

Mário Abatemarco Júnior

Efeito protetor de *L. diolivorans* 1Z isolado de grãos de kefir na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em modelo murino

**Belo Horizonte
2018**

Mário Abatemarco Júnior

Efeito protetor de *L. diolivorans* 1Z isolado de grãos de kefir na infecção experimental com *Salmonella entérica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em modelo murino

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador:

Prof. Dr^a. Elisabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

Co-orientadora:

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

Colaboradores:

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Esteves Arantes (Departamento de Patologia/ICB/UFMG)

Prof. Dr. Álvaro Cantinni Nunes (Departamento de Biologia Geral)

Belo Horizonte/MG
2018

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Kefir: definição e histórico	1
1.2 Grãos de kefir: definição e composição microbiológica	2
1.3 Efeitos benéficos atribuídos ao kefir	3
1.3.1 Estudos Clínicos com kefir	5
1.4 Probióticos: definição e histórico	6
1.5 Características desejáveis para um candidato a probiótico	8
1.6 Mecanismos de ação dos probióticos	10
1.7 Gênero <i>Lactobacillus</i>	12
1.7.1 Características morfológicas, taxonômicas e metabólicas	12
1.7.2 Efeitos benéficos	13
1.8 <i>Lactobacillus diolivorans</i>	15
1.8.1 Características morfológicas, metabólicas, filogenéticas e aplicações	15
1.9 Gênero <i>Salmonella</i>	18
1.9.1 Características morfológicas, taxonômicas e metabólicas	18
1.9.2 Salmonelose humana	18
1.10 Modelo de infecção por <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sor. Typhimurium em camundongos gnotobióticos	21
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais e microrganismos	29
4.2 Bactérias	29
4.3 Preparo da suspensão microbiana administrada aos animais convencionais	30
4.4 Delineamento experimental	31

4.4.1 Experimentos com camundongos convencionais	31
4.4.2 Experimentos com camundongos gnotobióticos	31
4.5 Avaliação da porcentagem de sobrevivência e acompanhamento da variação de peso após desafio oral com <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sor. Typhimurium	32
4.6 Determinação da capacidade de colonização do TGI de animais suíços isentos de germes por <i>L. diolivorans</i> 1Z	32
4.7 Antagonismo contra <i>S. Typhimurium in vivo</i>	33
4.8 Antagonismo <i>S. Typhimurium ex vivo</i>	33
4.9 Determinação da translocação da <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sor. Typhimurium ou <i>L. diolivorans</i> 1Z para fígado e baço	33
4.10 Análises histopatológicas e morfométricas de íleo e fígado	34
4.10.1 Documentação fotográfica das imagens	34
4.10.2 Análises morfométricas	35
4.11 Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti- inflamatórias em amostras de íleo e fígado	35
4.12 Detecção de sIgA total no conteúdo intestinal	36
4.13 Análises estatísticas	37
5. RESULTADOS	37
5.1 Avaliação da porcentagem de sobrevivência e acompanhamento do ganho de peso em camundongos convencionai após desafio oral com <i>Salmonella Typhimurium</i>	37
5.2 Determinação da capacidade de colonização do TGI de animais suíços isentos de germes por <i>L. diolivorans</i> 1Z	40
5.3 Determinação da translocação de <i>L. diolivorans</i> 1Z para fígado e baço de animais suíços gnotobióticos	40
5.4 Análises histopatológicas de íleo e fígado de animais monoassociados com <i>L. diolivorans</i> 1Z – grupo CP	41
5.5 Detecção de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo CP	43
5.6 Avaliação do efeito protetor de <i>L. diolivorans</i> 1Z frente à infecção por <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sor. Typhimurium	44
5.6.1 Antagonismo contra <i>S. Typhimurium in vivo</i>	44
5.6.2 Antagonismo contra <i>S. Typhimurium ex vivo</i>	45

5.6.3 Determinação da translocação de <i>S. Typhimurium</i> para fígado e baço	45
5.6.4 Análises histopatológicas do íleo e fígado – grupos CS e PS	46
5.6.5 Análises morfométricas do íleo e fígado – grupos CS e PS	50
5.6.5.1 Perímetro de lesões graves e leves no íleo	50
5.6.5.2 Celularidade no fígado	51
5.6.6 Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado	52
5.6.7 Detecção de sIgA no conteúdo intestinal dos animais dos grupos PS e CS	52
6. DISCUSSÃO	55
7. RESUMO DOS RESULTADOS	66
8. CONCLUSÕES	68
9. REFERÊNCIAS	69
10. ANEXOS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL - Bactéria do Ácido Lático

CS - Componente secretório

CT –*Cycle Threshold*

cDNA – *complementary Deoxyribonucleic Acid*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

DTA - Doenças transmitidas por alimentos

ELISA –*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FAO/WHO-*Food and Agricultural Organization/ World Health Organization*

FDA -*Food and Drug Administration*

GALT – *Gut Associated Lymphoid Tissue*

GRAS–*Generally Recognized as Safe*

HE - Hematoxilina-Eosina

IL - Interleucina

INF - Interferon

mRNA- *messenger Ribonucleic Acid*

sIgA - Imunoglobulina A secretória

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMP- *Pathogen-associated Molecular Pattern*

PBS –*Phosphate-buffered Saline*

PCR–*Polymerase Chain Reaction*

RNA–*Ribonucleic Acid*

rRNA–*ribosomal Ribonucleic Acid*

RT-qPCR –*reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

RQ – *Relative Quantification*

TGF–*Transforming Growth Factor*

TLR - *Toll-like Receptor*

TNF–*Tumor Necrosis Factor*

UFC - Unidades formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com os diferentes lactobacilos e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> . 1Z: <i>L. diolivorans</i> ; 8U: <i>L. kefiranofaciens</i> ; 17P2: <i>L. perolens</i> ; 18P: <i>L. satsumensis</i> ; 25P: <i>L. casei</i> .	39
Figura 2. Níveis populacionais de <i>L. diolivorans</i> 1Z nas fezes de camundongos gnotobióticos 4 e 7 dias após a monoassociação.	40
Figura 3. Determinação do número de células viáveis de <i>L. diolivorans</i> 1Z no fígado e baço de camundongos gnotobióticos após administração oral única de 10^8 UFC do microrganismo, sem desafio com <i>S. Typhimurium</i> .	41
Figura 4. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados com <i>L. diolivorans</i> 1Z (grupo CP).	40
Figura 5. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados com <i>L. diolivorans</i> 1Z (grupo CP)	45
Figura 6. Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no fluido intestinal de camundongos suíços monoassociados com <i>Lactobacillus diolivorans</i> 1Z.	42
Figura 7. Número células viáveis de <i>S. Typhimurium</i> nas fezes de animais gnotobióticos previamente monoassociados (grupo PS) ou não (grupo CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z.	43
Figura 8. Translocação de <i>S. Typhimurium</i> para o fígado (A) e baço (B) de camundongos gnotobióticos tratados (grupo PS) ou não (grupo CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z.	46
Figura 9. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos monoassociados (PS) ou não (CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> .	47
Figura 10. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos monoassociados (PS) ou não (CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	48
Figura 11. Fotomicrografia de fígado, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados (PS) ou não (CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	49
Figura 12. Fotomicrografia de fígado, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados (PS) ou não (CS) com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	50
Figura 13. Perímetro de lesões leves (A) e graves (B) atribuídas à salmonelose no íleo dos animais do grupo controle <i>Salmonella</i> (CS) e dos animais tratados com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> com oito dias de infecção	51
Figura 14. Número de núcleos celular/mm ² no fígado dos animais do grupo controle <i>Salmonella</i> (CS) e dos animais tratados com <i>L. diolivorans</i> 1Z e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> com oito dias de infecção	51

Figura 15. Expressão relativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL10 no 52
intestino delgado de camundongos monoassociados, ou não, com *L.*
diolivorans 1Z e infectados, ou não, com *S. Typhimurium*. Legenda: GF: grupo
germ-free; CP: monoassociados com *L. diolivorans* 1Z; CS: controle *S.*
Typhimurium; PS: tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiado com *S.*
Typhimurium

Figura 16. Expressão relativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL1- β e 54
IL10 e da enzima iNOS no fígado de camundongos monoassociados, ou não,
com *L. diolivorans* 1Z e infectados, ou não, com *S. Typhimurium*. Legenda:
GF: grupo *germ-free*; CP: monoassociados com *L. diolivorans* 1Z; CS: controle
S. Typhimurium; PS: tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiado com *S.*
Typhimurium

Figura 17. Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no 55
fluido intestinal de camundongos suíços monoassociados com *Lactobacillus*
diolivorans 1Z (ou não) e desafiados com *S. Typhimurium*

RESUMO

Kefir é uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, obtida pela dupla fermentação (alcoólica e ácido-lática) do leite pelas BAL e leveduras presentes nos grãos de kefir. A microbiota dos grãos é composta principalmente por bactérias do ácido lático e leveduras, sendo que o gênero *Lactobacillus* perfaz aproximadamente 90% da microbiota dos grãos. Vários efeitos benéficos têm sido atribuídos à ingestão do kefir, como por exemplo, melhora da intolerância a lactose, efeito hipocolesterolêmico, entre outros. Parte desses efeitos benéficos pode ser atribuído aos *Lactobacillus*, o que faz dos grãos uma fonte de microrganismos com potencial probiótico. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus diolivorans* 1Z, isolado de grãos de kefir. Cinco amostras de *Lactobacillus* (*L. satsumensis* 18P, *L. kefiranofaciens* 8U, *L. casei* 25P, *L. perolens* 17P2 e *L. diolivorans* 1Z) isolados de grãos cultivados em leite ou em água açucarada e previamente caracterizadas como potenciais probióticos por ensaios *in vitro*, foram submetidas a um ensaio para avaliar a taxa de sobrevivência e variação de peso em camundongos convencionais, tratados ou não, e desafiados oralmente com *Salmonella Typhimurium*. A administração oral diária de cultura liofilizada de *L. diolivorans* 1Z resultou em sobrevivência de 70% dos animais após o desafio com o patógeno e ganho de peso durante todo o período avaliado. Animais isentos de germes foram monoassociados com *L. diolivorans* 1Z por dose única oral de 10^8 UFC do microrganismo liofilizado e após sete dias de monoassociação foram desafiados oralmente com *S. Typhimurium* (grupo PS). Grupos de animais foram sacrificados nos tempos dois, quatro, seis e oito dias após a infecção, sendo que para cada dia, um grupo controle de animais não monoassociados com o lactobacilo e desafiado pelo patógeno também foi sacrificado (grupo CS). Nesses mesmos tempos, grupos de animais monoassociados e não desafiados também foram sacrificados (grupo CP). Foram retirados dos animais íleo e fígado, para análise histopatológica, morfométrica e detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias; fezes para avaliação do antagonismo *in vivo* e *ex vivo*; fígado e baço para avaliação da translocação da salmonela e fluido intestinal para detecção de sIgA. A administração de *L. diolivorans* 1Z não induziu alterações patológicas na mucosa ileal e hepática, não aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias no íleo e fígado ($P > 0,05$) e aumentou os títulos de sIgA ($P < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle isento de germe (grupo GF). A contagem de salmonela nas fezes dos animais PS foi estatisticamente menor a partir do quarto dia de infecção quando comparado com o grupo CS ($P < 0,05$). A análise histopatológica revelou menor dano à mucosa ileal, comprovada pelo menor perímetro de lesões graves atribuídas à infecção nos animais do grupo PS em relação ao grupo CS ($P < 0,05$) no oitavo dia de infecção. Esses achados foram acompanhados por uma menor expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no tecido intestinal. A contagem de salmonela no fígado dos animais PS foi menor em relação ao grupo CS ($P < 0,05$), alcançando níveis indetectáveis após o sexto dia de infecção o que poderia ser explicado pelo aumento da secreção de sIgA no conteúdo intestinal e por um aparente aumento do número de células de Küpffer no grupo PS. No fígado, a expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL1- β e da enzima iNOS e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β aumentou de maneira progressiva ao longo dos dias de infecção nos grupos PS e CS. Comparando os dois grupos, uma tendência à diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias foi observada no grupo PS em relação ao grupo CS ($P > 0,05$). Não foram detectadas diferenças no número de núcleos/mm² no fígado entre os grupos PS e CS ($P > 0,05$) o que indica que o tratamento com *L. diolivorans* 1Z não foi capaz de diminuir o infiltrado inflamatório para o referido órgão. No entanto, a análise qualitativa das

lâminas de fígado coradas em HE, revelou que o perfil de células inflamatórias presentes no fígado dos animais do grupo CS foi predominantemente polimorfonuclear, enquanto no grupo PS foi predominantemente mononuclear. Como consequência, a resposta inflamatória no fígado dos animais do grupo PS foi mais rápida e eficiente para a diminuição da contagem de *S. Typhimurium* no órgão. Os resultados desse trabalho sugerem que *L. diolivorans* 1Z é uma linhagem potencialmente probiótica, segura e capaz de proteger da morte animais desafiados por *S. Typhimurium*, aparentemente por mecanismos imunológicos que merecem ser aprofundados em trabalhos futuros.

Palavras chaves: Kefir, grãos de kefir, *Lactobacillus*, probiótico

ABSTRACT

Kefir grains are composed by yeasts and lactic acid bacteria and the genus *Lactobacillus* make up an important part of the microbiota of the grains. Various beneficial effects have been attributed to ingestion of kefir, for example, improvement of lactose intolerance, hypocholesterolemic and immunomodulatory effects, among others. Part of these beneficial effects can be attributed to the lactobacilli, which makes kefir grains a source of potential probiotic microorganisms. Therefore, the objective of this work was to evaluate the probiotic capacity of lactobacilli isolated from Brazilian kefir grains cultured in milk or brown sugar solution. The survival rate and weight variation of mice treated or not with *Lactobacillus* strains (*L. satsumensis* 18P, *L. kefiranofaciens* 8U, *L. casei* 25P, *L. perolens* 17P2 and *L. diolivorans* 1Z) and challenged orally with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium were tested. *L. diolivorans* 1Z was selected for the best results (70% of the mice survived and continued gaining weight during the entire period of infection). After that, germfree mice were monoassociated with *L. diolivorans* 1Z by an oral single dose of 10^8 CFU of the lyophilized microorganism and after seven days were challenged orally with *S. Typhimurium* (PS group). Groups of animals were sacrificed at two, four, six and eight days after infection, and for each day, a control group (germfree mice challenged by the pathogen – CS group) was also sacrificed. At the same time, groups of monoassociated and non-challenged animals were also sacrificed (CP group). It was taken from the animals the ileum, for histopathological analysis and detection of pro and anti-inflammatory cytokine gene expression; feces for antagonistic assay; and liver for enumeration of *Salmonella*, histopathological and morphometric analysis and intestinal fluid for sIgA detection. The administration of *L. diolivorans* 1Z did not induce pathological changes in the ileal mucosa and liver, did not increase the expression of pro-inflammatory cytokines in the ileum and liver ($P > 0.05$) and increased the sIgA titers ($P < 0.05$) when compared to the germ free control group (GF group). The number of *Salmonella* in feces of animals from PS group was statistically lesser than in CS Group ($P < 0.05$) from the fourth day of infection. The histopathological analysis revealed less damage of the ileal mucosa in PS group when compared to CS group from the sixth day after the infection. These results are in accordance with the reduction in *Salmonella* counts and lower expression of pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α in intestine in PS group mice. The number of *Salmonella* in liver from group PS was smaller when compared to the CS group, reaching undetectable levels after the sixth day of infection that could be explained by an apparent increase in Küpffer cells and by increased secretion of sIgA in intestinal fluid in the PS group. In the liver, the expression of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL1- β and the enzyme iNOS and anti-inflammatory IL-10 and TGF- β increased progressively over the days of infection in the PS and CS. Comparing the two groups, a tendency to decrease the expression of pro-inflammatory cytokines and increase of anti-inflammatory was observed in the PS group in relation to the CS group ($P > 0.05$). No differences were detected in the number of nuclei / mm^2 in the liver between the PS and CS groups ($P > 0.05$) indicating that treatment with *L. diolivorans* 1Z was not able to decrease the inflammatory infiltrate for the liver. However, the qualitative histological analysis of the liver revealed that the inflammatory cell profile present in the organ of the CS group was predominantly polymorphonuclear, while in the PS group it was predominantly mononuclear. As a consequence, the inflammatory response in the liver of the animals of the PS group was faster and more efficient for the decrease of the count of *S. Typhimurium* in the organ. The results of this work suggest that *L.*

diolivorans 1Z is a potentially probiotic line, safe and capable of protecting animals challenged by *S. typhimurium*, apparently by immunological mechanisms that deserve to be studied in future works.

Key-words: Kefir, kefir grains, *Lactobacillus*, probiotic

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Kefir: definição e histórico

Kefir é uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, com pH variando entre 4,2 e 5,5, ou menor, obtida pela dupla fermentação (alcoólica e ácido-lática) do leite pelos grãos de kefir (GARROTE *et al*, 2010). Apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente espumoso e efervescente. A bebida pronta para o consumo possui ácido lático, assim como os ácidos fórmico, succínico e propiônico, CO₂, álcool etílico, diferentes aldeídos e traços de álcool isoamílico e acetona, além de uma variedade de folatos (GUVEN & GULMEZ, 2003). O ácido lático formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro.

De acordo com o *Codex Alimentarius*, o kefir deve ser constituído de menos que 10% de gordura de leite, um mínimo de 2,8% de proteína de leite, 0,6% de acidez titulável, 10⁷ UFC/g de contagem microbiana total e 10⁴ UFC/g de levedura, no entanto não há nenhuma menção ao conteúdo de etanol no produto (FAO/WHO, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define kefir como “leite fermentado com cultivo ácido-lático elaborado com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido lático, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* ssp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*” (BRASIL, 2007).

A bebida tem sido consumida há muitos anos na região das montanhas do Cáucaso, de onde é originária. Apenas no final do século XIX que o consumo da bebida se popularizou fora da Rússia e, atualmente, o consumo de kefir tornou-se mundial devido às inúmeras publicações demonstrando seus efeitos benéficos sobre a saúde humana (JOHN & DEESEENTHUM, 2015). O termo kefir se origina do eslavo “keif” e significa “bem-estar” ou “bem-viver” sensações que eram descritas pelos consumidores da bebida após a sua ingestão (SARKAR, 2008).

1.2 Grãos de kefir: definição e composição microbiológica

Os grãos de kefir são semelhantes a pedaços de couve-flor constituídos por um conjunto complexo de diferentes espécies de bactérias do ácido lático, do ácido acético e leveduras que convivem em uma complexa relação simbiótica e se encontram firmemente aderidas e encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis que são secretados por algumas destas espécies. Essa matriz polissacarídica, também chamada de kefirano, retém uma comunidade relativamente estável e constante de microrganismos (MARSHALL, 1993; ARSLAN, *et al.*, 2015).

Historicamente os grãos de kefir eram considerados como um presente de Allah entre aos muçulmanos das Montanhas do Cáucaso. Os grãos eram passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso e considerados a fonte de riqueza da família (JOHN & DEESEENTHUM, 2015).

Até o momento, não se conseguiu esclarecer a origem evolutiva dos grãos. Mesmo com a identificação dos isolados de sua microbiota, ainda não foi obtida sua formação espontânea em laboratório. Novos grãos de kefir só se formam da multiplicação e propagação de grãos existentes. Porém, alguns autores sugerem que os habitantes da região do Cáucaso utilizavam de um odre de barro onde se estocava leite de cabra ou ovelha e depois adicionavam fragmentos de estômago de carneiro ou veado, agitando de tempos em tempos, até a coagulação do produto. Neste ponto, retiravam o produto e não higienizavam o odre; adicionavam mais leite como substrato e o processo se repetia. Então se formou uma crosta neste recipiente, sobretudo de microrganismos vivos, que se adaptaram ao meio e nele se propagaram (LIU & MOON, 1983). Atualmente, os grãos de kefir têm sido cultivados em outros substratos além do leite, a saber, açúcar mascavo, leite de soja e sucos de frutas sendo que a coloração dos mesmos depende do substrato utilizado para o cultivo. Os grãos são amarelos claro quando cultivados em leite, ocre e pardos se crescidos em açúcar mascavo ou purpúreos se cultivados em suco de uva (GUZEL-SEIDYM *et al.*, 2000; ZANIRATTI, *et al.*, 2015).

Nos grãos de kefir é encontrada uma diversidade microbiológica elevada que inclui espécies de leveduras, bactérias do ácido lático (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias do ácido acético e outros microrganismos ainda não descritos (GARROTE *et al.*, 1997; 2001; NALBANTAGLU *et al.*, 2014). A composição da população pode diferir, dependendo da origem dos grãos e dos diferentes métodos de cultivo (GARROTE *et al.*, 2001; ZANIRATTI *et al.*, 2015). Em culturas lácteas encontra-

se um polissacarídeo conhecido como kefirano ou como fator de crescimento de kefir (KGF), que é um heteropolissacarídeo formado por unidades repetitivas de glicose e galactose (1:1) que é encontrado apenas nos grãos de kefir de leite e produzido por BAL sobretudo por *L. kefiranofaciens*. PAIVA *et al.*, (2016) caracterizaram exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir de leite e água acrescida de açúcar mascavo. Tanto o EPS produzidos por *L. kefiranofaciens* (isolado de grãos de leite) quanto o EPS produzido por *L. satsumensis* (isolado de grãos de água) foram homopolissacarídeos formados por resíduos de glicose unidos por ligações α (1,6). Ao que parece, a estrutura química dos EPS secretados por BAL parece não influenciar na sua principal função no grão de kefir que é permitir o encapsulamento dos microrganismos que os compõem em uma matriz polissacarídea. A microbiota dominante e sub-dominante nos grãos de kefir apresenta bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* e *Streptococcus* e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Torula* (ARSLAN *et al.*, 2015; JOHN & DEESEENTHUM, 2015; ZANIRATTI *et al.*, 2015)

Várias bactérias do ácido lático já foram isoladas de grãos de kefir e identificadas por testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares como: *Lactobacillus acidophilus* (ANGULO *et al.*, 1993; NALBANTAGLU *et al.*, 2014), *L. brevis* (SIMOVA *et al.*, 2002), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (SIMOVA *et al.*, 2002), *L. delbrueckii* (SIMOVA *et al.*, 2002; WHITTHUNH *et al.*, 2004), *L. helveticus* (ANGULO *et al.*, 1993, LIN *et al.*, 1999; SIMOVA *et al.*, 2002; NALBANTAGLU *et al.*, 2014), *L. kefir* (ANGULO *et al.*, 1993, TAKIZAWA *et al.*, 1998; GARROTE *et al.*, 2001; ZANIRATTI *et al.*, 2015), *L. kefiranofaciens* (TAKIZAWA *et al.*, 1998, NALBANTAGLU *et al.*, 2014; ZANIRATTI *et al.*, 2015), *L. plantarum* (GARROTE *et al.*, 2001), *L. satsumensis*, *L. perolens*, *L. diolivorans*, *L. parafarraginis*, *L. mali*, *L. casei* (ZANIRATTI *et al.*, 2015), *Leuconostoc mesenteroides* (LIN *et al.*, 1999; GARROTE *et al.*, 2001; WHITTHUNH *et al.*, 2004), *Lactococcus lactis* (GARROTE *et al.* 2001; SIMOVA *et al.* 2002; WHITTHUNH *et al.*, 2004), *Streptococcus thermophilus* (SIMOVA *et al.*, 2002), *Oenococcus oeni* (ZANIRATTI *et al.*, 2015).

1.3 Efeitos benéficos atribuídos ao kefir

Em países do leste europeu, o consumo de kefir é recomendado para pessoas saudáveis com o objetivo de reduzir o risco de doenças crônicas, além de ser recomendado

para o tratamento de algumas desordens metabólicas, hipertensão arterial, doenças cardíacas isquêmicas e alergias (FARNWORTH, 1999; FARNWORTH, 2006). Na literatura médica, estão disponíveis alguns trabalhos que demonstram esses efeitos benéficos. Recentemente, ROSA *et al.*, (2016), demonstrou o efeito benéfico do kefir no tratamento da síndrome metabólica em modelo murino de hipertensão arterial. Em 2017, esse mesmo grupo de pesquisa publicou um estudo de revisão compilando diversos trabalhos disponíveis na literatura científica demonstrando os efeitos antibacteriano, antioxidante, anticarcinogênico, anti-inflamatório e anti-hipertensivo. (ROSA *et al.*, 2017).

Os efeitos antibacteriano (ZACCONI *et al.*, 1995; LRAPORDA, *et al.*, 2017), imunológico (FURUKAWA *et al.*, 1991; THOUREUX & SCHMUCKER, 2001; VINDEROLA, *et al.*, 2005), antitumoral (FURUKAWA *et al.*, 1990; NAGIRA *et al.*, 2002; ZAMBERI, *et al.*, 2016; SHARIFI, *et al.*, 2017), hipocolesterolêmico (FANG *et al.*, 2000; PLANT & CONWAY, 2001; ROSA *et al.*, 2016) e aumento da tolerância à lactose (HERTZLER & CLANCY 2003; RATTRAY & CONNELL, 2011) associados à ingestão do kefir já foram demonstrados em vários estudos. Atividade cicatrizante também já foi verificada utilizando-se uma pomada à base de kefir em ratos albinos com uma ferida dorsal infectada com *Staphylococcus aureus* (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Vários trabalhos demonstraram o efeito imunomodulador de kefir. VINDEROLA *et al.* (2005), alimentaram camundongos BALB/c com kefir cru e kefir pasteurizado e demonstraram que isto aumentou o número de células secretoras de IgA na lâmina própria e brônquios, além de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e pulmonares. Os mesmos autores ainda mostraram que todos os parâmetros estudados voltaram aos valores basais após uma semana sem administração da bebida, o que sugere haver baixo risco de super estimulação da resposta imune de mucosa com o consumo do leite fermentado. Em outro estudo, camundongos BALB/c alimentados com kefir cru e kefir pasteurizado em diferentes concentrações por 2, 5 e 7 dias consecutivos tiveram a produção de IL-4, IL-6 e IL-10 na lâmina própria aumentada. No entanto, menores concentrações de kefir foram necessárias para se obter o mesmo aumento quando comparado às doses de kefir pasteurizado durante o mesmo período de tempo, demonstrando a importância da presença de células viáveis para a imunomodulação (VINDEROLA *et al.*, 2006). VINDEROLA *et al.* (2007), administraram oralmente kefirano a camundongos BALB/c por 2, 5 e 7 dias consecutivos e observaram aumento

do número de células produtoras de IL-10, IL-6 e IL-12 na lâmina própria e aumento de IL-4 e IL-12 no fluido intestinal quando comparados ao grupo controle.

1.3.1 Estudos clínicos com kefir

Poucos estudos clínicos foram realizados avaliando os efeitos benéficos do kefir. Os trabalhos mais recentes publicados na literatura médica foram resumidos e serão apresentados, a seguir:

MAKI *et al*, (2017) testaram o efeito do kefir na constipação intestinal em pacientes com deficiência física e mental, quadro clínico muito comum em pessoas nessa condição. Quarenta e dois pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo experimental que recebeu 2g de kefir liofilizado em cada refeição por 12 semanas e o grupo controle que recebeu glicerol enema, um produto farmacêutico conhecidamente diarreio gênico. A consistência das fezes foi avaliada como parâmetro de melhora. Apesar de algumas variações individuais, a administração de kefir melhorou a consistência das fezes dos pacientes. Os autores sugeriram que a administração diária de kefir poderia prevenir a constipação intestinal.

FATHI *et al*, (2017) testaram a influência da ingestão do kefir e do leite com baixo teor de gordura no perfil lipídico sérico (LDL, HDL e triglicérides) em mulheres com sobrepeso ou obesas na pré-menopausa com dieta rica em produtos lácteos. Setenta e cinco mulheres entre 25 e 45 anos de idade foram randomicamente divididas em 3 grupos. No grupo controle, as participantes receberam duas doses de leite com baixo teor de gordura e nos grupos experimentais receberam duas doses adicionais da mesma bebida ou 2 doses de kefir que foi mantida por 8 semanas. Foi observada melhora no perfil lipídico do grupo que recebeu kefir em comparação com o grupo controle, mas não houve diferença entre os grupos experimentais.

TU *et al*, (2015) testaram o efeito do kefir na densidade mineral óssea em pacientes com osteoporose. Quarenta pacientes foram randomicamente divididas em dois grupos um dos quais, grupo experimental, recebeu kefir suplementado com Carbonato de Cálcio (1600mg) e o grupo controle recebeu apenas o Carbonato de Cálcio na mesma dosagem. A densidade mineral óssea (DMO) do quadril foi determinada antes do ensaio, 1, 3 e 6 meses após o tratamento. A administração do kefir após 6 meses de tratamento aumentou a DMO do quadril dos participantes em comparação com o grupo controle.

O`BRIEN *et al*, (2015) avaliaram o efeito do consumo pós-treino de kefir no desempenho e recuperação em treinamento intensivo de resistência. Sessenta e sete indivíduos (homens e mulheres) de 18 a 24 anos de idade foram divididos em quatro grupos levando-se em consideração o tipo de treino (treinamento de rotina ou treinamento de resistência) e consumo ou não de kefir no pós treino duas vezes por semana durante 15 semanas. Os participantes foram acompanhados quanto a medidas antropométricas e determinação da proteína C reativa (PCR) como biomarcador para risco cardiovascular. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas medidas corporais. No entanto, houve uma melhora na performance dos indivíduos do grupo de treinamento de resistência que receberam kefir em comparação com o grupo que realizou o mesmo treinamento, mas não recebeu a bebida. Os autores atribuíram a melhora pela diminuição da PCR sérica.

1.4 Probióticos: definição e histórico

Elie Metchnikoff foi o primeiro pesquisador a sugerir que a utilização de bactérias poderia beneficiar a microbiota do trato gastrointestinal e conferir longevidade aos seus usuários. Sua teoria foi baseada na constatação de que camponeses da Bulgária tinham uma média de vida superior à da população europeia, conferida, provavelmente, pela utilização de leites fermentados. Diante deste fato, Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina de 1908, propôs que os *Lactobacillus* eram importantes para a saúde e passou a defender o uso de iogurtes e alimentos fermentados. Também no início do século XX, em 1906, Henry Tissier, recomendou a administração de bifidobactérias para modular a microbiota de crianças com diarreia, afirmando que estas bactérias poderiam competir com bactérias indesejáveis, eliminando-as e tornando-se dominantes no intestino (SHORTT, 1999; NICOLI & VIEIRA, 2000).

Posteriormente, vários outros pesquisadores continuaram a busca por bactérias benéficas para a saúde humana, até que, em 1930, Minoru Shirota, que reconhecia a importância da medicina preventiva e modulação da microbiota gastrintestinal, isolou, no Japão, uma linhagem de *Lactobacillus* capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal. Esta linhagem, denominada *Lactobacillus casei* linhagem Shirota, foi usada para produção da bebida láctea fermentada chamada *Yakult*, a qual é ainda comercializada. Do final da década de 30 até o final da década de 50, devido às circunstâncias mundiais (depressão, guerras), houve pouca pesquisa nesta área. O

interesse na microbiota intestinal humana ressurgiu no início dos anos 60, levando à introdução do conceito de probióticos (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

A palavra probiótico deriva-se do grego e significa “a favor da vida”. O termo probiótico foi originalmente usado para descrever suplementos alimentares microbianos que estimulavam o crescimento de animais domésticos em fazendas (GALDEANO *et al.*, 2007). Há mais de 20 anos atrás, a produção de substâncias que inibiam o crescimento de patógenos na superfície de meios sólidos e a habilidade de reduzir a aderência de patógenos em ensaios *in vitro* definiam os probióticos (CHAN *et al.*, 1985). FULLER (1989) definiu probióticos de forma mais abrangente como “suplemento alimentar com microrganismos vivos que, afetam benéficamente o hospedeiro através do melhoramento do balanço da microbiota intestinal”. A FAO/WHO, em 2002, definiu probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, sendo esta, a definição atualmente mais aceita.

Os microrganismos mais utilizados como probióticos são as bactérias produtoras de ácido lático (BAL), as quais são encontradas em altos níveis no intestino do homem e de animais saudáveis. Essas bactérias são consideradas pelo FDA (Food and Drug Administration) como possuidoras do status GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras). Numa revisão de literatura recente, PLAZA-DÍAZ *et al.*, (2018), listou os probióticos mais utilizados em estudos clínicos para o tratamento pediátrico de doenças infecciosas intestinais os quais pertencem ao gênero *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG, *L. salivarius* CEC T5713, *L. fermentum* CEC T 5716, *L. casei* CRL 431, *L. casei* CNCMI-1518, *L. reuteri* DSM 17938, *L. paracasei* CBAL 74) e *Bifidobacterium* (*B. lactis* B94 e *B. animalis* subs *lactis* BB12). Outros gêneros compreendem *Streptococcus* (*S. salivarius* e *S. thermophilus*) e *Lactococcus* (*L. lactis*), além de algumas linhagens de leveduras (*Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae*) (NAIDU *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2013 GOMES-SANTOS *et al.*, 2017; FONSECA *et al.*, 2017). A maior parte dos probióticos são bactérias Gram (+). Entretanto, existem preparações probióticas comerciais incluindo bactérias Gram (-), tais como as linhagens *E. coli* EMO e *E. coli* Nissle 1917 (NICOLI *et al.*, 2016). Culturas simples ou mistas de microrganismos vivos são usadas em preparações probióticas, em diferentes formas farmacêuticas, incluídas na dieta humana e animal (BERG, 1998, VAUGHAN *et al.*, 1999; KECHAGIA *et al.*, 2013).

1.5 Características desejáveis para um candidato a probiótico

Para que um microrganismo seja selecionado e utilizado na preparação de produtos probióticos ele precisa possuir algumas características importantes que, segundo o Guia para Avaliação de Probióticos em Alimentos (FAO/WHO, 2002), são:

- Identificação (gênero, espécie e linhagem);
- Propriedades tecnológicas satisfatórias;
- Não deve apresentar resistência a antimicrobianos transmissível;
- Resistência às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI);
- Ter efeito benéfico comprovado: conferindo uma proteção ao hospedeiro contra patógenos ou modulando a resposta imunológica;

No que se refere à segurança, a sobrevivência dos probióticos dentro do TGI e a avaliação da translocação para locais extra-intestinais precisam ser conhecidas para prever não só os efeitos benéficos, mas também os potenciais efeitos maléficos (SALMINEN *et al.*, 1998a). Após a ingestão, os níveis de sobrevivência do probiótico no TGI variam consideravelmente entre as linhagens (MARTEAU *et al.*, 1993). Enquanto algumas são extensivamente eliminadas no estômago, outras, podem passar pelo intestino em concentrações muito elevadas (MARTEAU *et al.*, 1993).

Alguns autores ressaltam a importância da especificidade do hospedeiro, ou seja, uma linhagem probiótica para uso em seres humanos deve ser isolada de seres humanos. Afirma-se que o probiótico irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar àquele do qual foi isolado, visto que é hospedeiro-específico (SAARELA *et al.*, 2000). Entretanto, a levedura *Saccharomyces boulardii*, mesmo não sendo de origem humana ou animal, é reconhecida como probiótico e empregada na indústria farmacêutica desde 1960. Esta levedura tem a capacidade de eliminar ou reduzir os efeitos de diferentes tipos de diarreias e infecções intestinais, neutralizando diferentes tipos de toxinas, como as produzidas por *Clostridium difficile* (CZERUCKA *et al.*, 2007), além do seu efeito protetor sobre os efeitos nefastos de *S. Typhimurium* em modelo murino de febre tifóide (MARTINS *et al.*, 2010; 2013). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A 905, isolada da cachaça, vem sendo caracterizada desde 2005 quanto ao potencial probiótico e já demonstrou efeito protetor em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium* e doença inflamatória intestinal (MARTINS *et al.*, 2005b; 2007; 2011; TIAGO *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2016).

Outra característica desejável para um probiótico é a capacidade de aderência ao epitélio intestinal. A adesão às células epiteliais é o primeiro passo da colonização (mesmo que temporária) de um microrganismo, modula o sistema imune intestinal

(devido ao contato do probiótico com o tecido linfóide associado ao intestino) e pode impedir a adesão de patógenos. Por isto, têm sido propostos ensaios avaliando propriedades de adesão usando células intestinais humanas para selecionar bactérias probióticas (SALMINEN *et al.*, 1998a; OUWEHAND *et al.*, 2002; LIONG, 2007; VASILEVIC & SHAH, 2008; GUGLIELMETTI *et al.*, 2009). Entretanto, não se conhecem probióticos capazes de se instalar no trato digestivo de um indivíduo adulto, mesmo após sua ingestão prolongada, uma vez que a microbiota residente, ainda que desequilibrada, impede essa colonização. Portanto, a ingestão diária de um probiótico em quantidade adequada é indispensável para manter níveis artificialmente elevados do micro-organismo no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado (MARTINS *et al.*, 2005). Para que isso ocorra, além de permanecer viável durante sua passagem pelo sistema gastrointestinal, o nível populacional do probiótico deve ser suficientemente elevado para ter um impacto no local onde se espera que desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana, considera-se que um microrganismo poderá agir no ecossistema onde ele se encontra somente quando presente em população igual ou superior a 10^7 células viáveis/g do conteúdo. A concentração em células viáveis do probiótico deve ser, portanto, ajustada na preparação inicial levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do microrganismo sem se multiplicar no tubo digestivo e o efeito de diluição intestinal de maneira a atingir, no mínimo, 10^7 células/g do conteúdo intestinal. Considera-se, portanto, que a concentração de células viáveis do probiótico no produto a ser ingerido deve estar, pelo menos, entre 10^8 e 10^9 UFC/g (NICOLI & VIEIRA, 2000). Essa mesma orientação é dada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, que estabelece que para um produto probiótico apresentar a alegação de promoção da saúde, a quantidade mínima viável do micro-organismo probiótico deve estar situada entre 10^8 - 10^9 UFC / dose diária do produto final, conforme a indicação de consumo pelo fabricante (BRASIL, 2007). Assim, se a dose diária recomendada do produto for de 100mL, a contagem de células viáveis do probiótico por mL do produto deve estar entre 10^6 - 10^7 UFC durante todo o prazo de validade.

1.6 Mecanismos de ação dos probióticos

Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são, basicamente, os mesmos atribuídos à microbiota intestinal, os quais incluem:

Competição por nutrientes e sítios de adesão: vários microrganismos usados como probióticos competem por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal e por nutrientes, inibindo, deste modo, a fixação e a alimentação de patógenos (BERNET *et al.*, 1994; NICOLI & VIEIRA, 2000; RASTALL *et al.*, 2005; LIONG, 2007).

Inibição da produção ou ação de toxinas: alguns probióticos têm a propriedade de inibir a ação de microrganismos patogênicos, inibindo a produção ou a ação de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo, assim, a sua atuação no epitélio intestinal (CZERUCKA *et al.*, 1994; BRANDÃO *et al.*, 1998; FUKUDA *et al.*, 2011).

Reforço da função de barreira intestinal: alguns probióticos apresentam a capacidade de influenciar as interações célula-célula e a estabilidade celular do epitélio intestinal. Esse mecanismo ocorre através da preservação da arquitetura do citoesqueleto e da regulação da permeabilidade, pela fosforilação de proteínas das junções intracelulares (NG *et al.*, 2009). Outro mecanismo envolvido no reforço da barreira intestinal é o aumento da expressão de proteínas MUC2, MUC3 e MUC5AC em células intestinais, que levam a um aumento da produção de muco (OTTE & PODOLSKY, 2004).

Modulação do sistema imunológico: alguns microrganismos probióticos têm a capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro por meio da ativação de macrófagos, proliferação de células T e aumento ou diminuição da produção de imunoglobulinas, anticorpos e citocinas (PLAZA-DÍAZ, *et al.*, 2018). A imunomodulação pelos probióticos é resultado da interação de moléculas conservadas da parede celular destes microrganismos denominada Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) com Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) localizadas em células fagocitárias do hospedeiro, induzindo as vias de sinalização imune, sendo que o tipo de resposta imunológica gerada é dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga (MAASSEN *et al.*, 2000; CHRISTENSEN *et al.*, 2002; PERDIGÓN *et al.*, 2002). A interação do microrganismo probiótico com as células dendríticas e macrófago do tecido linfóide associado ao intestino (do inglês, GALT) é o que promove a produção de citocinas, moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipos 1 e 2 (LEBEER *et al.*, 2010). Outro aspecto importante é que, uma vez estabelecido no TGI, o probiótico pode promover o estímulo

à proliferação de células T regulatórias e produção de imunoglobulinas, principalmente sIgA, permitindo um desenvolvimento normal do sistema imunológico por meio da indução da tolerância a antígenos luminais, auxiliando no combate a patógenos entéricos (MARTINS *et al.* 2013), prevenção de doenças autoimunes (TIAGO *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2016) e alergias (FONSECA *et al.*, 2017). O efeito imunomodulador de várias linhagens microbianas com potencial probiótico já foi demonstrado dentro do nosso grupo de pesquisa, dentre elas, *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 (NEUMANN *et al.*, 1998), *Bifidobacterium longum* Bb46 (SILVA *et al.*, 2004), *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A 905 (MARTINS *et al.*, 2011), *B. longum* 5¹A (SOUZA *et al.*, 2012), *L. acidophilus* L36 e *L. salivarius* L38 (STEINBERG *et al.*, 2014), *Weissella paramesenteroides* WpK4 (ALVIM *et al.*, 2016) e *L. rhamnosus* D1 e *L. plantarum* B7 (ACURCIO *et al.*, 2017).

Produção de substâncias inibidoras de microrganismos patogênicos: algumas linhagens probióticas produzem substâncias que inibem o crescimento de vários patógenos, como os ácidos orgânicos, bacteriocinas, substâncias *bacteriocin-like* e peróxido de hidrogênio (importante para o controle de patógenos em ambientes aeróbios, como na vagina, por exemplo) (YILDRIM & JOHNSON, 1998; NARDI *et al.*, 2005; RASTALL *et al.*, 2005; LIONG, 2007; CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2008).

A produção de compostos antimicrobianos pelos probióticos é, provavelmente, um dos mais importantes mecanismos responsáveis pelo fenômeno de antagonismo. Na busca por novos candidatos a probióticos, vários trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa já demonstraram a ocorrência desse fenômeno em experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (ZANIRATTI *et al.*, (2015), ALVIM *et al.*, (2016), ACURCIO *et al.*, (2017) SILVA *et al.*, (2017) e GALVÃO *et al.*, (2017)). De maneira interessante, embora a presença desses metabólitos antimicrobianos seja frequentemente demonstrada *in vitro*, nem sempre são produzidos ou têm atividade *in vivo* (SILVA *et al.*, 2001). SILVA *et al.*, (2017), demonstrou que, embora a amostra de *Pediococcus pentosaceus*, isolada das fezes de cavalo, tenha apresentado atividade antagonista *in vitro* contra *S. Typhimurium*, animais BALB/c convencionais tratados com este microrganismo não foi protegido da morte num modelo de infecção oral com o mesmo patógeno. Por outro lado, RAMARÉ *et al.* (1993) verificaram que a presença de uma substância antimicrobiana do tipo *bacteriocin-like* nas fezes de camundongos gnotobióticos monoassociados com um *Peptostreptococcus* sp. de origem fecal humana (posteriormente identificado como *Ruminococcus gnavus*), não era produzida *in vitro* em meios de cultura comerciais não

suplementados e sua ação somente aparecia nessas condições quando era adicionada a enzima proteolítica tripsina aos meios. Foi demonstrado que o composto inibitório produzido precisava sofrer uma clivagem pela tripsina para se tornar ativo contra várias bactérias Gram-positivo, como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium septicum* e *Clostridium sordelli*. Esse estudo mostrou pela primeira vez a participação ativa do hospedeiro em uma interação bacteriana que ocorria no TI e demonstrou a importância do modelo *in vivo*.

1.7 Gênero *Lactobacillus*

1.7.1 Características morfológicas, taxonômicas e metabólicas

Os *Lactobacillus*, descritos por Beijerinck em 1901, são bactérias Gram positivo, não formadoras de esporos, com morfologia bacilar ou cocobacilar, fermentadoras, microaerófilas e quimio-organotróficas, que requerem meios ricos para seu crescimento. Além disso, são catalase-negativas, entretanto atividade de pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens. De forma geral, o genoma dos *Lactobacillus* tem conteúdo GC menor que 54 mols% (FELIS & DELLAGLIO, 2007).

De acordo com o *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* (GARRITY *et al.*, 2004), o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*, que engloba também os gêneros *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. Até o momento, o gênero apresenta 224 espécies e 29 subespécies descritas (EUZÉBY, 2018).

A divisão clássica do gênero está baseada em suas características metabólicas, na qual o tipo de fermentação pode ser classificado em: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório (AXELSSON, 2004). Vários *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios e heterofermentativos facultativos e, alguns obrigatórios, são utilizados em alimentos fermentados. Entretanto, esse último grupo é rotineiramente associado à deterioração alimentar. Os *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios incluem aqueles que fermentam glicose produzindo exclusivamente ácido lático e não fermentam pentoses ou gliconato. Os heterofermentativos obrigatórios englobam os *Lactobacillus* que fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás, a partir da glicose, é uma característica marcante desses micro-organismos. Os heterofermentativos facultativos incluem os *Lactobacillus* que fermentam hexoses em

ácido-lático e podem produzir gás a partir de gliconato, mas não através da glicose. Esses micro-organismos também fermentam pentoses, através de uma fosfoacetolase induzida para produzir ácidos lático e acético. (VÁSQUEZ *et al.*, 2005)

Os *Lactobacillus* são micro-organismos ubíquos, sendo encontrados em uma variedade de ambientes nos quais existem carboidratos disponíveis para seu metabolismo. Entre os ambientes nos quais os *Lactobacillus* são abundantes podem-se citar: alimentos (produtos lácteos, carne fermentada, massas, vegetais, frutas e bebidas) trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário humano e de outros animais, esgotos, entre outros (FELIS & DELLAGLIO, 2007).

1.7.2 Efeitos benéficos

Várias linhagens pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram isoladas e, têm tido seu potencial probiótico intensamente caracterizado, sendo publicados vários efeitos benéficos advindos da sua utilização. Um dos mais extensivamente estudados é o *L. rhamnosus* GG. Recentemente uma metanálise foi publicada compilando vários trabalhos demonstrando seu efeito na prevenção de diarreia associada ao uso de antibióticos (BLAABJERG *et al.*, 2017). *L. casei* Shirota tem efeitos descritos em distúrbios do TGI, como por exemplo na constipação crônica (KOEBNICK *et al.*, 2003) e efeitos anticarcinogênicos (LEE & SALMINEN, 1995; NAITO *et al.*, 2008). O efeito hipocolesterolêmico, de desconjugação de sais biliares e aumento da tolerabilidade à lactose, de outras linhagens de *Lactobacillus*, também já foram demonstrados em vários trabalhos (GILLILAND, 1984; KLAVER & VAN DER MEER, 1995; FANG, *et al.*, 2000; PLANT & CONWAY, 2001; MANDAL & BAGHI, 2018).

Os *Lactobacillus* apresentam ainda atividade antagonista contra uma variedade de patógenos, tais como *Salmonella* Typhimurium (STEINBERG *et al.*, 2014; ZANIRATTI *et al.*, 2015; ACURCIO *et al.*, 2017;), *Listeria monocytogenes* (SANTOS *et al.*, 2011) e *E. coli* O157 (JOHNSON-HENRY *et al.*, 2007) Efeitos anti-inflamatórios (como redução da produção de IL12, IL6 e TNF- α) foram observados na associação de *L. reuteri* com células dendríticas *in vitro* (NG *et al.*, 2009). Recentemente, um trabalho do nosso grupo de pesquisa também demonstrou o efeito anti-inflamatório (com redução das citocinas pró-inflamatórias IL1- β , IL6 e TNF- α) de duas linhagens de *Lactobacillus* (*L. plantarum* 59 e *L. fermentum* 137) durante infecção com *Gardnerella vaginalis* e *Candida albicans* em modo de cultura de célula HeLa (SANTOS *et al.*, 2018)

Um grande número de evidências sugere que respostas imunes do tipo 1 geradas por *Lactobacillus* probióticos na mucosa intestinal podem estimular imunidade celular sistêmica necessária para imunoterapia de câncer, para o controle de microrganismos intracelulares patogênicos e para o combate do envelhecimento do sistema imune em indivíduos idosos (ABBAS *et al.*, 2015). Em um estudo recente, MOTEVASEI *et al.*, (2018), avaliaram a atividade antitumoral de diferentes doses de *Lactobacillus crispatus* administrados intraperitonealmente em camundongos BALB/c em um modelo de câncer de mama. Foi observado aumento da sobrevivência dos animais tratados com o microrganismo em relação ao grupo controle sem tratamento. Os parâmetros de melhora avaliados, como redução do tumor e diminuição da expressão de iNOS, COX-2 e arginase, foram melhores nos grupos que receberam tratamento com *Lactobacillus crispatus*, porém foi dose-dependente.

A inibição de microrganismos patogênicos e toxigênicos por probióticos se dá, em geral, por produção de substâncias antimicrobianas ou por exclusão competitiva (FARNWORTH, 2006). Neste sentido, a adesão de bactérias potencialmente probióticas às células epiteliais pode contribuir significativamente para a exclusão competitiva de patógenos (COCONNIER *et al.*, 1993; BEIRÃO, 2017). A capacidade de adesão de microrganismos ao epitélio intestinal é um dos parâmetros que devem ser avaliados na seleção de candidatos a probióticos (FAO/WHO, 2002). Pode-se fazer essa avaliação por meio de testes indiretos, medindo-se a hidrofobicidade de superfície celular do microrganismo em solventes apolares, ou diretamente, pela avaliação da colonização intestinal de animais isentos de germe (STEINBERG *et al.*, 2014; ZANIRATTI *et al.*, 2015; ACURCIO *et al.*, 2017). A capacidade de ligação ao epitélio intestinal por meio da avaliação da adesão do microrganismo às células CACO-2 é outra metodologia que pode ser utilizada na seleção de potenciais probióticos (DIOSMA *et al.*, 2013). GOLOWSCZYC *et al.*, 2007 avaliaram a capacidade de diferentes linhagens de *L. kefir*, isoladas de grãos de kefir, de se ligar a células CACO-2 e de proteger ou não essas células contra a adesão e invasão de *Salmonella* Enteritidis. Foi demonstrado que o papel protetor de *L. kefir* foi linhagem dependente e que às diferenças na quantidade de proteína S entre as linhagens poderia estar correlacionado com maior ou menor invasão de *Salmonella* Enteritidis às células CACO-2. Em um trabalho mais antigo SCHNEITZ *et al.* (1993), já havia demonstrado que a camada S de algumas linhagens de *L. acidophilus* estava envolvida no processo de adesão a enterócitos de frango.

Frequentemente há uma correlação alta entre hidrofobicidade de superfície celular e capacidade de colonização em animais isentos de germe. Em um trabalho prévio, comprovamos isso para *Lactobacillus satsumensis* 18P isolado de grãos de kefir de água (ABATEMARCO, 2014).

1.8 *Lactobacillus diolivorans*

1.8.1 Características morfológicas, metabólicas, filogenéticas e aplicações

Lactobacillus diolivorans, assim como qualquer espécie do gênero, são bactérias Gram-positivo, catalase negativo, microaerófilo e apresenta forma de bastonete curto. Produzem gás a partir da fermentação da glicose, são capazes de crescer numa ampla faixa de pH (2,5-7,0), halotolerantes (crescem em meio com até 3,0% de NaCl) e exibem crescimento a 10°C (YU *et al.*, 2011; ARASU *et al.*, 2014). São heterofermentativos obrigatórios, apresentam atividade de descarboxilase para lisina, mas não para tirosina, ornitina e histidina (ARASU *et al.*, 2013).

Filogeneticamente, *L. diolivorans* pertence ao grupo de *L. buchneri* do qual fazem parte também *L. farraginis*, *L. hilgardii*, *L. kefiri*, *L. kisonensis*, *L. otakiensis*, *L. parabuchneri*, *L. parafarraginis*, *L. parakefiri*, *L. rapi* e *L. sunkii*. As espécies pertencentes a este grupo filogenético contem principalmente heterofermentadores obrigatórios e alguns heterofermentadores facultativos. Todos os membros desse grupo produzem L(+) ou D(-) ácido láctico, com exceção do *L. parakefiri* que produz apenas o isômero L(+). O conteúdo de G-C desse grupo está entre 38,8 e 42mol% (SALVETTI *et al.*, 2012)

Lactobacillus diolivorans já foi isolado de alimentos fermentados. YU *et al.*, (2011) avaliaram a diversidade de BAL em um alimento naturalmente fermentado típico da Mongólia feito artesanalmente a partir do leite de égua, iaque, cabra e vaca e isolaram 17 linhagens diferentes de *Lactobacillus diolivorans*. No trabalho de ARASU *et al.*, (2014) foram isolados e selecionados *Lactobacillus* heterofermentativos para uso em silagem por meio de testes que avaliaram a produção de ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e succínico). Além disso, foram realizados testes *in vitro* para avaliar a tolerância à suco gástrico, sais biliares, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e antagonismo contra fungos de importância em alimentos para um possível uso desses microrganismos como probióticos para animal. Resumidamente, *Lactobacillus diolivorans* apresentou alta produção de ácidos orgânicos, portanto, interessante para uso em silagem, e

características importantes para uso como probiótico, como resistência a suco gástrico e sais biliares e sensibilidade a maior parte dos antimicrobianos testados. No entanto, não produziu nenhuma substância capaz de antagonizar o crescimento dos fungos testados.

L. diolivorans tem sido bastante explorado por sua habilidade natural de produzir 1,3 propanodiol a partir da fermentação do glicerol. PFÜGL *et al.*, 2014 avaliaram a produção de 1,3 propanodiol a partir da fermentação do glicerol gerado na produção do biodiesel a partir do óleo de canola e do óleo de palma. Foi demonstrado que *L. diolivorans* converteu igualmente e de maneira eficiente o glicerol, derivado do óleo e derivado do óleo de canola, a 1,3 propanodiol (PFÜGL *et al.*, 2012; PFÜGL *et al.*, 2013). O glicerol é um subproduto sem muito valor comercial, ao contrário do 1,3 propanodiol que é um produto de bastante valor agregado e tem sido largamente utilizado na última década para produção de tereftalato de polítrimerileno (PPT) usado para fabricação de vários produtos industriais, como lençóis, carpete e vestuário (PFÜGL *et al.*, 2014).

O potencial probiótico do *L. diolivorans* 1Z foi avaliado anteriormente por meio de testes *in vitro* de tolerância a suco gástrico e sais biliares, perfil de susceptibilidade à antimicrobianos, antagonismo contra patógenos entéricos e hidrofobicidade de superfície celular. *L. diolivorans* 1Z foi classificado como resistente ao suco gástrico (% inibição < 40,0%), tolerante aos sais biliares (60% ≥ %inibição ≥ 40%), moderadamente hidrofóbico (33% ≤ MATS ≤ 66%), apresentou atividade antagonista contra todos os patógenos testados e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos típico dos *Lactobacillus* (ZANIRATTI *et al.*, 2015). Foi avaliada ainda a sobrevivência e reativação *in vitro* de *L. diolivorans* 1Z, após a liofilização utilizando 3 crioprotetores em duas concentrações diferentes (trealose 5 e 10%, skim milk 10 e 20% e sacarose 15 e 25%). *L. diolivorans* 1Z apresentou taxas de sobrevivência superiores a 90% com todos os crioprotetores testados e uma rápida velocidade de reativação (inferior a 4 horas) na formulação com *skim milk* 10%. Os resultados em conjunto nos levaram a concluir que *L. diolivorans* 1Z apresentou potencial para uso como probiótico merecendo ser testado em modelos *in vivo* (ABATEMARCO, 2014). A habilidade de *L. diolivorans* 1Z em produzir exopolissacarídeo (EPS) e o efeito do EPS na adesão e invasão de *Salmonella* Enteritidis em células CACO-2 também já foram testados. Células previamente tratadas com o EPS produzido por *L. diolivorans* 1Z protegeu as células CACO-2 contra a adesão e invasão da *S. Enteritidis*, em comparação com o grupo controle não tratado com o EPS e desafiado com o patógeno. Ademais, o EPS produzido pelo *L. diolivorans* 1Z foi caracterizado quanto ao tamanho (massa molar: $7,15 \times 10^7$ Da) e composição primária de carboidrato,

apresentando 94% de α -glicose + 6% de outros carboidratos, o que o define como um heteropolissacarídeo que é caracterizado pela presença de outras hexoses além da glicose. A habilidade de *L. diolivorans* 1Z produzir EPS poderia ser explorada pela indústria de alimentos na produção de bebidas lácteas, uma vez que já foi demonstrado que bebidas fermentadas com linhagens produtoras de EPS com massa molar acima de $2,5 \times 10^4$ Da tendem a apresentar menor susceptibilidade à separação do soro lácteo, viscosidade mais elevada, e maiores escores sensoriais do que a bebida fermentada por linhagens não produtoras (VILLANOEVA, 2016).

1.9 Gênero *Salmonella*

1.9.1 Características morfológicas, taxonômicas e metabólicas

O gênero *Salmonella* é formado por espécies de bactérias bacilares, Gram-negativo, anaeróbias facultativas, intracelulares facultativas, que incluem agentes etiológicos de doenças coletivamente chamadas de salmoneloses (BERGEY, 2005). Estas bactérias pertencem à família *Enterobacteriaceae* e fermentam a glicose, reduzem nitrato a nitrito e possuem flagelos peritríquios. A *Salmonella* foi isolada em 1885, por Daniel Salmon, um veterinário americano e, desde então, aproximadamente 2.500 sorotipos diferentes foram descritos (BRENNER *et al.*, 2000; LAMAS *et al.*, 2018).

O gênero inclui duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. À *Salmonella enterica* incluem seis subespécies: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (I), *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (II), *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (IIIA), *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (IIIB), *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *Salmonella enterica* subespécie *indica* (VI) (GRIMONT & WEILL, 2007). A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (referida neste trabalho como *S. enterica*) possui aproximadamente 1500 sorotipos identificados (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014) e representa a subespécie de *Salmonella* com maior número de sorotipos isolados de humanos e animais.

Os sorotipos de *S. enterica* diferem quanto à variedade de hospedeiros susceptíveis e ao grau de adaptação ao hospedeiro (BÄUMLER *et al.*, 1998; ANDERSON & KENDALL, 2017). Alguns sorotipos de *S. enterica* têm predileção por uma determinada espécie de hospedeiro, mas podem eventualmente causar a doença em outras espécies. Este grupo inclui *S. enterica* sorotipo Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) e *S. enterica* sorotipo Dublin, que preferencialmente infectam suínos e bovinos, respectivamente, mas que

podem infectar humanos (CHIU *et al.*, 2004). Há um segundo grupo de *S. enterica* que causa doença sistêmica em uma espécie, como os sorotipos Typhi (*S. Typhi*) e Paratyphi (*S. Paratyphi*), que infectam apenas humanos, e o sorotipo Gallinarum (*S. Gallinarum*), que infecta aves (BÄUMLER *et al.*, 1998). A maioria dos sorotipos da *S. enterica*, no entanto, infectam várias espécies animais e o homem, e tendem a causar enterite no hospedeiro. A este último grupo pertencem a *S. enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) e a *S. enterica* sorotipo Enteritidis.

1.9.2 Salmonelose humana

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de infecção alimentar em seres humanos em todo o mundo. A infecção por *S. enterica* pode causar duas desordens distintas em seres humanos: a enterite não-tifoide e a febre tifoide. A enterite não-tifoide pode ser causada por diversos sorotipos de *S. enterica*, sendo mais comuns os sorotipos Typhimurium (*S. Typhimurium*) e Enteritidis (*S. Enteritidis*). A febre tifoide é causada infecção pelo sorotipo Typhi (*S. Typhi*). (FERNANDES *et al.*, 2006).

A enterite não-tifoide é transmitida por via fecal-oral e pode ocorrer após ingestão de alimento de origem animal como leite, ovos e carne contaminados (MURASE *et al.*, 2000; OLIVER *et al.*, 2005; FEARNLEY *et al.*, 2011), através da ingestão de produtos de origem vegetal contaminados (BENNETT *et al.*, 2014), ou pelo contato com água contaminada (AILES *et al.*, 2013). JACKSON *et al.* (2013) referem *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* como os dois principais sorotipos de *Salmonella* encontrados após levantamento de surtos ocasionados durante o período de 1998 a 2008 pelo Sistema de Vigilância de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos dos Estados Unidos (*Foodborne Disease Outbreak Surveillance System – FDOSS*). A infecção por *S. Typhimurium* foi associada ao consumo de diversos produtos alimentares.

Estima-se que a infecção por *Salmonella* não-tifoide seja responsável por 93,8 milhões de casos de doença, sendo 80,3 milhões destes casos de origem alimentar, e 55 mil mortes anualmente em todo o mundo (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, a infecção por *Salmonella* não-tifoide foi a responsável por 11% das doenças, 35% das hospitalizações e 28% das mortes atribuíveis a doenças de origem alimentar (SCALLAN *et al.*, 2011). Segundo VOETSCH *et al.* (2004), o número referido de doentes hospitalizados e de mortos anualmente nos Estados Unidos foi da

ordem de 1,4 milhões e de 15 mil e 400 indivíduos, respectivamente. HOFFMANN *et al.* (2012) estimaram para os Estados Unidos o custo anual relacionado à enterite não-tifoide de 3.3 bilhões de dólares.

No Brasil, a vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) teve início no final de 1999. Surtos de DTA constituem eventos de Saúde Pública de notificação compulsória imediata segundo a Portaria nº 204/2016 (BRASIL, 2016a). Segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (MS), entre 2007 a 2016, ocorreram 6.632 surtos de DTA, com 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações (14,5% do total de doentes) e 109 óbitos. Ainda segundo o MS, a região brasileira com maior número de surtos é a Sudeste, concentrando 43,8% com mais de 501 registros de surtos só no estado de Minas Gerais. Os sinais e sintomas com maior relato nos casos de surtos de DTA são diarreia (29,6%) e dor abdominal (19,6%). Dos microrganismos envolvidos nos surtos de DTA, 90,5% correspondem a bactérias. *Salmonella* spp. aparecem como os principais microrganismos causadores de DTA sendo identificadas em 7,5% dos surtos, seguida da *E.coli* (7,2%) e *S. aureus* (5,8%). Este número pode estar subestimado, uma vez que 70,3% dos surtos notificados permanecem sem identificação do agente etiológico (BRASIL, 2016b).

A febre tifoide é uma enfermidade de alta morbidade ocasionada após infecção pelo sorotipo Typhi (*S. Typhi*) de *S. enterica*, para os quais seres humanos são hospedeiros naturais estritos e reservatórios da infecção. Estudos retrospectivos desenvolvidos por CRUMP *et al.* (2004) reportaram que no ano de 2000 a infecção por *S. Typhi* foi responsável pelo aparecimento de mais de 20 milhões de doenças e 200 mil mortes no mundo. A transmissão ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de alimentos pobremente higienizados manipulados por indivíduos infectados ou através da ingestão de água não tratada contaminada pela bactéria eliminada nas fezes de indivíduos doentes ou portadores crônicos da infecção (CONNOR & SCHWARTZ, 2005). A incidência maior da febre tifoide é referida em países em desenvolvimento, e ocorrem em maior número nas regiões Centro-Sul da Ásia, Sudoeste, Oeste, Central e Leste da África e América Latina (CRUMP *et al.*, 2004; BUCKLE *et al.*, 2012).

As manifestações clínicas e patológicas da enterite não-tifoide e da febre tifoide são distintas. A enterite não-tifoide tem período de incubação de 6 a 72 horas após a infecção e caracteriza-se clinicamente pela apresentação de gastroenterite autolimitada e não sistêmica, com diarreia profusa, dor abdominal, vômito menos frequentemente, e infecção local da porção distal do íleo, cólon e linfonodos mesentéricos dos humanos

infectados (IMANISHI & CHAI, 2013). Em pacientes imunossuprimidos, no entanto, a infecção por *Salmonella* não-tifoide ocasiona uma síndrome denominada salmonelose não-tifoide invasiva, que resulta em bacteremia e pode gerar complicações como septicemia e meningite nos pacientes acometidos (MILLEDGE *et al.*, 2005; MOLYNEUX *et al.*, 2009). O sinal clínico mais frequente relacionado à infecção por *Salmonella* não-tifoide invasiva é febre; a diarreia nos casos de infecção por *Salmonella* não-tifoide invasiva é menos frequente e geralmente pouco proeminente quando ocorre (FEASEY *et al.*, 2012).

Na febre tifoide, o indivíduo infectado desenvolve enfermidade sistêmica caracterizada mais frequentemente por febre persistente, dores abdominais, perda de apetite, hepato e esplenomegalia (DAS *et al.*, 2014; KHANAM *et al.*, 2015). A *S. Typhi* instala-se inicialmente no íleo, onde se adere e invade as células epiteliais intestinais, através das quais a *S. Typhi* transloca-se para folículos linfoides intestinais e linfonodos mesentéricos (DE JONG *et al.*, 2012). Durante exame microscópico de conteúdo fecal de pacientes com febre tifoide observam-se acúmulo de células inflamatórias e hemácias (DAS *et al.*, 2014). A enterite é caracterizada histologicamente por edema e infiltração de linfócitos, monócitos, plasmócitos e, o que resulta em marcante hipertrofia da mucosa ileal (KRAUS *et al.*, 1999). A bactéria atinge a corrente sanguínea e dissemina-se a órgãos sistêmicos como baço, fígado, medula óssea, vesícula biliar e placas de Peyer (DE JONG *et al.*, 2012). Aproximadamente 2 a 5% dos indivíduos infectados por *S. Typhi* desenvolvem o estado de portadores crônicos, com infecção do trato biliar e eliminação intermitente de *S. Typhi* no conteúdo fecal durante anos (GUNN *et al.*, 2014). Na vesícula biliar, a *S. Typhi* adere e invade as células epiteliais, onde forma biofilmes de *S. Typhi* associados a infiltrado de histiócitos, ausência relativa de neutrófilos e dano do epitélio vesicular, com extrusão das células epiteliais (GONZALEZ-ESCOBEDO & GUNN, 2013). A secreção de bile com *S. Typhi* possibilita a infecção secundária das placas de Peyer, via ciclo entero-hepático (GORDON, 2008), o que favorece o aparecimento de lesões em placas de Peyer devido à isquemia e necrose teciduais e que podem levar a ulceração das placas de Peyer, com conseqüente hemorragia ou perfuração intestinais (PARRY *et al.*, 2002). Além da hemorragia e perfuração intestinais, a febre tifoide severa pode ocasionar complicações como hepatite, encefalopatia, miocardite, efusão pleural ou pneumonia e choque hemodinâmico (PARRY *et al.*, 2002; PARRY *et al.*, 2014).

1.10 Modelo de infecção por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium em camundongos gnotobióticos

Considerando as infecções naturais, a *S. Typhi* infecta exclusivamente o ser humano. O único modelo animal de infecção experimental que, uma vez infectado via oral por *S. Typhi* desenvolve uma síndrome similar à febre tifoide humana é o chimpanzé (EDSALL *et al.*, 1960; SANTOS, 2014). Em função das dificuldades de se trabalhar com chimpanzé, outros animais têm sido usados como modelo para o estudo da febre tifoide humana e, sem dúvida, o camundongo é o animal mais intensamente explorado para essa finalidade.

A infecção experimental de *S. Typhimurium* no modelo murino resulta em uma enfermidade que se assemelha à febre tifoide humana. Após o desafio oral com *S. Typhimurium* ocorre aumento da temperatura corporal dos animais e enrugamento da pele, entre 4-8 dias após o desafio. Ao nível intestinal, enterite difusa está presente, caracterizada por infiltrados inflamatórios de leucócitos mononucleares bem como, edema e destruição da arquitetura das vilosidades e descamação do epitélio. Essas lesões são mais pronunciadas na região terminal do íleo (SANTOS, 2014). No íleo distal e no ceco, *S. Typhimurium* invade células epiteliais, células M e células dendríticas usando o sistema de secreção do tipo III (T3SS) codificado por genes pertencentes à ilha de patogenicidade I de *Salmonella* (SPI-1), considerada um dos seus principais fatores de virulência (HARAGGA *et al.*, 2008). O mecanismo de entrada nas células do hospedeiro é caracterizado por rearranjo do citoesqueleto, que permite a migração bacteriana da superfície apical em direção à basal. O processo de invasão leva a produção de IL1- β e IL18, bem como das quimiocinas Cxcl1 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*”), Cxcl3 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 3*”) e Cxcl5 (“*chemokine (C-X-C motif) ligand 5*”), que recrutam fagócitos e iniciam a inflamação da mucosa intestinal (RAUPACH *et al.*, 2006). Uma vez que tenha atingido a submucosa, células dendríticas sub-epiteliais nas placas de Peyer e macrófagos residentes no GALT tornam-se alvos de *S. Typhimurium* (HOPKINS *et al.*, 2000). Algumas bactérias são capturadas e mortas por macrófagos residentes, porém, uma fração delas escapa da morte pelos fagócitos através da indução de piroptose mediada por caspase-1 que é induzida pelo sistema T3SS (HERSH *et al.*, 1999). Após a invasão do intestino, *Salmonella* espalha-se a partir do trato gastrointestinal pela corrente sanguínea para todo o corpo (MASTROENI & GRANT, 2011). Camundongos desafiados desenvolvem uma doença sistêmica, cuja cinética de infecção é, classicamente, dividida em quatro fases. A primeira se traduz pela rápida eliminação

de bactérias séricas. Ao longo da primeira semana após a infecção, *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocíticas. A segunda fase é caracterizada por uma rápida multiplicação bacteriana no fígado e baço atingindo taxas de crescimento de 0,5-1,5 Log UFC/dia (SANTOS, 2014), o que resulta em hepato e esplenomegalia, respectivamente. Após uma semana, se estabelece uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento de bactérias pelo sistema imune inato (através de PAMPs; *pathogen-associated molecular pattern*), por intermédio das células fagocíticas. Isso resulta na produção de várias citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1, IL6, IL12, IFN- γ) bem como na infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos nos locais de inflamação. O crescimento bacteriano nesses locais, principalmente no fígado e baço, leva a formação de abscessos contendo predominantemente leucócitos polimorfonucleares, lesões estas que acabam por adquirir forma de granulomas com área central de necrose (SANTOS, 2014). Nessas lesões, *S. Typhimurium* reside intracelularmente em macrófagos. Na quarta fase do processo infeccioso mecanismos efetores da imunidade adaptativa são gerados, e os títulos de anticorpos anti-*Salmonella* aumentam, além da produção de citocinas pró-inflamatórias com destaque para o IFN- γ (SALEZ & MALO, 2004; GRASSL & FINLAY, 2008). A morte dos camundongos é, provavelmente, resultado das lesões hepáticas desencadeadas pela produção de citocinas pró-inflamatórias e pela indução de síntese de óxido nítrico elicitada pelo lipídio A (KHAN *et al.*, 1998).

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os microrganismos e seus hospedeiros é a utilização de um modelo animal isento de germes. O termo gnotobiótico foi proposto para designar o campo de investigação interessado na criação de animais e plantas que estão livres de qualquer micro-organismo ou associados somente a espécies conhecidas introduzidas artificialmente (PLEASANTS, 1974).

A nomenclatura usada em gnotobiologia é limitada a termos que, por uso geral, é familiar e compreendida pela maioria dos pesquisadores da área. O indivíduo axênico ou isento de germes (IG) é definido como aquele que é livre de toda forma demonstrável de vida aparte da produzida pelo seu próprio protoplasma. A criação de tais indivíduos deve ser feita continuamente em isoladores. O indivíduo gnotobiótico (GN) ou gnotoxênico é aquele, inicialmente IG, que é associado intencionalmente somente com um ou mais tipos de micro-organismos previamente caracterizados. Esses animais devem ser também mantidos em isoladores. O holoxênico ou convencional (CV) é aquele que apresenta uma

microbiota complexa e desconhecida na sua totalidade e é criado sem precauções especiais desde o nascimento (NEUMANN *et al.*, 2017).

A tecnologia da gnotobiologia depende da habilidade de controlar a composição do ambiente no qual o organismo se desenvolve e funciona. O uso de animais gnotobióticos tem o potencial de fornecer novas e importantes informações sobre como uma bactéria afeta o desenvolvimento normal, o estabelecimento e a manutenção do sistema imune associado à mucosa e as funções célula-epitélio. Além do mais, a gnotobiologia pode ajudar no estudo sobre etiologias de doenças infecciosas, condições inflamatórias agudas e crônicas (SARTOR, 1995; CISALPINO *et al.*, 2017). Desde a década de 1950, quando a produção de ratos e camundongos isentos de germes foi obtida, o uso desse modelo animal nas ciências biomédicas vem aumentando. Entretanto, o estado isento de germes dá origem a uma variedade de aspectos fisiológicos, morfológicos e imunológicos diferentes daqueles encontrados na presença da microbiota normal, como por exemplo, as vilosidades do intestino delgado, que são maiores nas regiões do trato digestivo onde as densidades microbianas são normalmente maiores (FALK *et al.*, 1998). Além das diferenças na arquitetura geral do trato digestivo, os animais isentos de germes apresentam diferenças na motilidade intestinal, na diferenciação epitelial e na imunologia. Estudos em camundongos isentos de germes mostraram que a morfogênese de unidades de vilosidades da cripta pode ser complementada na ausência de microrganismos. Entretanto, comparações entre esses animais e os convencionais revelaram que componentes da microbiota podem diferenciar linhagens intestinais epiteliais durante a morfogênese (FALK *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado também que animais convencionais e isentos de germe apresentam um padrão de resposta inflamatória diferente frente a um estímulo estéril (esquemia e reperusão) ou infeccioso e que parte dessas diferenças é atribuída à capacidade inata dos animais isentos de germes produzirem quantidades maiores de IL-10, em comparação com os animais convencionais, o que lhes confere um *status* imunológico hiporesponvo ou antiinflamatório (FAGUNDES *et al.*, 2011; CISALPINO *et al.*, 2017).

Camundongos IG ou GN representam um sistema experimental simplificado para estudar o fenômeno de resistência à colonização e os mecanismos envolvidos no mesmo. Camundongos GN oferecem um potencial considerável como ferramenta no estudo da relação microbiota-hospedeiro porque, além de retratar um hospedeiro livre de germes ou modificado por micro-organismos conhecidos, permite o estudo da relação intermicrobiana dentro do organismo do hospedeiro e pode ser usado no estudo de algum fator

exógeno ou endógeno, quando as ações isoladas de tais fatores, afetadas ou não pela microbiota associada no hospedeiro, são de interesse. Esses modelos são importantes, pois o estudo das interações entre linhagens bacterianas *in vitro* nem sempre pode ser extrapolado para o que realmente ocorre *in vivo*, no tubo digestivo de animais (SMITH *et al.*, 2007; NEUMANN, *et al.*, 2017).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A salmonelose é um dos principais problemas de saúde pública e representa um custo significativo para a sociedade em muitos países, em especial naqueles subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com milhares de mortes registradas por todo o mundo. Os problemas relacionados à infecção por essa bactéria aumentaram significativamente, tanto em termos de incidência, quanto em termos de gravidade da doença. Desde o começo da década de 1990, linhagens de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos vêm aumentando e um dos grandes problemas atuais da medicina é a alta resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado.

Nesse contexto surgem os probióticos, que são definidos pela Organização Mundial da Saúde como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A grande vantagem da utilização desses agentes bioterapêuticos, em comparação com a antibioticoterapia clássica, é a não seleção de microrganismos resistentes. Os probióticos atuam reforçando as funções benéficas atribuídas a microbiota indígena intestinal, que são: resistência à colonização, contribuição nutricional e modulação da resposta imunológica do hospedeiro.

Dos gêneros microbianos pertencentes à microbiota indígena intestinal humana, os *Lactobacillus* se destacam por estarem presentes em grande quantidade (fazem parte da população sub-dominante com aproximadamente 10^8 UFC/g de conteúdo intestinal) e vários trabalhos publicados na literatura científica comprovam seus efeitos benéficos, sendo muitas linhagens já utilizadas como probióticos.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* estão presentes em muitos tipos de alimentos, como por exemplo, iogurtes, carnes e derivados, queijos, bebidas fermentadas, cereais, sorvetes, manteigas e, em especial, no kefir. Devido a sua longa história de uso em fermentação de alimentos e ausência de fatores de virulência, são geralmente reconhecidos como microrganismos seguros para o consumo (GRAS: *Generally Recognized As Safe*). O gênero *Lactobacillus* perfaz aproximadamente 90% da microbiota do kefir, o que faz deste alimento uma fonte em potencial de microrganismos probióticos.

Num trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (ZANIRATTI *et al.*, 2015), cinquenta e dois *Lactobacillus* foram isolados de grãos de kefir, identificados em nível de espécie e avaliados *in vitro* quanto ao potencial probiótico, sendo que cinco deles apresentaram características desejáveis para um microrganismo candidato a probiótico e merecem ser caracterizados em relação ao potencial probiótico em modelos *in vivo*, conforme é preconizado no Guia para Avaliação de Probióticos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2002). Ademais, esse trabalho foi o primeiro a isolar *L. diolivorans* dos grãos de kefir. Apesar de outros trabalhos o terem isolado de outras fontes e inclusive o terem testado quanto ao potencial probiótico *in vitro*, este é o primeiro trabalho no qual se avalia o efeito protetor em um modelo *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir cultivados em leite e em água açucarada em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar a taxa de sobrevivência e variação de peso em animais convencionais tratados ou não com *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir e desafiados oralmente com *S. enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium.

3.2.2 Avaliar os níveis populacionais de *L. diolivorans* 1Z e *S. enterica* sub. *enterica* sor. Typhimurium nas fezes de camundongos gnotobióticos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z e desafiados, ou não, com *S. enterica* sub. *enterica* sor. Typhimurium em diferentes tempos de infecção.

3.2.3 Avaliar antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium* após quatro e sete dias de monoassociação de camundongos gnotobióticos com *L. diolivorans* 1Z

3.2.4 Determinar a translocação de *L. diolivorans* 1Z e *S. enterica* sub. *enterica* sor. Typhimurium para fígado e baço de camundongos gnotobióticos em diferentes tempos após desafio oral com *S. enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium.

3.2.5 Determinar as lesões histopatológicas de fígado e íleo em camundongos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, ou não, e desafiados oralmente com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium.

3.2.6 Realizar medida de perímetro de lesões leves e graves no íleo e celularidade no fígado em camundongos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, ou não, e desafiados oralmente com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium.

3.2.7 Avaliar a expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias no intestino delgado e fígado de camundongos gnotobióticos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, ou não, e desafiados com *S. enterica* sub. *enterica* sor. Typhimurium, ou não.

3.2.8 Determinar a concentração de sIgA no fluido intestinal de camundongos gnotobióticos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, ou não, e desafiados com *S. enterica* sub. *enterica* sor. Typhimurium, ou não.

4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos de taxa de sobrevivência e variação de peso, foram utilizados camundongos convencionais machos da linhagem Balb/c, de 21-23 dias de idade obtidos do Biotério Central da UFMG. Para os demais experimentos, foram utilizados camundongos Suiços isentos de germes, de 21 a 23 dias de idade, machos e fêmeas, obtidos do Biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG), onde foram mantidos em isoladores de plástico flexível do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, Mc Henry, USA) e manuseados de acordo com os procedimentos descritos por PLEASANTS, 1974, adaptados às nossas condições (SILVA, 1986). Durante os experimentos, os camundongos foram mantidos em

microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands) no biotério do Departamento de Microbiologia e receberam ração sólida esterilizada (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água estéreis *ad libitum*. Todos os animais 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, e receberam a mesma ração (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com “A Diretriz Brasileira para o cuidado de animais para fins científicos e didáticos (DBCA)” do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA, 2015) e possuem a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo nº 96/2011 e protocolo nº257/2016 (CEUA).

4.2 Bactérias

Os *Lactobacillus* utilizados neste trabalho foram isolados de grãos de kefir de leite ou água açucarada obtidos de diferentes estados brasileiros. Tais microrganismos foram identificados por suas características morfotintórias (coloração de Gram), fisiológicas (teste de catalase) e moleculares (PCR ARDRA 16S-23S e sequenciamento do gene 16S do rRNA). Posteriormente, passaram por uma caracterização probiótica preliminar *in vitro* que avaliou a tolerância às condições adversas do TGI (suco gástrico e sais biliares artificiais), hidrofobicidade da superfície celular, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e capacidade antagonista contra bactérias patogênicas (ZANIRATTI *et al.*, 2015). Baseado nesses testes, foram selecionados e encaminhados para o teste de avaliação da sobrevivência e variação de peso, cinco potenciais candidatos a probióticos, a saber: *Lactobacillus diolivorans* 1Z, *L. perolens* 17P2, *L. satsumensis* 18P, *L. kefiranofaciens* 8U e *L. casei* 25P. O Quadro 1 mostra o meio de cultivo (leite ou água açucarada) dos grãos de kefir dos quais os microrganismos foram isolados assim como a origem.

Quadro 1: Origem e meio de cultivo dos grãos de kefir dos quais foram isolados os *Lactobacillus* com potencial probiótico selecionados para testes *in vivo*

Linhagem	Meio de cultivo dos grãos	Origem
<i>L. diolivorans</i> 1Z	Água açucarada	Belo Horizonte/MG
<i>L. perolens</i> 17P2	Água açucarada	Curitiba/PR

<i>L. satsumensis</i> 18P	Água açucarada	Curitiba/PR
<i>L. kefiranofaciens</i> 8U	Leite	Divinópolis/MG
<i>L. casei</i> 25P	Leite	Salvador/BA

A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14.028, utilizada nos ensaios com animais gnotobióticos e convencionais, é de origem humana e pertence à coleção de cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismo, sendo mantida a -80oC, em BHI acrescido de glicerol. Antes da administração aos animais, foi ativada por meio do cultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas a 37°C, sem agitação. O inóculo da bactéria patogênica, 10² unidades formadoras de colônias (UFC) por animal gnotobiótico e 10⁵ UFC por animal convencional, foi obtido através de diluições seriadas sucessivas da cultura ativa em solução salina (NaCl 0,9% p/v) estéril (SILVA *et al.*, 2004).

4.3 Preparo da suspensão microbiana administrada aos animais convencionais

Os *Lactobacillus* utilizados neste trabalho foram liofilizados em leite desnatado (*Skim milk*, Difco, Sparks, EUA) 10% p/v e mantido sob refrigeração até a utilização. A sobrevivência e capacidade de reativação *in vitro* após liofilização dos *Lactobacillus* selecionados para este trabalho já tinham sido comprovadas em trabalho anterior (ABATEMARCO, 2014). A viabilidade da cultura foi confirmada???como???antes da administração aos animais e, a partir daí, preparada a suspensão microbiana pela dispersão de um grama de produto liofilizado (contendo 10⁹ UFC/g) para cada 100mL de água filtrada esterilizada. Novas suspensões eram preparadas diariamente e administradas *ad libitum* para os animais, em substituição da água de beber. O volume ingerido foi averiguado em proveta graduada pela medição do que restou na mamadeira imediatamente antes da troca pela suspensão nova.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Experimentos com camundongos convencionais

O experimento com camundongos convencionais foi realizado para avaliar o efeito do tratamento com os diferentes *Lactobacillus* (Quadro 1, seção 4.2) no ganho de peso e na sobrevivência dos animais durante um desafio experimental com *S. Typhimurium*. Assim, os camundongos foram divididos em 6 grupos, dos quais cinco,

compostos por dez animais cada, receberam uma suspensão de cada um dos cinco *Lactobacillus* testados por 10 dias e um grupo (controle) recebeu água durante este período. Após dez dias de pré-tratamento, tanto os grupos que receberam *Lactobacillus* quanto o grupo controle, receberam por gavagem intra-gástrica, uma dose 10^5 UFC/0,1mL de *S. Typhimurium*, previamente ativada conforme item 4.2. O acompanhamento do peso e mortalidade foi realizado durante vinte e oito dias após o desafio com o patógeno. A suspensão de *Lactobacillus* foi administrada aos animais durante todo o tempo de experimentação.

4.4.2 Experimentos com camundongos gnotobióticos

Camundongos suíços isentos de germes receberam uma dose única de 10^8 UFC do *L. diolivorans* 1Z liofilizado (grupo Probiótico/*Salmonella* - PS) ou água estéril (grupo Controle *Salmonella* - CS) e, após sete dias de monoassociação, ambos os grupos foram desafiados com uma dose de 10^2 UFC de *S. Typhimurium*. Como controles foram utilizados um grupo de animais isentos de germes (grupo GF) e um grupo de animais monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, porém não desafiados com o patógeno (grupo Controle Probiótico - CP). Quatro animais de cada grupo foram sacrificados, seguindo as normas de experimentação animal preconizadas pelo CONCEA (2015), em diferentes tempos pós-infecção (dois, quatro, seis e oito dias) quando foram coletados baço, fígado, fezes, conteúdo intestinal e porções do intestino delgado, que foram devidamente preparados e acondicionados para a realização dos ensaios de detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias (RNAm), análises histopatológicas, enumeração de *S. Typhimurium* e dosagem de sIgA. Os animais isentos de germes foram mantidos no isolador do laboratório de Gnotobiologia durante todo o experimento e foram sacrificados junto com os grupos de animais com oito dias de infecção.

4.5 Avaliação da porcentagem de sobrevivência e acompanhamento da variação de peso após desafio oral com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium

Para acompanhamento da variação de peso, os animais dos grupos experimentais e controle foram pesados no dia do desafio com a bactéria patogênica (peso inicial) e, a partir daí, de dois em dois dias, até o 28º dia após a infecção (peso final) ou até a sobrevivência do último animal do grupo.

A sobrevivência de animais convencionais tratados ou não com os *Lactobacillus* e desafiados com *S. Typhimurium* foram observados até o 28º dia após a infecção. O resultado foi expresso como percentagem de animais que sobreviveram à infecção.

4.6 Determinação da capacidade de colonização do TGI de animais suíços isentos de germes por *L. diolivorans* 1Z

A capacidade de colonização do TGI de animais gnotobióticos foi determinada pela enumeração fecal de *L. diolivorans* 1Z em vinte e quatro animais selecionados aleatoriamente após quatro e sete dias de monoassociação. Os animais do grupo CP (Controle Probiótico) e PS (Probiótico/*Salmonella*) receberam uma dose única de 10^8 UFC da bactéria por via intragástrica e, nos dias indicados acima, as fezes foram colhidas por estimulação anal, pesadas e submetidas a diluições decimais em salina tamponada, esterilizada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar MRS (Accumedia), para enumeração bacteriana. A incubação foi feita em câmara de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Os resultados foram expressos como média do log do número de UFC por grama de fezes (MARTINS *et al.*, 2009).

4.7 Antagonismo contra *S. Typhimurium* *in vivo*

Antes do sacrifício nos dias dois, quatro, seis e oito pós-infecção, as fezes dos camundongos gnotobióticos monoassociados previamente com *L. diolivorans* 1Z (grupo PS) ou não (grupo CS) foram coletadas por estimulação anal em condições assépticas, pesadas, trituradas, homogeneizadas e diluídas separadamente. Dez microlitros das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas, em triplicata, pela técnica de microgota (MORTON, 2001; GALVÃO, PRUDÊNCIO & VANETTI, 2015), em ágar MacConkey (Accumedia) para enumeração de *Salmonella*.

4.8 Antagonismo contra *S. Typhimurium* *ex vivo*

O ensaio para detecção do efeito antagonista *ex vivo* da linhagem *L. diolivorans* 1Z foi realizado pela técnica de difusão em sobrecamada de ágar conforme descrito em

VASCONCELOS *et al.*, 2003. O teste foi realizado com amostras dos dias quatro e sete dias após monoassociação com o lactobacilo. Para tanto, as fezes dos camundongos monoassociados foram coletadas por estimulação anal e colocadas no centro de uma placa contendo ágar MRS (Accumedia) e, então, incubadas sob refrigeração a 4°C por 24 horas. Após este período, o conteúdo foi exposto ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro) por 30 minutos e as placas abertas para evaporação do clorofórmio residual. Uma sobrecamada de meio BHI semi-sólido (ágar bacteriológico 0,75% p/v), inoculado com a bactéria reveladora *S. Typhimurium* previamente ativada, foi vertida sobre as placas que, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 18 horas. Foi analisada a presença ou não de halo de inibição ao redor das fezes, sendo o diâmetro da zona inibitória determinado com um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, São Paulo, Brasil).

4.9 Determinação da translocação da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium ou *L. diolivorans* 1Z para fígado e baço

Nos dias dois, quatro, seis e oito após o desafio com *S. Typhimurium*, os camundongos gnotobióticos monoassociados previamente com *L. diolivorans* 1Z (grupo PS) ou não (grupo CS) foram sacrificados, sendo o baço e o fígado dissecados em condições assépticas, pesados, triturados, homogeneizados e diluídos separadamente. Dez microlitros das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram plaqueadas, em triplicata, por microgota (MORTON, 2001; GALVÃO, PRUDÊNCIO & VANETTI, 2015), em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA) para enumeração de *Salmonella*. Para os grupos que receberam *L. diolivorans* 1Z e não foram desafiados pela bactéria patogênica (grupo CP), as mesmas diluições foram plaqueadas em ágar MRS (Accumedia) para enumeração do lactobacilo. As placas de MacConkey foram incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose e as MRS por 48 horas em anaerobiose. Os resultados expressos em Log de UFC/g de órgão.

4.10 Análises histopatológicas e morfométricas do íleo e fígado

Amostras de fígado e íleo foram coletadas dos animais em cada tempo (dois, quatro, seis e oito dias pós-infecção). Os fígados foram coletados e fixados em formol tamponado 10% antes do processamento para inclusão em parafina. Os intestinos foram retirados, o íleo foi separado e aberto, imediatamente pré-fixado em solução de Bouin (Formol: Ácido Pícrico 1:4). O material foi processado de acordo com ARANTES &

NOGUEIRA (1997) de forma a formar rolos de intestino com a mucosa voltada para dentro (rocambolos) que foram processados para inclusão em parafina e dos quais obtivemos cortes histológicos de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Os cortes histológicos de fígado e íleo foram codificados e examinados sequencialmente por uma mesma patologista (Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.

4.10.1 Documentação fotográfica das imagens

As lâminas coradas em HE de fígado e íleo dos grupos Controle *Salmonella* e Probiótico *Salmonella* do oitavo dia de infecção foram fotografadas utilizando o Microscópio Óptico de luz direta Olympus BX51 equipado com o software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA). Para o fígado foram capturadas imagens das regiões mais afetadas pelo infiltrado inflamatório em objetiva de 20X e para o estudo histológico do íleo, regiões de intenso infiltrado inflamatório na muscular, invadindo criptas e com destruição das vilosidades foram classificados como lesões graves. Já regiões com pouco infiltrado inflamatório, edema de submucosa e pouca destruição de cripta foram classificados como lesões leves. As áreas foram documentadas em comparação com o perímetro total em objetiva de 4X. Todas as capturas foram feitas com resolução de 1392x1040 pixels e transferidas via câmera de vídeo colorida Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado a um computador.

4.10.2 Análises morfométricas

Foram avaliadas para o fígado a celularidade e para o íleo o perímetro intestinal lesado normalizado pelo perímetro total. A análise quantitativa de celularidade foi realizada através do programa KS300 (Zeiss, Jena, Germany) no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Para isso, lâminas coradas por HE foram automaticamente medidas quanto à área tecidual e quantificadas quanto ao número de núcleos celulares presentes por área através da digitalização das imagens pelo programa, sendo, portanto excluídas as áreas que não

continham tecido. O resultado foi expresso em quantidade de núcleos celulares por área analisada mm². O perímetro de área total por lesão grave e leve foi mensurado pelo programa Image J (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA – disponível online no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), sendo os dados normalizados e expresso em porcentagem por área afetada.

4.11 Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado

Dois, quatro, seis e oito dias após infecção com *S. Typhimurium*, camundongos gnotobióticos de todos os grupos (GF, CP, CS e PS) foram sacrificados para quantificação relativa dos níveis de mRNA dos genes IL10, TGF- β , IFN- γ e TNF- α (para íleo e fígado), IL1- β e iNOS (para fígado) de acordo com ACURCIO *et al.*, (2017), sendo utilizado como calibrador do experimento o grupo GF. Fragmentos do intestino delgado (proximal, medial e distal) e fígado medindo 1-2 cm foram coletados dos animais, imersos em RNAlater (Ambion, Austin, Texas, EUA) e mantidos em freezer -20 °C até o momento da extração do RNA total. O RNA total foi extraído usando Trizol (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA isolado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para avaliação da integridade e, posteriormente, quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific, Inc., Bremen, Alemanha). Apenas amostras de RNA total com mais de 200 μ g/mL e uma razão A260/A280 entre 1,7 e 2,1 foram usadas. O DNA genômico foi removido pela utilização de Turbo DNase I antes da transcrição reversa, realizada com o kit High capacity cDNA Reverse Transcription, ambos de acordo com instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O cDNA resultante foi amplificado por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando o kit SYBR Green PCR Master Mix 2X, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os iniciadores gene-específicos para as citocinas e os genes de referência Actb (β -actina) e Gapdh (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) utilizados como normalizadores para os dados de expressão são descritos por GIULIETTI *et al* (2001) e ACURCIO *et al.* (2017). Os níveis de expressão (Ct) do grupo controle dos animais isentos de germes (GF) foram usados como calibradores e a expressão relativa de mRNA para cada citocina foi obtida pelo método de quantificação relativa derivado (HELLEMANS *et al.*, 2007). Os

resultados foram expressos como a média e o desvio padrão da expressão relativa de mRNA para cada citocina normalizada pelo nível de expressão do gene de referência.

4.12 Detecção de sIgA total no conteúdo intestinal

Os níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) no conteúdo intestinal dos camundongos foram analisados pelo método de ELISA de captura, em triplicata, conforme descrito por MARTINS *et al.*, (2007). O intestino delgado dos camundongos foi removido por meio de cortes nas junções gastroduodenal e ileocecal, sendo o fluido intestinal coletado, pesado e diluído na proporção de 500 mg do conteúdo intestinal para 2,0 mL de salina fosfatada (pH 7,2), contendo 1% (v/v) de inibidor de protease (P-8340, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA). O material foi centrifugado a 2000 x g, por 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. Para dosagem das sIgA totais, as placas de ELISA foram revestidas no dia anterior à realização do ensaio, com anticorpo de captura anti-IgA (M-8769, Sigma, St Louis, MO, EUA). As amostras do fluido intestinal foram diluídas na proporção 1:100 em PBS-Tween e a detecção foi feita por anticorpos anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase (A-4789, Sigma, St Louis, MO, EUA). A absorbância foi determinada pela leitura de OD492nm em leitor de ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) e a concentração de sIgA da amostra foi calculada pela interpolação da curva de linearidade construída a partir de diluições seriadas progressivas (1:2; 1:4, 1:8; 1:16, etc) a partir da solução estoque de IgA purificado padrão (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EUA) na concentração de 1µg/mL. A leitura das absorbâncias das diluições do padrão foi realizada nas mesmas condições que a das amostras e os resultados expressos foram expressos como µg de sIgA/g de conteúdo intestinal.

4.13 Análises estatísticas

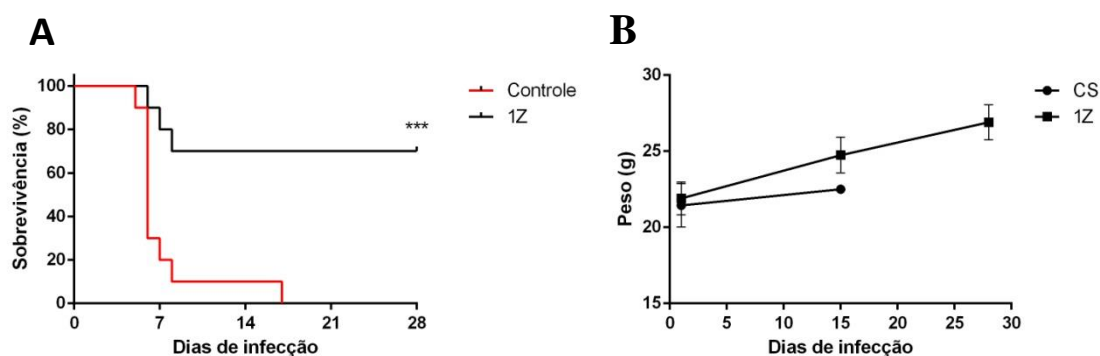
A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo consideradas como diferença estatística os valores com nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância

(ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, para comparação das médias, e as curvas de mortalidade foram analisadas pelo teste de Log-Rank Survival.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da porcentagem de sobrevivência e acompanhamento da variação de peso de camundongos convencionais após desafio oral com *S. Typhimurium*

A administração oral de *L. diolivorans* 1Z (P=0,0004), *L. perolens* 17P2 (P=0,003) e *L. casei* 25P (P=0,0004) nos camundongos foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais infectados. A mortalidade foi de 100% para o grupo controle, sendo que logo na primeira semana pós-infecção, uma mortalidade de 90% já tinha sido observada. Por outro lado, os animais do grupo que receberam *L. diolivorans* 1Z tiveram uma sobrevivência de 70% ao final dos 28 dias de experimento, não apresentando nenhuma morte após o oitavo dia de infecção. Os animais tratados com *L. casei* 25P também apresentaram alto percentual de sobrevivência (60%), não apresentando nenhuma morte após 10 dias de infecção. *L. satsumensis* 18P e *L. kefiranofaciens* 8U, apesar de terem sido selecionados como potenciais probióticos pelos testes *in vitro* realizados em trabalho prévio (ZANIRATTI *et al.*, 2015) não foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais após a infecção por *S. Typhimurium* (Figura 1-A).



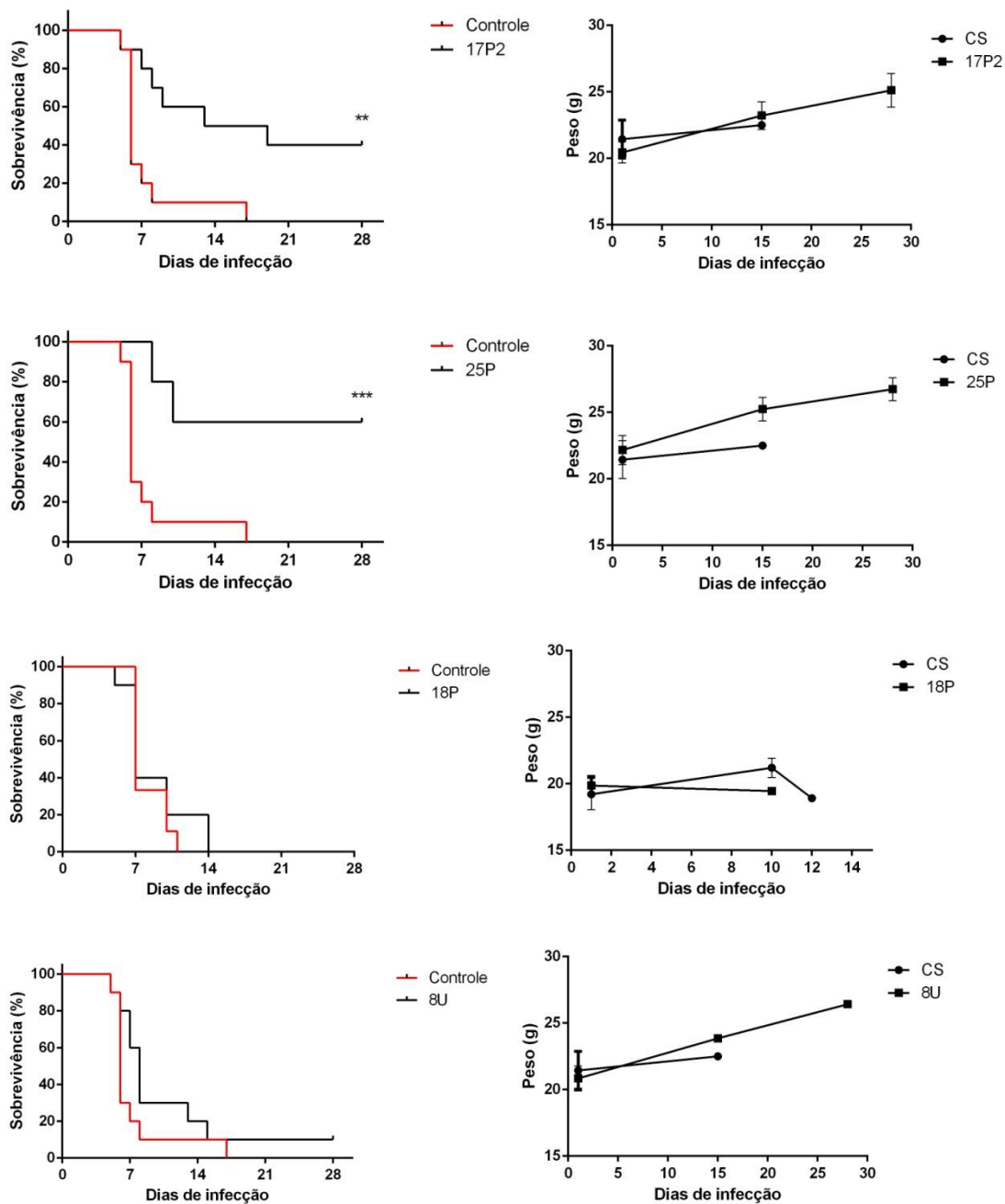


Figura 1. A- Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com os diferentes *Lactobacillus* após desafio com *S. Typhimurium*. 1Z: *L. diolivorans*; 17P2: *L. perolens*; 25P: *L. casei*; 18P: *L. satsumensis*; 8U: *L. kefiranofaciens* **B** – Análise comparativa entre o peso de camundongos não tratados (controle) e tratados com os diferentes *Lactobacillus* após desafio com *S. Typhimurium* * indica diferença estatística entre o grupo controle e o grupo experimental (P<0,05). N=10.

A Figura 1-B mostra a variação de peso dos animais convencionais BALB/c desafiados com *S. Typhimurium*, com ou sem tratamento com *Lactobacillus*, durante 28

dias após a infecção. Os resultados indicaram que os animais dos grupos tratados com os *Lactobacillus* que sobreviveram ao desafio continuaram ganhando peso, com exceção dos animais do grupo que recebeu *L. satsumensis* 18P, com destaque para o tratamento com *L. diolivorans* 1Z no qual se observou a maior média de peso após os 28 dias de infecção ($26,90 \pm 1,14$ g).

A indução de alta taxa de sobrevivência aliado ao ganho de peso em um modelo murino de infecção com *S. Typhimurium* evidencia o papel protetor do microrganismo candidato a probiótico frente a esse patógeno. O tratamento com *L. diolivorans* 1Z induziu a maior taxa de sobrevivência (70%) e maior ganho de peso em relação aos outros microrganismos testados. Por essa razão, *L. diolivorans* 1Z foi escolhido para dar continuidade nos ensaios *in vivo* de caracterização probiótica.

5.2 Determinação da capacidade de colonização do TGI de animais suíços isentos de germes por *L. diolivorans* 1Z

Neste ensaio, os níveis populacionais alcançados pelo lactobacilo nas fezes dos animais gnotobióticos apresentaram-se em níveis elevados, superiores a 10^7 UFC/g de conteúdo intestinal, quantidade preconizada por NICOLI & VIEIRA (2000) para obtenção de efeito protetor. As médias da contagem no 4º e 7º dia após a monoassociação foram, respectivamente, $9,52 \pm 0,03$ e $9,59 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC/g de fezes, indicando que o mesmo foi capaz de colonizar o trato digestivo de animais isentos de germes e de se manter em níveis elevados até o momento do desafio (Figura 2).

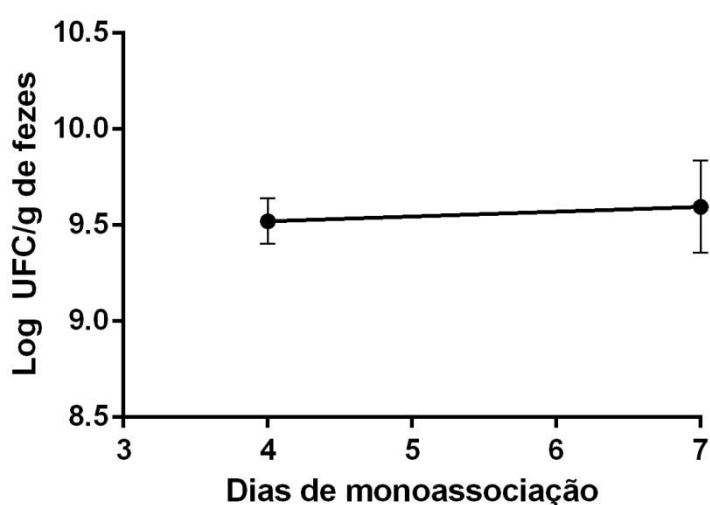


Figura 2. Níveis populacionais de *L. diolivorans* 1Z nas fezes de camundongos gnotobióticos 4 e 7 dias após a monoassociação. N=12.

5.3 Determinação da translocação de *L. diolivorans* 1Z para fígado e baço de animais suíços gnotobióticos

A Figura 3 mostra que *L. diolivorans* 1Z foi capaz de translocar do intestino dos animais monoassociados para fígado e baço alcançando valores em torno de $4,25 \pm 0,93$ e $5,58 \pm 0,35$ Log UFC/g de órgão, respectivamente, no 9º e no 11º dia de monoassociação. No entanto, a partir do 13º dia de monoassociação, os níveis populacionais de *L. diolivorans* 1Z nos referidos órgãos caíram para valores indetectáveis pelo método ($< 3,00$ Log UFC/g).

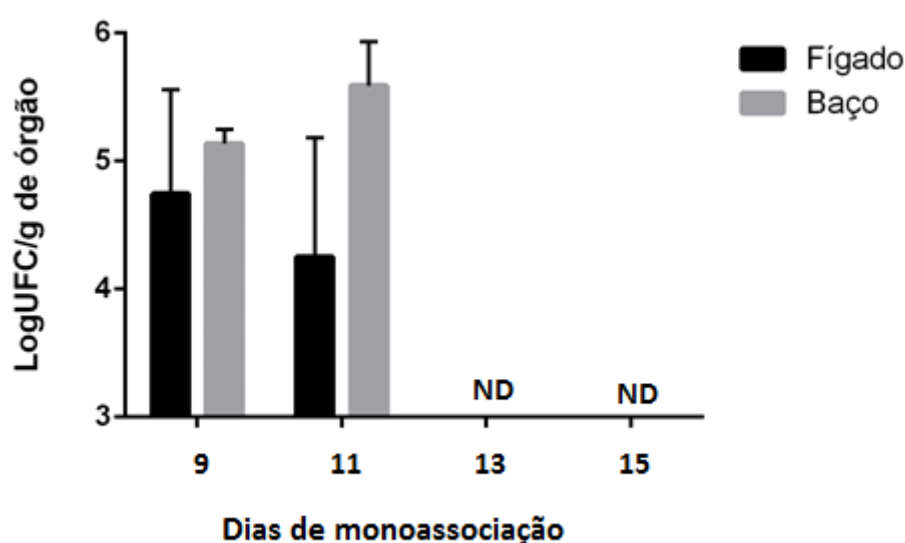


Figura 3. Determinação do número de células viáveis de *L. diolivorans* 1Z no fígado e baço de camundongos gnotobióticos após administração oral única de 10^8 UFC do microrganismo, sem desafio com *S. Typhimurium*. ND = Não Detectado. N=4.

5.4 Análise histopatológica de íleo e fígado de animais monoassociados com *L. diolivorans* 1Z – grupo CP

Os animais monoassociados (grupo controle probiótico - CP) não apresentaram alterações importantes no íleo, que apresentou vilosidades e parede intestinal com aspectos normais em todos os dias avaliados, como pode ser visto nas Figuras 4A, 4B, 4C e 4D.

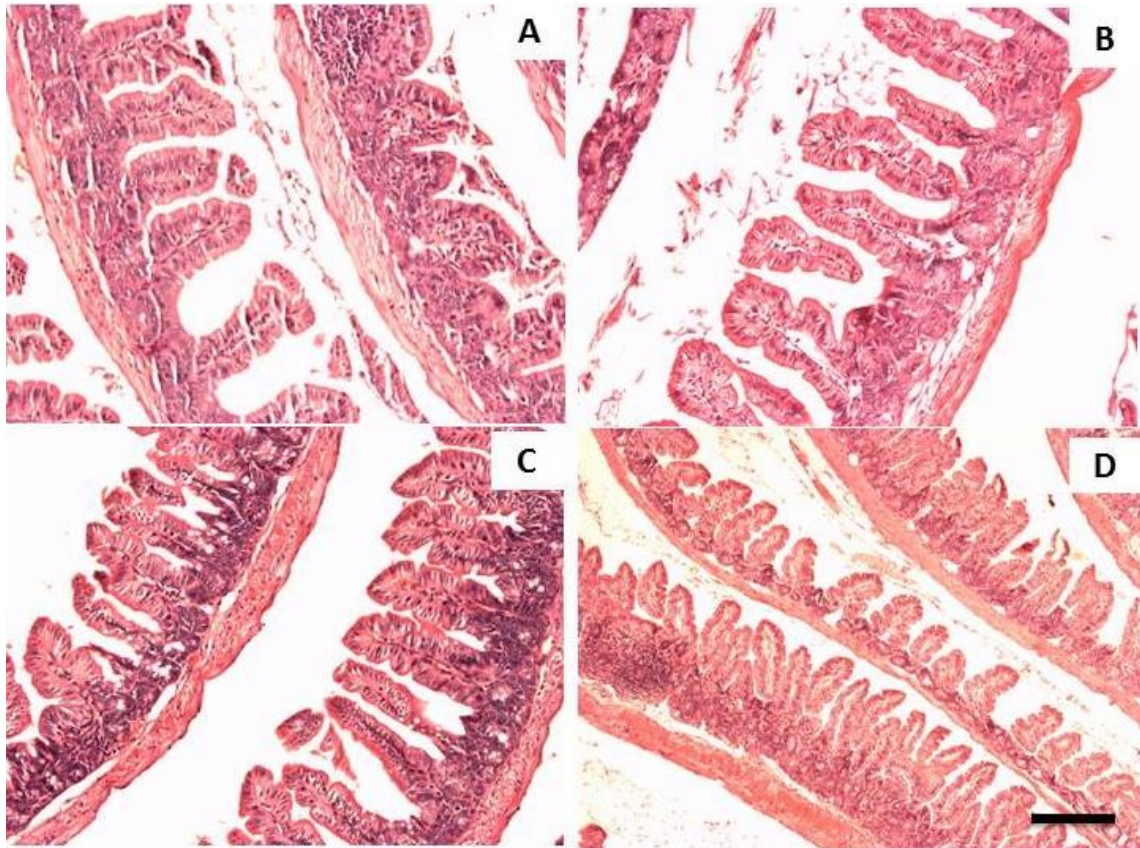


Figura 4. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados com *L. diolivorans* 1Z (Controle Probiótico). (A) 9, (B) 11, (C) 13 (D) 15 dias de monoassociação.. Aumento de 10x. Barra de escala representa 100µm. (N=4)

Os fígados dos animais monoassociados (grupo controle probiótico - CP) por sua vez, desde o nono dia apresentaram discretos focos periportais de infiltrado predominantemente mononuclear com rara presença de eosinófilos e discreta congestão de vasos intra-hepáticos (Fig. 5A). No 11º dia ainda foram evidenciados discretos focos de infiltrado periportais (Fig. 5B). Do 13º dia em diante o infiltrado inflamatório não foi facilmente visível e outros sinais de alterações hepáticas estavam ausentes (Fig. 5C e 5D).

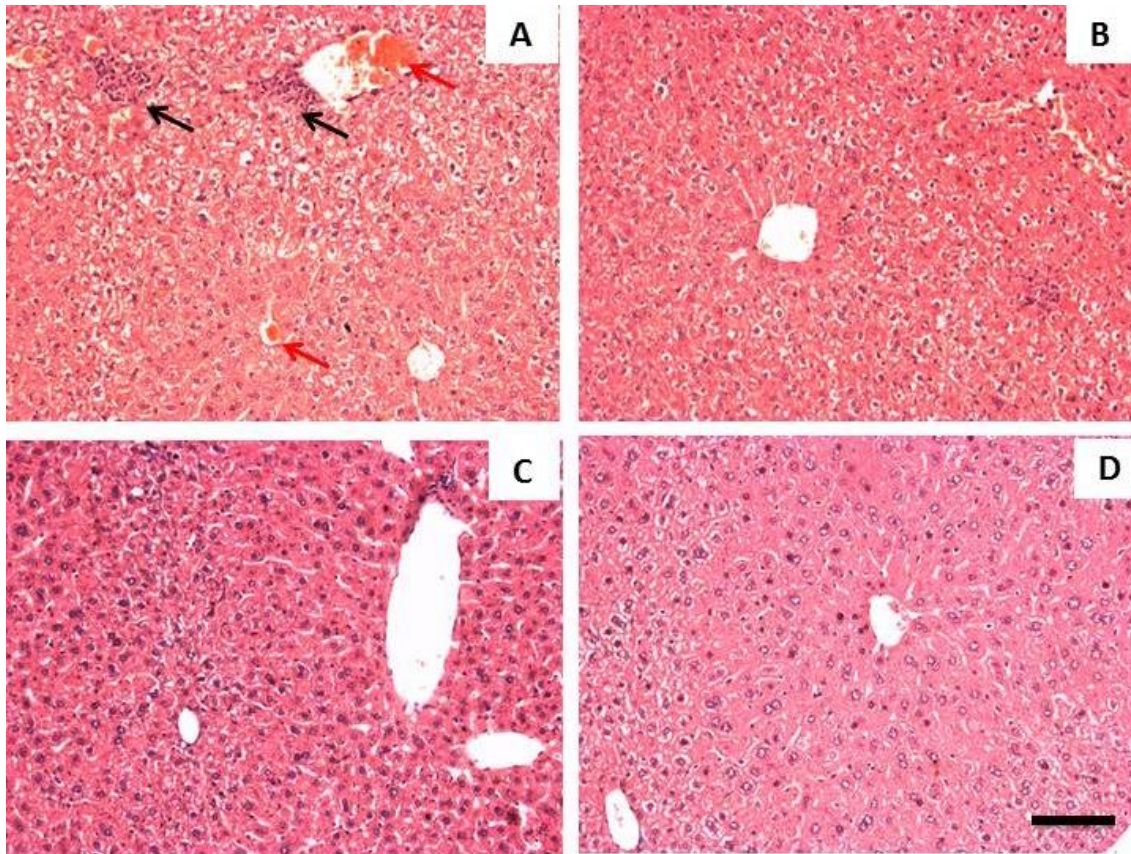


Figura 5. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados com *L. diolivorans* 1Z (Controle Probiótico). (A) 9, (B) 11, (C) 13 (D) 15 dias de monoassociação.. Aumento de 10x. Barra de escala representa 100 μ m. (N=4)

5.5 Detecção de sIgA no conteúdo intestinal dos animais do grupo CP

No 9º dia após a monoassociação com *Lactobacillus diolivorans* 1Z, os animais do grupo CP apresentaram títulos de sIgA no fluido intestinal maiores ($P=0,03$) que nos animais do grupo controle isento de germe (grupo GF). No 15º dia após a monoassociação não houve diferença estatística na concentração de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo CP em relação ao grupo GF ($P>0,05$), como mostra a Figura 6.

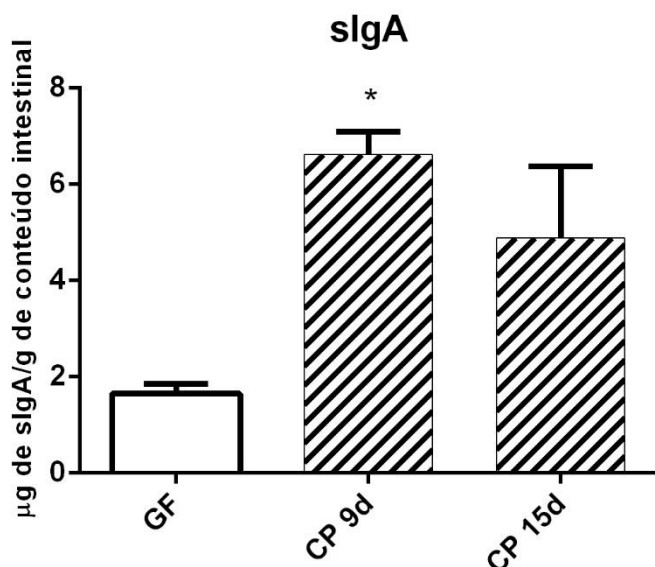


Figura 6. Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no fluido intestinal de camundongos suíços monoassociados com *Lactobacillus diolivorans* 1Z.: GF: grupo controle *germ-free*. CP: animais monoassociados com *Lactobacillus diolivorans* 1Z. 9d e 15d representa o tempo, em dias, em que os animais foram sacrificados após a monoassociação. *indica diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). N=4.

5.6 Avaliação do efeito protetor de *L. diolivorans* 1Z frente à infecção por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium em camundongos suíços gnotobióticos

5.6.1 Antagonismo contra *S. Typhimurium* *in vivo*

A contagem de *S. Typhimurium* nas fezes caiu ao longo do tempo de infecção no grupo previamente monoassociado com *L. diolivorans* 1Z (grupo PS), enquanto que no grupo não tratado (grupo CS) o número de *Salmonella* permaneceu alto (acima de 9 log UFC/g de fezes) e estável ao longo dos dias pós-infecção (Figura 7). Comparando os grupos PS e CS em cada tempo experimental, obtivemos diferenças estatística no quarto ($P=0,006$), sexto e oitavo dia ($P=0,01$) após o desafio com *S. Typhimurium*.

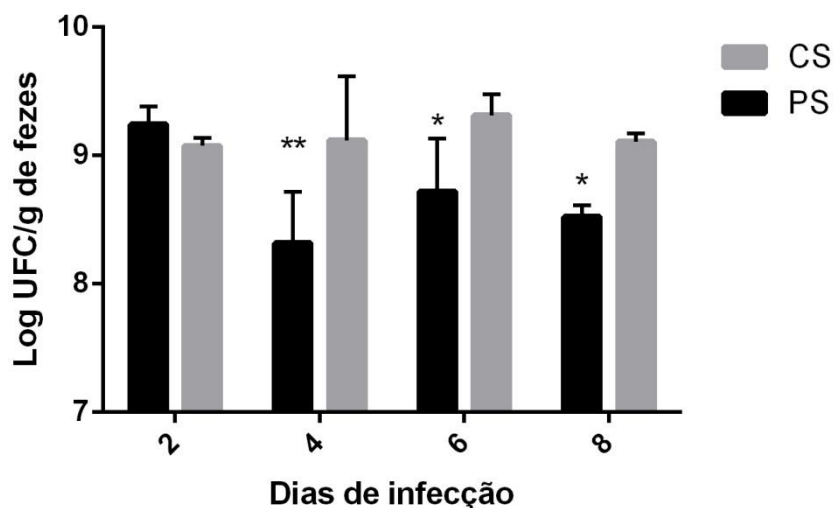


Figura 7. Número células viáveis de *S. Typhimurium* nas fezes de animais gnotobióticos previamente monoassociados (grupo PS) ou não (grupo CS) com *L. diolivorans* 1Z, dois, quatro, seis e oito dias após a infecção pela bactéria patogênica. * indica diferença estatística entre os grupos em cada tempo de infecção ($P < 0,05$). $N=4$.

5.6.2 Antagonismo contra *S. Typhimurium* *ex vivo*

Não foram observados halos de inibição de crescimento ao redor das fezes obtidas do grupo de animais monoassociados com *L. diolivorans* 1Z, apesar de ter sido observada inibição de crescimento de *S. Typhimurium* *in vitro* (ZANIRATTI *et al.*, 2015).

5.6.3 Determinação da translocação de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. *Typhimurium* para fígado e baço

A Figura 8A mostra uma redução progressiva do número de *S. Typhimurium* no fígado dos animais previamente monoassociados com *L. diolivorans* 1Z (grupo PS) ao longo do tempo de infecção, alcançando níveis indetectáveis pelo método ($< 3,00$ Log UFC/g) nos dias seis e oito. Por outro lado, houve um aumento progressivo ao longo dos dias após a infecção no número da bactéria patogênica no grupo não tratado (grupo CS). Comparando os grupos PS e CS em cada tempo experimental, obtivemos diferenças estatística ($P=0,0009$) no sexto e oitavo após o desafio com *S. Typhimurium*.

A Figura 8B mostra um aumento progressivo do número de *S. Typhimurium* no baço dos animais não tratados com *L. diolivorans* 1Z (grupo CS) ao longo do tempo de infecção, enquanto que no grupo previamente monoassociado (grupo PS) há uma

estabilização na contagem de *Salmonella* a partir do sexto dia após a infecção. Contudo, os dados não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

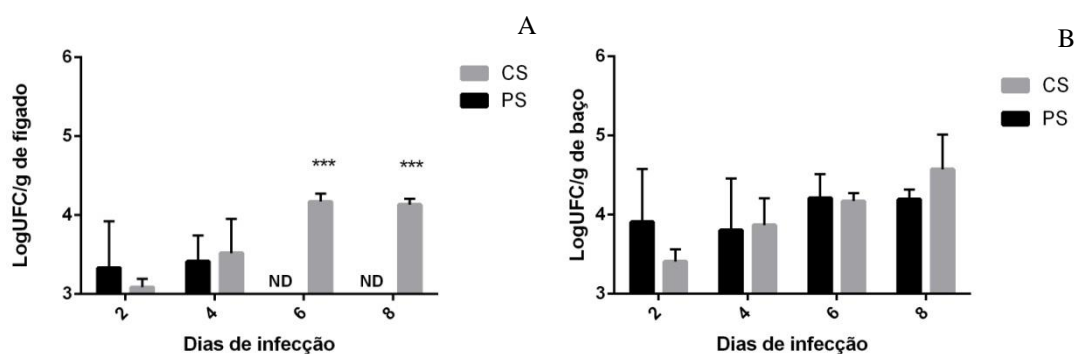


Figura 8. Translocação de *S. Typhimurium* para o fígado (A) e baço (B) de camundongos gnotobióticos tratados (grupo PS) ou não (grupo CS) com *L. diolivorans* 1Z. * indica diferença estatística entre o grupo controle e o grupo experimental ($P < 0,05$). As barras verticais indicam o desvio-padrão da média. ND = Não Detectado. N=4.

5.6.4 Análises histopatológicas do íleo e fígado – grupos CS e PS

Os animais infectados com *S. Typhimurium* (grupo CS) apresentaram tanto no fígado quanto no íleo, alterações que foram se intensificando a partir do dia dois após a infecção. No íleo, aos dois dias, as alterações foram predominantemente de edema discreto da lâmina própria da mucosa, cujo epitélio apresentou vacuolização, descamação do topo das vilosidades e presença de alguns linfócitos intraepiteliais. Houve ainda alguns focos de infiltrado por neutrófilos e áreas de rebaixamento vilositário com discreto aumento da celularidade da lâmina própria. Estas lesões progrediram em intensidade e distribuição com focos de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e necrose epitelial, acompanhado de alargamento da lâmina própria do topo das vilosidades (dilatação linfática) (Fig. 9A). Os aspectos nos dias 4 e 6 foram progressivos com formação de típicas placas de necrose da submucosa e intensas alterações vilositárias, que refletem a friabilidade do tecido (Fig.9C e 10A). No dia 8, entretanto, notou-se lesões mais discretas, com sinais de regeneração epitelial indicando que a história natural da infecção tendeu a se resolver no intestino a partir deste tempo (Fig.10C).

Os animais dos grupos tratados com probiótico e infectados com *Salmonella* (grupo PS) aos dois dias apresentaram alterações muito discretas da mucosa ileal, com poucos focos de infiltrado superficiais e áreas de edema. Alguns animais não apresentaram alterações dignas de nota (Fig. 9B). Nos dias subsequentes, observamos

preservação do epitélio e, a despeito de pequenos focos da lâmina própria com aumento da celularidade, a arquitetura estava bem preservada, indicando certo grau de proteção da mucosa comparativamente ao grupo CS no mesmo tempo (Fig. 9C e 9D; 10A e 10B; 10C e 10D). Aos quatro dias, alguns animais não apresentaram alterações significativas da mucosa e os demais apresentaram arquitetura normal apesar de pequenas placas de necrose e infiltrados na submucosa que estava com superfície epitelial preservada (Fig. 9D). Aos oito dias, o íleo apresentou aspecto preservado (Fig. 10D).

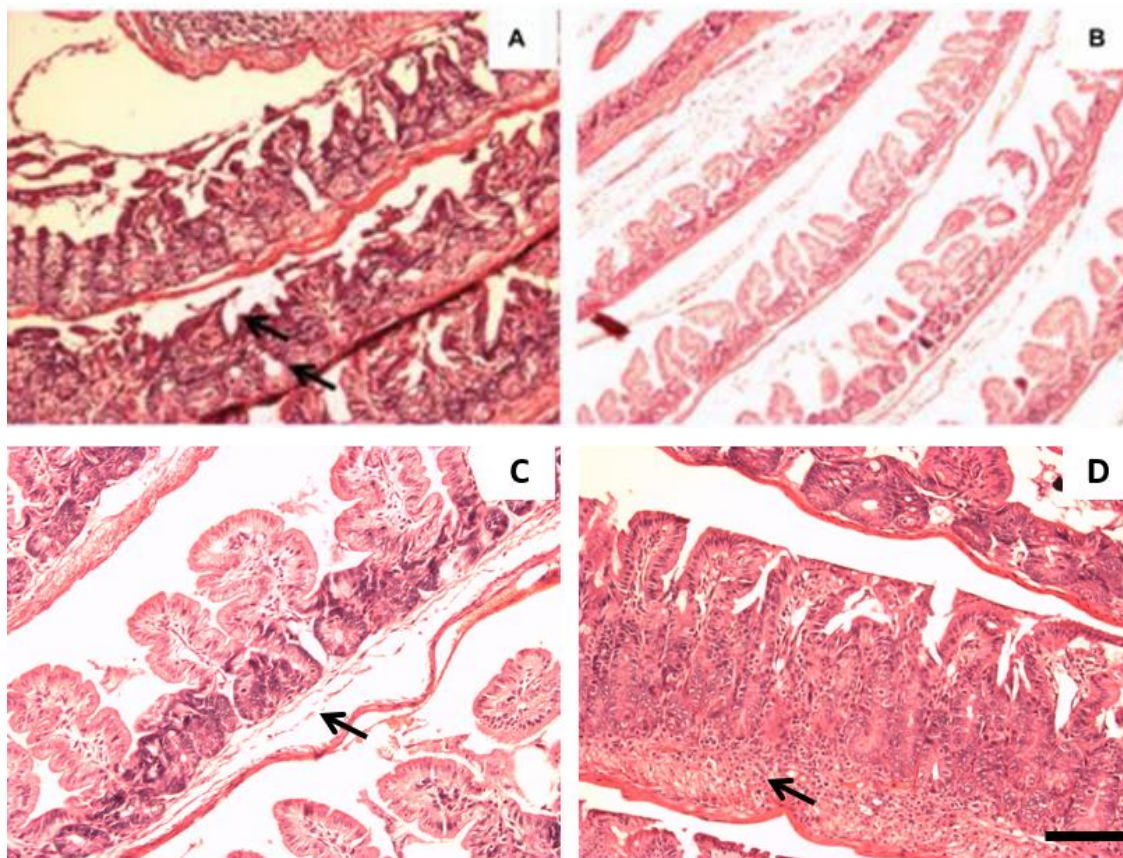


Figura 9. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos monoassociados (PS) ou não (CS) com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium*. (A) CS 2d, (B) PS 2d, (C) CS 4d (D) PS 4d. CS: grupo Controle *Salmonella*; PS: grupo Probiótico desafiado com *Salmonella*; 2d: animais sacrificados com 2 dias de infecção; 4d: animais sacrificados com 4 dias de infecção. Aumento de 10x. Barra de escala representa 100 μ m. (N=4). Setas indicam áreas de rebaixamento vilositário com discreto aumento da celularidade da lâmina própria (9A); foco de infiltrado inflamatório (9B); área de edema (9C); pequenas placas de necrose e infiltrado na submucosa (9D).

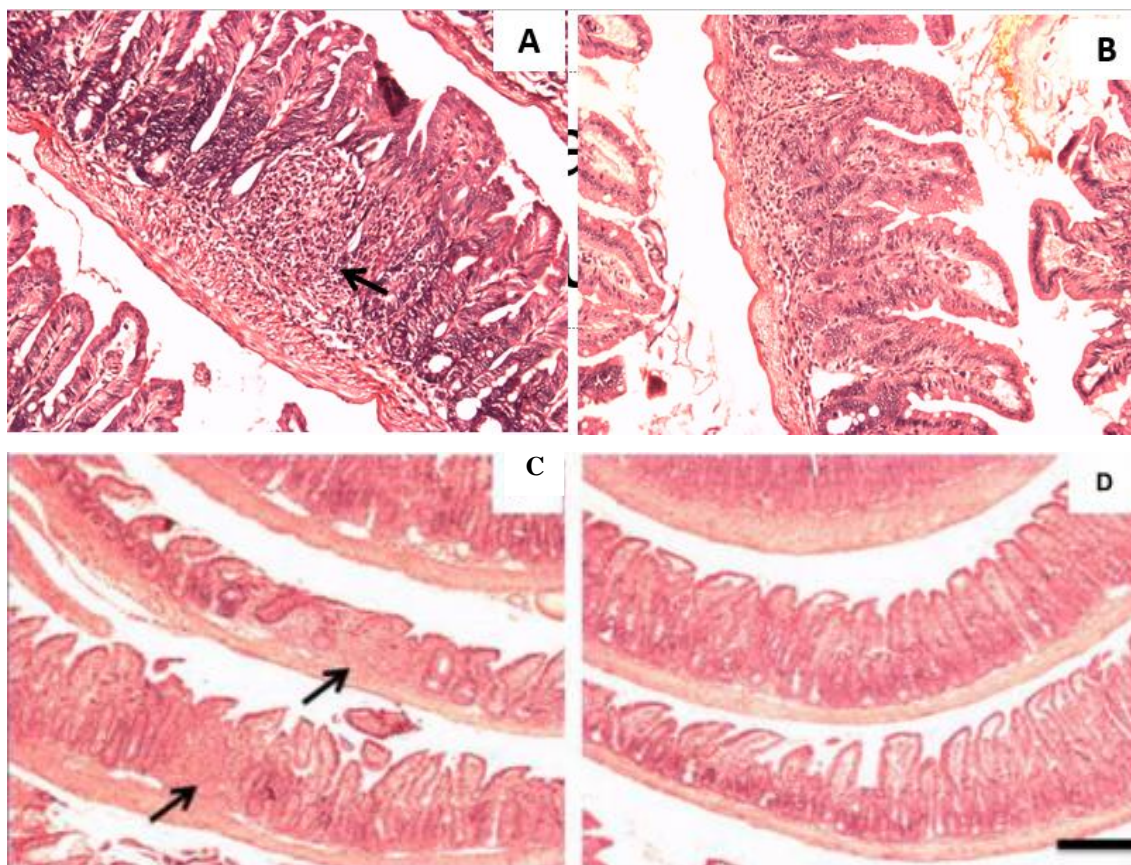


Figura 10. Fotomicrografia de íleo, corada em HE, de camundongos monoassociados (PS) ou não (CS) com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium*. (A) CS 6d, (B) PS 6d, (C) CS 8d (D) PS 8d. Legenda: CS: grupo Controle *Salmonella*; PS: grupo Probiótico desafiado com *Salmonella*; 6d: animais sacrificados com 6 dias de infecção; 8d: animais sacrificados com 8 dias de infecção. Aumento de 10x. Barra de escala representa 100µm. (N=4). As setas indicam áreas de infiltrado inflamatório.

Os fígados dos animais não monoassociados com *L. diolivorans* 1Z e infectados com *Salmonella* (CS) também apresentaram alterações progressivas ao longo do tempo de infecção, com lesões que se iniciaram no dia dois, com infiltrado mono e polimorfonuclear restrito a focos pequenos e com relativa preservação do parênquima (Fig. 11A). Estes achados tornaram-se progressivamente mais intensos e difusos nos fígados de animais sacrificados aos quatro, seis e oito dias, quando grandes áreas de necrose acompanharam os múltiplos focos de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (Fig. 11C, 12A e 12C).

No fígado, os animais dos grupos monoassociados com *L. diolivorans* 1Z e infectados com *Salmonella* (PS) apresentaram aos dois dias (Fig. 10B) aspecto muito semelhante ao dos animais tratados com probiótico sem infecção (grupo CP) (Fig. 4A). Foram observados raros focos de infiltrado predominantemente mononuclear e alguns

dos animais não apresentaram alterações. No dia quatro, os animais do grupo PS (Fig. 11D) apresentaram infiltrado polimorfonuclear menor que nos animais do grupo CS (Fig. 11C) com discretas alterações degenerativas do parênquima (áreas de necrose). No sexto dia, persistiram focos inflamatórios nos fígados dos animais do grupo PS (Fig. 12B) bem menores que no tempo anterior e em relação ao grupo CS (Fig.12A), sem alterações degenerativas do parênquima indicando uma recuperação mais precoce das lesões hepáticas atribuídas à infecção. A partir do sexto dia, observou-se discreto aumento da celularidade e do volume das células de Küpffer. Aos oito dias, o fígado dos animais do grupo PS (Fig. 12D) ainda apresentaram focos bem delimitados de infiltrado predominantemente mononuclear e parênquima hepático bem preservado.

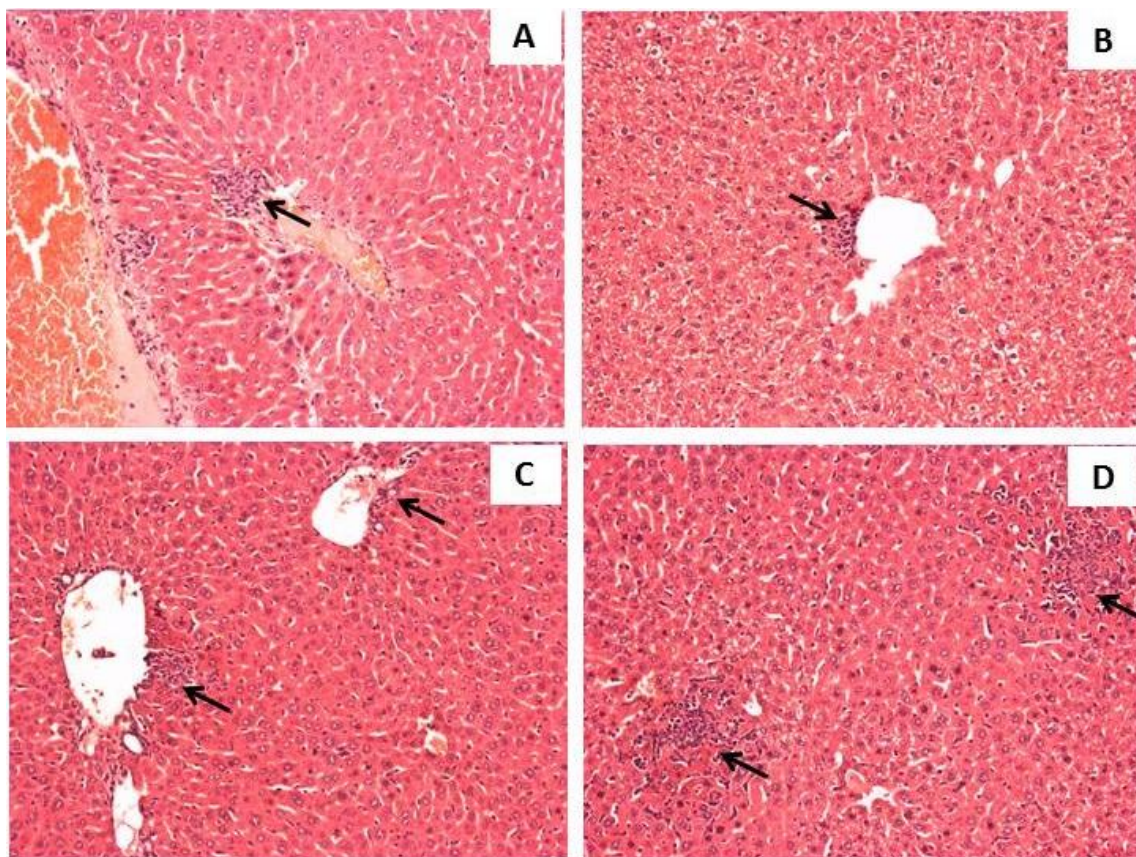


Figura 11. Fotomicrografia de fígado, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados (PS) ou não (CS) com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium* . (A) CS 2d, (B) PS 2d, (C) CS 4d, (D) PS 4d. Legenda: CS: Controle *Salmonella*; PS: Probiótico desafiado com *Salmonella*; 2d: animais sacrificados com 2 dias de infecção; 4d: animais sacrificados com 4 dias de infecção Aumento de 10x. Barra de escala representa 100µm (N=4). As setas indicam áreas de infiltrado inflamatório.

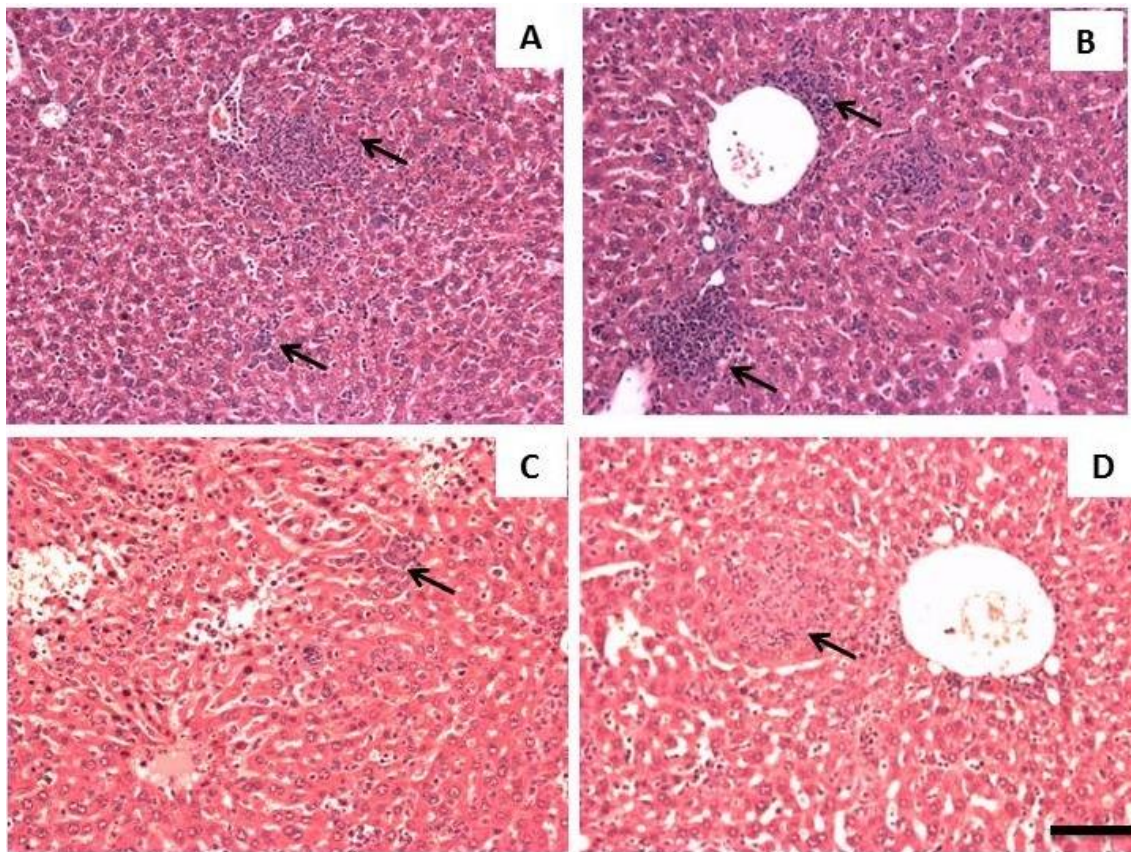


Figura 12. Fotomicrografia de fígado, corada em HE, de camundongos suíços monoassociados (PS) ou não (CS) com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium*. (A) CS 6d, (B) PS 6d, (C) CS 8d, (D) PS 8d. CS: Controle *Salmonella*; PS: Probiótico desafiado com *Salmonella*; 6d: animais sacrificados com 6 dias de infecção; 8d: animais sacrificados com 8 dias de infecção. Aumento de 10x. Barra de escala representa 100 μ m (N=4). As setas indicam áreas de infiltrado inflamatório.

5.6.5 Análises Morfométricas do íleo e fígado – grupos CS e PS

5.6.5.1 Perímetros de lesões graves e leves no íleo

Não foram obtidas diferenças no perímetro de lesões leves no íleo entre os animais dos grupos CS e PS ($P > 0,05$) (Figura 13A). Por outro lado, as lesões graves no íleo foram menores nos animais do grupo tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium* (PS) em comparação ao grupo controle *Salmonella* (CS) ($P = 0,02$) (Figura 13B).

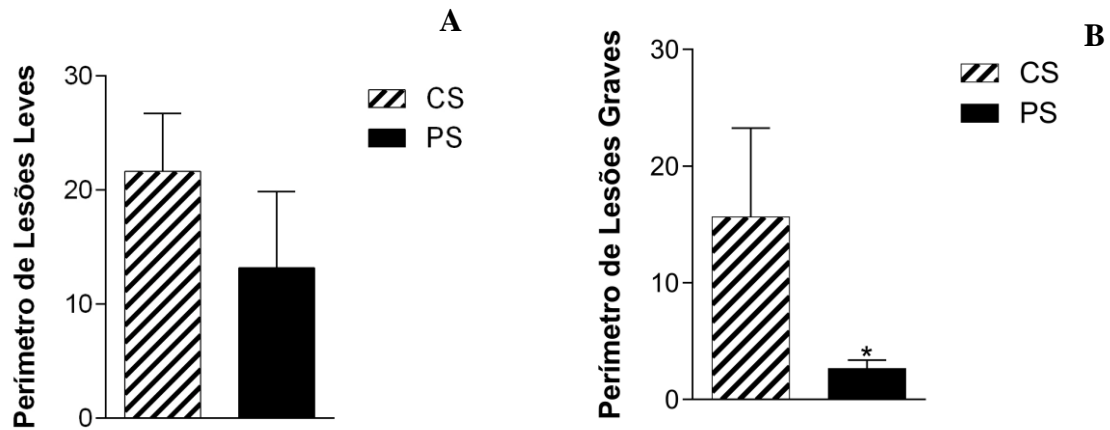


Figura 13. Perímetro de lesões leves (A) e graves (B) atribuídas à salmonelose no íleo dos animais do grupo controle *Salmonella* (CS) e dos animais tratados com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium* com oito dias de infecção. *indica diferença estatística entre os grupos CS e PS ($P < 0,05$). $N = 4$.

5.6.5.2 Celularidade no fígado

Não houve diferença estatística na celularidade (número de núcleos celulares/ mm^2) hepática entre os animais do grupo PS e CS ($P > 0,05$) (Figura 14) indicando que o tratamento com *L. diolivorans* 1Z não foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório atribuído à infecção nos fígados dos animais do grupo PS em relação ao grupo CS.

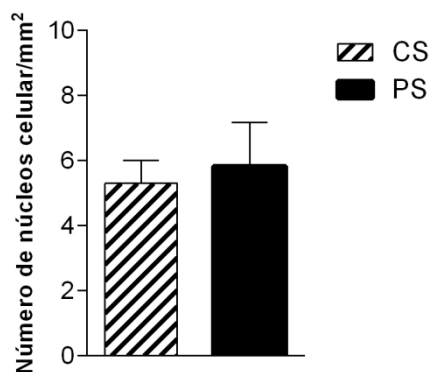


Figura 14. Número de núcleos celular/ mm^2 no fígado dos animais do grupo controle *Salmonella* (CS) e dos animais tratados com *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium* com oito dias de infecção. $N = 4$.

5.6.6 Expressão relativa de genes codificadores de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo e fígado

No íleo, houve um aumento progressivo na expressão das citocinas IFN- γ e TNF- α no grupo CS ao longo do tempo de infecção. Comparando com este grupo, um aumento menor dessas mesmas citocinas ocorreu no grupo PS, com diferença estatística a partir do segundo dia de infecção para IFN- γ ($P < 0,0001$) e no oitavo dia para TNF- α ($P < 0,0001$). Para as citocinas anti-inflamatórias TGF- β e TNF- α não houve diferença estatística entre os grupos ao longo dos dias após a infecção ($P > 0,05$) (Figura 15).

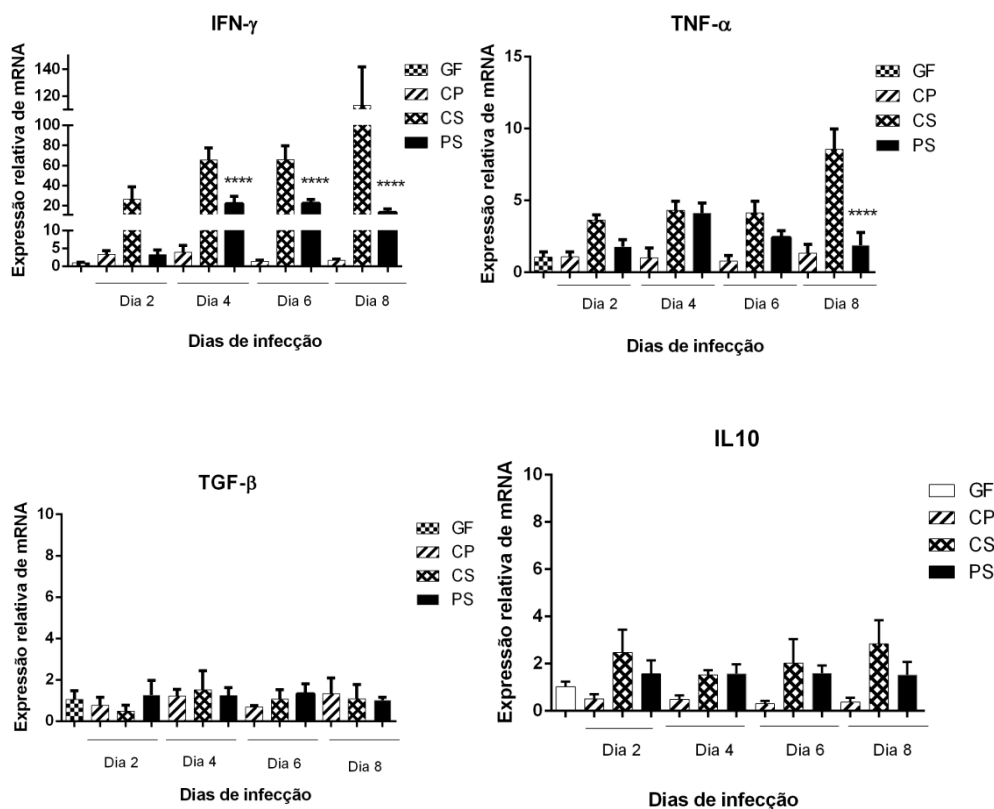
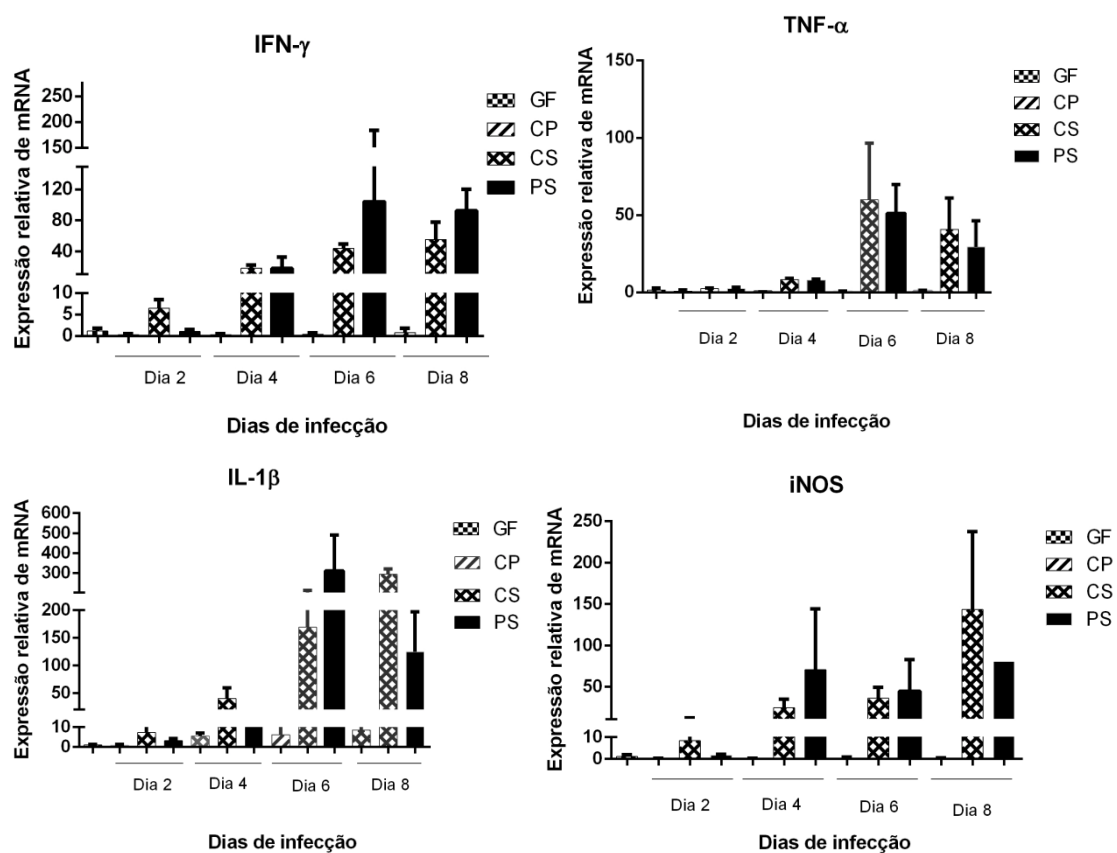


Figura 15. Expressão relativa das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL10 no intestino delgado de camundongos monoassociados, ou não, com *L. diolivorans* 1Z e infectados, ou não, com *S. Typhimurium*. Legenda: GF: grupo *germ-free*; CP: monoassociados com *L. diolivorans* 1Z; CS: controle *S. Typhimurium*; PS: tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiado com *S. Typhimurium*. * indica diferença estatística entre o grupo CS e PS no mesmo tempo após a infecção ($P < 0,05$). N=4.

No fígado, houve um aumento progressivo da expressão das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β), anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10) e da enzima iNOS nos grupos PS e CS ao longo dos dias após a infecção. Comparando a média dos valores relativos das citocinas entre esses dois grupos, no oitavo dia após a infecção foi observada uma tendência a diminuição da expressão das citocinas TNF- α ($40,76 \pm 10,14$ contra $29,59 \pm 8,99$) ($P=0,19$) e IL-1 β ($293,00 \pm 13,71$ contra $124,80 \pm 36,13$) ($P=0,43$) e de iNOS ($143,30 \pm 47,17$ contra $80,82 \pm 6,60$) ($0,84$) e aumento de IL-10 ($11,23 \pm 1,34$ contra $19,27 \pm 3,42$) ($0,84$) e TGF- β ($0,29 \pm 0,05$ contra $1,51 \pm 0,56$) ($0,39$) no grupo PS, quando comparado ao grupo CS (Figura 16).



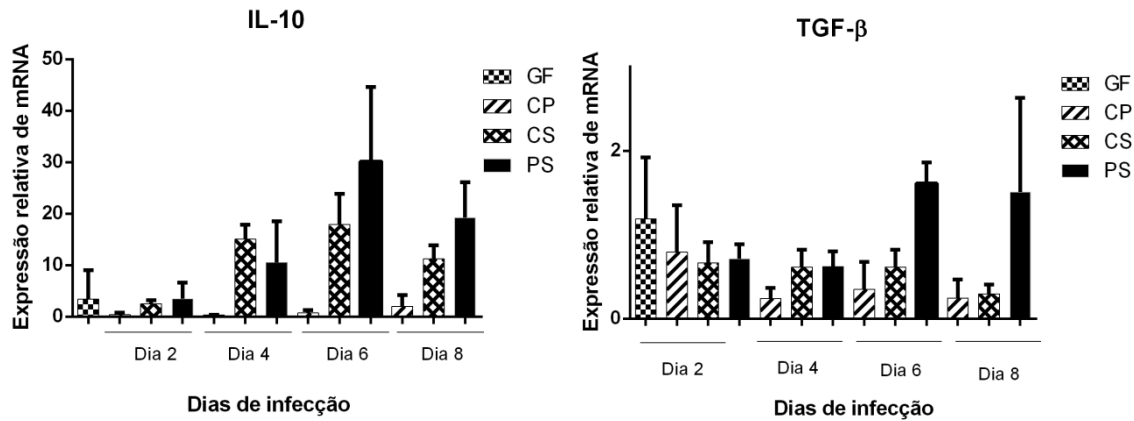


Figura 16. Expressão relativa das citocinas $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$, $IL1-\beta$ e $IL10$ e da enzima $iNOS$ no fígado de camundongos monoassociados, ou não, com *L. diolivorans* 1Z e infectados, ou não, com *S. Typhimurium*. Legenda: GF: grupo *germ-free*; CP: monoassociados com *L. diolivorans* 1Z; CS: controle *S. Typhimurium*; PS: tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiado com *S. Typhimurium* (N=4).

5.6.7 Detecção de sIgA no fluido intestinal dos animais dos grupos PS e CS

Os títulos de sIgA no fluido intestinal dos animais tratados com *Lactobacillus diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium* (grupo PS), foram maiores ($P < 0,05$) comparativamente ao grupo controle *Salmonella* (CS) no oitavo dia após a infecção. No segundo dia após a infecção, no entanto, não foi detectada diferença estatística nos títulos de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo PS em relação ao grupo CS ($P = 0,02$), como mostra a Figura 17.

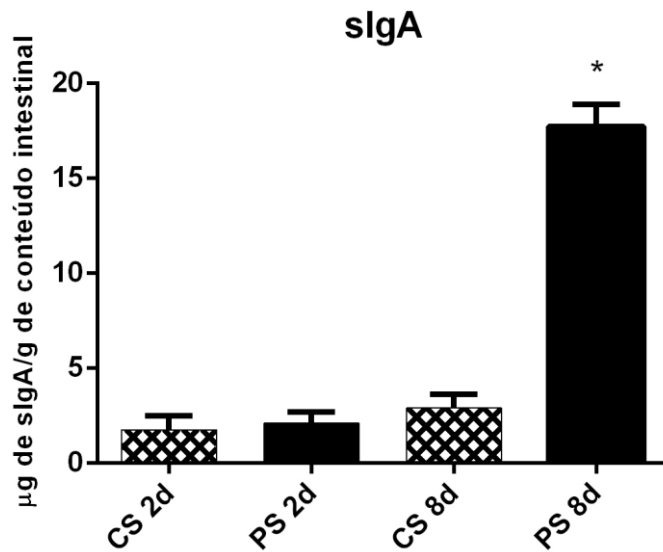


Figura 17. Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no fluido intestinal de camundongos suíços monoassociados com *Lactobacillus diolivorans* 1Z (ou não) e desafiados com *S. Typhimurium*. PS: grupo de animais monoassociados com *L. diolivorans* 1Z e desafiado com *S. Typhimurium*. CS: animais isentos de germe desafiados com *S. Typhimurium*. 2d e 8d representam o tempo, em dias, em que os animais foram sacrificados após o desafio. *indica diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). N=4.

6. DISCUSSÃO

A capacidade de colonização do TGI de camundongos gnotobióticos foi avaliada por meio da contagem de células viáveis de *L. diolivorans* 1Z nas fezes dos animais após administração única de 10^8 UFC/ml do microrganismo liofilizado (conforme item 4.1). *L. diolivorans* 1Z foi capaz de colonizar e se manter em nível populacional acima de 10^9 UFC/g no TGI de animais gnotobióticos nos tempos avaliados (Figura 2). Até o momento, os estudos têm demonstrado que níveis populacionais elevados, mesmo que transitórios, são importantes para o desenvolvimento dos mecanismos de ação dos probióticos e, consequentemente, a obtenção dos seus potenciais efeitos benéficos. Segundo a OMS, a resistência às condições estressantes do trato gastrointestinal é recomendada para microrganismos probióticos. Apesar das diferenças fisiológicas entre o trato digestório de camundongos e humanos, esse modelo animal ainda é bastante aceito pela comunidade científica na triagem de linhagens probióticas. Os resultados encontrados para *L. diolivorans* 1Z é similar ao encontrado por outros trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório, que também mostraram que microrganismos candidatos a probióticos são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo de camundongos, resistindo às

condições de estresse, alcançando níveis populacionais altos e estáveis (SILVA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; STEINBERG *et al.*, 2014; ALVIM *et al.*, 2016).

Durante a seleção e caracterização de novas linhagens probióticas, a questão da segurança de sua administração para o hospedeiro deve ser cuidadosamente avaliada. As bactérias do ácido láctico (BAL), em especial os *Lactobacillus*, têm uma longa história de uso seguro por seres humanos e animais e, por isso, passaram a possuir o status GRAS. Linhagens probióticas, como *L. acidophilus*, tem sido utilizadas com segurança por mais de 80 anos (SALMINEN *et al.*, 1998a). Porém, não deve ser assumido que uma linhagem recém-isolada, com algum potencial probiótico, é inócua apenas pelo histórico de segurança adquirido pelas linhagens probióticas tradicionais (SALMINEN *et al.*, 1998b). Portanto, para avaliar a segurança de *L. diolivorans* 1Z, foram realizados ensaios de translocação para fígado e baço, análises histopatológicas de fígado e íleo, expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e IL10) e pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) em camundongos suíços gnotobióticos que receberam uma dose única de 10^8 UFC do referido lactobacilo e foram sacrificados nos tempos 9, 11, 13 e 15 dias após monoassociação. Para avaliar a translocação de *L. diolivorans* 1Z para fígado e baço, os animais monoassociados foram sacrificados nos referidos tempos experimentais, os órgãos coletados, macerados, diluídos em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) e plaqueados em ágar MRS. A Figura 3 mostra que *L. diolivorans* 1Z foi detectado no fígado e baço até o 11º dia de monoassociação. A partir do 13º dia, não foi possível detectar *L. diolivorans* 1Z nos referidos órgãos. Não é de se surpreender que *L. diolivorans* 1Z tenha se translocado temporariamente para o fígado e baço desses animais, uma vez que o lactobacilo foi introduzido em animais isentos de germes, portanto, sem interferência do efeito de resistência à colonização exercida pela microbiota indígena intestinal.

A translocação de um microrganismo é definida como a passagem de microrganismos viáveis através da barreira mucosa para locais extra-intestinais, como linfonodos mesentéricos, fígado, baço, rins e corrente sanguínea (BERG & GARLINGTON, 1979; MARTINS *et al.*, 2013). BERG (1995) propôs que, normalmente, ocorre uma translocação fisiológica e esta seria responsável pela modulação da resposta imune do hospedeiro pela microbiota indígena. A translocação de um probiótico para órgãos linfoides, como as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, poderia ativar eventos de apresentação de antígenos, respostas imunes *in situ* e sistêmicas. Nesse sentido, a translocação poderia ser benéfica para o hospedeiro.

Ao exame histopatológico, intestino e fígado dos animais não apresentaram alterações morfológicas consideradas patológicas (Figuras 4 e 5). A ausência de alterações morfológicas na arquitetura normal dos órgãos avaliados indica que *L. diolivorans* 1Z não apresenta risco de dano à mucosa intestinal. A degradação da mucosa intestinal tem sido usada como um dos primeiros marcadores para patogenicidade de uma linhagem potencialmente probiótica e estudos avaliando esse parâmetro tem mostrado que as linhagens probióticas tradicionais, como *L. acidophilus*, não geram degradação da superfície intestinal (DONOHUE *et al.*, 1998). Esses achados estão de acordo com a literatura, pois raros casos de infecções local e sistêmica, incluindo septicemia e endocardites, devido ao consumo de *Lactobacillus*, bifidobactérias ou outras BAL, têm sido reportados e, quando ocorrem, apresentam números muito baixos quando comparados com outros casos de septicemia (incidência para *Enterococcus* spp. 5-15%, *Lactobacillus* spp. 0,1%, *Leuconostoc* spp. <0,01% (SALMINEN *et al.*, 1998a). Já foi demonstrado que a administração de *Weissella paramesenteroides* WpK4 (ALVIM, *et al.*, 2016), *Lactobacillus acidophilus* L36 e *L. salivarius* L38 (STEINBERG, *et al.*, 2014), *Bifidobacterium longum* 5^{1a} (SOUZA, *et al.*, 2012), e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 (MARTINS, *et al.*, 2011) também não causaram nenhum dano patológico a mucosa intestinal e fígado dos animais em modelo de estudo semelhante ao deste trabalho. Os resultados da análise histopatológica e translocação para fígado e baço dos animais do grupo CP, permitem concluir que, dentro dos critérios de segurança para o uso de probióticos avaliados no presente trabalho, *L. diolivorans* 1Z pode ser considerado seguro.

Os probióticos podem exercer seus efeitos benéficos por meio de três mecanismos de ação principais: aumento da resistência à colonização, modulação da resposta imunológica do hospedeiro e contribuição nutricional. No que se refere ao aumento da resistência à colonização, os probióticos podem atuar competindo por nutrientes e receptores (inibição direta) ou produzindo metabólitos inibitórios, bacteriocinas ou substâncias semelhantes à bacteriocinas (inibição indireta) contra bactérias patogênicas (LEBEER *et al.*, 2008; 2010). A capacidade de *L. diolivorans* 1Z de reduzir o número de *S. Typhimurium* no intestino de animais gnotobióticos foi avaliada por meio da contagem de células viáveis de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais tratados (PS) ou não (CS) com o lactobacilo (Figura 7). Foi observada uma redução do número de *Salmonella* no grupo PS, enquanto que no grupo CS esse permaneceu alto e estável ao longo dos dias pós-infecção. Para avaliar se a redução da *Salmonella* se deu pela produção de substância

antagonista no TGI, testamos a capacidade inibitória de fezes dos animais monoassociados com *L. diolivorans* 1Z (antagonismo *ex vivo*). Não foram observados halos de inibição de crescimento contra *S. Typhimurium* neste ensaio. Não podemos descartar completamente a hipótese de que a redução da contagem de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais possa ter ocorrido pela ação de substância antagonista produzida por *L. diolivorans* 1Z *in vivo*, mas que poderia ter sido inativada por enzimas proteolíticas ainda no lúmen intestinal, o que justificaria sua não detecção no ensaio *ex vivo* como já foi descrito por BAMBIRRA *et al* (2007) ao estudar o efeito protetor de *L. sakei* 2a em modelo murino gnotobiótico de infecção por *L. monocytogenes*. Mecanismos imunológicos, não avaliados no presente trabalho, também poderiam explicar a redução do número de *S. Typhimurium* no lúmen intestinal dos animais do grupo PS em relação ao grupo CS (P=0,01) a partir do quarto dia de infecção. DE LEBLANC *et al* (2010), demonstraram que a ingestão de *L. casei* CRL 431, uma linhagem comercial da Christian Hansen® isolada de fezes de bebê, aumentou a fagocitose da *S. Typhimurium* de macrófagos isolados das placas de Peyer e da cavidade peritoneal do grupo dos animais pré-tratados com o lactobacilo e desafiados com o patógeno em relação ao grupo controle não tratado e desafiado. A estimulação da atividade fagocítica de células mononucleares por microrganismos candidatos a probióticos também já foi demonstrada no nosso grupo de pesquisa para *L. acidophilus* H2b20, sendo o trabalho pioneiro publicado em 1997 por PODOPRIGORA & NEUMANN. Em um trabalho mais recente, MACIEL *et al* (2016) demonstraram que a administração de kefir em ratos diabéticos aumentou a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, o que poderia aumentar a imunocompetência de indivíduos portadores de diabetes mellitus, contribuindo para a redução de infecções oportunistas. Por outro lado, MARTINS *et al* (2005b), demonstraram que a administração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 em animais gnotobióticos não reduziu a contagem de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais após o desafio (grupo experimental) em comparação com o grupo controle (animais desafiados e que não receberam a levedura). Apesar do antagonismo não ter sido observado nesse trabalho, a taxa de mortalidade do grupo experimental foi estatisticamente menor (P<0,05) em comparação com o grupo controle. Trabalhos posteriores demonstraram que o efeito protetor promovido pela levedura no modelo de febre tifoide estava relacionado à modulação do sistema imunológico avaliada pelo aumento da produção de sIgA no fluido intestinal e no soro, do número de células de Küpffer e *clearance* de *Escherichia coli* B₄₁

(MARTINS, *et al.*, 2007; 2011) e/ou a capacidade de ligação da *S. Typhimurium* à parede da levedura (TIAGO, *et al.*, 2012; MARTINS, *et al.*, 2013).

Avaliamos o efeito de *L. diolivorans* 1Z na translocação de *S. Typhimurium* para fígado e baço em camundongos gnotobióticos. Houve uma diminuição progressiva na contagem de *S. Typhimurium* no fígado dos animais do grupo PS ao longo dos dias após infecção, enquanto no grupo CS um aumento progressivo nos níveis populacionais da bactéria patogênica no mesmo órgão foi observado. Esta constatação, aliada ao resultado do experimento sem desafio, que demonstrou que *L. diolivorans* 1Z translocou transitoriamente para o fígado dos animais monoassociados, sugeriam que *L. diolivorans* 1Z poderia estimular o aumento no número de células de Küpffer. De fato, uma análise histológica descritiva das lâminas de fígado revelou um aumento das células de Küpffer no grupo PS, o que poderia estar relacionado à diminuição na contagem de *Salmonella* nesse órgão. NEUMANN *et al.*, (1998) mostraram que a administração oral de *L. acidophilus* UFV-H2b20 reduziu o tempo necessário para o clareamento de *E. coli* B41 da corrente sanguínea de camundongos gnotobióticos em relação ao grupo isento de germe e que esta redução estava relacionada ao aumento do número de células de Küpffer. MARTINS *et al.*, (2011) demonstraram que a administração da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 reduziu os níveis populacionais de *S. Typhimurium* no fígado dos animais pelo aumento de células de Küpffer. Nossos resultados mostraram também uma menor contagem de *Salmonella* no fígado em relação ao baço, o que reforça ainda mais a hipótese de que existe algum mecanismo de eliminação da bactéria no fígado que está ausente no baço, suposição esta que ainda precisa ser confirmada. Células de Küpffer são macrófagos residentes do fígado que estão localizados no interior dos sinusóides e representam cerca de 15% da população celular hepática. Uma de suas inúmeras funções é a de fagocitar bactérias que eventualmente penetram o sangue portal a partir do intestino grosso, evitando dessa maneira, os efeitos deletérios que poderiam ser induzido pela translocação de patógenos para o órgão (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Não houve diferença na produção de sIgA no fluido intestinal entre animais dos grupos tratados com *L. diolivorans* 1Z (PS) ou não (CS) e desafiados com *S. Typhimurium* ($P > 0,05$) no segundo dia após a infecção (Figura 17). Este fato pode explicar a translocação do patógeno para fígado e baço nos dois grupos, nos primeiros dias de infecção. No oitavo dia após o desafio, no entanto, os títulos de sIgA foram maiores no grupo PS em relação ao grupo CS ($P = 0,02$) o que pode explicar a menor contagem da *S. Typhimurium* nos dois órgãos no grupo PS, principalmente no fígado,

onde a contagem da bactéria patogênica caiu para níveis indetectáveis resultando em diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos 6 e 8 dias após a infecção ($P=0,0009$). Podemos sugerir, então, que a diminuição da contagem de *S. Typhimurium* no fígado dos animais do grupo PS, resultou da combinação do aumento da secreção de sIgA no fluido intestinal, que conteve a translocação do patógeno, e o aumento das células de Küppfer que eliminou as salmonelas que já haviam translocado. Trabalhos utilizando modelo de febre tifóide semelhante ao utilizado neste trabalho foram publicados recentemente por nosso grupo de pesquisa. ACURCIO *et al.*, (2017) administraram *Lactobacillus rhamonosus* D1 ou *L. plantarum* B7 em animais gnotobióticos e, após 5 dias, desafiaram os animais com *S. Typhimurium*. Os resultados mostraram menor contagem do patógeno no fígado dos animais dos grupos tratados com *Lactobacillus rhamonosus* D1, mas não com o *L. plantarum* B7. Nesse trabalho, a produção de sIgA não foi avaliada, então os autores relacionaram a menor translocação da *S. Typhimurium* à melhor preservação do epitélio intestinal que foi estimulada por *L. rhamonosus* D1 e não por *L. plantarum* B7. ALVIM *et al.*, (2016) também obtiveram uma menor contagem de *S. Typhimurium* no fígado e baço dos animais tratados com *Weissella paramesenteroides* Wpk4, em comparação com o grupo não tratado e desafiado. Este resultado foi explicado pelo aumento da produção de sIgA no conteúdo intestinal dos animais do grupo que recebeu o probiótico, em comparação ao controle, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho.

A IgA, isotipo de anticorpo dominante na mucosa intestinal, é produzida localmente por linfócitos B ativados na lâmina própria. A ativação das células B para a produção de IgA pode acontecer de modo dependente ou independente dos linfócitos T. Em geral, a produção de IgA dependente de células T apresenta maior afinidade e especificidade aos antígenos bacterianos que a IgA produzida de maneira independente (FAGARASAN, *et al.*, 2010; GUTZEIT, *et al.*, 2014; HONDA & LITTMAN, 2016). Em camundongos, a maior parte da IgA é produzida por mecanismos independentes de células T, ao contrário do que acontece em humanos (MURPHY, 2014).

A natureza da IgA difere entre os dois principais compartimentos nos quais ela é encontrada, no sangue e nas secreções de mucosa. A IgA no sangue ocorre principalmente na forma de monômero (mIgA). Já nos tecidos de mucosa, a IgA é quase exclusivamente produzida como polímero, geralmente como dímero, em que os dois monômeros de Ig são ligados por uma cadeia J (*Joining*). (INAMINE & SCHNABEL, 2017). Para alcançar o antígeno no lúmen intestinal após sua produção na lâmina própria, a IgA precisa ser

transportada por meio do epitélio. Isso é feito via células epiteliais imaturas na base das criptas intestinais, que constitutivamente expressam o receptor de imunoglobulina polimérico (**pIgR**, do inglês *polymeric immunoglobulin receptor*), que está localizado em suas superfícies basolaterais. Esse receptor apresenta alta afinidade por Igs poliméricas ligadas por cadeia J, como é o caso da IgA dimérica, e transporta o anticorpo por transcitose até a superfície luminal do epitélio, onde é liberado por clivagem proteolítica do domínio extracelular do receptor. Parte do **pIgR** clivado permanece associado à IgA e é conhecido como componente secretor (frequentemente abreviado como SC, do inglês *secretory component*). O anticorpo resultante é denominado **IgA secretora (sIgA)**, do inglês *secretory IgA*). Acredita-se que o componente secretor ligado protege a IgA da proteólise por enzimas presentes no lúmen intestinal o que é fundamental para que a IgA exerça seus efeitos protetores sobre o epitélio intestinal (STRUGNELL & WIJBURG, 2010; INAMINE & SCHNABEL, 2017).

A sIgA previne o acesso bacteriano à superfície apical das células epiteliais pelo aprisionamento da bactéria na camada de muco, o que desempenha papel crucial na prevenção da invasão por microrganismos patogênicos (FRANSEN *et al.*, 2015). O aprisionamento da *Salmonella* na camada de muco pela ação da sIgA poderia explicar a redução da sua contagem nas fezes dos animais grupo PS em comparação com o grupo CS. Se a *S. Typhimurium* está aderida no epitélio pelo aumento da sIgA no fluido intestinal, menos patógeno terá no lúmen, o que reduzirá sua eliminação pelas fezes. Além do mais, a ligação do anticorpo pode alterar a expressão de flagelina o que compromete a motilidade e reduz a virulência da *Salmonella* (CULLENDER, *et al.*, 2013). Por fim, a sIgA neutraliza a ação de toxinas bacterianas, protegendo as células epiteliais da estimulação tóxica (MANTIS, *et al.*, 2011). A sIgA tem pouca capacidade de ativar a via clássica do complemento ou de atuar como opsonina e não induz inflamação. Isso significa que pode limitar a penetração de patógenos na mucosa sem o risco de dano inflamatório, algo benéfico durante a infecção por bactérias patogênicas intestinais, pois não interfere com a homeostase entre o hospedeiro e a microbiota indígena intestinal (GUTZEIT, *et al.*, 2014).

Em camundongos, existe ainda uma segunda via de secreção de IgA no intestino – a **via hepatobiliar**. A IgA dimérica que não se ligou ao pIgR é capturada para as veias portais da lâmina própria, as quais drenam o sangue intestinal para o fígado. No fígado, essas pequenas veias (sinusóides) são revestidas por um endotélio que permite que os anticorpos acessem os hepatócitos subjacentes, os quais têm pIgR em sua superfície. A

IgA é capturada para dentro dos hepatócitos e transportada por transcitose para um ducto biliar adjacente. Dessa forma, a IgA secretora pode ser distribuída diretamente no intestino delgado por meio do ducto biliar comum. Essa via hepatobiliar permite que a IgA dimérica elimine microrganismos que invadiram a lâmina própria e foram ligados lá pela IgA (MURPHY, 2014). A via de secreção hepatobiliar poderia ser a responsável pelo aumento da sIgA detectada no fluido intestinal dos animais do grupo PS, em comparação com o grupo CS, o que poderia explicar a diminuição da contagem de *S. Typhimurium* no fígado do grupo tratado com *L. diolivorans* 1Z em relação ao grupo controle. Ademais, o estímulo para produção de sIgA parece ser independente da presença do patógeno no lúmen intestinal, uma vez que uma maior quantidade de anticorpo também foi detectada no fluido intestinal dos animais do grupo CP comparativamente ao grupo GF (Figura 6) demonstrando que, *L. diolivorans* 1Z, é capaz de estimular a produção de sIgA.

A análise histopatológica do íleo dos animais do grupo CS mostrou alterações da mucosa ileal que progrediram e foram se intensificando a partir do segundo dia após a infecção. No grupo tratado com *L. diolivorans* 1Z (PS), essas alterações também foram observadas, porém com menor intensidade ou ausentes em alguns animais. A proteção da mucosa ileal dos animais do grupo PS, comparativamente ao grupo CS, foi comprovada pela medida do perímetro das lesões graves atribuídas à presença da *S. Typhimurium* (P=0,02).

Durante a infecção de camundongos com *S. Typhimurium*, as primeiras células encontradas pelo patógeno são as células epiteliais intestinais, células dendríticas (DCs) e macrófagos (COBURN, GRASSL & FINLAY, 2007; MURPHY, 2014). As células dendríticas estão presentes na mucosa intestinal e reconhecem os antígenos que são apresentados às células T no GALT e nos linfonodos mesentéricos. Algumas células dendríticas estendem projeções citoplasmáticas entre as células epiteliais intestinais em direção ao lúmen para reconhecem antígenos. Outras células dendríticas presentes na lâmina própria reconhecem os antígenos derivados dos conteúdos intestinais e que passaram pela barreira epitelial (ABBAS *et al.*, 2015). A interação com essas células induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ , levando a um influxo massivo de neutrófilos, macrófagos e DCs imaturas, os quais são necessários para a supressão do crescimento bacteriano na luz intestinal em infecções sub-letais por *Salmonella* (MASTROENI & GRANT, 2011).

Neste estudo, o modelo do desafio experimental de camundongos isentos de germes com *S. Typhimurium* desenvolveu-se conforme o esperado, produzindo um

aumento dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IFN- γ ao longo dos dias após infecção no grupo controle *Salmonella* (CS). A diminuição da expressão de TNF- α e IFN- γ no grupo PS, comparativamente ao grupo CS, está acompanhada com a diminuição na contagem de *S. Typhimurium* no intestino dos animais (Figura 7). Como a expressão dessas citocinas depende da interação entre o patógeno e as células do epitélio intestinal, células dendríticas (DCs) e macrófagos, é de se esperar que, havendo menor contagem do microrganismo no lúmen intestinal, haverá menos estímulo para expressão dessas citocinas. A ação de TNF- α ao longo do processo inflamatório é paradoxal. Níveis aumentados dessa citocina no início da inflamação são importantes para evitar a disseminação sistêmica do patógeno do local da infecção por todo organismo via corrente sanguínea por meio da estimulação das células endoteliais o que as levam a expressarem proteínas que desencadeiam a coagulação nos vasos sanguíneos locais, ocluindo-os e cortando o fluxo sanguíneo (MURPHY, 2014). No entanto, se esse mecanismo de proteção do hospedeiro falha, a manutenção de altos níveis de TNF- α no intestino pode comprometer a função de barreira epitelial pelo aumento da permeabilidade intestinal, o que facilita a invasão da *S. Typhimurium* para órgãos extra-intestinais, como fígado e baço (MURPHY, 2014). BEAUREPOUIRE *et al.*, (2009) correlacionaram o aumento da permeabilidade *in vitro* de células epiteliais intestinais derivadas do colon pela ação de TNF- α com o aumento da translocação bacteriana pela via transcelular. No grupo CS, o aumento progressivo na expressão de TNF- α e IFN- γ pode ter comprometido a barreira epitelial e assim ter facilitado a translocação da *S. Typhimurium* para fígado e baço. A manutenção de níveis aumentados dessa citocina ao longo de todo o experimento nesse grupo pode justificar os níveis populacionais elevados da bactéria patogênica nos referidos órgãos. No grupo PS, a diminuição da expressão de TNF- α e IFN- γ ($P < 0,0001$) pode estar associada à melhor preservação da integridade epitelial intestinal, que continuou oferecendo resistência a translocação do patógeno, o que pode explicar a menor contagem de *S. Typhimurium* no fígado dos animais desse grupo comparativamente ao grupo CS.

Esses resultados estão de acordo com o que foi verificado na análise histopatológica que evidenciou comprometimento da integridade da barreira epitelial ileal nos grupos CS e PS nos primeiros dias da infecção (Figura 8). No entanto, no grupo PS, as alterações histopatológicas se tornaram menos intensas em relação ao grupo CS ao longo dos dias após o desafio, com evidente sinal de melhora no oitavo dia e que foi posteriormente confirmada pela medida do perímetro das lesões graves (Figura 12). A

diminuição da contagem de *S. Typhimurium* e diminuição da expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ no intestino dos animais do grupo PS, em comparação com o grupo CS, podem explicar a melhor preservação da arquitetura da mucosa ileal induzida pela administração de *L. diolivorans* 1Z.

O aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1- β no fígado ao longo dos dias após a infecção é um indicativo da disseminação sistêmica da *S. Typhimurium* que estimula os macrófagos hepáticos a liberarem uma quantidade massiva dessas citocinas (MURPHY, 2014). A liberação sistêmica de TNF- α na corrente sanguínea causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ocasionando perda de volume plasmático e, por fim, choque séptico, levando a um colapso na função de vários órgãos vitais, como rim, fígado e pulmão, sendo, geralmente a causa da morte dos animais infectados com *S. Typhimurium* (MURPHY, 2014; ABBAS *et al.*, 2015). Camundongos com defeitos ou ausência de receptores de TNF- α são resistentes ao choque séptico, porém, são incapazes de controlar a infecção (MURPHY, 2014; ABBAS *et al.*, 2015). Essa constatação ilustra o papel paradoxal do TNF- α , importante para conter a infecção no sítio primário de infecção, mas catastrófica quando liberada sistemicamente na resposta inflamatória induzida por bactérias Gram-negativo, como é o caso da *S. Typhimurium* (PFEFFER, 2003). Não houve diferença estatística na expressão das citocinas pró-inflamatórias hepáticas entre os animais do grupo PS e CS ($P > 0,05$). No entanto, uma tendência à diminuição da expressão dessas citocinas foi observada nos animais do grupo PS comparativamente com o grupo CS que poderia ser explicada pela tendência ao aumento da expressão das citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 no grupo PS em comparação ao CS. TGF- β e IL-10 são reconhecidamente citocinas que regulam negativamente a inflamação (MURPHY, 2014). SOUSA & TEIXEIRA (2005), em um estudo de revisão, demonstraram que o balanço entre a produção de TNF- α e IL-10 determina a injúria tecidual após isquemia e reperfusão intestinal. Os autores destacaram ainda que estratégias terapêuticas que aumentem a IL-10 e previnam o aumento da concentração de TNF- α poderiam ser usadas como adjuvantes em tratamentos de injúrias teciduais causadas por isquemia e reperfusão. A utilização de probióticos neste contexto poderia ser uma alternativa. O efeito sistêmico de microrganismos candidatos a probióticos na modulação da resposta imunológica já foi demonstrado em nosso grupo de pesquisa. SILVA *et al.*, (2004), demonstraram que a proteção dos animais tratados com *Bifidobacterium longum* Bb46 e desafiados com *S. Typhimurium*, comparativamente ao grupo controle não tratado e desafiado, poderia ser atribuída, em parte, à diminuição da

produção de IFN- γ e pelo aumento de IL-10, observado em cultura de células esplênicas obtidas dos animais dos grupos experimental e controle.

Não houve diferença no número de núcleos celulares/mm² no fígado dos animais dos grupos avaliados (Figura 14), o que indica que não houve diferença no número de focos de infiltrado inflamatório entre os grupos CS e PS no tempo avaliado, embora a contagem do número de *S. Typhimurium* no fígado dos animais PS tenha caído para níveis indetectáveis (<10³ UFC/g de órgão). Como o recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido é estimulada pela presença do patógeno, era de se esperar que, havendo menor contagem de *S. Typhimurium* no fígado haveria redução do número de leucócitos no órgão.

A presença do patógeno no fígado, ainda que em quantidades menores em relação ao grupo CS (Figura 8A), aliada à presença de células viáveis de *L. diolivorans* 1Z nos primeiros dias de infecção no grupo CP (Figura 3) nos permite sugerir que pode ter havido um aumento no recrutamento de neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea e a manutenção da resposta inflamatória no tecido, que foi confirmada pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias, ao longo dos dias após a infecção (Figura 16). No entanto, a resposta inflamatória no fígado dos animais do grupo PS foi mais resolutiva, comparativamente ao grupo CS, uma vez que foi suficiente para diminuir a quantidade de patógeno no órgão, importante para evitar a disseminação sistêmica do microrganismo, e a conseqüente morte do animal por choque séptico. É importante dizer que o método de avaliação da celularidade utilizado no presente trabalho não discrimina o tipo de leucócito presente no infiltrado inflamatório (polimorfo ou mononuclear). No entanto, na análise qualitativa das lâminas de fígado coradas em HE, percebemos que no grupo CS o tipo de célula inflamatória predominante no infiltrado foi polimorfonuclear enquanto no grupo PS prevaleceram as células mononucleares. A diferença no perfil de células inflamatórias indica que a inflamação no fígado dos animais CS e PS estão em fases diferentes. Já é bem descrito na literatura que as primeiras células a migrarem para o foco infeccioso são os neutrófilos (polimorfonucleares) que fagocitam o microrganismo e morrem em seguida por apoptose no local da infecção. Posteriormente, os monócitos são recrutados da corrente sanguínea para ao foco inflamatório para fagocitarem os corpos apoptóticos e os restos celulares no tecido. A resolução da inflamação ocorre depois que os neutrófilos apoptóticos foram removidos pelos macrófagos no tecido (ABBAS *et al.*, 2015). Podemos inferir, então, que a administração de *L. diolivorans* 1Z contribuiu para que a resposta inflamatória no fígado dos animais do grupo PS fosse mais rápida e eficiente para

eliminação da *S. Typhimurium*, em comparação com o grupo CS. Além disso, o aumento de IFN- γ no fígado dos animais do grupo PS, comparativamente ao grupo CS, pode ser indicativo da maior atividade microbicida dos macrófagos no local da infecção. IFN- γ derivado das células NK aumentam a capacidade dos macrófagos para matarem as bactérias fagocitadas, similarmente ao IFN- γ produzido pelos linfócitos T citotóxicos (SUN & LANNIER, 2011). Essa interação IFN- γ -macrófago dependente de célula NK pode ser suficiente para controlar a infecção por bactérias intra-celulares como *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* (ABBAS *et al.*, 2015).

Assim como no intestino, os danos teciduais no fígado foram se intensificando ao longo dos dias após infecção. Tanto no grupo controle *Salmonella* (CS) quanto no grupo tratado e desafiado (PS), foram observadas áreas de infiltrado inflamatório com alterações degenerativas do parênquima hepático. A administração do *L. diolivorans* 1Z não impediu a translocação da *S. Typhimurium* para o fígado dos animais do grupo PS, o que explica as lesões hepáticas atribuídas à sua presença no órgão. No entanto, a contagem do patógeno diminuiu progressivamente ao longo do tempo após infecção, o que pode explicar a recuperação mais precoce das lesões hepáticas quando comparadas ao grupo CS, no qual o número da *S. Typhimurium* permaneceu alto nos mesmos tempos avaliados. Guardadas as particularidades de cada modelo experimental, os resultados encontrados no modelo gnotobiótico estão de acordo com a maior sobrevivência dos animais convencionais tratados com o *L. diolivorans* 1Z e desafiados com *S. Typhimurium*, em comparação aos animais convencionais que não receberam o probiótico.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos podem ser resumidos como a seguir:

- O tratamento experimental com *L. diolivorans* 1Z (P=0,0004), *L. perolens* 17P2 (0,003) e *L. casei* 25P (P=0,0004) em camundongos BALB/c convencionais foi capaz de proteger os animais da morte após desafio oral com *Salmonella Typhimurium*, em comparação com o grupo controle com destaque para o tratamento com *L. diolivorans* 1Z que promoveu 70% de sobrevivência e as maiores médias de ganho de peso;
- *L. diolivorans* 1Z foi capaz de colonizar o TGI dos animais suíços isentos de germes e de se manter em níveis elevados (log 9,59 \pm 0,06) até o momento do desafio oral com *Salmonella Typhimurium*;

- *L. diolivorans* 1Z foi capaz de se translocar para o fígado e baço dos animais monoassociados. No entanto, a carga microbiana diminuiu ao longo dos dias após a monoassociação e não foi capaz de causar alterações patológicas no íleo e fígado dos animais;
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z no grupo CP não induziu aumento de expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL10 quando comparadas ao grupo GF ($P>0,05$);
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z no grupo CP aumentou os títulos de sIgA no fluido intestinal dos animais quando comparados aos do grupo GF ($P=0,03$) no segundo dia de infecção.
- O modelo utilizado neste trabalho, apresentou sinais microbiológicos, histopatológicos e imunológicos condizentes com a infecção sistêmica por *Salmonella* Typhimurium;
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z foi capaz de reduzir a contagem de *Salmonella* nas fezes dos animais do grupo PS, em comparação com o grupo CS, a partir do quarto dia de infecção ($P=0,006$);
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z foi capaz de diminuir a contagem de *Salmonella* no fígado dos animais do grupo PS, em comparação com o grupo CS, a partir do sexto dia de infecção ($P=0,0009$);
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z não foi capaz de diminuir a contagem de *Salmonella* no baço dos animais do grupo PS, em comparação com o grupo CS ($P>0,05$);
- A análise descritiva da superfície epitelial do íleo mostrou alterações histopatológicas típicas da presença de *S. Typhimurium* nos grupos PS e CS. No entanto, no grupo tratado com *L. diolivorans* 1Z e desafiado, as alterações foram de menor intensidade ou ausentes em alguns animais. A proteção da mucosa ileal dos animais do grupo PS, comparativamente ao grupo CS, foi comprovada pela medida do perímetro das lesões graves atribuídas à presença da *S. Typhimurium* no oitavo dia após a infecção ($P=0,02$).
- O parênquima hepático, por sua vez, apresentou áreas de infiltrado inflamatório mesmo após oito dias de infecção, tanto no grupo PS quanto no grupo CS que foi confirmada pela medida de celularidade, não tendo sido observada diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).
- No íleo, a expressão das citocinas IFN- γ e TNF- α aumentou de maneira progressiva ao longo dos dias após a infecção tanto nos grupos PS e CS. No entanto, esse aumento foi comparativamente menor no grupo PS em relação ao CS para IFN- γ a partir do segundo dia de infecção ($P<0,0001$) e TNF- α no oitavo dia de infecção ($P<0,0001$).

- No fígado, a expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL1- β e da enzima iNOS e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β aumentou de maneira progressiva ao longo dos dias de infecção nos grupos PS e CS. Comparando os dois grupos, uma tendência à diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias foi observada no grupo PS em relação ao grupo CS ($P > 0,05$).
- O tratamento com *L. diolivorans* 1Z no grupo PS aumentou os títulos de sIgA no fluido intestinal dos animais quando comparados ao grupo CS no oitavo dia de infecção ($P = 0,02$).

8. CONCLUSÃO

Sustentado pelos resultados encontrados até o momento, pode-se concluir que *L. diolivorans* 1Z é capaz de reduzir os efeitos deletérios de uma infecção oral por *Salmonella* Typhimurium em modelo experimental de camundongos gnotobióticos, assim como é capaz de reduzir a taxa de mortalidade de camundongos convencionais desafiados oralmente com esse mesmo patógeno. Os mecanismos através dos quais se dá essa proteção incluem modulação da resposta imunológica em nível intestinal e sistêmica, celular e humoral, porém ainda não estão completamente esclarecidos. Ainda que outros estudos precisem ser desenvolvidos para esclarecer tais mecanismos, *L. diolivorans* 1Z apresenta potencial probiótico que precisa ser explorado.

Todos os resultados apresentados nesse trabalho foram obtidos com a cultura liofilizada de *L. diolivorans* 1Z, o que demonstra que o microrganismo pode ser submetido a esse processo de desidratação, comumente utilizado para manutenção de culturas microbianas utilizadas por indústrias de alimentos e medicamentos, sem perda da sua capacidade probiótica.

9. REFERÊNCIAS

- ABATEMARCO, M.J. **Caracterização funcional e tecnológica de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir como critério de seleção de linhagens probióticas.** 103f. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular.** 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p.536, 2015.

ACURCIO, L.B.; SANDES, S. H. C.; BASTOS, R. W. ; SANT' ANNA, F. M. ; PEDROSO, S. H. S. P. ; Reis, D. C. ; NUNES, A.C. ; Cassali, G. D. ; SOUZA, M. R. ; NICOLI, J. R. . **Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection.** *Beneficial Microbes*, v. 1, p. 1-10, 2017.

AILES, E.; BUDGE, P.; SHANKAR, M.; COLLIER, S.; BRINTON, W.; CRONQUIST, A.; CHEN, M.; THORNTON, A.; BEACH, M.J. BRUNKARD, J.M. **Economic and health impacts associated with a *Salmonella* Typhimurium drinking water outbreak– Alamosa, CO.** *PLoS One*. v.8, p.e57439, 2013.

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, A. C. . **Probiotic *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces intestinal gene expression of pro-inflammatory cytokines and hepatic injuries in murine model of typhoid fever.** *Beneficial Microbes*, v. 7, p. 61-73, 2016.

ANDERSON, C.J.; KENDALL, M;M.; ***Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strategies for Host Adaptation.** *Front Microbiol*, v. 12, p.1-12, 2017.

ANGULO, L., LOPEZ, E., LEMA, C. **Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain).** *J. Dairy Res.* 60, 263-267. 1993.

ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. **Distribution of enteroglucagon and peptide YY immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice.** *Cell Tissue Res.*, v. 290, p. 61–69, 1997.

ARASU, M.V MIN-WOONG, J.A.; SOUNDHARRAJAN, AI.; DAHYEKIM, B.; HYUNG-SU-PARK, A.; JUNG-WONPARK,C.; NAIFABDULLAHAL, D.; KICHOON, C. **Characterization, phylogenetic affiliation and probiotic properties of high cell density *Lactobacillus* strains recovered from silage.** *J Sci Food Agric*, v. 94, p. 2429–2440, 2014.

ARSLAN, S. **A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir.** *Journal of Food*. V.13, p.340-45, 2015.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.** 3rd ed. New York: Marcel Dekker, p.1-66. 2004.

BAMBIRRA, F.H.S. ; LIMA, K.G.C. ; FRANCO, B.D.G.M. ; CARA, D.C. ; NARDI, R.M.D. ; BARBOSA, F.H.F. ; NICOLI, J.R. . **Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice.***Letters in Applied Microbiology* v. 45, p. 663-667. 2007.

BASTOS, R.W.; PEDROSO, S.H.S.P.; VIEIRA, A.T.; MOREIRA, L.M.C.; FRANÇA, C.S.; CARTELLE, C.T. ; ARANTES, R.M.E.; GENEROSO, S.V.; CARDOSO, V.N.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R.; MARTINS, F.S. **UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis.** *Beneficial Microbes* , v. 7, p. 549-557, 2016.

BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A. e ADAMS, L.G. **Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica***. *Infection and Immunity*. v.66, p.4579-4587, 1998.

BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D.M. **Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability**. *J Interferon Cytokine Res.* v.3, p.133-44, 2009.

BEIRÃO, E. M. **Colonização por germs patogênicos e defesa do microbioma**. *Microbioma, disbiose, probióticos e bacterioterapia*. Capítulo 6, p. 43-47, 2017.

BENNETT, S.; LITRELL, K.W.; HILL, T.A.; MAHOVIC, M. e BEHAVESH, C.B. **Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990–2010: a recurring public health problem**. *Epidemiology and Infection*. v.143, p.1352-1359, 2014.

BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. **Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model**. *Infect. Immun.*, v. 23, p. 403–411, 1979.

BERG, R.D. **Bacterial translocation from the gastrointestinal tract**. *Trends Microbiol.*, v. 3, p. 149-154, 1995.

BERG, R. D. **Probiotic, probiotics or ‘conbiotics’?** *Trends Microbiol.*, v. 6, p. 89–92, 1998.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Ed. George M. Garrity. Williams & Wilkins, 2th ed., v. 2, p. 1106, 2005.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. ***Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria**. *Gut*, v. 35, p. 483-489, 1994.

BLAABJERG, S.; ARTZI D. M.; AABENHUS, R. **Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Outpatients-A Systematic Review and Meta-Analysis**. *Antibiotics*, v. p.12-16, 2017.

BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J.R. **Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 564-568, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº204 de 17 de Fevereiro de 2016. **Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados**. 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. Acesso em: 12/01/2018. 2016b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de Outubro de 2007. Aprova o **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. **Salmonella nomenclature**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2465-2467, 2000.

BUCKLE, G.C.; WALKER, C.L.F. e BLACK, R.E. **Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010**. *Journal of Global Health*. v.2, p.010401, 2012.

CHAN, R. C.; REID, G.; IRVIN, R. T.; BRUCE, A. W.; COSTERTON, J. W. **Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by Lactobacillus whole cells and cell wall fragments**. *Infect. Immun.*, v. 47, p.84–89, 1985.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. **Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application**. *International Journal of Food Microbiology*, v.125, p. 215-222, 2008

CHIU, C.H.; SU, L.H. e CHU, C. **Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment**. *Clinical Microbiology Reviews*. v.17, p.311-322, 2004.

CHRISTENSEN, H.; FRØKIÆR, H.; PESTKA, J. **Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells**. *J.Immunol.*, v.168, p. 171–8, 2002.

CISALPINO, D.; FAGUNDES, C. T; BRITO, C. B.; ASCENÇÃO, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; VIEIRA, A. T.; SOUSA, L. P.; AMARAL, F.A.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. **Microbiota-induced antibodies are essential host inflammatory responsiveness to sterile and infectious stimuli**. *J. Immunol.* v. 300, p. 1-12, 2017.

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, 2007.

COCONNIER, M. H., BERNET, M. F., KERNÉIS, S. CHAUVI-ERE, G., FOURNIAT, J. SERVIN, A. L. **Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion**. *FEMS Microbiol. Let.* 110: 299-306, 1993

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for fermented milks**. *Codex Stan 243-2003*. Revision, 2010. Roma, 2010.

CONCEA. **Diretriz Brasileira para o cuidado de animais para fins científicos e didáticos**. *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*. 2015

CONNOR, B.A. e SCHWARTZ, E. **Typhoid and paratyphoid fever in travellers**. *The Lancet Infectious Diseases*. v.5, p.623-628, 2005.

CROSS, M. L. **Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic nactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 34, p. 245-253, 2002.

CRUMP, J.A.; LUBY, S.P. e MINTZ, E.D. **The global burden of typhoid fever.** *Bulletin of the World Health Organization*. v.82, p.346-353, 2004.

CULLENDER TC, CHASSAING B, JANZON A, *et al.* **Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut.** *Cell Host Microbe*. 14:571–81 2013.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. **Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 26, p. 767-778, 2007.

CZERUCKA, D.; ROUX, I.; RAMPAL, P. ***Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells.** *Gastroenterology*, v. 106, p. 65-72, 1994.

DAS, S.K.; CHISTI, M.J.; AFRAD, M.H.; MALEK, M.A.; AHMED, S.; FERDOUS, F.; FARZANA, F.D.; DAS, J.; SHAHUNJA, K.; AFROZE, F.; SALAM, M.A.; AHMED, T.; FARUQUE, A.S.; BAKER, P.J. e AL MAMUN, A. **Gastroenteritis due to typhoidal *Salmonella*: a decade of observation at an urban and a rural diarrheal disease hospital in Bangladesh.** *BMC Infectious Diseases*. v.14, p.1-8, 2014.

DE JONG, H.K.; PARRY, C.M.; VAN DER POLL, T. e WIERSINGA, W.J. **Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis.** *PLoS Pathogens*. v.8, p.e1002933, 2012.

DE LEBLANC A. M; CASTILLO N. A, PERDIGON, G. **Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection.** *Int J Food Microbiol*, v. 138, p. 223-31, 2010.

DIOSMA, G.; ROMANIN, D.E.; REY-BURUSCO, M. F.; LONDERO, A.; GARROTE, G. L. **Yeasts from kefir grains: isolation, identification and probiotic characterization.** *World J Microbiol Biotechnol*. v.9, p.1-12, 2013.

DONOHUE, D.; SALMINEN, S.; MARTEAU, P. **Safety of probiotic bacteria.** In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker. New York: Marcel Dekker, p. 369–384. 1998.

EDSALL, G.; GAINES, S.; LANDY, M.; TIGERTT, W.D.; SPRINZ, H.; TRAPANI, R.J.; MANDEL, A.D. e BENENSON, A.S. **Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella Typhi*.** *The Journal of Experimental Medicine*. v.112, p.143-166, 1960.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus* (2018).** Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em: 11/01/2018.

FALK, P.G; HOOPER, L.V; MIDTVEDT, T; GORDON, J.I. **Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 1301-1314, 1998.

FANG, H., ELINA, T., HEIKKI, A. AND SEPPO, S. **Modulation of humoral immune response through probiotic intake.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 29, 47-52, 2000.

FAO/WHO, **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report ,1-11, 2002

FAGARASAN S, KAWAMOTO S, KANAGAWA O, *et al.* **Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis.** *Annu Rev Immunol.* 28:243–73. 2010.

FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M. **Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system.** *Microbes Infect*,v. 13, p. 1121-32, 2011.

FARNWORTH, E.R. **Kefir: from folklore to regulatory approval.** *J. Nutraceut. Funct. Med. Foods.* 1, 57-68. 1999.

FARNWORTH, E.R. **Kefir-a complex probiotic.** *Food Sci. Technol. Bull.: Funct. Foods.* 2, 1–17. 2006

FATHI, Y.; GHODRATI, N.; ZIBAEENEZHAD, M. J.; FAGHIH, S. **Kefir drink causes a significant yet similar improvement in serum lipid profile, compared with low-fat milk, in a dairy-rich diet in overweight or obese premenopausal women: A randomized controlled trial.** *J Clin Lipidol.* v.11, p.136-146, 2017.

FEARNLEY, E.; RAUPACH, J.; LAGALA, F. e CAMERON, S. **Salmonella in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008.** *International Journal of Food Microbiology.* v.146, p.219-227, 2011.

FEASEY, N.A.; DOUGAN, G.; KINGSLEY, R.A.; HEYDERMAN, R.S. e GORDON, M.A. **Invasive non-typhoidal Salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa.** *The Lancet.* v.379, p.2489-2499, 2012.

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

FONSECA, V.M.B. ; MILANI, T. H.M.S.; PRADO, R; BONATO, V.L.D.; RAMOS, S.G.; MARTINS, F. S. ; VIANNA, E.O.; BORGES, M.C. **Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice.** *RESPIROLOGY*, v. 22, p. 905-912, 2017.

FRANSEN, F; ZAGATO, E; MAZZINI, E. *et al.* **BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity.** *Immunity*;43:527–40. 2015

FUKUDA, S.; TOH, H.; HASE, K.; OSHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; YOSHIMURA, K.; TOBE, T.; CLARKE, J.M.; TOPPING, D.L.; SUZUKI, T.; TAYLOR, T.D.; ITOH, K.; KIKUCHI, J.; MORITA, H.; HATTORI, M.; OHNO, H. **Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate.** *Nature*, v. 469, p. 543-549, 2011.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals.** *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, p. 365–369, 1989.

FURUKAWA N., MATSUOKA A., TAKAHASHI T., YAMANAKA Y. **Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice.***J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 43, 450-453. 1990.

FURUKAWA, N., A. MATSUOKA, T. TAKAHASHI, AND Y. YAMANAKA. **Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A.***Anim. Sci. Technol.* 62, 579-585. 1991.

GACKOWSKA, L.; MICHALKIEWICZ, J.; KROTKIEWSKI, M.; *et al.* **Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells.** *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 57, 2006

GALDEANO, C. M.; DE MORENO DE LEBLANC, A. VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. **Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria.** *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 5, p. 485–492, 2007

GALVÃO, M. F. **ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS DA MICROBIOTA FECAL HUMANA CONTRA ENTEROPATÓGENOS.** 107f. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

GALVÃO, M.F; PRUDÊNCIO, C.V; VANETTI, M.C.D. **Stress enhances the sensitivity of *Salmonella* serovar Typhimurium to bacteriocins.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p. 1137-1143, 2015.

GALVÃO, M.F. ; BASTOS, R.W.; ACURCIO, L.B.; NASCIMENTO, B.B.; SANDES, S.H.C.; ARANTES, R.M.E.; SOUZA, M.R.; MARTINS, F.S.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. **Evaluation of colonisation resistance in stool of human donors using *ex vivo*, *in vitro* and *in vivo* assays.** *Beneficial Microbes*, v. 8, p. 217-230, 2017.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes.***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, release 5.0. New York: Springer-Verlag. 2004.

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L. **Preservation of kefir grain a comparative study.** *Lebensmittel-WissenschaftTechnologie*.3, 77-84. 1997.

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L. **Chemical and microbiological characterization of kefir grains.** *Journal of Dairy Research*, 6: 639–652, 2001.

GARROTE GL, ABRAHAM A.G e DE ANTONI G.L. **Microbial interactions in kefir: a natural probiotic drink.** In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. p. 327–340. 2010

GILL, H. S. **Stimulation of the immune system by lactic cultures.** *International Dairy Journal*, n. 8, p. 535–544, 1998.

GILLILAND, S. E., KIM, H. S. **Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans** .*J. Dairy Sci.* 67, 1-6. 1984.

GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R. AND MATHIEU, C. **An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.** *Methods*, v.25, p.386-401, 2001.

GOLOWCZYC M., MOBILI P., GARROTE G.L., ABRAHAM A.G., DE ANTONI G.L. **Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.** *Int J Food Microbiol.* 118, 264–273. 2007.

GOMES-SANTOS, A.C.; OLIVEIRA, R.P ; MOREIRA, T.G.; CASTRO-JUNIOR, A.B.; HORTA, B.C.; LEMOS, L. ; ALMEIDA, L.A.; REZENDE, R.M. ; CARA, D.C.; Oliveira, S.C.; Azevedo, V.A.C ; MIYOSHI, A.; FARIA, A.M. **Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways.** *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1-12, 2017.

GONZALEZ-ESCOBEDO, G. e GUNN, J.S. **Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage.** *Infection and Immunity*. v.81, p.2920-2930, 2013.

GORDON, M.A. ***Salmonella* infections in immunocompromised adults.** *Journal of Infection*. v.56, p.413-422, 2008.

GRASSL, G.A.; FINLAY, B. B. **Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections.** *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 24, p. 22-26, 2008.

GRIMONT, P.A.D. e WEILL, F. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars.** 9 th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France, 2007. Disponível em: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_En.pdf.

GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI, I.; MINUZZO, M.; ARIOLI, S.; PARINI, C.; COMELLI, E.; MORA, D. **Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines.** *Current Microbiology*, v. 59, p. 167-172, 2009.

GUNN, J.S.; MARSHALL, J.M.; BAKER, S.; DONGOL, S.; CHARLES, R.C. e RYAN, E.T. ***Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence.** *Trends in Microbiology*. v.22, p.648-655, 2014.

GUTZEIT, C; MAGRI, G; CERUTTI, A. **Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction.** *Immunol Rev.* v. 260:76–85.2014.

GUVEN, A., GULMES, M. **The effect of Kefir and vitamin E-supplemented diets on the activities of GSH-Px, GST, CAT, and LPO levels in mice tissues.** *Journal of Veterinary Medicine B.* 50, 412-416. 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; **Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir.** *J. Dairy Sci.* 83:275, 2000.

HARAGGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. **Salmonellae interplay with host cells.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 53-66, 2008.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biology*, v. 8, R19, p. 1-14, 2007.

HERSH, D.; MONACK, D. M.; SMITH, M. R.; GHORI, N.; FALKOW, S. ZYCHLINSKY, A. **The Salmonella invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 2396-2401, 1999.

HERTZLER, S.R. E CLANCY, S.M. **Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion.** *Journal of the American Dietetic Association.* v, p.103, 582 -587, 2003.

HOFFMANN, S.; BATZ, M.B. e MORRIS JR, J.G. **Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens.** *Journal of Food Protection.* v. 75, p.1292-1302, 2012.

HONDA K, LITTMAN D. R. **The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease.** *Nature.* ; v. 535:75–84. 2016

HOPKINS, S. A.; NIEDERGANG, F.; CORTHESEY-THEULAZ, I. E.; KRAEHENBUHL, J.P. **A recombinant Salmonella Typhimurium vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer 's patch dendritic cells.** *Cellular Microbiology*, v. 2, p. 59-68, 2000.

IMANISHI, M. e CHAI, S.J. **Salmonellosis (Nontyphoidal).** *CDC Health Information for International Travel 2014: The Yellow Book.* pp.285, 2013.

INAMINE, T e SCHNABEL, B. **Immunoglobulin A and liver diseases.** *J Gastroenterol.* p 1 – 10. 2017.

IRAPORDA, C.; ABATEMARCO, M. J.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L. **Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens.** *Journal of Dairy Research.* v. 84, p. 339-345, 2017.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I. e WEILL, F. **Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme.** *Research in Microbiology*. v.165, p.526-530, 2014.

JACKSON, B.R.; GRIFFIN, P.M.; COLE, D.; WALSH, K.A. e CHAI, S.J. **Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008.** *Emerging Infectious Diseases*. v.19, p.1239-1244, 2013.

JOHNSON-HENRY, K.C., HAGEN, K.E., GORDONPOUR, M., TOMPKINS, T.A., SHERMAN, P.M. **Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells.** *Cell Microbiol* 9, 356–367. 2007.

JOHN, S. M. E DEESEENTHUM, S. **Properties and benefits of kefir–A review.** *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*.v. 37, p.275–282. 2015.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12º edição. Editora Guanabara Koogan, p.319, 2013.

KECHAGIA, M. BASOULIS, D. KONSTANTOPOULOU, S. DIMITRIADI, D. GYFTOPOULOU, K. SKARMOUTSOU, N. FAKIRI, E.M. **Health benefits of probiotics: a review.** *I. Nutr.* v.2, p.48-65. 2013

KHAN, S. A.; EVEREST, P.; SERVOS, S.; FOXWELL, N.; ZÄHRINGER, U.; BRADE, H.; RIETSCHER, E. T.; DOUGAN, G.; CHARLES, I. G.; MASKELL, D. J. **A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections.** *Mol. Microbiol.*, V. 29, p. 571–579, 1998.

KHANAM, F.; SAYEED, M.A.; CHOUDHURY, F.K.; SHEIKH, A.; AHMED, D.; GOSWAMI, D.; HOSSAIN, M.L.; BROOKS, A.; CALDERWOOD, S.B.; CHARLES, R.C.; CRAVIOTO, A.; RYAN, E.T. e QADRI, F. **Typhoid fever in young children in bangladesh: clinical findings, antibiotic susceptibility pattern and immune responses.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v.9, e0003619, 2015.

KLAVER, F. A. M., VAN DER MEER, R. **The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity.** *Appl. Environm. Microbiol.*59, 1120-1124. 1993.

KOEBNICK, C.; WAGNER, I.; LEITZMANN, P.; STERN, U.; ZUNFT HJ. **Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation.** *Can J Gastroenterol*. v. 17, p. 655-9, 2003.

KRAUS, M.D.; AMATYA, B. e KIMULA, Y. **Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings.** *Modern Pathology*. v.12, p.949-955, 1999.

- LAMAS, A.; MIRANDA, J. M.; REGAL, P.; VÁZQUEZ, B.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. **A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*.** *Microbiol Res.* v.206, p.60-73, 2018.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. **Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 72, p. 728–764, 2008.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. **Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens.** *Nature Rev. Microbiol.*, v. 8, p. 171–184, 2010.
- LEBLANC, A. M, CASTILLO, N. A, PERDIGON, G. **Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection.** *Int J Food Microbiol.* v.138, p.223-31, 2010
- LEE, Y.K; SALMINEN, S. **The coming age of probiotics.** *Trends Food Sc. Technol.*, v. 6, p. 241-245. 1995.
- LIN, C.W., CHEN, H.L., LIU, J.R. **Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan.** *Aust. J. Dairy Technol.* 54, 14-18, 1999.
- LIONG, M. **Probiotics: A Critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments.** *Nutrition Reviews*, v. 65, p. 316-328, 2007.
- LIU, J., A, P., MOON, N. J. **Kefir a “new” fermented milk product.** *Cult.Dairy Prod. J.* 83, p.11-12. 1983.
- MAASSEN, C. B.; VAN HOLTEN-NEELEN, C.; BALK, F.; DEN BAK-GLASHOUWER, M. J.; LEER, R. J.; LAMAN, J. D.; BOERSMA, W. J.; CLAASSEN, E. **Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains.** *Vaccine*, v. 18, p. 2613-2623, 2000.
- MACIEL, F. R.; PUNARO, G. R.; RODRIGUES, A. M.; BOGSAN, C. S.B.; ROGERO, M. M.; OLIVEIRA, M. N.; MOURO, M. G.; HIGA, E. M.S. **Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats.** *Clinical Nutrition*, v. 35, p.1066-1072. 2016.
- MAJOWICZ, S.E; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. e INTERNATIONAL COLLABORATION ON ENTERIC DISEASE 'BURDEN OF ILLNESS' STUDIES. **The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis.** *Clinical Infectious Diseases.* v.50, p.882-889, 2010.
- MAKI, R.; MATSUKAWA, M.; MATSUDUKA, A.; HASHINAGA, M.; ANAI, H.; YAMAOKA, Y.; HANADA, K.; FUJII, C. **Therapeutic effect of lyophilized, Kefir-**

fermented milk on constipation among persons with mental and physical disabilities. *Jpn J Nurs Sci.* V. v.10, p.71-89, 2017.

MANDAL, H.; BAGCHI, T. **In Vitro Screening of Indigenous *Lactobacillus* Isolates for Selecting Organisms with Better Health-Promoting Attributes.** *Appl Biochem Biotechnol.*, 2018.

MANTIS, N.J; ROL, N; CORTHE´S, Y.B. **Secretory IgA’s complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut.** *Mucosal Immunol.* 4:603–11. 2011.

MARSHALL ,V. M. **Starter cultures for milk fermentation and their characteristics.** *Journal of the Society of Dairy Technology.*46, 49-56, 1993.

MARTEAU, P., POCHART, P., BOUHNİK, Y., RAMBAUD, J.C., **Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract.** *World Rev. Nutr. Diet.* 74, 1–21. 1993.

MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. **Utilização de leveduras como probióticos.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, p. 1-13, 2005a.

MARTINS, F.S., NARDI, R.M.D., ARANTES, R.M.E., ROSA, C.A., NEVES, M.J., NICOLI, J.R., **Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51, 83–92. 2005b.

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.** *J. Med. Microbiol.* 56, 352–359. 2007.

MARTINS, F.S.; SILVA, A.A.; VIEIRA, A.T.; BARBOSA, F.H.F.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. **Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties.** *Archives of Microbiology*, v. 191, p. 623-630, 2009.

MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. et al. **Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection.** *Plos One*, v. 5. e8925. doi:10.1371/journal.pone.0008925, 2010.

MARTINS, F.S.; ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TIAGO, F.C.P.; MARTINS, A.K.S.; SILVA, F.C.P.; SOUZA, E.L.S.; SOUSA, L.P.; ARAÚJO, H.R.C.; PIMENTA, P.F.; BONJARDIM, C.A.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. **Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune response and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine modelo of typhoid fever.** *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 359-364, 2011.

MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A. ; ARANTES, R. M. E. ; TIAGO, F. C. .P. ; SOUSA, L. P.; ARAÚJO, H. R. C. ; PIMENTA, P. F. ; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J. R. ; TEIXEIRA, M. M. . **Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice.** *Microbes and Infection* , v. 15, p. 270-279, 2013.

MASTROENI, P.; GRANT, A. J. **Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, e12, 2011.

MILLEDDGE, J.; CALIS, J.C.; GRAHAM, S.M.; PHIRI, A.; WILSON, L.K.; SOKO, D.; MBVWINJI, M.; WALSH, A.L.; ROGERSON, S.R. e MOLYNEUX, M.E. **A etiology of neonatal sepsis in Blantyre, Malawi: 1996–2001.** *Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health*. v.25, p.101-110, 2005.

MOLYNEUX, E.M.; MANKHAMBO, L.A.; PHIRI, A.; GRAHAM, S.M.; FORSYTH, H.; PHIRI, A.; WALSH, A.L.; WILSON, L.K. e MOLYNEUX, M.E. **The outcome of non-typhoidal *Salmonella* meningitis in Malawian children, 1997–2006.** *Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health*. v.29, p.13-22, 2009.

MORTON, R.D. **Aerobic Plate Count.** In *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods*. Ed. Downes, F.P and Ito, K.pp 63-67. Washington, DC: American Public Health Association. 2001.

MURASE, T.; YAMADA, M.; MUTO, T.; MATSUSHIMA, A. e YAMAI, S. **Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following a food-borne outbreak.** *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, p.3495-3497, 2000.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 483. 2014.

NAGIRA T., NARISAWA J., TERUYA K., KATAKURA Y., SHIM S., KUSUMOTO K., TOKUMARU S., TOKUMARU K., BARNES D.W. SHIRAHATA S. **Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir .***Cytotechnology*, 40, 125–137. 2002.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. **Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB).** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 39, p. 13–126, 1999.

NAITO, S.; KOGA, H.; YAMAGUCHI, A.; FUJIMOTO, N.; HASUI, Y.; KURAMOTO, H.; IGUCHI, A.; KINUKAWA, N. **Prevention of recurrence with epirubicin and *Lactobacillus casei* after transurethral resection of bladder câncer.** *J Urol*, v. 179, p.485-90, 2008.

NALBANTOGLU, U., CAKAR, A., DOGAN, H., ABACI, N., USTEK, D., SAYOOD, K.. **Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains.** *Food Microbiol.* v. 41, p. 42–51, 2014.

NARDI, R.M.D.; SANTORO, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; PIMENTA, A.M.C.; FERRAZ, V.P.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. **Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 649-656, 2005.

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 germ-free mice.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

NEUMANN, E.; MARTINS, F. S.; SOUZA, D. G.; VIEIRA, A. T.; FAGUNDES, C. T.; MADEIRA, M. F. M.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, L. Q. NICOLI, J. R. **Obtenção, características e utilização do modelo animal gnotobiótico.** *Microbioma, disbiose, probióticos e bacterioterapia*. Capítulo 1, p. 1-13, 2017.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S.C. **Mechanisms of action of probiotics: recent advances.** *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 15, n. 2, p. 300-310. 2009.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. **Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo.** *Ciência Hoje*, v. 28, p. 34-38, 2000.

NICOLI, J.R.; ELIAN, S. D.; PAULA, L.M.; SOUZA, E.L.; VIEIRA, A.T.; GARCIA, C.C.; TEIXEIRA, M.M.; ARANTES, R.M.; MARTINS, F.S. ***Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, p. 201-210, 2016.

OBERMAN, H.; LIBUDZISZ, Z. **Fermented milks.** In: Wood, B. J. B. (ed.). *Microbiology of fermented foods*, 2 ed. Londres: Blakie Academic & Professional, cap. 11, p. 308-350, 1998.

O'BRIEN, K. V.; STEWART L. K.; FORNEY, L. A.; ARYANA, K. J.; PRINYAWIWATKUL, W.; BOENEKE, C. A. **The effects of postexercise consumption of a kefir beverage on performance and recovery during intensive endurance training.** *J Dairy Sci*, v.98, p. 46-59, 2015.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M. e ALMEIDA, R.A. **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications.** *Foodborne Pathogens & Disease*. v. 2, p.115-129, 2005.

OTTE, J. M.; PODOLSKY, D. K. **Functional modulation of enterocytes by Gram-positive and Gram-negative microorganisms.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 286, p. G613–G626, 2004.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. **The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria.** *International Dairy Journal*, n.8, p.749–758, 1998.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. **Probiotics: an overview of beneficial effects.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 82, p. 279-289, 2002.
p. 569–580, 1997.

PADGETT, E. L.; PRUETT, S. B. **Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun*, n. 186, p.775–781, 1992.

PAIVA, I. M.; STEINBERG, R. S.; LULA, I.S.; SOUZA-FAGUNDES, E.M ; MENDES, T.O.; BELL, M.J.V.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C.; NEUMANN, E. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology*, v. 72, p. 390-398, 2016.

PARRY, C.M.; HIEN, T.T.; DOUGAN, G.; WHITE, N.J. e FARRAR, J.J. **Typhoid fever**. *New England Journal of Medicine*. v.347, p.1770-1782, 2002.

PARRY, C.M.; THOMPSON, C.; VINH, H.; CHINH, N.T.; HO, V.A.; HIEN, T.T.; WAIN, J.; FARRAR, J.J. e BAKER, S. **Risk factors for the development of severe typhoid fever in Vietnam**. *BMC Infectious Diseases*. v.14, p.73, 2014.

PERDIGÓN, G.; GALDEANO, M. C; VALDEZ, J. C.; MEDICI, M. **Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system**. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 564, p. 21–26, 2002.

PFEFFER, K. **Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors**. *Cytokine Growth Factor Ver.* v. 14, p. 185-91, 2003.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. **1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans***. *Bioresour Technol.* v. 119, p.133-140, 2012.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. **Genetic engineering of *Lactobacillus diolivorans***. *FEMS Microbiol Lett*.v. 344, p. 152-158, 2013.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. **Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans***. *Bioresour Technol*. v. 152, p. 499-504, 2014.

PLANT, L.; CONWAY, P. **Association of lactobacillus spp. With Peyer's patches in mice**. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(2), 320-324. 2001.

PLAZA-DÍAZ, J.; RUIZ-OJEDA.; GIL-CAMPOS, M.; ANGEL, G. **Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases**. *Nutrients*. v. 10, p.1-20, 2018.

PLEASANTS, J. R. **Gnotobiotics**. In: MELBY, E.C.; ALTMAN, N, H. (eds) *Handbook of laboratory animal science*. CRC Press, Cleveland, p.119–174, 1974.

PODOPRIGORA, G. I. ; NEUMANN, E. . **The probiotics stimulative action on the hosts mononuclear phagocyte system in mice with different microbial and immune status**. *Baltic Journal of Laboratory Animal Science*, v. 7, p. 12-20, 1997.

PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C. et al. **Salmonella: a foodborne pathogen**. *International Food Research Journal*, n. 18, p. 465-473, 2011.

RAMARE, F., NICOLI, J. R., DABARD, J., CORRING, T., LADIRE, M., GUEUGNEAU, A., RAIBAUD, P. **Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and *in vitro*.** *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 2876-2883. 1993.

RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, H.S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. **Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, p. 145-152, 2005.

RATTRAY, F.P. e CONNELL, M.J. **Fermented Milks Kefir.** In: Fukay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2th ed. Academic Press; San Diego, U.S.A., p. 518-524.0. 2011.

RAUPACH, B.; PEUSCHEL, S. K.; MONACK, D. M.; ZYCHLINSKY, A. **Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection.** *Infection and Immunity*, v. 74, p. 4922-4926, 2006.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. **Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract.** *Inflammopharmacology*, vol. 13, n.5-6, p. 485-492, 2005.

ROSA, D.D.; GRZEŚKOWIAK, Ł.M.; FERREIRA, C. L.; FONSECA, A. C.; REIS, S. A.; DIAS, M. M.; SIQUEIRA, N. P.; SILVA, L. L.; NEVES, C. A.; OLIVEIRA, L. L.; MACHADO A. B.; PELUZIO, M. C. **Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome.** *Food Funct.* v. 10, p. 3390-401, 2016.

ROSA, D.D.; GRZEŚKOWIAK, Ł.M.; REIS, S. A.; DIAS, M. M.; SIQUEIRA, N. P.; SILVA, L. L.; PELUZIO, M. C **Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits.** *Nutr Res Rev.*v.30, p.82-96. 2017.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; HATTO, J.; MATTILA SANDHOLM, T. **Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.** *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 197-15, 2000.

SALEZ, L.; MALO, D. **Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections.** *Medicine Science (Paris)*, v. 20, p. 1119-1124, 2004.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM. **Demonstration of safety of probiotics: a review.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, p. 93-106, 1998a.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.-C.; CUMMINGS, J.H.;FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBER-FROID, M.; ROWLAND, I.; **Functional food science and gastrointestinal physiology and function.** *Br. J. Nutr.*, v. 80, p. S147–S171, 1998b.

SALVETTI, E.; TORRIANI,S.; FELIS, G.E. **The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update.** *Probiotics & Antimicro.* v. 4, p. 217–226, 2012.

SANTOS, C. M. A.; PIRES, M. C. V.; LEÃO T.L.; SILVA A. K. S.; MIRANDA, L. S, MARTINS F. S, SILVA, A. M, NICOLI, J. R.**Anti-inflammatory effect of two Lactobacillus strains during infection with Gardnerella vaginalis and Candida albicans in a HeLa cell culture model.** *Microbiology*, 2018.

SANTOS, R. L. **Pathobiology of Salmonella, Intestinal Microbiota, and the Host Innate Immune Response.** *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 252, 2014.

SANTOS, L.M.; SANTOS, M.M.; SOUZA, S.; PEREIRA, H; ARANTES, R..M.E.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; **Monoassociation with probiotic Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against Listeria monocytogenes infection.** *Medical Microbiology and Immunology*, v. 200, p. 29-38, 2011.

SARKAR, S. **Biotechnological innovations in kefir production: a review.** *British Food J.*, 110(3). 283-295, 2008.

SARTOR, R.B. **Microbial factors in Crohn’s disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation**, p.96-124, 1995. In KIRSTNER, J.B; SHORTER, R.G (ed.). *Inflammatory Bowel Diseases*, 4th ed. The Willians & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1995.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L. e GRIFFIN, P.M. **Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens.** *Emerging Infectious Diseases.* v.17, p.7-15, 2011.

SCHNEITZ C., NUOTIO L., LOUNATMA K. 1993.**Adhesion of Lactobacillus acidophilus to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer).***Journal of Applied Bacteriology*, 74, 290–294. 1993.

SHARIFI, M., MORIDNIA, A.,MORTAZAVI, D., SALEHI, M., BAGHERI, M., SHEIKHI, A. **Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties.** *Med Oncol.*v.11, p.27-34. 2017.

SHORTT, C. **The probiotic century: historical and current perspectives.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 411-417, 1999.

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).

SILVA, S. H., VIEIRA, E. C., DIAS, R. S., NICOLI, J. R. **Antagonism against *Vibrio cholerae* by a diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota.** *J. Med. Microbiol*, 50: 161-164. 2001.

SILVA, B.C., SANDES, S.H.C., ALVIM, L.B., BOMFIM, M.R.Q., NICOLI, J.R., NEUMANN, E. AND NUNES, A.C. **Selection of a candidate probiotic strain of *Pediococcus pentosaceus* from the faecal microbiota of horses by in vitro testing and health claims in a mouse model of *Salmonella* infection.** *Journal of Applied Microbiology*, v.122, p.225-238. 2017.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A. *et al.* **Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, p. 1–6, 2002.

SOUZA, T.C. ; ZACARÍAS, M.F. ; SILVA, A.M. ; BINETTI, A. ; REINHEIMER, J.; NICOLI, J.R. ; VINDEROLA, G. . **Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks.** *Journal of Applied Microbiology* , v. 112, p. 1184-1192, 2012.

SMITH, K., MCCOY, K.D., MACPHERSON A.J. **Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota.** *Sem. Immunol.*, v. 19, p. 59–69, 2007.

SOUZA, D.G. e TEIXEIRA, M.M. **The balance between the production of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion.** *Mem Ins Oswaldo Cruz*, v. 100, p.59-66, 2005.

STEINBERG, R.S. ; LIMA, M. ; GOMES DE OLIVEIRA, N.L. ; MIYOSHI, A. NICOLI, J.R. ; NEUMANN, E. ; NUNES, A.C. . **Effect of intestinal colonisation by two *Lactobacillus* strains on the immune response of gnotobiotic mice.** *Beneficial Microbes*, v. 5, p. 409-419, 2014.

STRUGNELL, R. A. e WIJBURG, O.L.C. **The role of secretory antibodies in infection immunity.** *Nat Rev Microbiol.* v.8, p.656–67. 2010.

SUN, T.C; LANIER, L.L. **NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells.** *Nature Reviews Immunology.* v.11, p.645-745, 2011.

TAKIZAWA, S., KOJIMA, S., TAMURA, S., FUJINAGA, S., BENNO, Y., NAKASE,T. **The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains.***Syst. Appl. Microbiol.* 21, 121–127.1998.

THOREUX, K., SCHMUCKER, D.L. **Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats.** *Journal of Nutrition*, 131, 807–812, 2001.

TIAGO, F. C.; MARTINS, F. S.; SOUZA, E. L.; PIMENTA, P. F.; ARAUJO, H. R. ; CASTRO, I.M. ; BRANDAO, R. L.; NICOLI, J. R.. **Adhesion on yeast cell surface as a trapping mechanism of pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, p. 1194-1207, 2012.

TIAGO, F.C.P.; PORTO, B.A.A.; RIBEIRO, N.S.; MOREIRA, L.M.C.; ARANTES, R.M.E.; VIEIRA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; GENEROSO, S.V.; NASCIMENTO, V.N.; 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.

TU, M.Y.; CHEN, H. L.; TUNG, Y. T.; KAO, C.C.; HU, F. C.; CHEN, C. M. **Short-Term Effects of Kefir-Fermented Milk Consumption on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in a Randomized Clinical Trial of Osteoporotic Patients.** *PLoS One*. v.10, 9.14-23, 2015.

VASCONCELLOS, 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*, São Paulo, v. 34, n.Supl. 1, p. 21-24, 2003.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. **Probiotics - From Metchnikoff to bioactives.** *International Dairy Journal*, v. 18, p. 714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. **DNA based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species.** *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

VAUGHAN, E. E., MOLLET, B.; VOS, W. M. **Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 10, p. 505–510, 1999.

VILLANOEVA, C.N.B. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de kefir e da atividade biológica da bebida, de *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes grãos e exopolissacarídeos.** 136f. Tese (doutorado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J. THANGAVEL, D. et al. **Immunomodulating capacity of kefir.** *Journal of Dairy Research*, n.72, p. 195–202, 2005.

VINDEROLA, C.G., PERDIGÓN, G., DUARTE, J., THANGAVEL, D., FARNWORTH, E., MATAR, C. **Effects of kefir fractions on innate immunity.** *Immunobiology* 211, 149–156. 2006.

VINDEROLA, G.; PERDIGÓN, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C.; **Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity.** *Cytokine*, v. 36, p. 254-260, 2007.

VOETSCH, A.C.; VAN GILDER, T.J.; ANGULO, F.J.; FARLEY, M.M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; DENEEN, V.C.; TAUXE, R.V. e EMERGING INFECTIONS PROGRAM FOODNET WORKING GROUP. **FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States.** *Clinical Infectious Diseases*. v.38, p.127-134, 2004.

WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T.J. **Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains.** *Int. J. Dairy Technol.* 57, 33-37. 2004.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. **Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454.** *Journal of Food Protection*, v. 6, p. 47-51, 1998.

YU, J.; WANG, W. H.; MENGHE, B. L. G.; JIRI, M. T.; WANG, H. M. LIU, W. BAO, H, LU, Q.; ZHANG, J. C.; WANG, F.; XU, H. Y.; SUN, T. S; ZHANG, H. P. **Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia.** *J. Dairy Sci.* v. 94, p. 3229–3241, 2011.

ZACCONI, C., PARISI, M.G., SARRA, P.G., DALLAVALLE, P. **Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks.** *Microbiol Aliments Nutrition*, 12, 387–390. 1995.

ZAMBERI, N.R; ABU, N; MOHAMED, N. E, NORDIN N; KEONG, Y. S; BEH, B. K; ZAKARIA Z. A; NIK ABDUL RAHMAN, N. M; ALITHEEN, N. B. **The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells.** *Integr Cancer Ther.* V. 3 p. 53-64. 2016

ZANIRATI, D.F ; ABATEMARCO, M.J ; SANDES, S.H.C ; NICOLI, J.R ; NUNES, A.C ; NEUMANN, E . **Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures.** *Anaerobe* (London) v. 32, p. 70-76, 2015.

10. ANEXOS

10.1 Artigo publicado

IRAPORDA, C.; ABATEMARCO, M. J.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L. **Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens.** *Journal of Dairy Research*. v. 84, p. 339-345, 2017.

10.2 Artigo submetido

International Journal for Parasitology

The *in vitro* association of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (S.Typhimurium) with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* increase the gene expression of amebic virulence factors.

Fabrício Marcus Silva Oliveira^{a,b,1}, Sávio Henrique de Cicco Sandes^d, Luana Oliveira Prata^b, **Mario Abatemarco Junior^c**, Ana Cláudia de Carvalho Fernandes^b, Elisabeth Neumann^c, Álvaro Cantini Nunes^d, Maria Aparecida Gomes^e, Marcelo Vidigal Caliar^{b,*}

Author details

^{a,1} Postgraduate Program in Pathology, Institute of Biological Sciences of the Federal University. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^b Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^d Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^e Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

10.3 Artigo a ser submetido

***Lactobacillus diolivorans* 1Z isolated from Brazilian kefir grain as a new promising probiotic strain.**

Mário Abatemarco Júnior¹, Sávio H. C. Sandes², Mayra Fernanda Ricci³, Rosa Maria Esteves Arantes³, Alvaro C. Nunes², Jacques R. Nicoli¹, Elisabeth Neumann^{1*},

¹Departamento de Microbiologia, ²Departamento de Biologia Geral, and ³Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Running title: Probiotic properties of *L. diolivorans* 1Z

*Proofs to be sent to the corresponding author: Elisabeth Neumann, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Phone: (+55) 31 34092737; Fax: (+55) 31 34092731; E-mail: enemann@icb.ufmg.br

Abstract

Kefir is a fermented beverage obtained by the double fermentation (alcoholic and acidic) of the milk or sugar solution by the bacteria and yeasts present in the kefir grains. Several health benefits have been attributed to the intake of kefir and part of them can be attributed to *Lactobacillus* species present in the. Therefore, the aim of this work was to verify the probiotic potential *in vivo* of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, isolated from brazilian kefir grains and previously characterized as a potentially probiotic by *in vitro* assays. Initially, conventional mice treated daily or not with a suspension of lyophilized cells of *L. diolivorans* 1Z were orally challenged with *Salmonella* Typhimurium. The daily oral administration of lyophilized culture of *L. diolivorans* 1Z resulted in survival of 70% of animals after the challenge with the pathogen and weight gain throughout the evaluated period. Then germ-free mice were monoassociated with *L. diolivorans* 1Z and after seven days were challenged orally with *S. Typhimurium* (PS Group). Germ-free challenged with *S. Typhimurium* were used as control (CS group). *Salmonella* count in the faeces of the animals of the group PS was statistically lower from the fourth day of infection when compared to the CS group ($P < 0.05$). Histopathological analysis revealed less damage to the ileum mucosa, proven by the smallest perimeter of major lesions attributed to the infection in the animals of the PS group in comparison to the group CS ($P < 0.05$) on the eighth day of infection. These findings were accompanied by a lesser expression of the inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α in the intestinal tissue. The translocation of *S. Typhimurium* to liver of the PS animals was smaller than group CS ($P < 0.05$), achieving undetectable levels after the sixth day of infection which could be explained by the increase in secretion of IgA in intestinal content and by an apparent increase in the number of K upffer cells. No differences were detected on cellularity in liver between PS and CS groups ($p > 0.05$) -which indicates that treatment with *L. diolivorans* 1Z was unable to

diminish the inflammatory infiltrates for the aforementioned organ. However, the qualitative analysis of the liver revealed that the profile of inflammatory cells present in the group CS was predominantly polymorphonuclear, while in the PS group was predominantly mononuclear. Besides that, there was higher expression of IFN- γ , IL10 and TGF- β in PS group liver. As a result, the inflammatory response in the animals' liver of PS group was faster and more efficient for the decrease in the count of *S. Typhimurium* in the organ. The results of this work suggest that *L. diolivorans* 1Z is a safe promising probiotic strain that protects mice from death after challenge with *S. Typhimurium*, apparently by immunological mechanisms that deserve better characterization.

Keywords: *Lactobacillus diolivorans*, Kefir, probiotic characterization, gnotobiotic mice, *S. Typhimurium*

1. Introduction

Kefir is a fermented drink, acidic, lightly alcoholic, with a pH varying between 4.2 and 5.5, or smaller, obtained by the double fermentation (alcoholic and acid-acidosis) of the milk by the kefir grains (Garrote *et al.*, 2010). In the kefir grains a high microbiological diversity is found which includes yeast species, lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), acetic acid bacteria and other micro-organisms not yet described (Garrote *et al.*, 2001; Nalbantaglu *et al.*, 2014; Arslan, *et al.*, 2015).

Beneficial effects associated with kefir intake have already been demonstrated in several studies and there are evidences that many of these effects are attributed to the microorganisms that compose their microbiota (Vinderola *et al.*, 2005; Iraporda *et al.*, 2017; Zamberi *et al.*, 2016; Sharifi *et al.*, 2017). It makes the kefir grains an excellent source for obtaining new candidates for probiotics.

Lactobacillus species are present in many types of foods, such as yogurts, meats and derivatives, cheeses, fermented beverages, cereals, ice cream, butters and are part of the dominant microbiota from kefir grains. Due to their long history of use in food fermentation and absence of virulence factors, they are generally recognized as safe microorganisms for consumption (GRAS: *General Recognised As Safe*) and have been exploited as probiotics. In a previous work we have isolated and identified some *Lactobacillus* strains from Brazilian kefir grains, that were characterized as potential probiotic by *in vitro* tests. In those tests *L. diolivorans* 1Z was classified as resistant to gastric juice (% inhibition < 40.0%), bile salts tolerant (60% \geq % inhibition \geq 40%), with moderately hydrophobic surface (33% \leq MATS \leq 66%), it have presented antagonistic activity against several pathogens and profile of antimicrobial susceptibility typical to *Lactobacillus* species (Zaniratti *et al.*, 2015). This strain was able to resist to lyophilization process and produce a heteropolysaccharide that inhibit *S. Enteritidis* adhesion to caco-2 cells (Abatemarco Jr. *et al.*, manuscript in preparation).

In face of those results, the goal of this work was to test the effect of *L. diolivorans* 1Z in a gnotobiotic murine model of *S. Typhimurium* oral infection. We have demonstrated that this strain pass through gastrointestinal tract of gnotobiotic mice in high number, it has GRAS (generally recognised as safe) status and was able to reduce the intestinal damage caused by *S. Typhimurium* resulting in lower mortality after infection. As far as we know, it is the first demonstration of the probiotic potential of *L. diolivorans*.

2. Materials and methods

Animals and microorganisms

For the survival rate and weight variation experiments, conventional male mice of the BALB/C lineage were used, 21-23 days old obtained from the Central Laboratory of UFMG. For the other experiments, germ-free Swiss NIH mice from 21 to 23 days of age were used. The gnotobiotic mice were kept in flexible plastic isolators type Trexler (Standard Safety Equipment Co, Palatine, IL, USA) and handled according to the procedures described by Pleasants, 1974, adapted to our conditions (Silva, 1986). During the experiments, the mice were kept in micro-isolators (UNO Roestvaststaal B.V., Zavenaar, The Netherlands). Sterilised water and a commercial autocavable diet (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) was provided *ad libitum*. The conventional mice were kept in a ventilated shelf with humidity control (60-80%), Temperature (22-24°C) and received the same ration (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) and water *Ad libitum*. All animals were maintained in an animal house with controlled day/night cycle of 12 hours. All experimental procedures were carried out according to "the Brazilian directive for the care of animals for scientific and didactic purposes (DBCA)" of the National Council of Animal Experimentation (CONCEA, 2015) and have The Institutional Ethics Committee on Animal experimentation (CEUA/UFMG) approved all experiments under agreement number 96/2011 and 257/2016.

Lactobacillus diolivorans 1Z, previously isolated from water kefir grains was identified and submitted to preliminary probiotic characterization *in vitro* as described by ZANIRATTI *et al.*, 2015. The strain was freeze-dried in Skimmed Milk (Skim Milk, Difco, Sparks, USA) 10% p/V and kept under refrigeration until the use. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14,028, of human origin, was maintained at -80 °C in BHI (Brain Heart infusion) broth containing 20% glycerol. Prior to the administration of the animals it was grown in BHI broth for 18 h at 37 °C.

Gnotobiotic and conventional mice were intragastrically inoculated with 10^2 cfu and 10^5 cfu *S. Typhimurium*, respectively. (Silva *et al.*, 2004).

Conventional mice *S. Typhimurium* infection

Conventional mice were divided into 2 groups composed of ten animals each. One group received lyophilized *L. diolivorans* 1Z resuspended in the drinking water (10^7 UFC/ml), daily and *ad libitum*, and the other group (control) received water during the experimentation period. After ten days of pre-treatment, both groups received by intragastrical inoculation, a dose of 10^5 cfu of *S. Typhimurium*. The monitoring of weight and mortality was carried out for twenty-eight days after the challenge with the pathogen. The suspension of *L. diolivorans* 1Z was administered to animals throughout the trial time.

Gnotobiotic mice *S. Typhimurium* infection

Swiss germ-free mice received a single dose of 10^8 cfu lyophilized *L. diolivorans* 1Z (Probiotic/Group *Salmonella* -PS) or sterile water (control group *Salmonella* -CS) and, after seven days of monoassociation, both groups were orally challenged with 10^2 cfu of *S. Typhimurium*. The colonization capacity of *L. diolivorans* 1Z was evaluated by faecal enumeration on MRS agar, as described by Steinberg *et al.*, 2014. As controls were used a group of germ-free animals (GF Group) and a group of mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z, both not challenged with the pathogen (probiotic control group-CP). Four animals of each group were sacrificed, following the animal experimentation standards advocated by the grant, in different infection times (two, four, six and eight days). Spleen, liver, feces, intestinal content and portions of ileum were collected and properly prepared and packed for the realization of the pro and anti-inflammatory cytokine detection tests

(mRNA), histopathological analysis, enumeration of *S. Typhimurium* and dosage of sIgA. For the germ-free control group, the sacrifice of animals was carried out at the day ten after the beginning of the experiment.

S. Typhimurium antagonism *in vivo* and *ex vivo*

Before the sacrifice in the days two, four, six and eight post infection, the faeces of the mice were collected under aseptic conditions, weighted and suspended in sterile saline (0.9%) to obtain serial 10-fold dilutions. Ten Microliters of the 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} dilutions were spread onto MacConkey agar (Accumedia) and incubated at 37 °C for 48 h for enumeration of *Salmonella*. All determinations were made in triplicate. The results were expressed as log cfu/g faeces

The antagonistic effect *ex vivo* of *L. diolivorans* 1Z was carried out by the technique of diffusion in agar as described in Vasconcelos *et al.*, 2003. The test was carried out with samples from the four and seven days after monoassociation with the Lactobacillus. For this, the faeces of monoassociated mice were collected and placed in a plate containing MRS agar (Accumedia) and then incubated under refrigeration at 4 °C for 24 h. After this period, the contents were exposed to chloroform vapor (1 ML in filter paper) for 30 minutes when the plates were opened for evaporation of residual chloroform. A semi solid BHI inoculated with *S. Typhimurium* was plated over the MRS agar and was subsequently incubated at 37 °C for 18 h. The antagonism was detected by the presence of a growth inhibition zone around the faeces.

S. Typhimurium and *L. diolivorans* 1Z translocation to liver and spleen in gnotobiotic mice

In the days two, four, six and eight after the challenge with *S. Typhimurium*, the mice previously associated with *L. diolivorans* 1Z (PS Group) or not (group CS) were sacrificed, the spleen and liver were dissected under aseptic conditions, weighted, suspended in sterile saline and diluted separately. Ten Microliters of the 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions were spread onto MacConkey agar (Difco, Sparks, USA) and incubated at 37 °C for 48 h for enumeration of *Salmonella*. For groups that have received *L. diolivorans* 1Z and were not challenged by the pathogen (group CP), the same dilutions were spread onto MRS agar (Accumedia) and incubated at 37 °C for 48 h for enumeration of *Lactobacillus*. The results expressed in the Log of UFC/g organ. All determinations were made in triplicate. The results were expressed as log cfu/g organ.

Histopatological analysis

Samples of liver and ileum were collected from animals in each time (Two, four, six and eight days post infection). The livers were collected and fixed in buffered formaldehyde 10% before processing for inclusion in paraffin. The intestines were removed, the ileum was separated, opened and immediately contract in Bouin solution (formaldehyde: picric acid 1:4). The material was processed according to Arantes and Nogueira (1997). The samples were decoded only after the result report by the pathologist. The samples of liver and ileum of the groups CS and PS at the day eight post infection were photographed using the Olympus BX51 Direct light optical microscope equipped with the Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, MD, USA). For the liver were captured images of the regions most affected by the inflammatory infiltrated (20x objective) and for the histological study of the ileum, regions of intense inflammatory infiltrated in muscular, invading crypts and with destruction of the villi were classified as serious injuries. Regions with little infiltrated inflammatory, submucous edema and little crypt destruction were classified as mild lesions. The areas were documented in comparison to the total

perimeter (4x objective). All catches were made with resolution of 1392x1040 pixels and transferred via video camera color Cool SNAP-Proof color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) to a video system coupled to a computer. The quantitative analysis of cellularity was performed through the program KS300 (Zeiss, Jena, Germany). The result was expressed as number of cellular nuclei per mm². The total area perimeter for serious and mild injury was measured by the Image J program (version 1.47 F, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA – available online on the site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), the data being normalized and expressed as a percentage per affected area.

Cytokine mRNA expression

Two, four, six and eight days after infection with *S. Typhimurium*, Gnotobiotic mice of all groups (GF, CP, CS and PS) were sacrificed for relative quantification of the mRNA levels of the IL10 genes, TGF- β , IFN- γ and TNF- α (for ileum and liver), IL1 β and iNOS (for liver) according to Acurcio *et al.*, (2017), being used as a calibrator of the experiment the GF group. Fragments of the small intestine (proximal, medial and distal) and liver measuring 1-2 cm were collected from the animals, immersed in RNAlater (Ambion, Austin, Texas, USA) and kept in freezer-20 °c until the time of extraction of total RNA. The total RNA was extracted using Trizol (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, USA), following the manufacturer's recommendations. The isolated RNA was subjected to agarose gel 1% (w/V) electrophoresis for integrity evaluation and subsequently quantified in Nanodrop (Thermo Scientific, Inc., Bremen, Germany). Only total RNA samples with more than 200 mg/ml and a A260/A280 ratio between 1.7 and 2.1 were used. The genomic DNA was removed before the reverse transcription, performed with the High capacity cDNA Reverse transcription kit, both according to manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The resulting cDNA was amplified

by the chain reaction of the quantitative polymerase in real time (RT-qPCR) using the kit SYBR Green PCR Master Mix 2x, following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene-specific initiators for cytokines and ACTB reference genes (β -actin) and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) used as normalizers for the expression data are described by Acurcio *et al.* (2017). The levels of expression of the control group of germ-free animals were used as calibrators and the relative expression of mRNA for each cytokine was obtained by the derived relative quantification method (Hellemans *et al.*, 2007). The results were expressed as the average and standard deviation of the relative mRNA expression for each cytokine normalized by the expression level of the reference gene.

Intestinal secretory immunoglobulin type A

The levels of secreted immunoglobulins of type A (sIgA) in the intestinal contents of the mice were evaluated by the capture ELISA method, as described by Martins *et al.*, (2007). The small intestine of the mice was removed by cuts in the gastroduodenal and ileocecal joints, the intestinal fluid collected, weighed and diluted in the proportion of 500 mg of intestinal content to 2.0 ml of saline phosphate (PH 7.2), containing 1% (v/v) of protease inhibitor (P-8340, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA). The material was centrifuged at 2000 x g, for 30 minutes at 4 °C, the supernatant was collected and stored at -20 °C until the dosage day. All samples were tested in triplicate and the results were expressed as μg of IgA/g of intestinal content.

Statistical analysis

The results were analysed using GraphPad Prism Version 5 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA), being considered as statistical difference the values with significance level less than 5% ($P < 0.05$). The parametric variables were subjected to the analysis of

variance (ANOVA) followed by the Tukey test, for comparison of the averages, and the mortality curves were analyzed by the Log-Rank survival test.

3. Results

Oral administration of *L. diolivorans* 1Z to the mice improved the survival rate and reduced weight loss of the infected animals (Figure 1). The mortality was 100% for the control group at the end of the experiment and in the first week post infection (p.i.) 90% of mortality had already been observed. On the other hand, the animals of the group that received *L. diolivorans* 1Z had a survival of 70% at the end of 28 days of experiment, presenting no death after the day eight p.i..

Lactobacillus diolivorans 1Z achieved high levels of viable cells in the faeces of the monoassociated mice. The average count on the 4th and 7th day after the monoassociation were respectively 9.52 ± 0.03 and 9.59 ± 0.07 Log₁₀ UFC/g of faeces (data not shown), indicating that it was able to pass through the stressing conditions of gastrointestinal tract of germ-free animals and to stay at high population levels until the time of the challenge. This strain translocated from the intestines of the monoassociated animals to liver and spleen reaching values around 4.25 ± 0.93 and 5.58 ± 0.35 Log UFC/g organ, respectively, on the 9th and 11th day of monoassociation. After the 13th day the population levels of *L. diolivorans* 1Z in those organs fell to undetectable values by the method (< 3.00 log cfu/g) (Figure 2). Histopathological analysis demonstrated that the monoassociate mice did not show significant changes in the ileum, which presented villi and intestinal wall with normal aspects. The livers of these mice in turn, from the 9th day have showed discrete periportal foci of predominantly mononuclear infiltration with rare presence of eosinophils and discrete intrahepatic vessel congestion. On the 11th day,

discrete foci of infiltration were still highlighted. From the 13th day onwards the inflammatory infiltration was not visible and other signs of liver changes were absent.

The changes in the ileum of germ-free mice after two days of infection with *S. Typhimurium* (CS Group) were predominantly discrete edema of the *lamina propria*, whose epithelium presented vacuolization, flaking of the top of the villi and presence of some intraepithelial lymphocytes. These lesions have progressed with polymorphonuclear inflammatory infiltrates and epithelial necrosis, accompanied by *lamina propria* enlargement at the top of the villi (Figure 3A). The aspects on days 4th and 6th p.i. were progressive with the formation of typical plaques of necrosis of the submucosa and intense vilosity changes. On the 8th day p.i. more discreet lesions were noticed, with traces of epithelial regeneration (Figure 3C). The livers of CS group mice also presented progressive changes over time of infection, with injuries that began on day two, with infiltrated of mononuclear and polymorphonuclear cells restricted to small foci and with relative preservation of the parenchyma (Figure 4A). These findings became more intense and diffuse in the liver of animals sacrificed at four, six and eight days p.i., with large areas of necrosis accompanied by multiple foci of inflammatory polymorphonuclear infiltration (Figure 4C).

Mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z and infected with *Salmonella* (PS Group) presented at two days p.i. very discreet alterations of the ileum mucosa, with few superficial infiltrates and edema areas. Some animals did not show any noteworthy changes (Figure 3B). In the following days, we observed the preservation of the epithelium and, despite small areas with increased cellularity, the architecture was well preserved, indicating protection of the mucosa compared to the group CS at the same time. At day four, some animals did not present significant changes of the mucosa and the others presented normal architecture despite small plaques of necrosis and infiltrates

in the submucosa that had preserved epithelial surface. At day eight, the ileum presented a preserved aspect (Figure 3D). The liver of PS group mice presented at day two (Figure 4B) aspect very similar to CP group. Rare foci of predominantly mononuclear infiltration were observed and some of the animals did not present any changes. On day four, the animals of the PS group presented polymorphonuclear infiltrates smaller than in the animals of the CS group with discreet degenerative changes of the parenchyma (areas of necrosis). On the sixth day, although inflammatory foci persisted in the livers of the animals of the PS group, they were smaller than in the previous time and in CS group. From the sixth day, there was a discreet increase in cellularity and Küpffer cells and at eighth day, the liver of the animals of the PS group (Figure 4D) still presented well-defined foci of predominantly mononuclear infiltration and well preserved hepatic parenchyma.

No differences were obtained in the perimeter of minor lesions in the ileum between the animals of the groups CS and PS at day eight p.i. ($p > 0.05$) (Figure 5A). On the other hand, serious lesions in the ileum were lower in the animals of the group PS compared to the group CS at the same time ($P < 0.05$) (Figure 5B). There was no statistical difference in cellularity (number of cellular nuclei/mm²) in liver among the animals of the PS and CS group ($p > 0.05$) (Figure 6).

The number of viable cells of *S. Typhimurium* in the faeces of PS group mice fell over the time of infection and have stayed at high levels in faeces from CS group (above 9 log cfu/g) during all the experimentation period (Figure 7A). It was observed a gradual reduction in the number of *S. Typhimurium* in the liver of PS Group over the time of infection, reaching undetectable levels (< 3.00 Log cfu/g) on the sixth and eighth days p.i.. On the other hand, there was a progressive increase in the number of the s.

Typhimurium viable cells in the untreated group at the same time (Figure 7B). Similar results were found in the spleen of mice from both groups (Figure 7C).

In the ileum, there was an increase in the expression of IFN- γ and TNF- α genes in CS group along the time of infection. A smaller increase of these same cytokines occurred in PS group, with statistical difference from the second day of infection to IFN- γ and on the eighth day to TNF- α . For TGF- β and TNF- α there was no statistical difference between the groups over the days after the infection (Figure 8). In the liver, there was a progressive increase in the expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-1 β , TGF- β , IL-10 and enzyme iNOS in the PS and CS groups over the days post infection. Comparing the relative values of the cytokines between these two groups, at the eighth day post infection was observed a tendency to decrease the expression of the TNF- α , IL-1 β and iNOS and an increase of IL-10 and TGF- β in the PS group when compared to the CS group (Figure 9).

The monoassociation with *L. diolivorans* 1Z induced higher production of sIgA in the intestinal fluid when compared to germ-free mice (GF group), although statistically difference have been found only at the day nine after monoassociation (Figure 10A). Interestingly, sIgA concentration in the intestinal fluid from mice of PS group was higher than that from the group CS during the time of experimentation, being statistically different at the day eight post infection (Figure 10B).

4. Discussion

The *L. diolivorans* 1Z capacity to survive to stressing conditions of gastrointestinal tract was evaluated by counting viable cells of this strain in faeces of gnotobiotic mice after

single administration of 10^8 cfu/ml of the lyophilized microorganism. *L. diolivorans* 1Z was able to colonize and maintain population level above 10^9 cfu/g in the mice faeces during evaluated times (Figure 2). To date, studies have shown that high population levels, even if transient, are important for the development of probiotic action mechanisms and, consequently, obtaining their potential beneficial effects. According to FAO/WHO (2002), resistance to the stressful conditions of the gastrointestinal tract is recommended for probiotic microorganisms. Despite the physiological differences between the digestive tract of mice and humans, this animal model is still widely accepted by the scientific community in the screening of probiotic strains and it has been used with this purpose for our research group for a long time (Neumann et al, 1998; Silva et al., 2004; Martins et al., 2009; Martins et al., 2010; Steinberg et al., 2014; Alvim et al., 2016). During the selection and characterization of new probiotic strain, it is important to evaluate the safety of its administration to the host. Lactic acid Bacteria (LAB), namely *Lactobacillus* spp., have a long history of safe use by humans and animals and therefore have received the status GRAS (generally recognised as safe). Probiotic strains, such as *L. acidophilus*, has been safely used for over 80 years (Salminen et al., 1998). However, it should not be assumed that a novel strain, with some potential probiotic is harmless only by the security history acquired by the traditional probiotic strains. Therefore, to assess the safety of *L. diolivorans* 1Z, translocation for liver and spleen were tested, histopathological analysis of liver and ileum, expression of anti-inflammatory cytokines (TGF- β and IL10) and proinflammatory (IFN γ . and TNF- α) in Swiss gnotobiotic mice that received a single dose of 10^8 cfu of *Lactobacillus* and were sacrificed in times 9, 11, 13 and 15 days after monoassociation. Although it was detected viable cells in liver and spleen at days 9 and 11, from the 13th day, it was not possible to detect *L. diolivorans* 1Z in those organs. It is not surprising that *L. diolivorans* 1Z has temporarily translocated

into the liver and spleen of these animals, since *Lactobacillus* was introduced into germ-free animals, therefore, without interference from the effect of resistance to colonization exerted by indigenous intestinal microbiota.

Translocation of a microorganism is defined as the passage of viable cells through the mucous barrier to extraintestinal sites, such as mesenteric lymph nodes, liver, spleen, kidneys and bloodstream. BERG (1995) proposed that a physiological translocation might be responsible for modulation of the host's immune response by indigenous microbiota. In that sense, translocation of a probiotic to lymphoid organs, such as Peyer patches and mesenteric lymph nodes, could activate antigen presentation events and *in situ* or systemic immune response modulation and could be beneficial to the host.

L. diolivorans 1Z does not present a risk of damage to the intestinal mucosa, as demonstrated by the absence of morphological changes in the normal architecture of the organ. The degradation of the intestinal mucosa has been used as one of the first markers for pathogenicity of a potential probiotic strain and studies evaluating this parameter in gnotobiotic mice has shown that traditional probiotic strains do not generate intestinal surface degradation (Donohue *et al.*, 1998; Alvim *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2014).

Probiotics can exert their beneficial effects by means of three main mechanisms of action that are improved resistance to colonization, modulation of the host's immune response and nutritional contribution. Regards to the improved resistance to colonization, probiotics can act by competing for nutrients and receptors (direct inhibition) or producing inhibitory metabolites, bacteriocins or substances like bacteriocins (indirect inhibition) (Lebeer *et al.*, 2008; 2010). We showed a reduction in the number of *Salmonella* in faeces of the PS group, while in the group CS the pathogen remained in high number over the infection period. *L. diolivorans* 1Z inhibited growth of *S.*

S. Typhimurium in vitro (Zanirati et al., 2015) but the same effect was not detected in the *ex vivo* test. Immune mechanisms could explain the reduction in the number of *S. Typhimurium* in the intestinal lumen of the animals of the PS group in relation to the group CS. In this regard, some authors have demonstrated that probiotic strains might increase the phagocytic activity of macrophages and reduce infections (Leblanc *et al* ,2010; Podoprigora e Neumann, 1997; Maciel et al., 2016).

We have assessed the effect of *L. diolivorans* 1Z in the translocation of *S. Typhimurium* for liver and spleen in gnotobiotic mice. There was a progressive decrease in the count of *S. Typhimurium* in the liver of the PS group during the days after infection, while in the CS group a progressive increase in the population levels of the pathogen in that organ was observed. This finding, allied to the translocation of *L. diolivorans* 1Z for a short period of time to the liver of the monoassociated animals, suggest that *L. diolivorans* 1Z could stimulate the increase in the number of Küpffer cells. In fact, a descriptive histological analysis of the liver revealed an increase in the Küpffer cells in the PS group, which could be related to the decrease in the count of *Salmonella* In that organ. Neumann *et al.*, (1998) showed that the oral administration of *L. acidophilus* UFV-H2b20 reduced the time needed for clearance of *E. coli* B41 of the blood stream of gnotobiotic mice in comparison to the germ-free group and that this reduction was related to the increase in the number of Küpffer cells. Martins *et al.*, (2011) demonstrated that the administration of the *S. cerevisiae* UFMG 905 reduced the population levels of *S. Typhimurium* in the liver of the animals by the increase of Küpffer cells. Our results also showed a lower count of *Salmonella* in the liver when compared to the spleen, which further suggest that there is some mechanism of elimination of the bacterium in the liver that is absent in the spleen, but this assumption still needs to be confirmed.

The sIgA concentration in the intestinal fluid of the animals of the PS and CS group was statistically equal ($P < 0.05$) in the first days after the infection (Figure 17). This fact can explain the translocation from the pathogen to liver and spleen in both groups, in the first days of infection. On the eighth day after the challenge, however, the titles of sIgA were higher in the PS group compared to the group CS which can explain the smallest count of *S. Typhimurium* in the two organs in the PS group, mainly in the liver where the number of pathogen fell to undetectable levels. It could be suggested that the increase on secretion of IgA in the intestinal would contained the translocation of the pathogen and the increase of the cells of Kupffer could eliminated salmonella that had already translocated. Similar results were already found to others potential probiotics (Acurcio *et al.*, 2017; Alvim *et al.*, 2016).

Immunoglobulin A is the predominant antibody at the intestinal lumen and prevents bacterial access to the apical surface of the epithelial cells by trapping the bacterium in the mucus layer, which plays a crucial role in preventing the invasion by pathogenic micro-organisms (Fransen *et al.*, 2015). Moreover, the antibody binding can alter the expression of flagelin which compromises motility and reduces the virulence of some microorganisms as *Salmonella* (Cullender, *et al.*, 2013). Finally, the sIgA neutralizes the action of bacterial toxins, protecting the epithelial cells of the toxic stimulation (Mantis, *et al.*, 2011). IgA has little ability to activate the classic path of the complement or to act as opsonin and does not induce inflammation. This means that it can limit the penetration of pathogens in the mucosa without the risk of inflammatory damage, that is beneficial during the infection by intestinal pathogenic bacteria, as it does not interfere with the homeostasis between the host and the indigenous intestinal microbiota (Gutzeit, *et al.*, 2014).

The histopathological analysis of the ileum of mice from the CS group showed changes of the ileum mucosa that progressed and were intensifying from the second day post infection. In the group treated with *L. diolivorans* 1Z (PS), these changes were also observed, but with less intensity or absent in some animals. The protection of the pouch mucosa of the animals of the PS group, compared to the CS group, has been proven by the measure of the perimeter of the serious lesions attributed to the Salmonellosis ($P < 0.05$).

During the infection of mice with *S. Typhimurium*, the first cells found by the pathogen are the intestinal epithelial cells, dendritic cells (DCs) and macrophages (Murphy, 2014). The interaction with these cells induces the synthesis of inflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ , leading to a massive influx of immature neutrophils, macrophages and DCs, which are necessary for the suppression of bacterial growth in intestinal lumen in *Salmonella* infections (Mastroeni & Grant, 2011). In this study, the experimental infection of germ-free mice with *S. Typhimurium* evolved as expected, producing an increase of inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ over the days post infection in the control group (CS). The decrease in the expression of TNF- α and IFN- γ In the PS group, compared to the CS group, it was accompanied by a decrease in the count of *S. Typhimurium* in the intestines of animals (Figure 6). Since the expression of these cytokines depends on the interaction between the pathogen and the cells of the intestinal epithelium, dendritic cells (DCs) and macrophages, it is to be expected that few microorganisms in the intestinal lumen will result in less expression of these cytokines. The action of TNF- α throughout the inflammatory process is paradoxal. Increased levels of this cytokine at the onset of inflammation are important for the containment of the microorganism at the site of infection. However, if this host protection mechanism fails and the microorganism is disseminated, maintaining high levels of TNF- α in the intestines

can compromise the function of epithelial barrier by increasing intestinal permeability, which facilitates the invasion of extraintestinal sites, such as liver and spleen by *S. Typhimurium* (Murphy, 2014; Beaurepouire *et al.*, 2009). In CS group, the progressive increase in the expression of TNF- α and IFN- γ It may have compromised the epithelial barrier and thus facilitated the translocation of the *S. Typhimurium* for liver and spleen. The maintenance of increased levels of this cytokine throughout the entire experiment in this group can justify the high population levels of the pathogenic bacterium in those organs. In PS group, the decrease in the expression of TNF- α and IFN- γ may be associated with the best preservation of intestinal epithelial integrity and resistance to translocation of the pathogen. This may explain the smallest number of *S. Typhimurium* in the liver of the animals of this group compared to the group CS.

These results are in accordance with what was verified in the histopathological analysis that evidenced the commitment of the integrity of the ileum epithelial barrier in the CS and PS groups in the early days of the infection (Figure 3). However, in the PS group, the histopathological changes became less intense than in the CS group over the days post infection, with evident signs of improvement on the eighth day. These result was subsequently confirmed by the perimeter measure of the major lesions (Figure 5). The decrease in the count of *S. Typhimurium* and reduction in the expression of TNF- α and IFN- γ in the intestines of the animals of the PS group, compared with the group CS, can explain the best preservation of the architecture of the ileum mucosa induced by the administration of *L. diolivorans* 1Z.

The increase in the expression of inflammatory cytokines TNF- α and IL1- β in the liver over the days after the infection is indicative of the suggest that systemic dissemination of *S. Typhimurium* stimulates the hepatic macrophages to produce a massive amount of these cytokines (Murphy, 2014). The systemic release of TNF- α in the bloodstream

causes vasodilation and increased vascular permeability, causing loss of plasma volume and, finally, septic shock, leading to a breakdown in the function of several vital organs, such as kidney, liver and lung, being usually the cause of death of animals infected with *S. Typhimurium* (Murphy, 2014; Abbas *et al.*, 2015). Mice with defects or absence of TNF- α receptors are resistant to septic shock but unable to control infection. This fact illustrates the paradoxical role of TNF- α , important to contain infection in the primary site of infection, but catastrophic when released systemically in the inflammatory response induced by Gram-negative bacteria, as is the case of *S. Typhimurium* (Pfeffer, 2003). It was observed a tendency to decrease the expression of hepatic inflammatory cytokines and to increase the expression of the anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10 in the animals of the PS group compared with the CS group. These cytokines negatively regulate inflammation (Murphy, 2014). Sousa and Teixeira (2005), in a review study, demonstrated that the balance between the production of TNF- α and IL-10 determines tissue injury after ischemia and intestinal reperfusion. The authors also highlighted that therapeutic strategies that increase the IL-10 and prevent the increase in the concentration of TNF- α could be used as adjuvants for treatment those tissue injuries. The use of probiotics in this context could be an alternative. Silva *et al.*, (2004), demonstrated that the protection of animals treated with *Bifidobacterium longum* Bb46 and challenged with *S. Typhimurium*, compared to the untreated and challenged control group, could be attributed in part to the decrease in the production of IFN- γ and by the increase of IL-10.

The presence of the pathogen in the liver, although in smaller quantities compared to the CS group (Figure 7B), combined with the presence of viable cells of *L. diolivorans* 1Z in the first days of infection in the CP group (Figure 2) allows us to suggest that there may have been an increase in the recruitment of neutrophils and monocytes of the bloodstream

and the maintenance of the inflammatory response in the tissue, which was confirmed by the increase of Inflammatory cytokines, over the days after infection (Figure 9). However, the inflammatory response in liver of the PS group was more efficient since it was sufficient to decrease the amount of pathogen in the organ, to avoid the systemic dissemination of the microorganism, and the death of the animal by septic shock. It is important to say that the method of evaluation of the cellularity used in this work does not discriminate against the type of leukocyte present in the inflammatory infiltrated (polymorph or mononuclear). However, in the qualitative analysis of the liver we realized that in the CS group the inflammatory cell most prevalent in the infiltrated was polymorphonuclear while in the PS group prevailed mononuclear cells. The difference in the profile of inflammatory cells indicates that the inflammation in the liver of the animals CS and PS are in different phases. It is already well described in the literature that the first cells to migrate to the infection site are the neutrophils (polymorphonuclear) that phagocytose the microorganism and then die by apoptosis. Later, monocytes are recruited to phagocyte apoptotic cells that remain in the tissue. The inflammation resolution occurs after the apoptotic neutrophils have been removed by the macrophages in the tissue (Abbas *et al.*, 2015). We can hypothetised that the administration of *L. diolivorans* 1Z contributed to the faster inflammatory response in the liver and more efficient in eliminating *S. Typhimurium* of the PS group compared to the CS group. In addition, the increase in IFN- γ in liver of PS group mice may be indicative of the largest microbicide activity of the macrophages at the site of the infection. IFN- γ from NK cells increases the capacity of macrophages to kill phagocytosed bacteria, similarly to IFN- γ produced by T Cytotoxic lymphocytes (Sun and Lannier, 2011). This interaction IFN γ -macrophage-dependent cell NK may be sufficient to control infection by intracellular bacteria as *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* (Abbas *et al.*, 2015).

Just like in the intestine, the tissue damage to the liver has been intensifying over the days after infection. Both in the control group *Salmonella* (CS) as in the treated and challenged group (PS), areas of inflammatory infiltration were observed with degenerative changes of the hepatic parenchyma. The administration of the *L. diolivorans* 1Z not prevent the translocation of the *S. Typhimurium* for the liver of the animals of the PS group, which explains the hepatic lesions attributed to their presence in the organ. However, the pathogen count has gradually decreased over time after infection, which may explain the earliest recovery of hepatic lesions when compared to the CS group, in which the number of *S. Typhimurium* remained high until the day eight post infection. The results found in the gnotobiotic mice model are in accordance with the greatest survival of conventional animals treated with *L. diolivorans* 1Z and challenged with *S. Typhimurium*, compared to conventional animals that did not receive the probiotic.

It can be concluded that *L. diolivorans* 1Z is able to reduce the deleterious effects of an oral infection by *S. Typhimurium* in gnotobiotic mice, as well as it is able to reduce the mortality rate of conventional mice challenged orally with this pathogen. Mechanisms through which this protection is given seem to include modulation of immunological response at the site of infection (ileum) and systemically (liver), both at cellular and humoral level, but are not yet completely clarified. Although other studies need to be developed to clarify such mechanisms, *L. diolivorans* 1Z can be characterized as a potential probiotic. Besides that, all the results presented in this work were obtained with the lyophilized culture of *L. diolivorans* 1Z, which demonstrate that the microorganism may be subjected to this dehydration process, commonly used for the maintenance of microbial cultures used by food and drug industries, without loss of its probiotic capacity.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and PRPq/UFMG.

References

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p.536, 2015.

ACURCIO, L.B.; SANDES, S. H. C.; BASTOS, R. W. ; SANT' ANNA, F. M. ; PEDROSO, S. H. S. P. ; Reis, D. C. ; NUNES, A.C. ; Cassali, G. D. ; SOUZA, M. R. ; NICOLI, J. R. . **Milk fermented by Lactobacillus species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against Salmonella Typhimurium infection**. *Beneficial Microbes*, v. 1, p. 1-10, 2017.

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, A. C. . **Probiotic Weissella paramesenteroides WpK4 reduces intestinal gene expression of pro-inflammatory cytokines and hepatic injuries in murine model of typhoid fever**. *Beneficial Microbes*, v. 7, p. 61-73, 2016.

ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. **Distribution of enteroglucagon and peptide YY immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice**. *Cell Tissue Res.*, v. 290, p. 61–69, 1997.

ARSLAN, S. **A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir**. *Journal of Food*. V.13, p.340-45, 2015.

BERG, R.D. **Bacterial translocation from the gastrointestinal tract**. *Trends Microbiol.*, v. 3, p. 149-154, 1995.

BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D.M.**Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability**. *J Interferon Cytokine Res.* v.3, p.133-44, 2009.

CONCEA. **Diretriz Brasileira para o cuidado de animais para fins científicos e didáticos**. *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*. 2015

CULLENDER TC, CHASSAING B, JANZON A, *et al*. **Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut**. *Cell Host Microbe*. 14:571–81 2013.

DONOHUE, D.; SALMINEN, S.; MARTEAU, P. **Safety of probiotic bacteria**. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker. New York: Marcel Dekker, p. 369–384. 1998.

FAO/WHO, **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report ,1-11, 2002

FRANSEN, F; ZAGATO, E; MAZZINI, E. *et al.* **BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity.** *Immunity*;43:527–40. 2015

GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L **Chemical and microbiological characterization of kefir grains.** *Journal of Dairy Research*, 6: 639–652, 2001.

GARROTE GL, ABRAHAM A.G e DE ANTONI G.L. **Microbial interactions in kefir: a natural probiotic drink.** In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria.* p. 327–340. 2010

GUTZEIT, C; MAGRI, G; CERUTTI, A. **Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction.** *Immunol Rev.* v. 260:76–85.2014.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biology*, v. 8, R19, p. 1-14, 2007.

IRAPORDA, C.; ABATEMARCO, M. J.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L. **Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens.** *Journal of Dairy Research.* v. 84, p. 339-345, 2017.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. **Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 72, p. 728–764, 2008.

LEBLANC, A. M, CASTILLO, N. A, PERDIGON, G. **Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection.** *Int J Food Microbiol.* v.138, p.223-31, 2010

MACIEL, F. R.; PUNARO, G. R.; RODRIGUES, A. M.; BOGSAN, C. S.B.; ROGERO, M. M.; OLIVEIRA, M. N.; MOURO, M. G.; HIGA, E. M.S. **Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats.** *Clinical Nutrition*, v. 35, p.1066-1072. 2016.

MARTINS, F.S.; SILVA, A.A.; VIEIRA, A.T.; BARBOSA, F.H.F.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. **Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties.** *Archives of Microbiology*, v. 191, p. 623-630, 2009.

MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. *et al.* **Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection.** *Plos One*, v. 5. e8925. doi:10.1371/journal.pone.0008925, 2010.

MARTINS, F.S.; ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TIAGO, F.C.P.; MARTINS, A.K.S.; SILVA, F.C.P.; SOUZA, E.L.S.; SOUSA, L.P.; ARAÚJO, H.R.C.; PIMENTA, P.F.;

BONJARDIM, C.A.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. **Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune response and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine modelo of typhoid fever.** *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 359-364, 2011.

MASTROENI, P.; GRANT, A. J. **Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, e12, 2011.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 483. 2014.

NALBANTOGLU, U., CAKAR, A., DOGAN, H., ABACI, N., USTEK, D., SAYOOD, K.. **Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains.** *Food Microbiol.* v. 41, p. 42–51, 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 germ-free mice.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

PFEFFER, K. **Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors.** *Cytokine Growth Factor Ver.* v. 14, p. 185-91, 2003.

PODOPRIGORA, G. I. ; NEUMANN, E. . **The probiotics stimulative action on the hosts mononuclear phagocyte system in mice with differentmicrobial and immune status.** *Baltic Journal of Laboratory Animal Science*, v. 7, p. 12-20, 1997.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM. **Demonstration of safety of probiotics: a review.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, p. 93-106, 1998.

SHARIFI, M., MORIDNIA, A.,MORTAZAVI, D., SALEHI, M., BAGHERI, M., SHEIKHI, A. **Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties.** *Med Oncol.*v.11, p.27-34. 2017.

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.

SOUZA, T.C. ; ZACARÍAS, M.F. ; SILVA, A.M. ; BINETTI, A. ; REINHEIMER, J.; NICOLI, J.R. ; VINDEROLA, G. . **Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks.** *Journal of Applied Microbiology* , v. 112, p. 1184-1192, 2012.

SOUZA, D.G. e TEIXEIRA, M.M. **The balance between the production of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion.** *Mem Ins Oswaldo Cruz*, v. 100, p.59-66, 2005.

SUN, T.C; LANIER, L.L. **NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells.** *Nature Reviews Immunology*. v.11, p.645-745, 2011.

STEINBERG, R.S. ; LIMA, M. ; GOMES DE OLIVEIRA, N.L. ; MIYOSHI, A. NICOLI, J.R. ; NEUMANN, E. ; NUNES, A.C. . **Effect of intestinal colonisation by two *Lactobacillus* strains on the immune response of gnotobiotic mice.** *Beneficial Microbes*, v. 5, p. 409-419, 2014.

VASCONCELLOS, 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*, São Paulo, v. 34, n.Supl. 1, p. 21-24, 2003.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J. THANGAVEL, D. et al. **Immunomodulating capacity of kefir.** *Journal of Dairy Research*, n.72, p. 195–202, 2005.

ZAMBERI, N.R; ABU, N; MOHAMED, N. E, NORDIN N; KEONG, Y. S; BEH, B. K; ZAKARIA Z. A; NIK ABDUL RAHMAN, N. M; ALITHEEN, N. B. **The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells.** *Integr Cancer Ther.* V. 3 p. 53-64. 2016

ZANIRATI, D.F ; ABATEMARCO, M.J ; SANDES, S.H.C ; NICOLI, J.R ; NUNES, A.C; NEUMANN, E . **Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures.** *Anaerobe* (London) v. 32, p. 70-76, 2015.

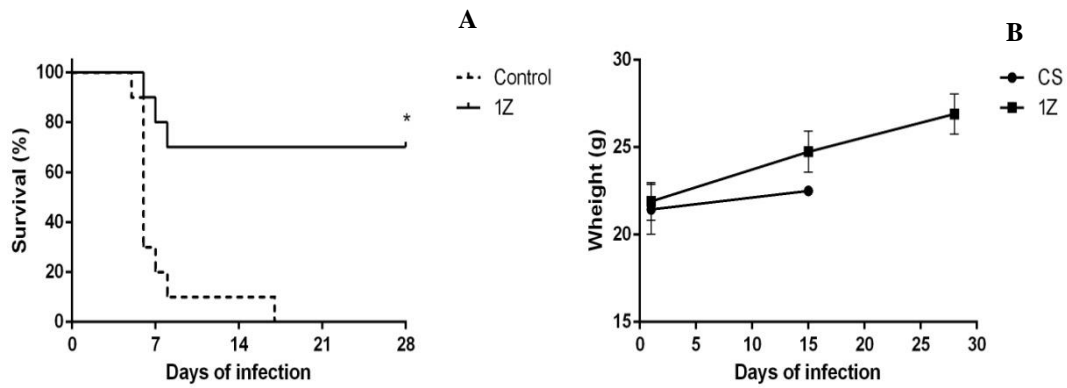


Figure 1. Survival (A) and weight loss (B) after oral challenge with *S. Typhimurium* of conventional mice treated with lyophilized *L. diolivorans* 1Z (1Z, full line) or not treated (CS, dotted line). * Indicates statistical difference between groups ($P < 0.05$).

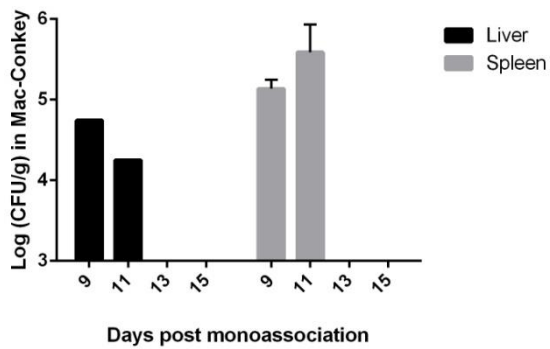


Figure 2. Translocation of *L. diolivorans* 1Z to liver and spleen in gnotobiotic mice after a single oral administration of a suspension containing 10^9 cfu/ml freeze-dried cells.

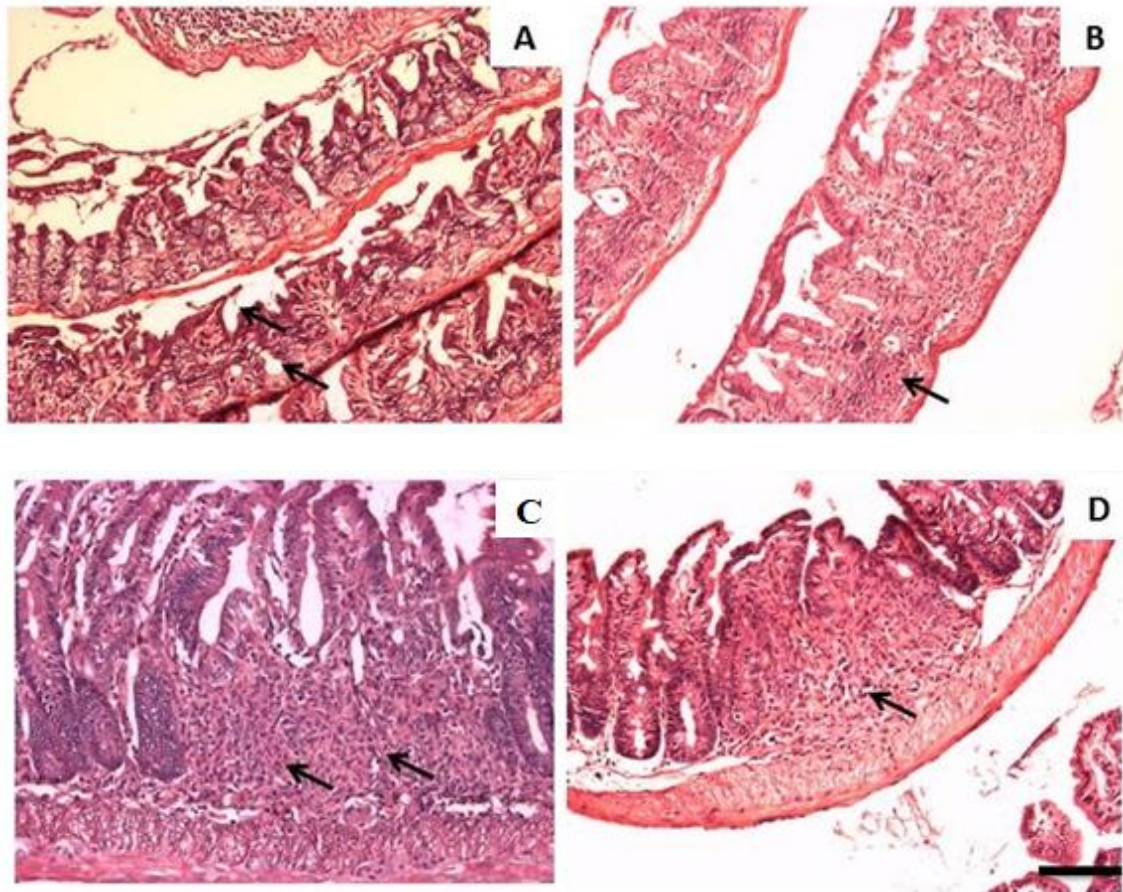


Figure 3. Photomicrography of ileum, stained in H&E, of mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z (PS) or not (CS) and challenged with *S. Typhimurium*. (A) CS 2d, and (B) PS 2d, animals sacrificed after two days of infection; (C) CS 8d and (D) PS 8d, animals sacrificed after eight days of infection. Arrows indicate areas of vilosity damage with discreet increase of the cellularity of the lamina propria (A) and Inflammatory infiltrate focus (B). 10x increase. Scale bar represents 100 μ m.

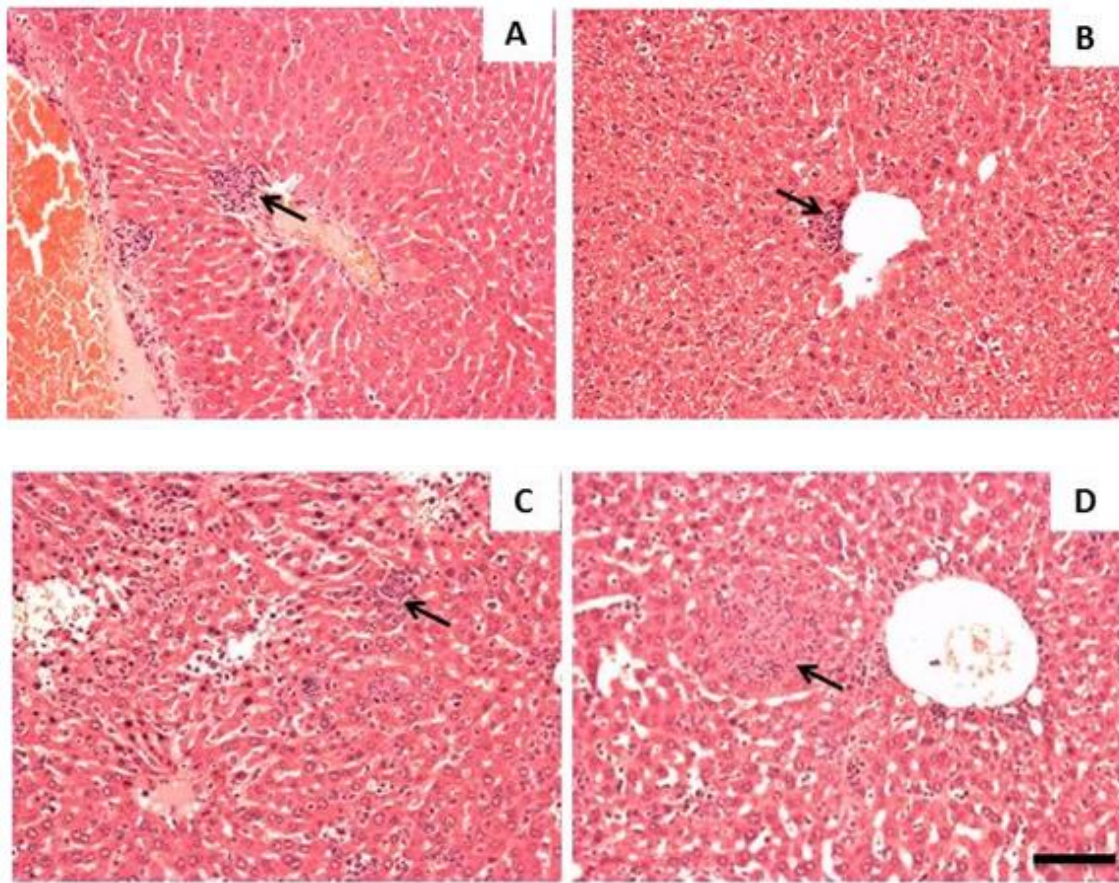


Figure 4. Photomicrography of liver, stained in H&E, of mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z (PS) or not (CS) and challenged with *S. Typhimurium*. (A) CS 2d, and (B) PS 2d, animals sacrificed after two days of infection; (C) CS 8d and (D) PS 8d, animals sacrificed after eight days of infection. Arrows indicate areas of inflammatory infiltrate (B). 10x increase. Scale bar represents 100 μ m.

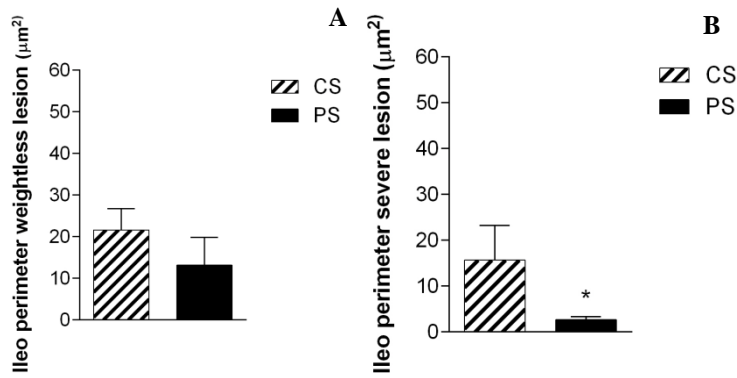


Figure 5. Perimeter of minor (A) and major (B) lesions attributed to *Salmonella* infection in ileum of mice monoassociated (PS) or not (CS) with *L. diolivorans* 1Z and challenged with *S. Typhimurium*. The samples were taken at day eight post infection. * Indicates statistical difference between the groups CS and PS ($P < 0.05$).

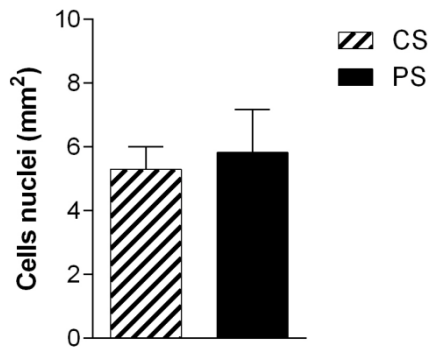


Figure 6. Liver cellularity (cells nuclei/ mm²) in the animal liver of mice monoassociated (PS) or not (CS) with *L. diolivorans* 1Z and challenged with *S. Typhimurium*. The samples were taken at day eight post infection. * Indicates statistical difference between the groups CS and PS ($P < 0.05$).

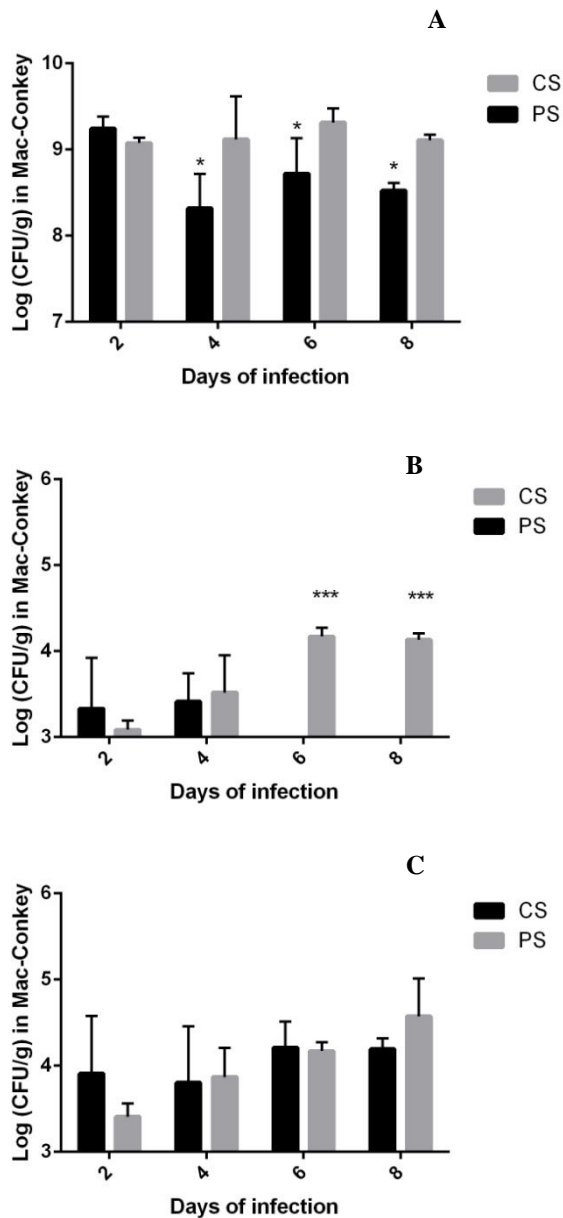


Figure 7. Viable cells of *S. Typhimurium* in faeces (A), liver (B) and spleen (C) of gnotobiotic mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z (PS) or not (CS), after two, four, six and eight days of infection. * Indicates statistical difference between groups at each time of infection ($P < 0.05$). $N = 4$.

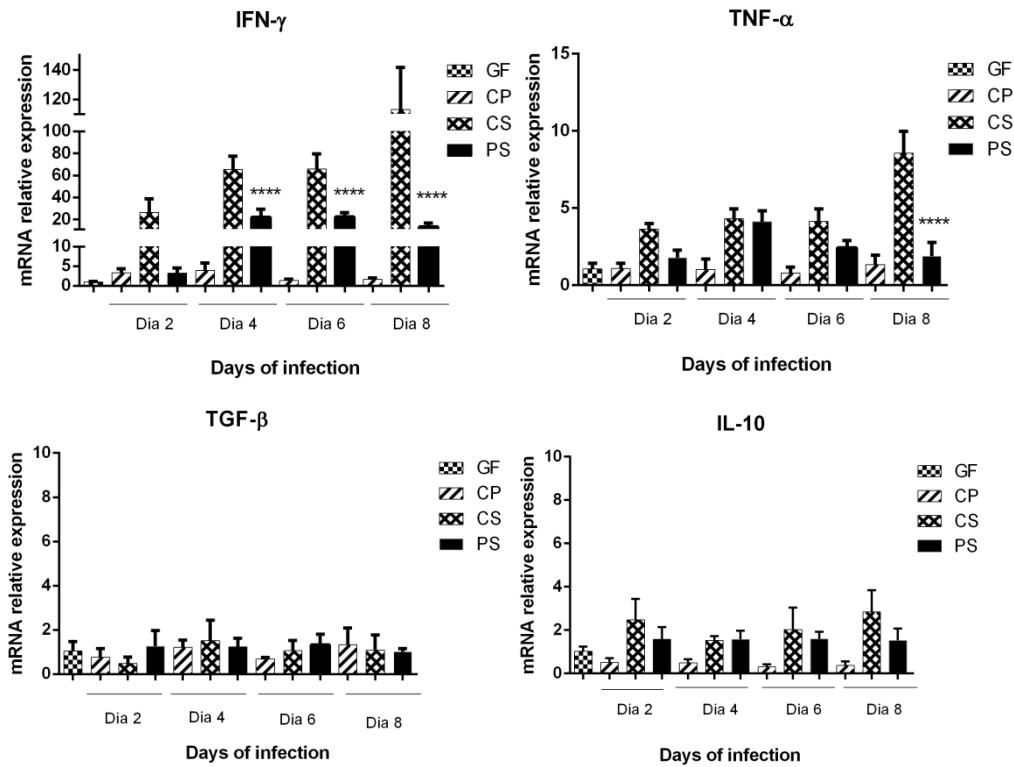


Figure 8. Relative levels of mRNA (RLmRNA) of genes encoding cytokines, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , and IL10 in ileum of mice monoassociated or not with *L. diolivorans* 1Z and challenged or not with *S. Typhimurium*. GF, germ-free without infection; CP, monoassociated with *L. diolivorans* 1Z without infection; CS: germ-free challenged with *S. Typhimurium*; PS: monoassociated with *L. diolivorans* 1Z and challenged with *S. Typhimurium*. * Indicates statistical difference between groups ($P < 0.05$).

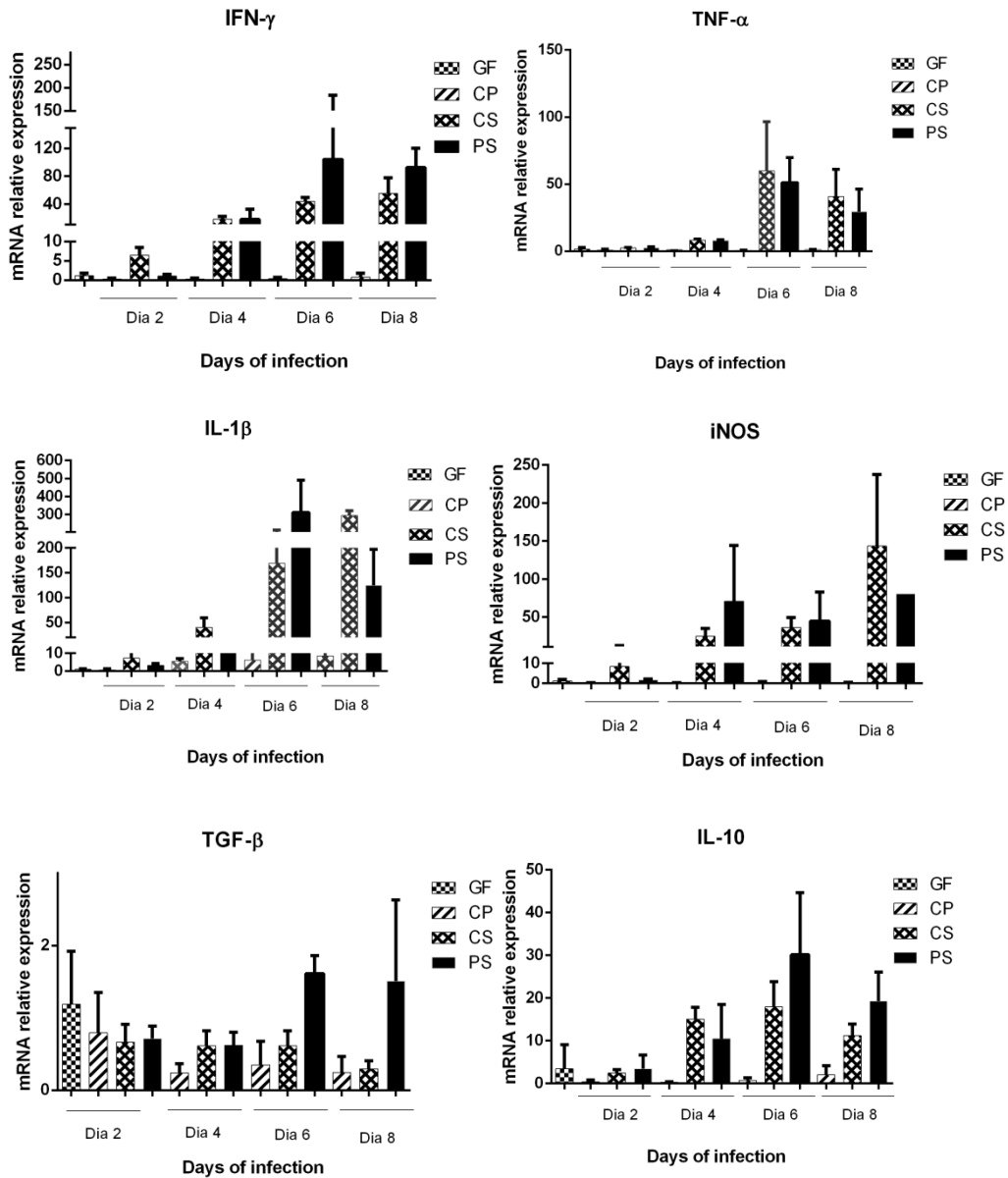


Figure 9. Relative levels of mRNA (RLmRNA) of genes encoding cytokines IFN- γ , TNF- α , IL1- β , the enzyme iNOS , TGF- β , and IL10 in liver of mice monoassociated or not with *L. diolivorans* 1Z and challenged or not with *S. Typhimurium*. GF, germ-free without infection; CP, monoassociated with *L. diolivorans* 1Z without infection; CS: germ-free challenged with *S. Typhimurium*; PS: monoassociated with *L. diolivorans* 1Z and challenged with *S. Typhimurium*.

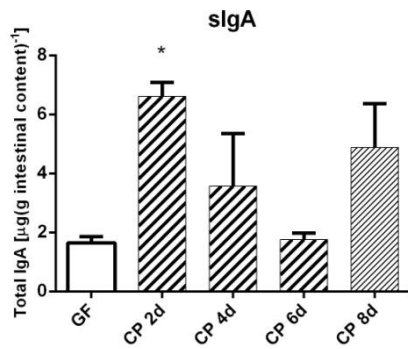


Figure 10. Amounts of secretory immunoglobulin A (sIgA) in the intestinal fluid of germ-free (GF) and gnotobiotic mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z (CP) after nine, eleven, thirteen and fifteen days of monoassociation. * Indicates statistical difference between groups ($P < 0.05$).

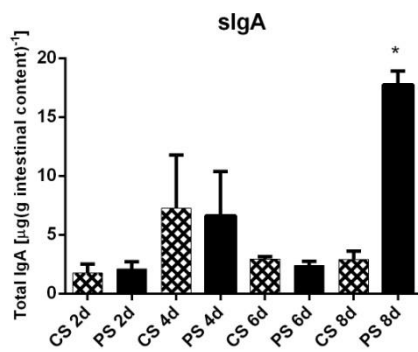


Figure 11. Amounts of secretory immunoglobulin A (sIgA) in the intestinal fluid of gnotobiotic mice monoassociated with *L. diolivorans* 1Z (PS) or not (CS) after two, four, six and eight days of infection. * Indicates statistical difference between groups ($P < 0.05$).

10. 4 Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 96/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Propriedades probióticas de Kefir preparado com leite de vaca, leite de soja ou água com açúcar mascavo, de microrganismos isolados de grãos de Kefir e de substâncias produzidas por esses isolados*", que tem como responsável(is) **Elisabeth Neumann**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 05/2011**.

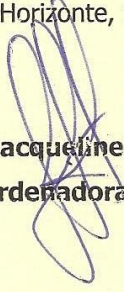
Este certificado expira-se em **11/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 96/2011**, related to the project entitled "*Probiotic properties of traditional milk kefir, soy milk kefir, sweet kefir, microorganisms isolated from kefir grains and substances produced by them*", under the supervisors of **Elisabeth Neumann**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 11, 2011**.

This certificate expires in **May 11, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Maio de 2011.


Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

10.5 Certificado de aprovação do projeto, expedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

ceua@prpq.ufmg.br
to enemann, me

Oct 25



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

UFMG

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 257/2016
Título do projeto: Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir e da atividade biológica de exopolissacarídeos produzidos por esses micro-organismos.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Elisabeth Neumann
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final](#)

Aprovado na reunião do dia 24/10/2016.

Belo Horizonte, 25/10/2016.

Atenciosamente,

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

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

10.5 Certificado de melhor trabalho apresentado no IV Simpósio de Microbiologia da UFMG na modalidade Pôster

IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia

CERTIFICADO

Certificamos que **Abatemarco, M.J., Sandes, S.H.C., Arantes, R.M.E., Nunes, A.C., Nicoli, J.R., Neumann, E.** participou do “IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 02 e 03 de outubro de 2017, e teve o seu trabalho, “**EFEITO PROTETOR DE L. diolivorans 1Z ISOLADO DE GRÃOS DE KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium EM MODELO MURINO GNOTOXÊNICO**”, DESTACADO COMO MELHOR PÔSTER.



Simone Gonçalves dos Santos
Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos
Coordenadora IV Simpósio de Microbiologia da UFMG

Flávio Guimarães da Fonseca
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

