente estudo.

**Tabela 8. Resumo dos resultados avaliados pelas amostras de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal e controle positivo**

Resultado avaliado	Amostra				
	B4	B5	B7	D1	LP
<b>Leite fermentado</b>					
Adequação à matriz láctea (leite fermentado)	X	X	X	X	X
Aceitação sensorial	X	X	x	X	X
Tolerância à liofilização (3 meses)	X	x	X	X	
<b>Antagonismo <i>in vitro</i></b>	X	X	X	X	X
<b>Animais Isentos de Germes</b>					
Colonização do trato gastrointestinal	X	X	X	X	X
Antagonismo <i>ex vivo</i>	X	X	X	X	X
<b>Infecção de <i>S. Typhimurium</i> em animais IG</b>					
Proteção à translocação para fígado (desafio - 6 dias)			x	X	X
Preservação das vilosidades do íleo			X	X	x
Redução de infiltrados inflamatórios no fígado				x	x
Redução da resposta do tipo Th1 no íleo (desafio - 5 dias)				x	
Estímulo da resposta regulatória no íleo (desafio - 5 dias)					X
<b>Infecção de <i>S. Typhimurium</i> em animais CV</b>					
Aumento da sobrevida			x	x	X
Redução da perda de peso	x		x	X	x
Proteção à translocação para baço (desafio - 7 dias)			x	X	
Proteção à translocação para fígado (desafio - 7 dias)			x	x	
Preservação das vilosidades do íleo			X		x
Redução de infiltrados inflamatórios no fígado			x	x	x
Redução da resposta do tipo Th1 no íleo (desafio - 5 dias)			X	X	x
Estímulo da resposta regulatória no íleo (desafio - 5 dias)			x	X	
Redução da resposta do tipo Th1 no íleo (desafio - 7 dias)			X	x	x
Estímulo da resposta regulatória no íleo (desafio - 7 dias)			x	X	
Manutenção da microbiota do íleo (desafio - 5 dias)			x	x	X
Manutenção da microbiota do íleo (desafio - 7 dias)			x	x	X

Legenda: B4 e D1: *L. rhamnosus*, B5: *L. casei*, B7: *L. plantarum*, LP: *L. paracasei* (controle positivo). CV: convencional,. IG: isento de germes. X maiúsculo indica um resultado mais expressivo estatisticamente que x minúsculo.

## 7. CONCLUSÕES

As linhagens B7 de *L. plantarum* e D1 de *L. rhamnosus* de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal apresentam potencial probiótico e são adequadas para elaboração de leite fermentado funcional, pois conferem efeitos protetores, de forma direta e indireta, em modelos *in vitro* e *in vivo*, na infecção experimental por *S. Typhimurium* (com uma leve superioridade da linhagem D1). A conclusão é reforçada pelo fato de que as amostras experimentais de lactobacilos apresentaram resultados semelhantes ou superiores ao controle positivo utilizado: *L. paracasei* probiótico isolado de um leite fermentado comercial com alegação funcional.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAWI, D.; AHNRE, S.; MOLIN, G. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.213-220, 2001.
- ALBEIJÓN MUKDSI, M.C.; MEDINA, R.B.; ÁLVAREZ, M.F.; GONZÁLEZ, S.N. Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goat's and ewe's milk and cheeses. **Food Chemistry**, v.117, p.241-247, 2009.
- ALVIM, L.B.; SANDES, S.H.C.; SILVA, B.C.; STEINBERG, R.S.; CAMPOS, M.H.A.; ACURCIO, L.B.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, Á.C. *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. **Beneficial Microbes**, v.7, p.61-73, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 23 de março de 2016.
- BARMAN, M.; UNOLD, D.; SHIFLEY, K.; AMIR, E.; HUNG, K.; BOS, N.; SALZMAN, N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v.76, p.907-915, 2007.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.J.; ROMERO, F.; GIL, A. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. **PLOS One**, v.7, p.e43197, 2012.
- BOEKHORST, J.; WELS, M.; KLEEREBEZEM, M.; SIEZEN, R.J. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment. **Microbiology**, v.152, p.3175–3183, 2006.

- BOLLA, P. A., SERRADELL, M. A., URRAZA, P.J., ANTONI, G.L. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **Journal of Dairy Research**, v.78 p.15-22, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 46 de 23/10/2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146 de 07/03/1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Brasília, 1996.
- CASTILLO, N.A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A.M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **BMC Microbiology**, v.11, p.1-12, 2011.
- CASTILLO, N.A.; LEBLANC, A.M.; GALDEANO, C.M.; PERDIGÓN, G. Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.861-876, 2012.
- CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAIKI, L.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J.; OOZEER, R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v.27, p. 139–155, 2013.
- CHA, B.K.; JUNG, S.M.; CHOI, C.H.; SONG, I.D.; LEE, H.W.; KIM, H.J.; HYUK, J.; CHANG, S.K.; KIM, K.; CHUNG, W.S.; SEO, J.G. The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.46, p.220-227, 2012.

- CHEN, Y.; CHEN, M. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from kefir grains on germ-free mice. **PLOS One**, v.8, p. e78789, 2013.
- CHIVA, M.; SORIANO, G.; ROCHAT, I.; PERALTA, C.; ROCHAT, F.; LLOVET, T.; MIRELIS, B.; SCHIFFRIN, E.J.; GUARNER, C.; BALANZÓ, J. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v.37, p.456-462, 2002.
- COBEA (2006) - Colegio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação e Ética**. <http://www.cobea.org.br/>. Acessado em março de 2012.
- COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.112-118, 2006.
- COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1858-1866, 2013.
- DAS, S.; SARKAR, A.; CHOUDHURY, S.S.; OWEN, K.A.; CASTILLO, V.; FOX, S.; ECKMANN, L.; ELLIOT, M.R.; CASANOVA, J.E.; ERNST, P.B. Engulfment and cell motility protein 1 (ELMO1) has an essential role in the internalization of *Salmonella* Typhimurium into enteric macrophages that impact disease outcome. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.1, p.311-324, 2015.
- DEGIROLAMO, C.; RAINALDI, S.; BOVENGA, F.; MURZILLI, S.; MOSCHETTA, A. Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. **Cell Reports**, v.7, p.12-18, 2014.
- DI GIACINTO, C.; MARINARO, M.; SANCHEZ, M.; STROBER, W.; BOIRIVANT, M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-Dependent TGF- $\beta$ -bearing regulatory cells. **The Journal of Immunology**, v.174, p.3237-3246, 2005.

FAO/WHO Expert Consultation: **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario (Canada), 2002.

FAYOL-MESSAOUDI, D.; BERGER, C.N.; COCONNIER-POLTER, M.; MOAL, V.L.; SERVIN, A. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6008-6013, 2005.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.8, p.44-61, 2007.

FERREIRA, R.B.R.; GILL, N.; WILLING, B.P.; ANTUNES, C.M.; RUSSEL, S.L.; CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. The intestinal microbiota plays a role in *Salmonella*-induced colitis independent of pathogen colonization. **PLOS One**, v.6, p. e20338, 2011.

FICHOROVA, R.N. ONDERDONK, A.B.; YAMAMOTO, H.; DELANEY, M.L.; DUBOIS, A.M.; ALLRED, E.; LEVITON, A. maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. **mBio**, v.2, p.e00280-10, 2011.

GALDEANO, M.C.; LEMME-DUMIT, J.M.; THIEBLEMONT, N.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; PERDIGÓN, G. Stimulation of innate immune cells induced by probiotics: participation of Toll-Like Receptors. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v.6, p.1-9, 2015.

GANAL, S.C.; SANOS, S.L.; KALLFASS, C.; OBERLE, K.; JOHNER, C.; KIRSCHNING, C.; LIENENKLAUS, S.; WEISS, S.; STAEHEL, P.; AICHELE, P.; DIEFENBACH, A. Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. **Immunity**, v.37, p.171-186, 2012.

GILL, N.; FERREIRA, R.B.R.; ANTUNES, L.C.M.; WILLING, B.P.; SEKIROV, I.; AL-ZAHRANI, F.; HARTMAN, M.; FINLAY, B.B. Neutrophil elastase alters the murine gut microbiota resulting in enhanced *Salmonella* colonization. **PLOS One**, v.7, p. e49646, 2012.

- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.
- GUEIMONDE, M.; DELGADA, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37, p.839-850, 2004.
- GULBINOWICZ, M.; BERDEL, B.; WÓJCIK, S.; DZIEWIATKOWSKI, J.; OIKARINEN, S.; MUTANEN, M.; KOSMA, V.; MIKKÄNEN, H.; MORYS, J. Morphometric analysis of the small intestine in wild type mice C57BL/6J — a developmental study. **Folia Morphologica**, v.63, p.423-430, 2004.
- HAMMES, W.; HERTEL, C. Genus *Lactobacillus*. In: DE VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A. (2a Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Heidelberg, Springer, p.465–510, 2009.
- HEASMAN, M.; MELLENTIN, J. **The Functional Food Revolution: Healthy People, Healthy Profits**. London: Earthscan. 2001. 313p.
- HEILIG, H.G.; ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E., MARTEAU, P.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.114-123, 2002.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506-514, 2014.
- HRNCIR, T.; STEPANKOVA, R.; KOZAKOVA, H.; HUDCOVIC, T.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Gut microbiota and lipopolysaccharide



- content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. **BMC Immunology**, v.9, p.65, 2008.
- HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1324-1332, 2006.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Determination of titratable acidity. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.150, p.1-2, 1991.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.117B, p.1-4, 1997.
- JUAREZ, G.E.; VILLENA, J.; SALVA, S.; VALDEZ, G.F.; RODRIGUEZ, A.V. Lactobacillus reuteri CRL1101 beneficially modulate lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in a mouse model of endotoxic shock. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1761-1773, 2013.
- JUSTINO, P.F.C.; MELO, L.F.M.; NOGUEIRA, A.F.; COSTA, J.V.G.; SILVA, L.M.N.; SANTOS, C.M.; MENDES, W.O.; COSTA, M.R.; FRANCO, A.X.; LIMA, A.O.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.I.P.; SOARES, P.M.G. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, v.111, p.1611-1621, 2014.
- KAISER, B.L.D.; LI, J.; SANFORD, J.A.; KIM, Y.; KRONEWITTER, S.R.; JONES, M.B.; PETERSON, C.T.; PETERSON, S.N.; FRANK, B.C.; PURVINE, S.O.; BROWN, J.N.; METZ, T.O.; SMITH, R.D.; HEFFRON, F.; ADKINS, J.N. A Multi-Omic View of Host-Pathogen-Commensal Interplay in *Salmonella*-Mediated Intestinal IFN $\alpha$  Production. **PLOS One**, v.8, p.e67155, 2013.
- KANKAINEN, M.; PAULIN, L.; TYNKKYNNEN, S.; VON OSSOWSKI, I.; REUNANEN, J. PARTANEN, P.; SATOKARI, R.; VESTERLUND, S.; HENDRICKX, A.P.; LEBBER, S.; DE KEERSMAECKER, S.C.; VANDERLEYDEN, J.; HAMALAINEN, T.; LAUKKANEN, S.;

- SALOVUORI, N.; RITARI, J.; ALATALO, E.; KORPELA, R.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LASSIG, A.; HATTAKA, K.; KINNUNEN, K.T.; KARJAINEN, H.; SAXELIN, M.; LAAKSO, K.; SURAKKA, A.; PALVA, A.; SALUSJARVI, T.; AUVINEN, P.; DE VOS, W.M.; Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17193-17198, 2009.
- KOZAKOVA, H.; SCHWARZER, M.; TUCKOVA, L.; STRUTKOVA, D.; CZARNOWSKA, E.; ROSIAK, I.; HUDCOVIC, T.; SCHABUSSOVA, I.; HERMANOVA, P.; ZAKOSTELSKA, Z.; ALEXSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; KORYSZEWSKA-BAGINSKA, A.; TSASKALOVA-HOGENOVA, H.; CUKROWSKA, B. Colonization of germ-free mice with a mixture of three *Lactobacillus* strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. **Cellular & Molecular Immunology**, v.13, p.251-262, 2015.
- KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SSHLOSS, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p5112-5120, 2013.
- LEBLANC, A.M.; CASTILLO, N.A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.223-231, 2010.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.
- LI, P.; YU, Q.; YE, X.; WANG, Z.; YANG, Q. *Lactobacillus* S-layer protein inhibition of *Salmonella*-induced reorganization of the cytoskeleton and activation of MAPK signaling pathways in Caco-2 cells. **Microbiology**, v.157, p.2639-2646, 2011.

- LIMA, C.D.C.L.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.266-272, 2009.
- LLUCH, J.; SERVANT, F.; PAÏSSÉ, S.; VALLE, C.; VALIÈRE, S.; KUCHLY, C.; VILCHEZ, G.; DONNADIEU, C.; COURTNEY, M.; BURCELIN, R.; AMAR, J.; BOUCHEZ, O.; LELOUVIER, B. The characterization of novel tissue microbiota using an optimized 16S metagenomic sequencing pipeline. **PLOS One**, v.10, p.e0142334, 2015.
- MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; ARANTES, R.M.E.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.352-359, 2007.
- MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; GOMES, D.A., ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; CARA, D.C.; NARDI, R.M.D.; NICOLI, J.R. 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, p. 995-1003, 2010.
- MATSUGUCHI, T.; TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; NAGAOKA, M.; ISHIKAWA, K.; YOKOKURA, T.; YOSHIKAI, Y. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, p.259-266, 2003.
- MATSUMOTO, S.; HARA, T.; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. 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 and Experimental Immunology**, v.140, p.417-426, 2005.

- MCCARTHY, J.; O'MAHONY, L.; O'CALLAGHAN, L.; SHEIL, B.; VAUGHAN, E.E.; FITZSIMONS, N.; FITZGIBBON, J.; O'SULLIVAN, G.C.; KIELY, B.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. **Gut**, v.52, p.975-980, 2003.
- MENDES, D.P.G.; SOUZA, M.R.; GALLETI JÚNIOR, M.; LEITE, M.O.; PENNA, C.F.A.M. Quality of fermented milks produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum* isolated from artisanal cheeses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.1291-1295, 2014.
- MENDONÇA, A.H.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; NICOLI, J.R.; SOUSA, S.M.M.; NARDI, R.M.D.; SOUZA, F.N.; FONSECA, L.M.; LEITE, M.O.; ARANTES, R.M.E. A *Lactobacillus rhamnosus* strain induces protection in different sites after *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium challenge in gnotobiotic and conventional mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.66, p.347-354, 2014.
- MIGOWSKI, E.; PUGLIESE, B.S. Gastreenterite aguda: por que dose maior de *Saccharomyces boulardii* na fase aguda? **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.7, p.267-271, 2009.
- MOAL, V.L.; SERVIN, A.L. Anti-infective Activities of *Lactobacillus* Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-infectious Biotherapeutic Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p. 167-199, 2014.
- MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M. Review article: Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. **Food Reviews International**, v.27, p.192-212, 2011.
- MUOTIALA, A.; MÄKELÄ, H. Role of gamma interferon in late stages of murine salmonellosis. **Infection and Immunity**, v.61, p.4248-4253, 1993.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P.V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v.334, p.1-15, 2012.

- NEDIALKOVA, L.P.; DENZLER, R.; KOEPEL, M.B.; DIEHL, M.; RING, D.; WILLE, T.; GERLACH, R.G.; STETCHER, B. Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of *Salmonella Serovar* Typhimurium and *E. coli* in Enterobacterial Blooms. **PLOS Pathogens**, v.10, p.e1003844, 2014.
- NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1565-1573, 1998.
- NG, S.C.; LAM, E.F.C.; LAM, T.T.Y.; CHAN, Y.; LAW, W.; TSE, P.C.H.; KAM, M.A.; SUNG, J.J.Y.; CHAN, F.K.L.; WU, J.C.Y. Effect of probiotic bacteria on the intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.28, 1624-1631, 2013.
- OTERO, M.C.; ESPECHE, M.C.; NADER-MACÍAS, M.E. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. **Process Biochemistry**, v.42, p. 1406-1411, 2007.
- OTT, A.; HUGI, A.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.441-450, 2000.
- PIMENTEL, T.C. Probióticos e benefícios à saúde. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.4, p.101-107, 2011.
- PLANTINGA, T.S.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; JACOBS, C.; JOOSTEN, L.A.; VAN'T LAND, B.; GARSSSEN, J.; NETEA, M.G. Modulation of Toll-like receptor ligands and *Candida albicans*-induced cytokine responses by specific probiotics. **Cytokine**, v.59, p.159-165, 2012.
- PLEASANTS, J.R. Gnotobiotics. In: MELBY Jr, E.C.; ALTMANN, N.H. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Cleveland, C. R. C press, p. 119-174, 1974.

- POGACIC, T.; MANCINI, A.; SANTARELLI, M.; BOTTARI, B.; LAZZI, C.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. **Food Microbiology**, v.36, p.207-215, 2013.
- PREIDIS, G.A.; SAULNIER, D.M.; BLUTT, S.E.; MISTRETTA, T.A.; RIEHLE, K.P.; MAJOR, A.M.; VENABLE, S.F.; FINEGOLD, M.J.; PETROSINO, J.F.; CONNER, M.E.; VERSALOVIC, J. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. **The FASEB Journal**, v.5, 1960-1969, 2012.
- RAFFATELLU, M.; GEORGE, M.D.; AKIYAMA, Y.; HORNSBY, M.J.; NUCCIO, S.P.; PAIXAO, T.A.; BUTLER, B.P.; CHU, H.; SANTOS, R.L.; BERGER, T.; MAK, T.W.; TSOLIS, R.M.; BENVIS, C.L.; SOLNICK, J.V.; DANDEKAR, S.; BÄUMLER, A.J. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. **Cell Host Microbe**, v.8, p.476-486, 2009.
- RAUTAVA, S.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Neonatology**, v.102, p.178-184, 2012.
- RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.; NUNES, A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M., SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.1567-1573, 2011.
- RINTTILÄ, T.; KASSINEN, A., MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1166-1177, 2004.

- SANTOS, R.L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C.L.; ADAMS, L.G.; TÜKEL, C.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**, v. 17, p.498-506, 2009.
- SHEIL, B.; MCCHARTY, J.; O'MAHONY, L.; O'CALLAGHAN, BENNET, M.W.; RYAN, P.; FITZGIBBON, J.J.; KIELY, B.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, J. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. **Gut**, v.53, p.694-700, 2004.
- SHEIL, B.; MACSHARRY, J.; O'CALLAGHAN, L.O.; O'RIORDAN, A.; WATERS, A.; MORGAN, J.; COLLINS, J.K.; O'MAHONY, L.; SHANAHAN, J. Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v.144, p.273-280, 2006.
- SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 29-37, 2004.
- SILVA, M.E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais**. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1986 (Dissertação, Mestrado).
- SOUZA, D.G.; VIEIRA, A.T.; SOARES, A.C.; PINHO, V.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; TEIXEIRA, M.M. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v.173, p.4137-4146, 2004.
- STECHER, B.; ROBBIANI, R.; WALKER, A.W.; WESTENDORF, A.M.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; CHAFFRON, S.; MACPHERSON, A.J.; BUER, J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; VON MERING, C.; HARDT, W.D. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. **PLOS Biology**, v.5, p.2177-2189, 2007.
- STEINBERG, R.S.; SILVA, L.C.S.; SOUZA, T.C.; LIMA, M.T.; OLIVEIRA, N.L.G.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; MIYOSHI, A.; NICOLI, J.; NEUMANN,

- E.; NUNES, A.C. Safety and protective effectiveness of two strains of *Lactobacillus* with probiotic features in an experimental model of salmonellosis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p.8755-8776, 2014.
- STELTER, C.; KAPPELI, R.; KONIG, C.; KRAH, A.; HARDT, W.D.; STECHER, B.; BUMMAN, D. *Salmonella*-Induced mucosal lectin RegIII $\beta$  kills competing gut microbiota. **PLOS One**, v.6, p.e20749, 2011.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMARKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. **Bacteriological Review**, v.40, p.722-756, 1976.
- TANNOCK, G.W.; TISSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4264-4267, 1999.
- TIAGO, F.C.P.; RIBEIRO, N.S.; MOREIRA, L.M.C.; ARANTES, R.M.E.; VIEIRA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; MARTINS, F.S.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. **Beneficial Microbes**, v.6, p.807-815, 2015.
- VAISHAMPAYAN, P.A.; KUEHL, J.V.; FROULA, J.L.; MORGAN, J.L.; OCHMAN, H.; FRNACINO, M.P. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. **Genome Biology and Evolution**, v.2, p.53-66, 2010.
- VASCONCELOS, A.L.S.; NICOLI, J.R.; NARDI, R.M.D. Antagonistic and protective effects against *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium by *Lactobacillus murinus* in the digestive tract of gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.21-24, 2003.
- VIEGAS, R.P.; SOUZA, M.R.; FIGUEIREDO, T.C.; RESENDE, M.F.S.; PENNA, C.F.A.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho.



**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.460-467, 2010.

WINTER, S.E.; THIENNIMITR, P.; WINTER, M.G.; BUTLER, B.P.; HUSEBY, D.L.; CRAWFORD, R.W.; RUSSEL, J.M.; BEVINS, C.L.; ADAMS, G.; TSOLIS, R.M.; ROTH, J.R., BÄUMLER, A.J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v.467, p.426-429, 2010.

YEUNG, C.Y.; CHAN, W.T.; JIANG, C.B.; CHENG, M.L.; LIU, C.Y.; CHANG, S.W.; CHIAU, J.S.C.; LEE, H.C. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PLOS One**, v.10, p.e0138746, 2015.

ZAKI, M.H.; MAN, S.M.; VOGEL, P.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T.D. *Salmonella* exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. **PNAS**, v.111, p.385-390, 2013.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1779-1785, 2006.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) para os experimentos *in vivo* do presente estudo.

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 380 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do efeito protetor de lactobacilos de queijo Minas artesanal na infecção experimental por Salmonella Typhimurium", que tem como responsável Marcelo Resende de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/03/2014. Este certificado espira-se em 11/03/2019.	
<b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 380 / 2013, related to the Project entitled "Evaluation of lactobacilli's from Minas artisanal cheese protector effect on a experimental infection by Salmonella Typhimurium", under the supervision of Marcelo Resende de Souza, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/03/2014. This certificate expires in 11/03/2019.	
FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/03/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	

### Anexo 2. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG para os experimentos de análise sensorial do presente estudo.

<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>	
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>	
<b>Título da Pesquisa:</b> Avaliação do efeito protetor de lactobacilos de queijos Minas artesanais na infecção experimental com Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium para o seu uso como probiótico em alimento funcional	
<b>Pesquisador:</b> Jacques Robert Nicoli	
<b>Área Temática:</b>	
<b>Versão:</b> 2	
<b>CAAE:</b> 23291713.4.0000.5149	
<b>Instituição Proponente:</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	
<b>Patrocinador Principal:</b> FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	
<b>Situação do Parecer:</b> Aprovado	
<b>Necessita Apreciação da CONEP:</b> Não	
<b>Considerações Finais a critério do CEP:</b> Aprovado conforme parecer.	

BELO HORIZONTE, 11 de Março de 2014