

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Lucas Jorge da Silva Fernandes

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DE DEZ LINHAGENS DE  
*LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO  
INDUZIDA POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM**

Belo Horizonte  
2022

Lucas Jorge da Silva Fernandes

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DE DEZ LINHAGENS DE  
*LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO  
INDUZIDA POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM**

**Versão final**

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientador: Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

Belo Horizonte  
2022

043

Fernandes, Lucas Jorge da Silva.

Avaliação do efeito enteroprotetor de dez linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* em modelo murino de infecção induzida por *Salmonella Typhimurium* [manuscrito] / Lucas Jorge da Silva Fernandes. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientador: Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho.

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

1. Genética. 2. Infecções por Salmonella. 3. Probióticos. 4. Mucosa Intestinal. 5. Antibiose. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Carvalho, Rodrigo Dias de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



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

**ATA DE DEFESA  
DE  
DISSERTAÇÃO**

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>	<b>328/2022</b> <b>entrada</b>
<b>Lucas Jorge da Silva Fernandes</b>	<b>1º/2020</b> <b>CPF: 031.734.502-80</b>

Às quatorze horas do dia **30 de setembro de 2022**, reuniu-se, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do efeito enteroprotetor de 10 linhagens de Lactiplantibacillus plantarum em modelo murino de infecção induzida por Salmonella Typhimurium**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>CPF</b>	<b>Indicação</b>
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	APROVADA
Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	UFMG	080.173.536-00	APROVADA
Frederico Marianetti Soriani	UFMG	249.486.428-35	APROVADA
Elisabeth Neuman	UFMG	562.737.116-15	APROVADA

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADA

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

**Belo Horizonte, 30 de setembro de 2022.**

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho – Coorientador

Frederico Marianetti Soriani

Elisabeth Neuman



---

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 01/10/2022, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 01/10/2022, às 08:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 03/10/2022, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 04/10/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1795606** e o código CRC **8E1D45F6**.

---

Referência: Processo nº 23072.258252/2022-00

SEI nº 1795606



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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Avaliação do efeito enteroprotetor de 10 linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* em modelo murino de infecção induzida por *Salmonella Typhimurium*"**

**Lucas Jorge da Silva Fernandes**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador  
UFMG

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho - Coorientador  
UFMG

Frederico Marianetti Soriani  
UFMG

Elisabeth Neuman  
UFMG

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 01/10/2022, às 08:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do**



**Magistério Superior**, em 01/10/2022, às 08:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamentono art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 03/10/2022, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 04/10/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5ºdo [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)

[novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1795705** eo código CRC **A086A14A**.



## AGRADECIMENTOS

A minha família que está junto a mim independente dos 2.700 km que nos separaram nestes dois anos. A minha mãe Luciana por me olhar nos olhos e imperativamente dizer “seja feliz” quando contei sobre meus planos de seguir a vida acadêmica em outro estado. Ao meu irmão Luan que é um ótimo ouvinte e que me guarda com muito carinho. Aos meus tios Gilvan e Elisangela por me ajudarem em horas tão essenciais. Aos amigos que deixei em Belém mas que sonham junto comigo e compartilham felicidades e tristezas.

A Emilly Valentine por ser uma porção de significados e vivências que foram impar na minha construção pessoal. A Gabriel que me deu o primeiro sorriso ao chegar em BH. Aos amigos que fiz fora e dentro da UFMG. Em especial, Rhayane Couto, Arthur Gualberto, Maykelin Fuentes e Luís Lima, cada um contribuiu para meu crescimento e permanência neste caminho que não é trilhado por um só.

Agradeço aos meus orientadores, professor Vasco Ariston pela confiança em aceitar um aluno externo a UFMG e por todo o suporte ofertado pelo LGCM e Rodrigo Dias por cada reunião e conversa norteadoras que tivemos. A equipe que compõe o LGCM, sei que cada um direta ou indiretamente contribuiu com esta dissertação. Minha gratidão a Nina, Andria, Monique e Rhayane Viegas.

Agradeço ao programa de pós graduação em genética por todo o suporte no período de pandemia, assim como a equipe administrativa e os professores que proporcionaram rico aprendizado. Agradeço a agência de fomento à pesquisa (CAPES) pela concessão da bolsa que viabilizou minha estadia e conclusão desta pós graduação.

*La columna rota*

KAHLO, Frida. La columna rota. Óleo/masonite (39, 8 x 30, 5 cm), 1944.

## RESUMO

*Salmonella* Typhimurium é um dos principais causadores de salmonelose não-tifoide (SNT) em humanos, um tipo de gastroenterite aguda que ocasiona dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, e com cerca de 93,8 milhões de casos globais. O principal recurso terapêutico contra SNT é o uso de antibióticos, no entanto, o uso destes antimicrobianos contribui para o surgimento de cepas multirresistentes. Neste contexto, o uso de microrganismos probióticos para o desenvolvimento de terapias alternativas representa uma estratégia promissora devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes no trato gastrointestinal e capacidade de inibição de microrganismos patogênicos. A partir de estudos prévios *in vitro*, nosso grupo de pesquisa identificou dez linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* com potencial inibitório contra *S. Typhimurium*. Baseado nesses achados, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito enteroprotetor destas linhagens contra a infecção por *S. Typhimurium* em modelo murino. Para tanto, camundongos BALB/c receberam tratamento com cada uma das dez linhagens *Lpb. plantarum* por 30 dias, sendo que no 10º dia os animais foram infectados com *S. Typhimurium*. Nesta primeira etapa, foi avaliada somente a taxa de mortalidade, no qual foi observado que os tratamentos com as linhagens Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 apresentaram as maiores taxas de sobrevivência: 70%, 80% e 20%, respectivamente. A partir destes resultados, estas linhagens foram selecionadas para investigação de seus efeitos sobre os sinais clínicos, níveis de IgA secretora, infiltrado inflamatório, análise histopatológica e grau de translocação bacteriana. A partir dos dados obtidos, não foi possível observar nenhum efeito significativo nos parâmetros avaliados, com exceção da linhagem Lpl 9 que preveniu a esplenomegalia e a linhagem Lpl 19 que reduziu a perda ponderal nos camundongos desafiados. Como análises complementares deste estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana de sete linhagens, por meio de ensaios *in vitro* de adesão (coagregação) e inibição por meio do sobrenadante. Os ensaios *in vitro* de coagregação demonstraram a presença de adesão em cinco linhagens, Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14 e Lpl 20. Sendo a Lpl 9, a linhagem com maior taxa de coagregação (55%) e cujo o sobrenadante apresentou melhor atividade de inibição (53,6%) após neutralização do pH. Os resultados obtidos demonstraram, portanto, que linhagens de *Lpb. plantarum* possuem propriedades microbicidas contra *Salmonella* sp., sendo que Lpl 9 e Lpl 4 foram as mais promissoras no tratamento da salmonelose em modelo *in vivo*. Contudo, maiores investigações são necessárias para elucidar os mecanismos probióticos usados por estas linhagens.

Palavras-chave: Salmonelose. Probióticos. Antagonismo bacteriano. Mucosa intestinal.

## ABSTRACT

*Salmonella* Typhimurium is one of the leading causes of non-typhoid salmonellosis (NTS) in humans, a type of acute gastroenteritis that causes abdominal pain, vomiting, diarrhea, and nausea, with about 93.8 million global cases. The main therapeutic arsenal against NTS is the use of antibiotics; however, the use of these antimicrobials contributes to the emergence of multidrug-resistant strains. In this context, the use of probiotic microorganisms for developing alternative therapies represents a promising strategy due to their anti-inflammatory and antioxidant properties in the gastrointestinal tract and ability to inhibit pathogenic microorganisms. From previous *in vitro* studies, our research group identified ten strains of *Lactiplantibacillus plantarum* with inhibitory potential against *S. Typhimurium*. Based on these findings, the objective of this work was to evaluate the enteroprotective effect of these strains against *S. Typhimurium* infection in a murine model. Therefore, BALB/c mice received treatment with each of the ten *Lpb. plantarum* strains for 30 days, and on the 10th day, the animals were infected with *S. Typhimurium*. In this first stage, only the mortality rate was evaluated, in which it was observed that the treatments with the Lpl 4, Lpl 9, and Lpl 19 strains presented the highest survival rates: 70%, 80%, and 20%, respectively. Based on these results, these strains were selected to investigate their effects on clinical signs, secretory IgA levels, inflammatory infiltrate, histopathological analysis, and degree of bacterial translocation. From the data obtained, it was impossible to observe any significant effect on the parameters evaluated, except the Lpl 9 strain that prevented splenomegaly and the Lpl 19 strain that reduced weight loss in challenged mice. As a complementary analysis of this study, the antimicrobial activity of seven strains was evaluated through *in vitro* adhesion (coaggregation) and inhibition using the supernatant. The *in vitro* coaggregation assays demonstrated the presence of adhesion in five strains, Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14, and Lpl 20. Lpl 9 is the strain with the highest rate of coaggregation (55%) and whose supernatant showed better inhibition activity (53.6%) after pH neutralization. Therefore, the results obtained showed, that strains of *Lpb. plantarum* has microbicidal properties against *Salmonella* sp., and Lpl 9 and Lpl 4 were the most promising in treating salmonellosis in an *in vivo* model. However, further investigations are required to elucidate the probiotic mechanisms used by these strains.

Keywords: Salmonellosis. Probiotics. Bacterial antagonismo. Intestinal mucosa.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 – Compostos antimicrobianos do grupo BAL.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2 - Protocolo experimental de infecção por <i>Salmonella</i> Typhimurium e tratamento com <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> em modelo murino. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 3 - Ensaio de coagregação: .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4 - Fotomicrografias do ensaio de coagregação:.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5 - Ensaio de atividade antibacteriana do sobrenadante de <i>Lpb. plantarum</i> contra <i>Salmonella</i> Typhimurium:.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6 - Avaliação do ensaio de mortalidade: .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7 - Efeitos do tratamento com diferentes linhagens de <i>Lpb. plantarum</i> no aparecimento de sintomas de distresse causados pela infecção experimental de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 8 - Avaliação da variação ponderal.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 9 - Avaliação do consumo alimentar e hídrico antes e após o desafio .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10 - Análise de score histopatológico.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11 - Análises de comprimento de vilosidades.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12 - Presença de infiltrado inflamatório em amostras de tecido de camundongos infectados por <i>S. Typhimurium</i>: ...</b>	<b>48</b>
<b>Figura 13 - Níveis de imunoglobulina A secretória no fluido intestinal.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 14 - Taxa de translocação de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 15 - Taxa de inflamação visceral .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Origem das linhagens de <i>Lpl. plantarum</i> utilizadas.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 2 – Grupos experimentais para o ensaio de mortalidade.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 3 – Pontuação de sintomas de distresse.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	Do inglês, <i>American type culture collection</i>
<b>BAL</b>	Bactéria do Ácido Lático
<b>CEBIO</b>	Centro de bioterismo
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>DAP</b>	Ácido mesodiaminopimérico
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>DSS</b>	Do inglês, <i>Dextran Sulfate Sodium</i>
<b>EPO</b>	Do Inglês, <i>Eosinophil Peroxidase</i>
<b>g</b>	Gramas
<b>HE</b>	Hematoxilina Eosina
<b>HTAB</b>	Do inglês, <i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
<b>IFN - <math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>sIgA</b>	Imunoglobulina A secretora
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL - 10</b>	Interleucina 10
<b>IL - 1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1-beta
<b>IL - 4</b>	Interleucina 4
<b>IL - 6</b>	Interleucina 6
<b>IL - 12</b>	Interleucina 12
<b>IL - 18</b>	Interleucina 18
<b>INV</b>	Gene, do inglês, <i>invasibility</i>
<b>IO</b>	Índice de massa de órgão
<b>KC</b>	Do inglês, <i>keratinocyte chemoattractant</i>
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>Kg</b>	Quilograma
<b><i>Lpb. plantarum</i></b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria-Bertani
<b>LAMASP</b>	Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública
<b>LABIO</b>	Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
<b>LGCM</b>	Laboratório de Genética Celular e Molecular
<b>LITAF</b>	Do inglês, <i>Lipopolysaccharide Induced TNF Factor</i>

<b>LPS</b>	Lipopolissacarideo ou lipoglicano
<b>M</b>	Molar
<b>MALDI-TOF</b>	Do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MRS</b>	Meio de cultura de Man, Ragosa & Sharpe
<b>MUC 2</b>	Gene mucina 2
<b>NAG</b>	N-acetil-beta-D-glicosaminidase
<b>NRAMP - 1</b>	Do inglês, <i>natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
<b>NF-κB</b>	Do inglês, <i>nuclear factor kappa B</i>
<b>NK</b>	Do inglês, <i>natural killer</i>
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OPD</b>	Do inglês, <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i>
<b>PBS</b>	Do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PGC - 3</b>	Do inglês, <i>pili gene cluster 3</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Do inglês, <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<b>ROS</b>	Do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SNT</b>	Salmonelose não-tifoide
<b>S. Typhimurium</b>	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium
<b>SCFA</b>	Do inglês, <i>Short-chain fatty acid</i>
<b>SCV</b>	Do inglês, <i>Salmonella-containing Vacuole</i>
<b>SPI - 1</b>	Do inglês, <i>Salmonella pathogenicity island 1</i>
<b>TGF – β1</b>	Do inglês, <i>transforming growth factor-beta 1</i>
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF - α</b>	Do inglês, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
<b>T3SS</b>	Do inglês, <i>Type III secretion system</i>
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>°C</b>	Graus celsius



<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>%</b>	Porcentos

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1. Gênero <i>Salmonella</i></b> .....	18
<b>1.1.1. Patogenicidade da <i>Salmonella</i> Não-Tifoide</b> .....	18
1.1.1.1. Colonização e invasão .....	18
1.1.1.2. Rompimento da barreira .....	19
1.1.1.3. Permanência Intracelular .....	20
<b>1.1.2. Resposta Imune Protetora Contra Infecção Por <i>S. Typhimurium</i></b> .....	21
<b>1.1.3. Tratamento</b> .....	22
<b>1.2. Bactérias Lácticas</b> .....	22
<b>1.2.1. Atividade antimicrobiana</b> .....	23
<b>1.2.2. Gênero <i>Lactiplantibacillus</i></b> .....	27
<b>1.2.3. Aplicação de <i>Lpb. plantarum</i> como Probiótico</b> .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	32
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>4.1. Linhagens bacterianas e condições de crescimento</b> .....	33
<b>4.2 Avaliação <i>in vitro</i> de atividade antibacteriana de <i>Lpb. plantarum</i></b> .....	34
4.2.1 Ensaio de Coagregação .....	34
4.2.2. Ensaio de atividade Antibacteriana do Sobrenadante de <i>Lpb. plantarum</i> .....	35
<b>4.3 Avaliação do efeito enteroprotetor das linhagens de <i>Lpb. plantarum</i> na infecção por <i>S. Typhimurium</i></b> .....	35
4.3.1 Animais .....	35
4.3.2. Ensaio de mortalidade .....	36
4.3.3. Sinais clínicos e sintomas de distresse .....	38
4.3.4. Análise histológica e morfométrica.....	38
4.3.5. Avaliação do infiltrado inflamatório .....	39
4.3.6. Dosagem de IgA secretora (sIgA).....	40
4.3.7. Translocação de <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	40
4.3.8. Índice Massa de Órgãos (IO) .....	40
<b>4.4 Análises Estatísticas</b> .....	41
<b>5. RESULTADOS</b> .....	42
<b>5.1 Ensaio de Coagregação de <i>Lpb. plantarum</i> com <i>S. Typhimurium</i></b> .....	42
<b>5.2. Ensaio de Atividade Antibacteriana do Sobrenadante de cultivo de linhagens de <i>Lpb.</i></b>	

<i>plantarum</i> .....	47
<b>5.3. Ensaio de Mortalidade</b> .....	47
<b>5.4. Sinais clínicos e sintomas de distresse</b> .....	49
<b>5.5. Análise histológica e morfometria</b> .....	52
<b>5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório</b> .....	53
<b>5.7. Dosagem de IgA secretora (sIgA)</b> .....	54
<b>5.8. Translocação bacteriana</b> .....	55
<b>5.9. Índice Massa de Órgãos (IO)</b> .....	56
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)</b> .....	73
<b>ANEXO B - CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA ADAPTADA DE PRADHAN E COLABORADORES (2019)</b> .....	74
<b>ANEXO C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	76

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae* constituído por microrganismos Gram-negativos, em forma de bastonetes, metabolismo anaeróbico facultativos, motilidade por flagelo, não fermentadores de lactose, produtores de sulfeto de hidrogênio, oxidase negativa e catalase positiva (ABULREESH, 2012). Dentro deste gênero há duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última, divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, além de conter um total de 2659 sorovares (GALÁN; BLISKA, 1996; WEI *et al.*, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). A maioria dos sorovares, cerca de 1586, são da espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GRIMONT *et al.*, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014).

Em relação aos sorovares, alguns possuem hospedeiros naturais, geralmente animais, que são assintomáticos, contudo todos os sorovares são patogênicos para humanos. As linhagens de *Salmonella* sp. são comumente encontradas no trato gastrointestinal (TGI) de animais de fazenda e em humanos. Como reservatórios menos usuais podemos citar répteis, aves selvagens e até mesmo insetos. No que tange a fontes de contaminação alimentar por *Salmonella* sp., os mais comuns são ovos, carne bovina, carne de aves, carne de porco, vegetais, nozes, laticínios e água (ANDINO; HANNING, 2015). A salmonelose para humanos pode ser classificada em: a) febres entéricas: tifoide e paratifoide, causadas pelos sorovares *S. enterica* Typhi e *S. enterica* Paratyphi, respectivamente, e que levam, em um período de incubação de 7 a 14 dias, a episódios de febre, cefaleia, bradicardia e manchas rosadas no peito, sendo responsáveis por cerca de 200.000 mortes e mais de 22 milhões de doentes a cada ano (OHL; MILLER, 2001; BUCKLER; WALKER; BLACK, 2012; b) salmonelose não-tifoide (SNT): diferente das febres entéricas que estão limitadas somente a humanos, outros animais podem hospedar o mesmo patógeno causador de SNT e sua incubação é estimada em 6 a 12 horas. Este tipo de infecção é causada principalmente pelos sorovares: Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg, e entre os principais sintomas destacam-se náusea, vômitos, diarreia não sanguinolenta, febre, calafrios, dor abdominal e mialgia (FEASEY *et al.*, 2012).

#### 1.1.1. Patogenicidade da *Salmonella* Não-Tifoide

##### 1.1.1.1. Colonização e invasão

*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium é conhecida por ser um patógeno intracelular facultativo, o qual causa um quadro sistêmico em camundongos infectados, similar a febre tifoide (doença causada por *S. Typhi*, em humanos).

A principal forma de aquisição de salmonelose é pela via de contaminação fecal-oral, onde alimentos e água contaminados são diretamente consumidos por hospedeiros susceptíveis a desenvolver a doença intestinal (FORD *et al.*, 2016). Após a introdução por via oral de *S. Typhimurium*, a bactéria inicia um percurso pelo TGI sobrevivendo a acidez estomacal e ação dos sais biliares até chegar ao intestino, seu alvo de colonização, especificamente, o íleo distal e cólon proximal, onde invadirá o epitélio intestinal para replicação e sobrevivência dentro das células do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2003; LÖNNERMARK *et al.*, 2015).

Primeiramente, para obter sucesso na colonização do hospedeiro, um importante fator é a presença das fimbrias (pili) que são as primeiras estruturas que entram em contato com o epitélio intestinal, onde inúmeras adesinas (exemplo, flagelinas, lipopolissacarídeo), podem se ligar a receptores das células do hospedeiro e promovem o aumento da sobrevivência da bactéria, através do efeito de auto-agregação (COLLINSON *et al.*, 1996; CHESSA *et al.*, 2008). Lipopolissacarídeos (LPS), por exemplo, são moléculas que possuem um comportamento atípico em *S. enterica* pois são estrategicamente liberadas gradualmente no momento de colonização e causam os sintomas iniciais da infecção devido a atividade pró-inflamatória de monócitos e macrófagos (NEEDHAM; TRENT, 2013; BENDER *et al.*, 2013). Em camundongos ocorrem outras observações intestinais como o aumento das placas de Peyer e espessamento da mucosa do íleo, além de uma série de lesões na porção terminal no período de três a cinco dias. Esta enterite difusa pode apresentar um infiltrado caracterizado pela predominância de leucócitos mononucleares (SANTOS *et al.*, 2001).

#### 1.1.1.2. Rompimento da barreira

Em decorrência da ação dos fatores de virulência da *Salmonella* Typhimurium, citados anteriormente, ocorre o rompimento da barreira epitelial intestinal. Para viabilizar a invasão de células do epitélio intestinal do hospedeiro, *S. Typhimurium* utiliza principalmente dois sistemas de secreção do tipo III (T3SS), um grupo de proteínas de canal que são responsáveis por entregar os efetores (moléculas de alta virulência) de *Salmonella* ao ambiente intracelular dos enterócitos, promovendo a invasão de enterócitos, influxo neutrofilico, ocorrência dos episódios diarreicos (ZHANG *et al.*, 2002) e auxiliando na permanência e replicação intracelular bacteriana em fagócitos por formação dos vacúolos contendo salmonela (SCV, do inglês, *Salmonella-containing vacuole*) (GALÁN; COLLMER, 1999; KNODLER; STEELE-MORTIMER, 2003; SRIKUMAR *et al.*, 2015).

Um dos mais bem descritos métodos de invasão de *Salmonella* sp., é tipicamente a invasão que ocorre pela via de células M. Estas capturam as células bacterianas e as entregam

a células apresentadoras de antígenos associadas às placas de Peyer pela região do domo subjacente. Posteriormente, o patógeno irá evadir-se para a região basolateral das placas de Peyer, onde alcançará a lâmina própria, entrará em contato com células fagocíticas e será capaz de liberar seus efetores utilizando o T3SS (REIS *et al.*, 2003; HASE *et al.*, 2009). Entretanto, o modo e os mecanismos envolvidos na evasão da placa de Peyer não estão bem esclarecidos. Outro método de invasão é por meio de células intestinais não-fagocíticas. Neste caso, a *Salmonella* sp. provoca um rearranjo do citoesqueleto das células epiteliais, promovendo o aparecimento de pseudópodes que englobam a bactéria. A indução de sua própria fagocitação por uma célula não especializada é devida as proteínas efetoras de *Salmonella* sp. inseridas na célula hospedeira por meio de T3SS-1, como por exemplo as proteínas codificadas pela família de genes *inv* (do inglês, *invasibility*) (EHRBAR *et al.*, 2001; TAKAYA *et al.*, 2003). Além dos exemplos citados anteriormente, a invasão por meio de células também pode ocorrer no íleo terminal, onde células dendríticas diretamente alocados na lâmina própria, projetam finas extensões membranares através do epitélio intestinal por meio da ação de efetores codificados por SPI-1, facilitando a passagem do patógeno do lúmen para a lamina própria. Outro modo a ser considerado para quebrar a barreira epitelial é por alteração das junções celulares que ocasiona a passagem bacteriana. Neste caso, a *Salmonella* sp. induz a ativação de proteínas da família Rho GTPases que atuam na reorganização do citoesqueleto de actina e conseqüentemente também alteram a localização das proteínas envolvidas nas junções compactas e aderentes, o que possibilita a invasão bacteriana pelos espaços lateral e basolateral em um processo conhecido como penetração paracelular (MEYERHOLZ *et al.*, 2002; CHIEPPA *et al.*, 2006; NIESS *et al.*, 2005; KÖHLER *et al.*, 2007; BUENO *et al.*, 2010).

#### 1.1.1.3. Permanência Intracelular

É essencial para a patogenicidade da *Salmonella* sp., a capacidade de sobrevivência no ambiente intracelular dos seus hospedeiros, sendo que cepas incapazes de sobreviver neste ambiente não são consideradas virulentas (BAKOWSKI; BRAUN; BRUMELL, 2008). Após o transporte da *Salmonella* para o interior das células eucarióticas, há a formação de um fagossomo contendo o patógeno. Logo, a presença de uma bactéria no interior da célula deveria ativar a resposta imune celular que tenta eliminar o conteúdo do vacúolo por fusão com o lisossomo. Entretanto, a *Salmonella* se utiliza do T3SS-2 para liberar efetores que alteram o comportamento do vacúolo (ERIKSSON *et al.*, 2003), ocasionando a evasão do sistema de degradação lisossomal (HOLDEN, 2002) e permitindo sua sobrevivência e conseqüentemente sua replicação dentro destas estruturas alteradas, conhecidas como vacúolos contendo

salmonela (SCV), em macrófagos alocados nos linfonodos mesentéricos - estes possibilitam o acesso do patógeno ao sistema reticulo-endotelial do organismo infectado (MONACK; BOULEY; FALKOW, 2004; MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). Desta forma, como última fase a *Salmonella* sp. alcança o sistema linfático e posteriormente o sistema circulatório, onde se inicia uma breve bacteremia. Esta é rapidamente controlada por macrófagos presentes no fígado e baço, contudo parte da *Salmonella* não é eliminada e começa a se replicar nestes órgãos. Em órgãos de camundongos infectados por *S. Typhimurium* este crescimento bacteriano pode chegar até 1,5 log/dia, gerando hepato e esplenomegalia. Na fase final, se estabelece um platô bacteriano que pode permanecer por uma ou várias semanas no organismo do camundongo, dependendo da linhagem de salmonela e linhagem do camundongo, além da presença de macrófagos. Este evento deve durar até a ação da resposta imune adquirida que poderá eliminar eficientemente o patógeno e conferir um período sem reinfecções (MASTROENI, 2002).

### 1.1.2. Resposta Imune Protetora Contra Infecção Por *S. Typhimurium*

A eficiente colonização intestinal da *Salmonella* sp. gera diversas lesões epiteliais e intenso influxo de leucócitos monomorfonucleares (BARTHEL *et al.*, 2003). Nos estágios iniciais de contato com o epitélio intestinal, o contato com partículas bacterianas, como o LPS, inicia um processo inflamatório nos tecidos próximos, este processo resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-12* e *IL-18* (BEHNSEN *et al.*, 2015) e alta sinalização por linfócitos T NK (do inglês, *natural killer*) produtor de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , citocinas essenciais para recrutamento e ativação de macrófagos, assim como para a indução de suas ferramentas bactericidas e ação final de fagolisossomos (HUANG, 2021). Geralmente, estes mecanismos eliminam grande quantidade da bactéria invasora. Contudo, mecanismos de virulência presentes na *Salmonella* sp., podem interferir na ação destas células imune (BROWNE; LESNICK; GUINEY, 2002). Outro ponto chave para a resistência/susceptibilidade a infecção de *S. Typhimurium*, é a expressão da proteína transmembrana, codificada por *Nramp1* (do inglês, *natural resistance-associated macrophage protein 1*), em macrófagos de camundongos. Os animais que não expressam esta proteína em seus macrófagos são mais suscetíveis a infecções por *Salmonella* sp. (FRITSCHÉ *et al.*, 2012)

Por outro lado, na resposta imune tardia, a ativação das células T é o principal estimulador da liberação do fator de ativação de macrófagos IFN- $\gamma$  para controle da replicação bacteriana (MONACK; BOULEY; FALKOW, 2004), assim como também células T CD4+ estão mais envolvidas neste processo que células CD8+ (LOPEZ-MEDINA *et al.*, 2014). Neste

seguimento, imunoglobulinas como IgA e IgM podem impedir a invasão tecidual da *Salmonella* sp. Experimentos demonstraram que um tratamento utilizando um hibridoma de IgA específica para *Salmonella* sp. foi capaz de impedir sua adesão a células epiteliais e células M (MICHETTI *et al.*, 1992; 1994; MITTRÜCKER; KAUFMANN, 2000).

### 1.1.3. Tratamento

As recomendações para casos de salmonelose leve são manter a hidratação e evitar o uso de medicamentos antibacterianos, pois esse uso poderia aumentar o tempo de permanência do patógeno no organismo. Em casos mais severos da doença, como manifestação de febre muito alta, intensa diarreia ou indicativo de infecções sistêmicas o principal arsenal terapêutico disponível é a antibioticoterapia, com o uso de fluoroquinolonas ou cefalosporinas de terceira geração. Entretanto o uso destas drogas tem provocado o aparecimento de cepas multirresistentes a antimicrobianos (a exemplo da variante ST313 *S. Typhimurium* resistente a fluoroquinolonas), casos de disbiose, agravamento de episódios diarreicos e prolongamento da colonização do patógeno no TGI, reduzindo dessa forma a eficácia do tratamento convencional (RAJASHEKARA *et al.*, 2000; CRUMP *et al.*, 2015; LEEKITCHAROENPHON *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2018; WILLIAMSON *et al.*, 2018; BAWN *et al.*, 2020).

Diante desses desafios, a pesquisa de novas alternativas como futuros tratamentos, tais como linhagens probióticas de Bactérias Acido Lácticas, representa uma estratégia promissora no combate a SNT.

## 1.2. Bactérias Lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes ou cocos, não esporulantes, catalase negativo, fastidiosas, microaerófilas ou anaeróbicas facultativas, geralmente mesófilas, sem motilidade, com alta tolerância a baixo pH e que tem o lactato como principal produto decorrente da fermentação de carboidratos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; PESSIONE, 2012; VON WRIGHT; AXELSSON, 2019). Seus principais representantes são dos gêneros *Lactobacillus* (reclassificado em 2020), *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (MOKOENA *et al.*, 2017; KÖNIG; FRÖHLICH, 2017; ZHENG *et al.*, 2020). Estes microrganismos podem ser isolados de diversos ambientes, incluindo vegetais em estado conservado e em decomposição, tubérculos como batata e beterraba, sucos, cereais, vinho e outras bebidas fermentadas, assim como em produtos de origem animal, principalmente laticínios, carnes e peixes fermentados. Estes microrganismos



podem também ser estar presentes em silagem, esgotos e cavidades de animais e humanos, incluindo as mucosas gastrointestinal e vaginal (DJADOUNI; KIHAL, 2012; LIU *et al.*, 2014).

Uma característica importante desse grupo é que muitas linhagens demonstram efeitos benéficos, sendo portanto caracterizadas como probióticos (VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015), que é um termo usado para definir todo o micro-organismo vivo que confere benefícios a saúde do hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (HILL *et al.*, 2014). Vários estudos correlacionam o grupo das BAL, principalmente espécies de *Lactobacillus*, a diversos efeitos benéficos no TGI humano. Esses efeitos são decorrentes de inúmeros mecanismos de ação, principalmente da (i) atividade antimicrobiana de seus metabólitos e peptídeos contra enteropatógenos, (ii) fortalecimento da barreira epitelial de mucosas e (iii) estimulação de respostas imunes anti-inflamatórias. (KANDLER, 1983; SOOMRO; MASUD; ANWAAR, 2002; FOLIGNE *et al.*, 2013; COTTER; ROSS; HILL, 2013).

### 1.2.1. Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana das BAL, por meio de ácidos orgânicos, ácidos de graxos de cadeia curta, bacteriocinas e espécies reativas de oxigênio, dentre outros (DE VUYST; LEROY, 2007) (Figura 1) apontam para seu uso como um promissor candidato terapêutico no tratamento de distúrbios inflamatórios e infecciosos do TGI, como gastroenterites causadas por enteropatógenos como *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium difficile*, e doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Crohn e a colite ulcerativa, nas quais patógenos oportunistas podem atuar como agentes complicadores (PILLAI; NELSON, 2008; CASTILLO *et al.*, 2013; ACURCIO *et al.*, 2017; JAKUBCZYK; LESZCZYŃSKA; GÓRSKA. 2020).

Os efeitos antimicrobianos dessas bactérias são decorrentes da produção de alguns compostos inibitórios produzidos por elas, como ácidos orgânicos (lactato) e ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs, do inglês, “*Short-chain fatty acids*”) (acetato), que acidificam o pH no lúmen intestinal e podem interferir nas funções celulares de outros microrganismos (KIVANÇ; YILMAZ, 2011), como visto na prospecção de 15 bactérias, pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* e - o antigo gênero - *Lactobacillus*, produtoras de diferentes ácidos orgânicos que apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra as espécies *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile* (TEJERO-SARIÑENA *et al.*, 2012). Em adição, um estudo comprovou que SCFAs da microbiota intestinal estão associados com os receptores GPR43 para regulação da expressão

de peptídeos antimicrobianos (AMP) RegIII $\gamma$  e  $\beta$ -defensinas produzidos por células epiteliais intestinais (ZHAO *et al.*, 2018).

Também devido à produção de peptídeos com ação antibacteriana, conhecidos como bacteriocinas, um grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos que atuam via formação de poros na membrana citoplasmática das bactérias alvos, o que aumenta o fluxo de íons transmembranares, ocasionando, assim, uma queda no pH intracelular e levando a célula à morte (WIEDEMANN *et al.*, 2006).

As bacteriocinas são classificadas em 4 principais classes:

(i) classe I ou lantibióticos, devido a alteração pós-tradução com adição de lantionina ou b-metil lantionina: são pequenos peptídeos de cerca de 5 kDa e seu principal representante é a nisina A;

(ii) classe II ou não-lantibióticos (não contém lantionina), são pequenos (<10 kDa), termoestáveis, bastante abundantes no ambiente. Ademais, podem ser divididos em 4 subgrupos: classe IIa (semelhante a pediocinas), possuem alta especificidade contra *Listeria monocytogenes* (DRIDER *et al.*, 2006), classe IIb (bacteriocinas complexas, formadas por 2 componentes), classe IIc (bacteriocinas circulares) e o último subgrupo são do tipo não modificada, linear e não “pediocina-like”;

(iii) classe III, que são grandes peptídeos (>10kDa), termoestáveis e subdivididos em 2 grupos: grupo IIIa, enzimas bacteriolíticas (bacteriolisinas) e seu principal representante é a Lisostafina e grupo IIIb, bacteriocinas não líticas, sendo seu principal representante é helveticina J isolado de *Lb. helveticus*

(iv) classe IV ou bacteriocinas cíclicas. Este último grupo possui peptídeos que sofrem modificações pós-traducionais para formação de uma ligação “head-tail”, o que lhes confere a circularidade estrutural, seu principal integrante é a enteriocina AS-48 (MAQUEDA *et al.*, 2004; COTTER; HILL; ROSS, 2005; ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016

Outro modo de ação microbicida dos probióticos das BAL é através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), como o peróxido de hidrogênio. A secreção de peróxido de hidrogênio pode gerar um estresse oxidativo causando danos a diferentes tipos de biomoléculas como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas de patógenos. Deste modo, Kullisaar e colaboradores (2002), observaram que duas linhagens de *Limosilactobacillus fermentum* possuíam uma ação eficaz microbicida pela ação do peróxido de hidrogênio e também resistência a estresse oxidativo, similar àquela observada em

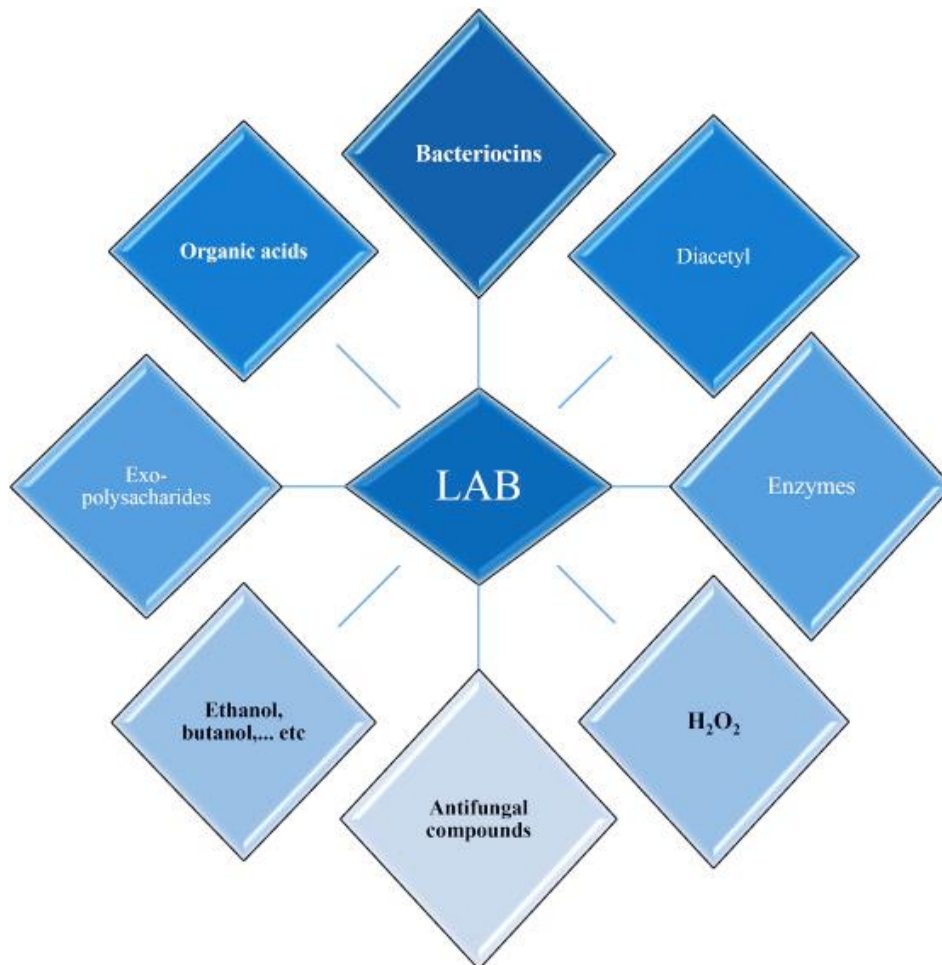
enteropatógenos. Corroborando com os resultados anteriores, a *Llb. fermentum* CS12-1 mostrou alta concentração de peróxido de hidrogênio (3.5 mM) e capacidade de inibição *in vitro* da *Escherichia coli* K88, uma cepa enterotoxigênica causadora de diarreia em leitões (KANG *et al.*, 2005).

Outro mecanismo antimicrobiano pertencente ao grupo das BAL é a capacidade de excluir patógenos competitivamente, através da disputa por sítios e fontes nutricionais, o que representa um importante mecanismo de proteção do TGI. A ocupação de sítios de ligação é possível, especificamente devido as interações com biomoléculas da parede celular bacteriana e aderência a células epiteliais (LEBEER *et al.*, 2008). À exemplo, alguns *Lactobacillus* spp. conseguem se ligar a manose, para competir com o sítio de ligação de *E. coli* através de proteínas de fímbria tipo 1 (OSSET *et al.*, 2001). Da mesma forma, Mack e colaboradores (2003) demonstraram *in vitro*, um dos mecanismos moleculares que possibilita a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v se fixar a superfície epitelial intestinal e afetar a ligação de bactérias exógenas. Por meio da utilização de uma linhagem mutante de *Lpb. plantarum* 299v para o gene (*Msa*), que codifica a adesina dependente de manose, foi observado que a linhagem mutante possuía dez vezes menos aderência a células epiteliais HT-29 e incapacidade de inibir a ligação de uma cepa enteropatogênica de *E. coli* a essas células epiteliais, quando comparada com o comportamento de sua linhagem selvagem. Semelhantemente, outro estudo sugeriu o mecanismo molecular envolvido na exclusão competitiva de *E. faecium* E1165 (bactéria resistente à vancomicina e responsável por várias infecções nosocomiais) por *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG). Através de análises genômicas, foi observado alta similaridade entre o *pili gene cluster 3 (PGC3)* de *E. faecium* e o cluster de gene de pili *SpaCBA* *Lcb. rhamnosus* GG, ambos envolvidos na aderência ao muco intestinal. Além disso, ensaios *in vitro* comprovaram que anticorpos anti-SpaCBA, ou especificamente contra a subunidade proteica SpaC, são capazes de se ligarem a antígenos de ambas as espécies estudadas. A observação desta resposta imunológica cruzada sugere, que o pilli de *Lcb. rhamnosus* GG seja capaz de bloquear o patógeno ao se ligar primeiramente ao muco intestinal (TYTGAT *et al.*, 2016).

Outro fator que pode atuar na proteção contra patógenos, é a habilidade de coagregação de algumas linhagens probióticas, ou seja, a ligação direta a outras bactérias, possibilitando sua exclusão, por exemplo, durante a passagem pelo TGI (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008). Por exemplo, em *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) foi identificada uma proteína de superfície (*GroEL*) que era responsável pela aderência do probiótico a *Helicobacter pylori*, uma dos principais agentes etiológicos de diarreias infecciosas

(BERGONZELLI *et al.*, 2006). De mesma natureza, o gene *cpf* que codifica uma proteína de superfície pertencente a *Loigolactobacillus coryniformis* DSM20001T, comprovou-se está envolvido na agregação deste bacilo a enteropatógenos como *E. coli* K88, *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* (SCHACHTSIEK; HAMMES; HERTEL, 2004). Da mesma forma, através de ensaios de coagregação, Gómez e colaboradores (2016) descreveram as propriedades probióticas de bactérias lácticas bacteriocinogênicas *Lactococcus lactis* VB69, *L. lactis* VB94, *Latilactobacillus sakei* MBSa1 e *Latilactobacillus curvatus* MBSa3 e não bacteriocinogênicas *L. lactis* 368, *Lactobacillus helveticus* 354, *Lacticaseibacillus casei* 40 e *Weissella viridescens* 113 quanto a capacidade de impedir a formação de biofilmes das seguintes bactérias patogênicas *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *S. Typhimurium*.

Por outro lado, a inserção de bactérias exógenas na comunidade bacteriana comensal, tais como os probióticos, pode afetar consequentemente a biodisponibilidade de nutrientes, acarretando o desfavorecimento do crescimento e fixação de patógenos. Em 2013, Deriu e colaboradores observaram que a linhagem *Escherichia coli* Nissle 1917 interferia na captação de ferro por *S. Typhimurium* no ambiente intestinal com inflamação aguda (colite induzida por DSS) ou crônica (infecção persistente) de camundongos. Dessa forma, a *E. coli* Nissle 1917 se mostrou capaz de competir pelo nutriente ferro em intestinos inflamados, transpor a ação da proteína antimicrobiana lipocalina 2, que previne sequestro de ferro por bactérias, e reduzir a colonização e posterior fixação da *S. Typhimurium*. Adicionalmente, no ambiente intestinal, muitas bactérias da microbiota modulam a disponibilidade de oxigênio, tornando-o escasso, o que pode ser um fator que desacelera o crescimento de vários patógenos aeróbicos (ALTIER, 2005)



**Figura 1: Compostos antimicrobianos do grupo BAL:** Apresentação de alguns dos principais mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana de bactérias do grupo BAL, no inglês, “LAB”, representadas como: bacteriocinas; diacetil; enzimas; peróxido de hidrogênio; compostos antifúngicos; álcoois; exopolissacarídeos; ácidos orgânicos. Fonte: adaptado de Daba e Elkhateeb (2020)

### 1.2.2. Gênero *Lactiplantibacillus*

Em 1901, Beijerinck propôs a criação do gênero *Lactobacillus* contendo 262 espécies (até março de 2020), pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* e grupo familiar mais próximo *Leuconostocaceae*. Atualmente, o gênero *Lactobacillus* passou por uma reclassificação sendo dividido em 25 gêneros (sendo destes 23 novos gêneros) composto por: *Lactobacillus* e *Paralactobacillus* – já existentes -, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Lentilactobacillus* e as famílias *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae*

formaram uma única família denominada *Lactobacillaceae*. Portanto, a nomenclatura utilizada para os microrganismos deste trabalho será *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lpb. plantarum*) (LUDWIG *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2020), seguindo a nova reclassificação taxônomica.

A nova reclassificação do gênero *Lactiplantibacillus* compreende 17 espécies: *Lpb. argentoratensis*, *Lpb. daoliensis*, *Lpb. daowaiensis*, *Lpb. dongliensis*, *Lpb. fabifermentans*, *Lpb. garii*, *Lpb. herbarum*, *Lpb. modestisalitolersans*, *Lpb. mudanjiangensis*, *Lpb. nangangensis*, *Lpb. paraplantarum*, *Lpb. pentosus*, *Lpb. pingfangensis*, *Lpb. plajomi*, *Lpb. plantarum*, *Lpb. songbeiensis* e *Lpb. xiangfangensis* (PARTE *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020).

Dentre estas espécies, a mais explorada por seu potencial probiótico é a *Lpb. plantarum* sendo utilizadas em diversos modelos *in vivo* e diferentes patologias. *Lpb. plantarum* é uma espécie Gram-positiva, em forma de bastão (bacilo), sem motilidade, não forma esporos, microaerofílica e possui temperatura de crescimento entre 20 a 45°C (mesofílica). Geralmente possui atividade de catalase negativa, mas algumas linhagens, em condições específicas, possuem atividade de catalase ou pseudocatalase contendo manganês (ZHENG *et al.*, 2020). Quanto a sua parede celular, é rica em ácidos do tipo glicerolteicóico (em algumas cepas, o tipo de ácido teicóico pode variar) e o ácido do tipo mesodiaminopimérico (DAP), como tipo de peptidoglicano mais comum. Devido a presença de cassetes de genes para metabolismo de carboidratos, esta espécie também está inclusa no grupo de microrganismos heterofermentativos facultativos oferecendo vantagem adaptativa em variados ambiente (BEHERA; RAY; ZDOLEC, 2018).

Frequentemente, a espécie *Lpb. plantarum* é isolada de produtos fermentados tais como vegetais, carnes, laticínios e cereais. Por outro lado, algumas cepas foram encontradas associadas a microbiota de insetos e de vertebrados. No caso de humanos, esta espécie já foi localizada no trato gastrointestinal, pele, microbiota vaginal e cavidade oral (MARTINO *et al.*, 2016; STORELLI *et al.*, 2018).

### 1.2.3. Aplicação de *Lpb. plantarum* como Probiótico

Os isolados de *Lpb. plantarum* são fortes candidatos para um possível uso terapêutico em diferentes condições patológicas, devido muitas linhagens apresentarem efeitos benéficos ao hospedeiro, incluindo seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, bem como sua capacidade de inibir microrganismos patogênicos (HAYEK; IBRAHIM, 2013; KARAMI *et al.*,

2017; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018; ZHENG *et al.*, 2020; BRANDI *et al.*, 2020; LEE; KIM, 2020). Este comportamento foi observado na linhagem *Lpb. plantarum* 299v ao estimular *in vitro*, o aumento de IL-10 em células isoladas de cólon humano inflamado como resposta atenuante a inflamação (PATHMAKANTHAN *et al.*, 2004). A capacidade de inibição foi observada em ensaios, *in vitro* e *in vivo*, envolvendo a bactéria multirresistente e enteroagregativa *E. coli* ATCC 25922, onde demonstrou-se que *Lpb. plantarum* MTCC 1407 reduz a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) do patógeno e melhorou a arquitetura do epitélio intestinal (KUMAR *et al.*, 2016). Em outro estudo envolvendo 10 sujeitos saudáveis ingerindo um probiótico por 7 dias, foi observado efeitos promissores da *Lpb. plantarum* TIFN101 sobre a barreira do intestino delgado com a modulação de vias de transcrição de genes envolvidos na adesão célula-célula e expressão de genes envolvidos na manutenção da arquitetura intestinal, como *MUC 2* (MUJAGIC *et al.*, 2017). Adicionalmente, um outro estudo demonstrou que frangos recém nascidos tratados com *Lpb. plantarum* LLTC-113 e infectados com *S. Typhimurium* apresentaram ausência de rompimento da barreira intestinal, diminuição da translocação para o baço e fígado e diminuição da presença de marcadores inflamatórios como mieloperoxidase (MPO), LITAF, IL-1 $\beta$  e IL-6 no soro dos animais (WANG *et al.*, 2018)

Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, 21 linhagens bacterianas isoladas de diferentes fontes foram identificadas e caracterizadas quanto as suas propriedades probióticas no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais. As identificações das bactérias foram feitas por meio de MALDI-TOF-Biotyper, indicando que todas as linhagens pertenciam ao grupo BAL. Entre estas, 10 linhagens pertenciam a espécie *Lactiplantibacillus plantarum*. Ensaios *in vitro* avaliaram propriedades benéficas (imunomodulação, tolerância ao estresse ácido e biliar, inibição de patógenos) e aspectos de segurança (antibiograma, atividade hemolítica e mucolítica) dessas linhagens (COELHO-ROCHA *et al.*, 2022). Os resultados obtidos demonstraram que algumas linhagens mostraram perfil de resistência à gentamicina, estreptomicina e vancomicina e foram sensíveis a clindamicina, eritromicina, ampicilina e cloranfenicol. Nos experimentos complementares de segurança, para degradação de mucina e hemólise, nenhuma linhagem mostrou-se capaz de degradar mucina ou apresentou atividade  $\beta$ -hemolítica demonstrando assim ausência das principais características de bactérias patogênicas.

Além disso, ao serem avaliadas quanto sua sobrevivência em diferentes condições de estresse, geralmente encontradas no TGI, as linhagens apresentaram resistência significativa ao suco gástrico e sais biliares, e foram capazes de melhorar os danos histopatológicos e

inflamatórios induzidos pelo quimioterápico 5-Fluorouracil em camundongos BALB/c via redução da expressão gênica de citocinas inflamatórias IL6 e IL1b e aumento da expressão gênica de IL10, indicando fortemente sua aplicabilidade como uma linhagem com efeitos imunomodulatórios. Redução do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na mucosa intestinal foi também observado. Outro resultado de grande relevância, foi a presença de atividade antimicrobiana *in vitro* das linhagens contra seis patógenos intestinais, *E. coli*, *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*, sugerindo que estas linhagens possuíam grande potencial probiótico para tratamento de gastroenterites. (COELHO-ROCHA *et al.*, 2022).



## 2. JUSTIFICATIVA

Os problemas gerados por *Salmonella* sp. afetam vários setores da sociedade, desde a produção industrial de alimentos até o setor de saúde. Isto gera perda de investimento, diminuição de importação e exportações, desperdício de insumos, aumento do número de internações, crescimento da taxa de mortalidade da população e risco de prevalência de cepas multirresistentes a antibióticos. Em contrapartida, vários estudos descrevem a ação de probióticos do gênero *Lactobacillus* contra várias enterobactérias patogênicas, como *Salmonella* sp., sendo possível observar aumento da resposta imune na mucosa intestinal. Diante do exposto, o uso de probióticos, além de ser uma alternativa promissora, poderia diminuir o uso e prescrição de antibióticos, assim como diminuir o risco de seleção de cepas resistentes. Isto poderia se traduzir em uma futura candidata a um possível terapêutico contra salmonelose que poderia prevenir complicações clínicas, como danos hepáticos, efeitos pró-inflamatórios do sistema imune e desnutrição severa ocasionada pela diarreia.

Em um trabalho anterior do nosso grupo, observamos que dez linhagens de *Lpb. plantarum* isoladas de diferentes nichos apresentaram efeito inibitório *in vitro* contra *S. Typhimurium*, sugerindo um grande potencial contra a *Salmonella Typhimurium* (COELHO-ROCHA *et al.*, 2022). A partir desses achados, este trabalho propôs investigar o efeitos dessas linhagens *in vivo* em modelo de infecção ocasionada pela bactéria patogênica *Salmonella Typhimurium*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito enteroprotetor de dez linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* contra a infecção experimental por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em modelo murino.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana do sobrenadante *in vitro* das linhagens de *Lpb. plantarum* contra *S. Typhimurium* ATCC 14028;
- Avaliar o efeito protetor das linhagens de *Lpb. plantarum* em modelo de salmonelose induzida por *S. Typhimurium* ATCC 14028 em modelo murino;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Linhagens bacterianas e condições de crescimento

Todas as linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* foram previamente identificadas pelo método de Gram e técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) (COELHO-ROCHA *et al.*, 2022). Exceto a Lpl 20 que foi cedida pelo LANMDA: Laboratório Nacional de Nutrigenômica y Microbiômica Digestiva Animal da CONACyT, todas as linhagens foram cedidas pelo LAMASP: Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública da UFES. Por sua vez, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi cedida pelo Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Tabela 1).

**Tabela 1. Origem das linhagens de *Lpb. plantarum* utilizadas**

Origem	ID	ID (original)	Procedência
Manteiga artesanal- Feira de Santana - BA (feira livre)	<b>Lpl 2</b>	<b>MT01</b>	<b>LAMASP</b>
Mandioca - Feira de Santana - BA (feira livre)	<b>Lpl 3</b>	<b>PUB16</b>	<b>LAMASP</b>
Caldo de cana – Feira de Santana - BA (ambulante)	<b>Lpl 4</b>	<b>CC09</b>	<b>LAMASP</b>
Leite de vaca – Fazenda em Ruy Barbosa – BA	<b>Lpl 9</b>	<b>LV.cr</b>	<b>LAMASP</b>
Beterraba - Feira de Santana- BA (feira livre)	<b>Lpl 11</b>	<b>BET21</b>	<b>LAMASP</b>
Abacaxi – Feira de Santana- BA (feira livre)	<b>Lpl 14</b>	<b>ABX10.1</b>	<b>LAMASP</b>
Leite de vaca – Feira de Santana- BA	<b>Lpl 17</b>	<b>LV13</b>	<b>LAMASP</b>
Fezes de bebê de 3 dias – Feira de Santana- BA	<b>Lpl 18</b>	<b>H15</b>	<b>LAMASP</b>
Fezes de bezerro- Fazenda em Ruy Barbosa- BA	<b>Lpl 19</b>	<b>B4.23</b>	<b>LAMASP</b>
Bebida tradicional pulque- Morélia, México	<b>Lpl 20</b>	<b>aM</b>	<b>LANMDA</b>

Neste estudo, as dez linhagens de *Lpb. plantarum* foram preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em estoques contendo 15% glicerol (v/v) e utilizamos 10  $\mu\text{L}$  para ativa-las em culturas contendo 2 mL de meio caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Difco). As linhagens foram crescidas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$ , em microaerofilia e sem agitação por cerca de 16 horas e crescimento final de  $10^{11}$  UFC/mL.

*Salmonella* Typhimurim ATCC 14028 foi mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$  em solução com glicerol a 20% (v/v), e utilizamos 10  $\mu\text{L}$  para ativa-la em 1 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, q.sp.1 L de água destilada). A bactéria foi crescida em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$ , sem agitação e em aerobiose por cerca de 16 horas.

## 4.2 Avaliação *in vitro* de atividade antibacteriana de *Lpb. plantarum*

### 4.2.1 Ensaio de Coagregação

A habilidade de adesão das linhagens de *Lpb. plantarum* à superfície de *S. Typhimurium* foi avaliada através do ensaio *in vitro* de coagregação, segundo a metodologia descrita por Gómez e colaboradores (2016), com modificações.

Primeiramente, culturas de cada linhagem de *Lpb. plantarum* e de *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram crescidas separadamente até atingirem a concentração de  $10^8$  UFC/mL (segundo suas respectivas curvas de crescimento), em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 RPM, e o sobrenadante foi descartado. Após a centrifugação, as células foram lavadas por duas vezes com PBS 0,1M e ressuspensas na mesma solução.

Em seguida, em um tubo de vidro, foram adicionados 3 mL de suspensão de *S. Typhimurium* e o mesmo volume de suspensão de uma linhagem de *Lpb. plantarum*. Como controle, foi usado um tubo contendo o volume final de 6 mL somente de *S. Typhimurium*. Posteriormente, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 3 horas. Ao final da incubação, 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada tubo foi retirado e diluído (1:10) em PBS 0,1M e a mesma quantidade foi plaqueada em meio sólido MacConkey (Microgen, New Delhi, India) e logo após, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. Typhimurium*. Também em cada tubo, uma alça microbiológica foi introduzida até o fundo do tubo no intuito de coletar uma alíquota da bactéria decantada, o material coletado foi usado para confecção de lâminas para coloração de Gram e posterior microscopia (Nikon Eclipse E200MV, objetiva de 100x).

Adicionalmente, de cada suspensão inicial descrita acima, foram misturados quantidades equivalentes (500  $\mu$ L) de *Lpb. plantarum* e *S. Typhimurium* (*Amix*), assim como, 1000  $\mu$ L somente de *S. Typhimurium* (*Ast*) e a mesma quantidade de *Lpb. plantarum* (*Alb*), foram separadamente colocados para controle. Em seguida, a densidade óptica a 600nm de *Ast* e *Alb* foram aferidas no tempo 0 do experimento. Após isso, *Amix* foi incubado por 24 horas, sem agitação, a temperatura ambiente e no fim deste período, foi medida sua densidade óptica a 600nm (tempo 24 do experimento).

Para expressar a porcentagem de coagregação do experimento, foi utilizada a equação de Handley e colaboradores (1987):

$$\% \text{ coagregação} = \frac{\left(\frac{Ast + Alb}{2} - Amix\right)}{\frac{(Ast + Alb)}{2}} \times 100$$

Onde *Ast* e *Alb* representam as densidades ópticas separadamente de *S. Typhimurium* e *Lpb. plantarum*, respectivamente, no momento da incubação e *Amix* representa a densidade óptica da mistura entre as duas espécies bacterianas após 24 horas.

#### 4.2.2. Ensaio de atividade Antibacteriana do Sobrenadante de *Lpb. plantarum*

Verificamos nesse ensaio o potencial de inibição antibacteriana presente no sobrenadante de culturas de *Lpb. plantarum* livre de células, segundo a técnica descrita por Hütt e colaboradores (2006).

Para tanto, linhagens de *Lpb. plantarum* foram crescidas em 30 mL de MRS durante 18 horas a 37°C. Por outro lado, *S. Typhimurium* foi também crescida em 5 mL de meio LB. Em seguida, para se obter um sobrenadante livre de células, as culturas de *Lpb. plantarum* foram centrifugadas a rotação de 8000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Em sequência, duas alíquotas de 15 mL de cada cultura foram coletadas. Uma alíquota foi mantida o pH (entre 3 e 4). Enquanto, a outra alíquota foi neutralizada para o pH 7 com adição de solução de NaOH 1M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, ambas as alíquotas foram filtradas em poros de 0,22 µm (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). Na etapa final, 200 µL da cultura overnight de *S. Typhimurium* foi inoculada em 1 mL de cada sobrenadante (filtrado e neutralizado ou não neutralizado) das linhagem de *Lpb. plantarum*. Esses inóculos foram alocados em estufa bacteriológica a 37°C, sem agitação, por 24h. Após este período todas as culturas tiveram sua densidade óptica aferida (600 nm). Para controle, foi inoculado 200 µL de *S. Typhimurium* em meio MRS estéril.

Para o cálculo da porcentagem de inibição, utilizamos a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(DO_{\text{controle}} - DO_{\text{teste}})}{DO_{\text{controle}}} \times 100$$

### 4.3 Avaliação do efeito enteroprotetor das linhagens de *Lpb. plantarum* na infecção por *S. Typhimurium*

#### 4.3.1 Animais

Camundongos BALB/c machos, com 3 semanas de idade foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e foram mantidos em mini-isoladores modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, São Paulo, Brasil) no biotério do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução/ICB/UFMG, em um ciclo diurno/noturno de 12 horas, com aeração, umidade (60 - 80%) e temperatura (25±2°C) controlados.

Os animais receberam vermífugo por dois dias *ad libitum* e foram aclimatados durante 7 dias após vermifugação. Durante todo o período experimental os animais receberam ração comercial sólida (Nuvital, Nuvilab, Paraná, Brasil), no entanto, água filtrada *ad libitum* foi consumida somente durante o período de aclimação.

#### 4.3.2. Ensaio de mortalidade

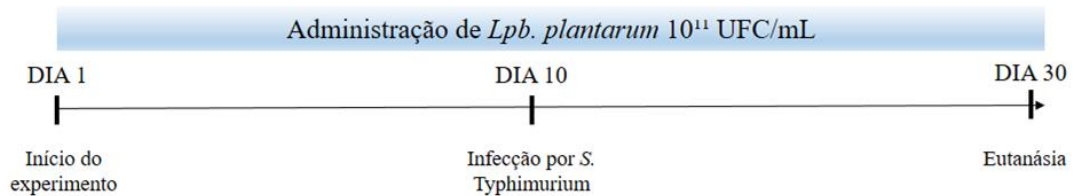
Para averiguar o papel protetor das linhagens de *Lpb. plantarum* na redução da mortalidade ocasionada pela infecção por *Salmonella* Typhimurium, utilizamos 11 grupos, descritos como 10 grupos tratamento e um grupo controle (n=10). Estes grupos foram nomeados seguindo o seguinte esquema: grupo Controle, onde os animais foram infectados, mas não receberam tratamento com as linhagens de *Lpb. plantarum*, e os demais grupos foram nomeados conforme a linhagem de *Lpb. plantarum* usado para tratamento, conforme a Tabela 2. Para isso, as 10 linhagens foram crescidas em 50 mL de meio MRS durante 18 h. Após este período, as culturas ( $10^{11}$  UFC/mL) foram centrifugadas, lavadas 3 vezes com PBS 0,1M e ressuspensas em 50 mL de PBS 0,1 M para administração aos animais via *continuous feeding* durante 30 dias. No décimo dia de experimentação os animais foram infectados com 100  $\mu$ L de *S. Typhimurium* ( $10^6$  UFC), previamente ressuspendida em PBS 0,1M.

**Tabela 2. Grupos experimentais para o ensaio de mortalidade**

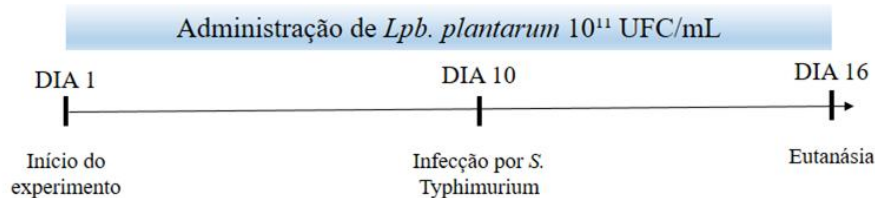
<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Desafio</b>
Controle	Sem tratamento	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 2	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 2	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 3	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 3	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 4	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 4	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 9	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 9	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 11	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 11	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 14	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 14	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 17	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 17	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 18	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 18	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 19	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 19	<i>S. Typhimurium</i>
LPL 20	<i>Lpb. plantarum</i> Lpl 20	<i>S. Typhimurium</i>

Durante todo o período experimental, os animais foram acompanhados quanto a mortalidade. Como ilustrado na figura 2A.

A)



B)



**Figura 2. Protocolo experimental de infecção por *Salmonella* Typhimurium e tratamento com *Lactiplantibacillus plantarum* em modelo murino.** A) Ensaio de mortalidade: os grupos experimentais receberam doses diárias de uma única linhagem de *Lpb. plantarum* ( $10^{11}$  UFC/mL) ou PBS 0,1 M, via *continuous feeding*, durante 30 dias. Ao décimo dia, foram desafiados com dose única de *S. Typhimurium* ( $10^6$  UFC) via gavagem. No 30º dia de experimento os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e deslocamento cervical. B) Ensaio de enteroproteção: os grupos experimentais receberam doses diárias de uma única linhagem de *Lpb. plantarum* ( $10^{11}$  UFC/mL) ou PBS 0,1 M, via *continuous feeding*, durante 16 dias. Ao décimo dia, foram desafiados com dose única de *S. Typhimurium* ( $10^6$  UFC), via gavagem. No 16º dia de experimento os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e deslocamento cervical.

A partir dos resultados do ensaio *in vivo* de mortalidade, as linhagens que apresentaram melhor efeito na prevenção da mortalidade foram selecionadas para serem testadas em experimento *in vivo* quanto a sua eficácia nos seguintes parâmetros: sinais clínicos (peso, consumo hídrico, consumo de ração e comportamento), dosagem de IgA secretora (sIgA), infiltrado de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), análise histopatológica, translocação bacteriana, índice de massa de órgãos. Assim como, estas linhagens foram direcionadas para ensaios *in vitro* complementares que ocorreram concomitantemente as análises *in vivo*.

Desta forma, para avaliar os parâmetros enteroprotetores, cada grupo experimental ( $n=6$ ) foi previamente tratado por *continuous feeding* com uma única linhagem de *Lpb. plantarum*, durante 10 dias, sob o mesmo regime utilizado no ensaio de mortalidade. No décimo dia, os grupos foram infectados com *S. Typhimurium* utilizando a mesma dose utilizada no ensaio de mortalidade e, posteriormente, foram eutanasiados, seis dias após a infecção, para coleta de amostras biológicas conforme nosso protocolo de análises. O esquema experimental pode ser

visualizado na figura 2B. Por fim, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo este procedimento antecedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (30 mg de xilazina/kg e 300 mg de cetamina/kg). As condições experimentais utilizadas no presente trabalho foram realizadas de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo 55/2022 (anexo I).

#### 4.3.3. Sinais clínicos e sintomas de distresse

Os animais foram acompanhados durante todo o período experimental quanto ao consumo de ração (50g), consumo hídrico (50 mL) e peso ponderal. Os dados de consumo foram avaliados por diferença entre a quantidade ofertada e quantidade encontrada após 24 horas.

Para inferir a presença de sintomas de distresse, utilizamos três critérios principais: estado de pelagem eriçada do animal, mudanças no temperamento e resistência a movimentação que foram avaliados diariamente por seis dias após a infecção. Para obtermos o score final de cada parâmetro, calculamos a somatória de cada animal em cada parâmetro ao final do período, segundo a pontuação contida na tabela 3, adaptada e com modificações de Atiq e colaboradores (2019).

**Tabela 3. Pontuação de sintomas de distresse.**

Sintomas	0	1	2	3
Pelagem	Pêlo brilhante	Piloereção na região do pescoço	Piloereção na região do pescoço e ventral	Piloereção em todo o corpo
Temperamento	Temperamento normal	Agitado	Marcas de estresse nos olhos, nariz ou patas	Marcas de estresse e postura curvada
Movimentação	Comportamento exploratório	Mantem em um lado da gaiola	Movimento após manipulação	Ausência de movimento após manuseio

#### 4.3.4. Análise histológica e morfométrica

Após a eutanásia, seções intestinais correspondente ao íleo e colón dos animais foram coletadas e lavadas com PBS 0,1M para retirada respectivamente de resíduos fecais e sangue. Posteriormente, as amostras intestinais foram enroladas em formato de rocambole, no sentido proximal-distal e transferidas para solução de formol 10% tamponado. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para fixação em parafina e realização de cortes histológicos. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histopatológica.

Após a obtenção das lâminas coradas, as mesmas foram analisadas por um patologista através de classificação histopatológica descrita por Pradhan *et al.* (2019), com algumas



modificações. Posteriormente, para cada lâmina, 20 campos histológicos foram capturados com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41; objetiva 40x) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5) e as imagens foram analisadas através do software ImageJ (versão 1.51j8), de forma a se medir a altura de vilosidades e a profundidade de cripta.

#### 4.3.5. Avaliação do infiltrado inflamatório

A extensão do infiltrado celular por neutrófilos e eosinófilos no cólon e íleo foi mensurada por meio da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO), conforme descrito por Coutinho *et al.* (2021). Para isso, fragmentos do íleo e cólon dos animais foram removidos e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em solução tampão com pH 4, na proporção de 100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão e, em seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o precipitado foi submetido à lise hipotônica, por adição de 500  $\mu\text{L}$  de salina 0,2%, seguido pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em solução tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e homogeneizado. Em sequência, as amostras sofreram três ciclos de congelamento/descongelamento, foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para o ensaio enzimático da MPO usando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM) como substrato e cálculo de densidade óptica (DO) a 450 nm.

Na determinação de EPO, cada 100 mg de tecido foi homogeneizado com 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2) e centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O pellet foi submetido à lise hipotônica por adição de 500  $\mu\text{L}$  de salina 0,2%, seguido pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas sob as mesmas condições utilizadas anteriormente e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuscitado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5%. Então, as amostras seguiram três ciclos de congelamento e descongelamento e depois foram centrifugadas e o sobrenadante colhido para ensaio enzimático. Por fim, 75  $\mu\text{L}$  de amostra foi incubada, por 30 minutos, com 75  $\mu\text{L}$  de 1,5 mM de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão Tris-HCl com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ao final de 30 minutos de incubação a  $20^{\circ}\text{C}$ , a reação é paralisada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e a leitura ocorre a 492nm.

Os resultados de MPO e EPO foram expressos por unidade arbitrária baseada na absorbância do ensaio enzimático.

#### 4.3.6. Dosagem de IgA secretora (sIgA)

A determinação do nível de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA, conforme descrito por Martins e colaboradores (2009). Após a eutanásia dos animais, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com PBS 0,1 M, suplementado com inibidores de protease (1  $\mu$ M de aprotinina; 25  $\mu$ M de leupeptina; 1  $\mu$ M de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS suplementado para cada 500 mg do conteúdo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 5.000 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C. Para a determinação de sIgA foi utilizado o anticorpo anti-IgA (M-8769, Sigma) de camundongo (desenvolvido em cabra) para o revestimento das microplacas anticorpo. Estes anticorpos foram conjugados a peroxidases anti-IgA de camundongo (A-4789, Sigma). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando uma curva padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Epoch) e a concentração de sIgA foi determinada na unidade de  $\mu$ g/g de fluido intestinal, baseada na curva padrão.

#### 4.3.7. Translocação de *Salmonella* Typhimurium

Em condições estéreis, o fígado do animal foi retirado e um fragmento de cerca de 1,2 g foi transferido para um microtubo, onde foi macerado e homogeneizado em PBS 0.1 M. Após a completa homogeneização, foi realizada uma diluição seriada do macerado e em seguida, 100  $\mu$ L dessas diluições foram semeadas em placas de Ágar MacConkey para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

#### 4.3.8. Índice Massa de Órgãos (IO)

Para o cálculo de índice de massa de órgãos, utilizamos a metodologia descrita por Aniagu e colaboradores (2005). O peso do baço e do fígado dos animais foram aferidos, e seus respectivos índices foram mensurados em relação ao peso corporal do animal, seguindo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Índice de órgão} = \left( \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do animal}} \right) * 100$$

#### 4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.). Desta forma, utilizamos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e para verificar o grau de significância entre os dados dos grupos experimentais, executamos os testes paramétricos, One-Way ANOVA e pós teste de Tukey, para dados com distribuição normal. Nos conjuntos de dados sem distribuição conhecida, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. Foi considerada diferença significativa aquela com um  $p$ -value  $< 0,05$ .

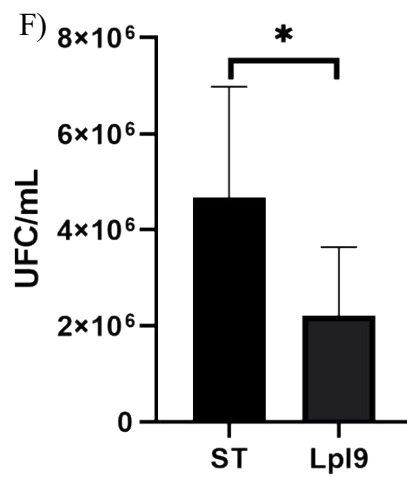
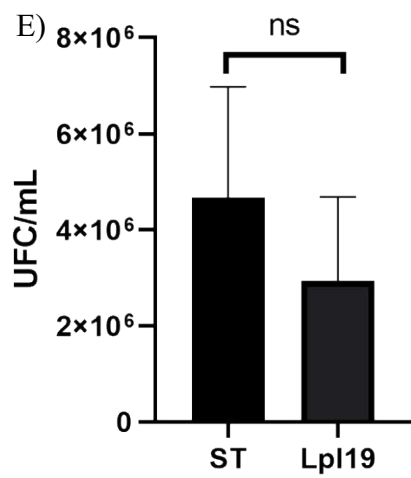
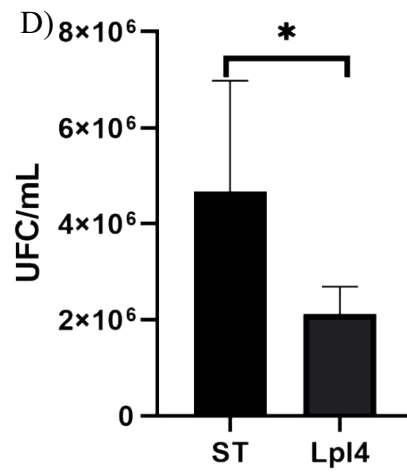
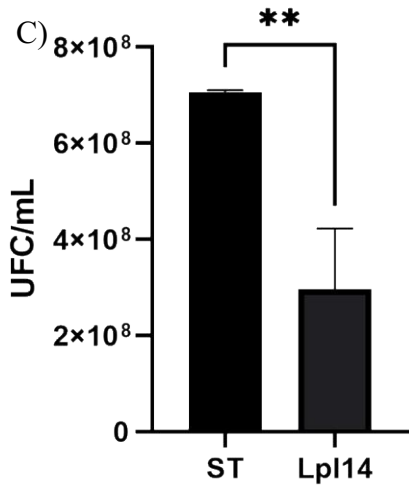
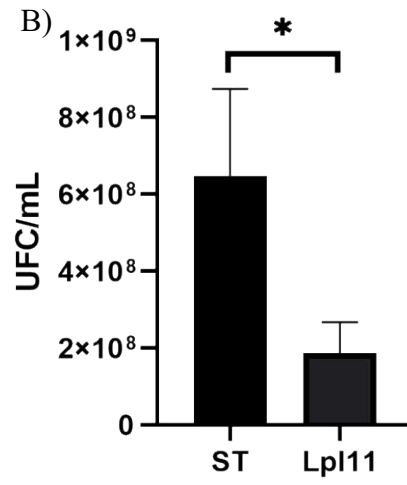
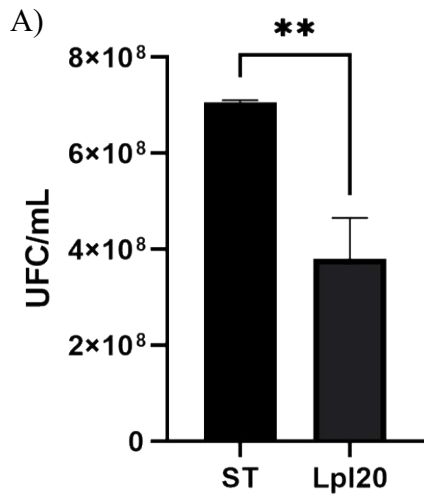
## 5. RESULTADOS

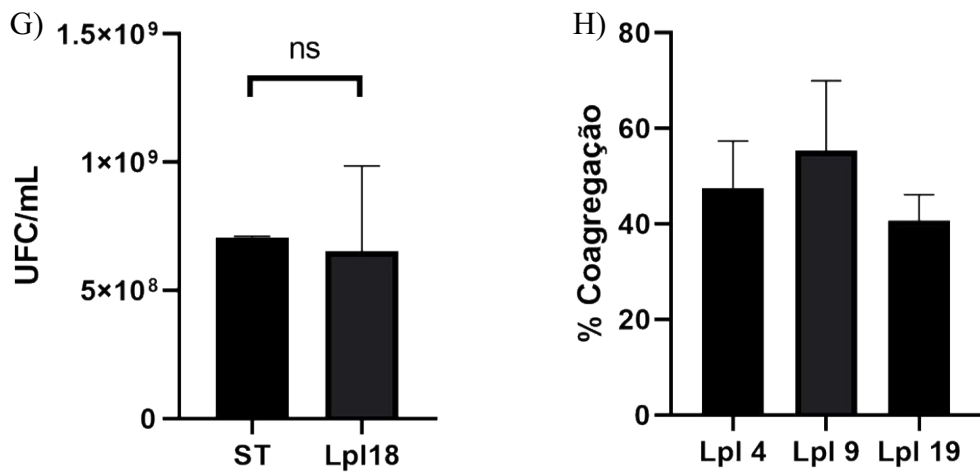
Neste trabalho, foram investigados os efeitos de 10 linhagens de *Lpb. plantarum*, utilizando conjuntamente ensaios *in vitro* de atividade antibacteriana e em modelo *in vivo* de infecção por *S. Typhimurium*. Apesar da ênfase deste trabalho estar nos efeitos observados *in vivo*, para melhor caracterizar os mecanismos de inibição a *S. Typhimurium* observada em um estudo prévio *in vitro* nas linhagens de *Lpb. plantarum* aqui utilizadas, decidimos incluir dois ensaios *in vitro* complementares, para avaliar a natureza do fenômeno inibitório pelas cepas de *Lactiplantibacillus* spp. O primeiro ensaio avaliou a capacidade de coagregação das células do grupo BAL ao patógeno e o segundo ensaio, envolveu mecanismos de inibição contidos no sobrenadante de culturas livres de células.

### 5.1 Ensaio de Coagregação de *Lpb. plantarum* com *S. Typhimurium*

A primeira análise avaliou sete linhagens: Lpl 4; Lpl 9; Lpl 11; Lpl 14; Lpl 18; Lpl 19 e Lpl 20 quanto a presença de coagregação por meio de contagem de unidades formadoras de colônia em meio MacConkey. Desta forma, as linhagens: Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14 e Lpl 20 apresentaram redução significativa na contagem de UFC em relação à amostra controle (contendo somente *Salmonella* sp.), não sendo observado o mesmo fenômeno apenas nas linhagens, Lpl 18 e Lpl 19. Estes resultados podem ser observados na figura 3 (A – G). Em adição aos resultados do plaqueamento, a figura 4 (A – E) ilustra fotomicrografias dos experimentos com as linhagens Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 20, Lpl 14.

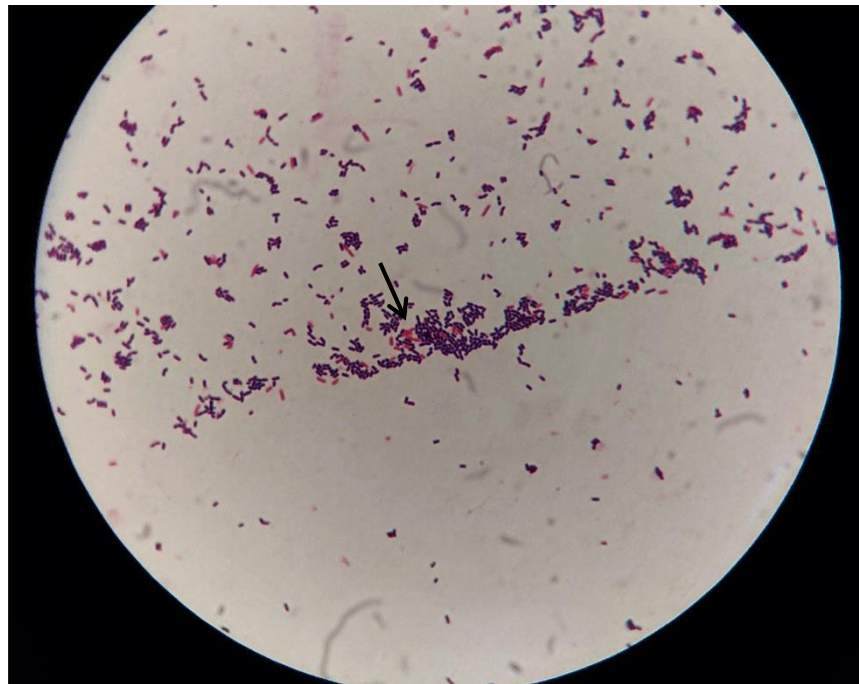
Na segunda etapa, foi investigada a porcentagem de coagregação com base nos valores de DO dos cultivos após 24 horas de incubação das linhagens Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19. Nosso resultado mostra que a linhagem Lpl 9 apresentou a maior porcentagem de coagregação, cerca de 55% e a linhagem Lpl 19 apresentou a menor porcentagem, cerca de 40%, como apresentado na figura 3, subitem H:



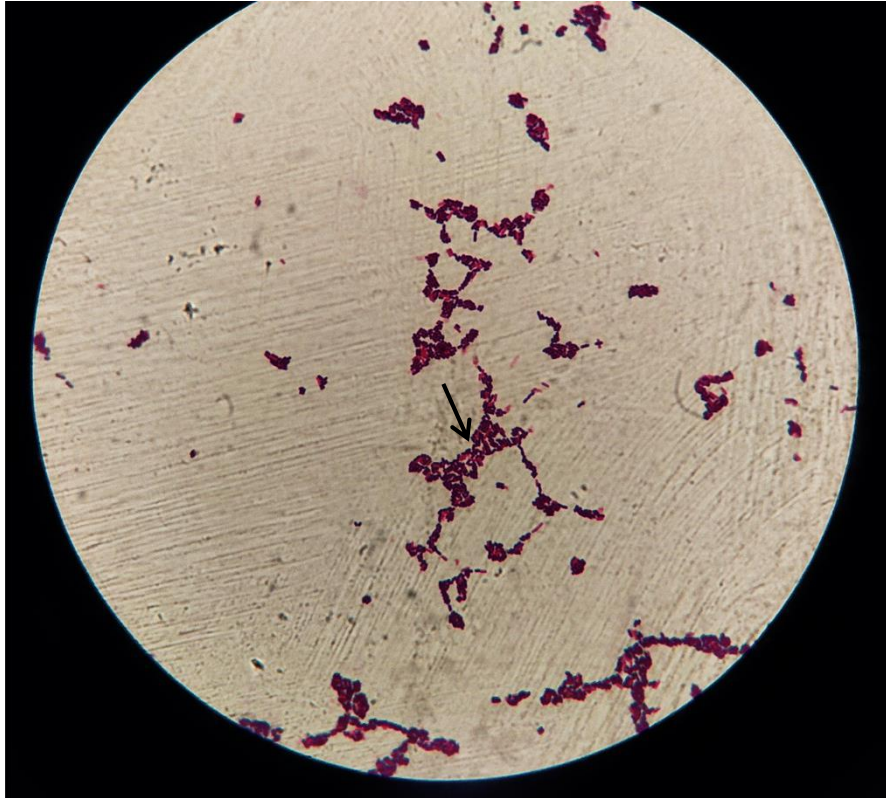


**Figura 3. Ensaios de Coagregação:** Ensaio de coagregação por plaqueamento em meio MacConkey. Figuras de A a G ilustram linhagens diferentes. Contagem de UFC/mL de co-culturas de *S. Typhimurium* (ST) e diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* (Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14, Lpl 18, Lpl 19 e Lpl 20), após 3 horas, a temperatura ambiente, em PBS. Figura H: Ensaio de porcentagem de coagregação por leitura de densidade óptica (DO), após 24 horas, a temperatura ambiente: figura H). Nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

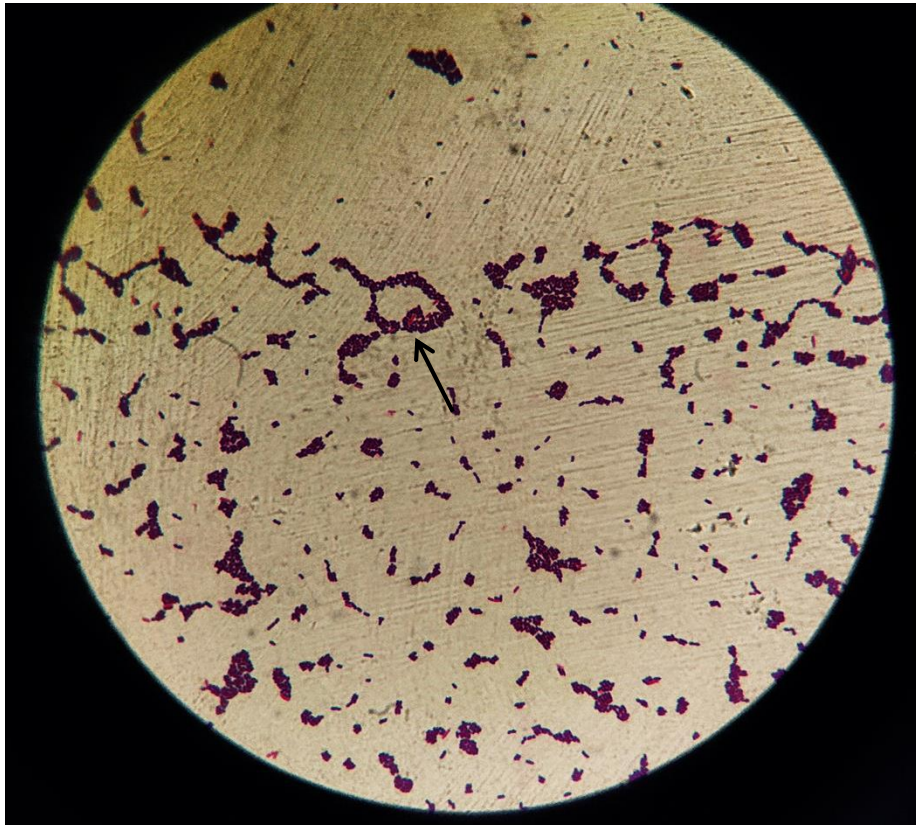
A) Lpl 4



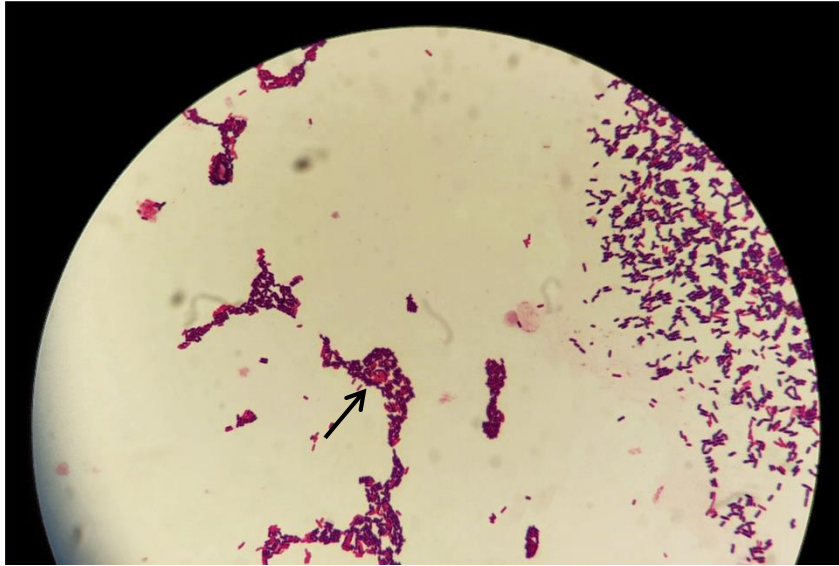
B) Lpl 9



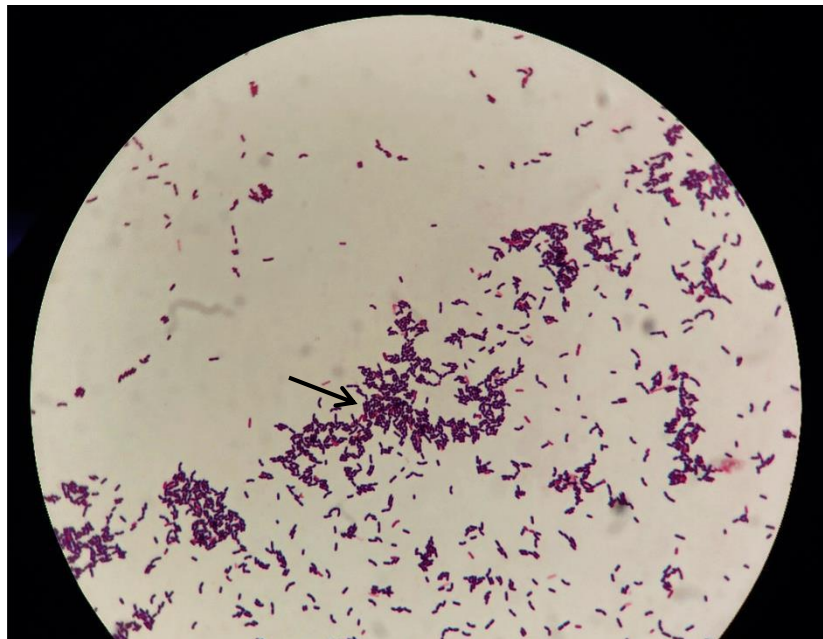
C) Lpl 11



D) Lpl 20



E) Lpl 14

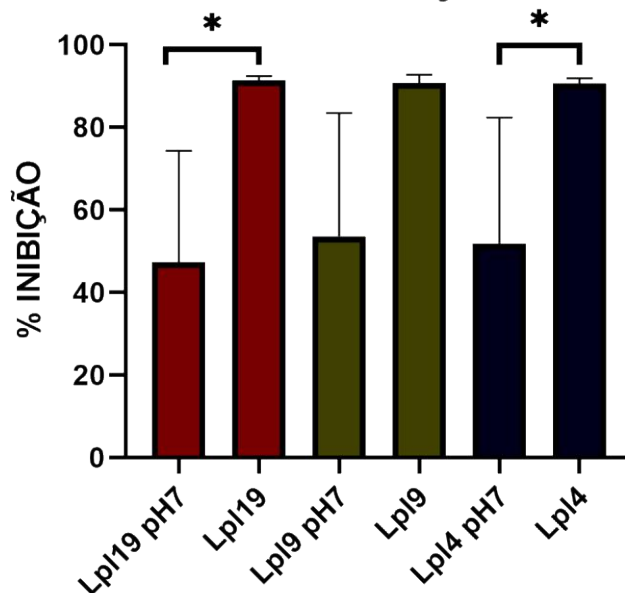


**Figura 4. Fotomicrografias do ensaio de coagregação:** Adesão de diferentes linhagens (Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14 e Lpl 20) de *Lpb. plantarum* a bactéria *S. Typhimurium*, após 3 horas, a temperatura ambiente, em PBS. Coloração de Gram e ampliação de 1000x. Figuras de A) a E) ilustram linhagens diferentes de *Lpb. plantarum* Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 20 e Lpl 14, respectivamente.



## 5.2. Ensaio de Atividade Antibacteriana do Sobrenadante de cultivo de linhagens de *Lpb. plantarum*

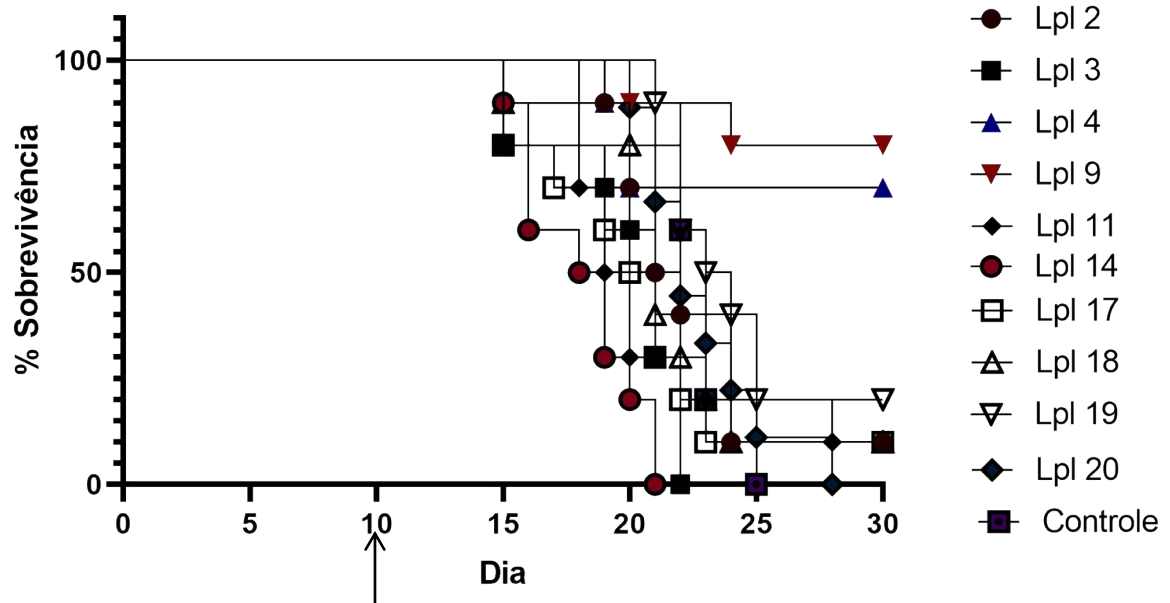
Nos ensaios de atividade antimicrobiana utilizando sobrenadante livre de células com pH neutralizado e não neutralizado, utilizamos as linhagens Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19. Na figura 5, observamos que após a neutralização do sobrenadante, ainda é possível observarmos a atividade inibitória contra *S. Typhimurium*, além disso, esta redução mostrou-se significativa no grau de inibição das linhagens Lpl 19 e Lpl 4, após a neutralização dos sobrenadantes. Por outro lado, a redução da porcentagem de inibição da linhagem Lpl 9 não se mostrou significativa nestas mesmas condições.



**Figura 5. Ensaio de atividade antibacteriana do sobrenadante de *Lpb. plantarum* contra *Salmonella Typhimurium*:** porcentagem de inibição em comparativo com grupo de sobrenadantes neutralizados para pH 7 (Lpl 19 pH 7, Lpl 9 pH 7 e Lpl 4 pH 7) e não neutralizados (Lpl 19, Lpl 9 e Lpl 4), após 24h, a 37°C. Nível de significância: \* $p > 0,05$ .

## 5.3. Ensaio de Mortalidade

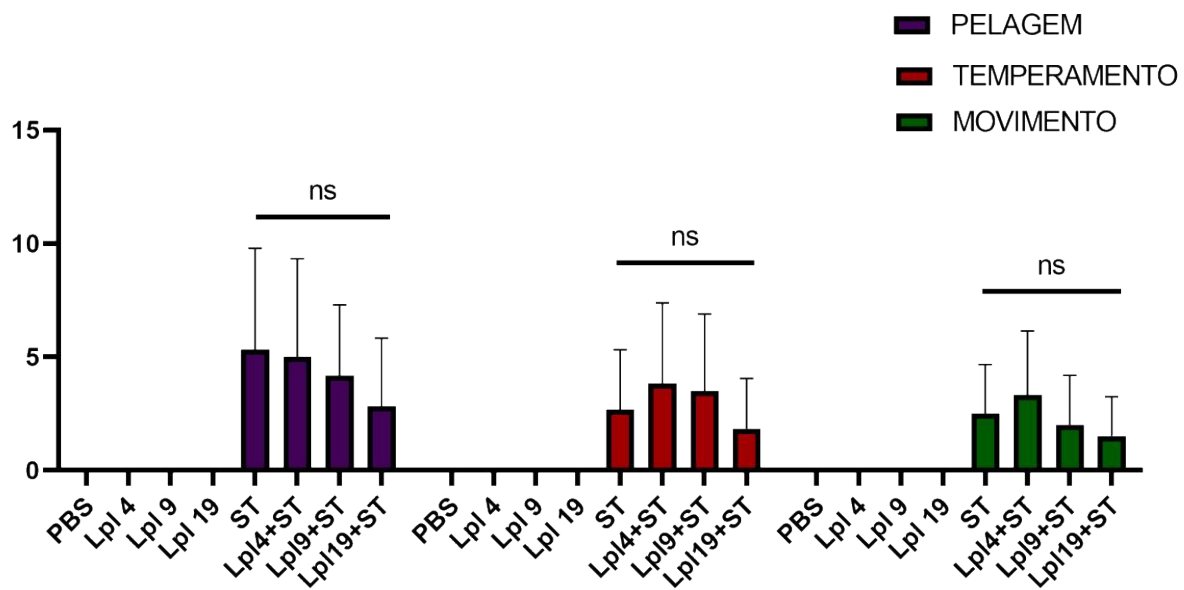
No ensaio de mortalidade utilizando as dez linhagens de *Lpb. plantarum*, observamos que os grupos tratados com Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 alcançaram taxas de sobrevivência de 70%, 80% e 20% respectivamente. E o grupo tratado com Lpl 19 foi o que mais tardiamente iniciou a taxa de óbitos (após 11 dias). Diferentemente das outras linhagens que apresentaram taxas de sobrevivência abaixo de 20%, como representado na figura 6:



**Figura 6. Avaliação do ensaio de mortalidade:** representação da porcentagem de sobrevivência, por um período de 30 dias, dos grupos de camundongos BALB/c tratados com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* (Lpl 2, Lpl 3, Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14, Lpl 17, Lpl 18, Lpl 19, Lpl 20) ou sem tratamento (Controle) e infectados por administração intragástrica de *Salmonella* Typhimurium. A seta indica o dia do desafio (10º dia) no esquema experimental.

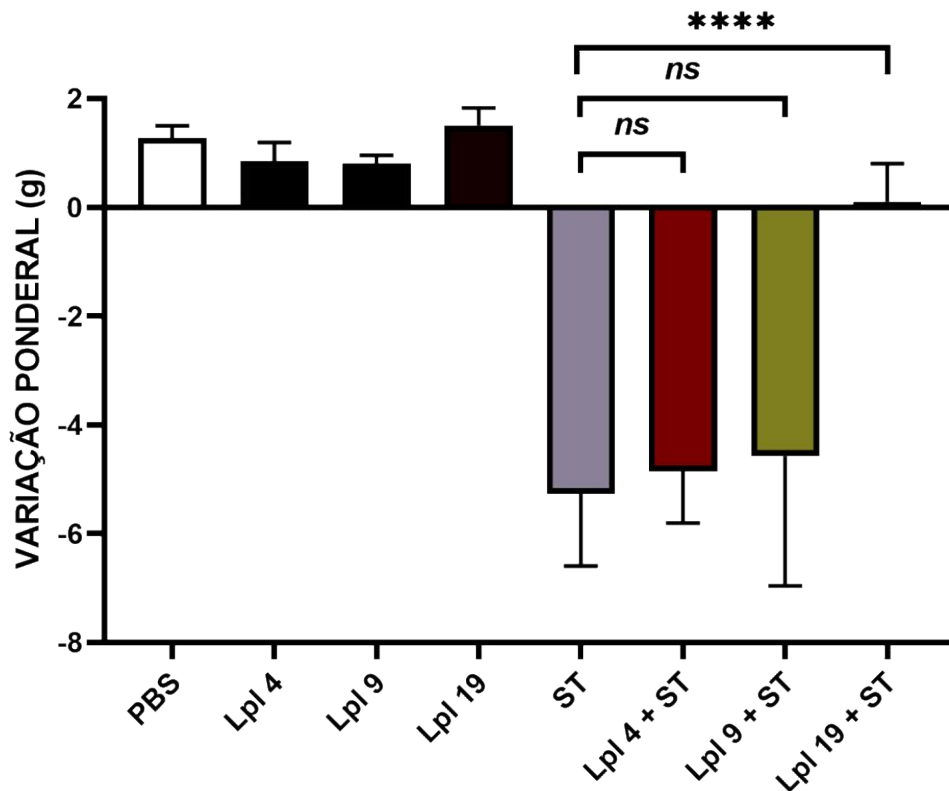
#### 5.4. Sinais clínicos e sintomas de distresse

Durante seis dias após o desafio, os camundongos foram observados quanto seus sinais clínicos e comportamento, este último seguindo um escore de sintomas de distresse, como apresentado na tabela 3. Em nossas análises, nenhum dos grupos experimentais infectados apresentou diferença estatística para os três sintomas pesquisados, durante o período observacional, como presente na figura 7.



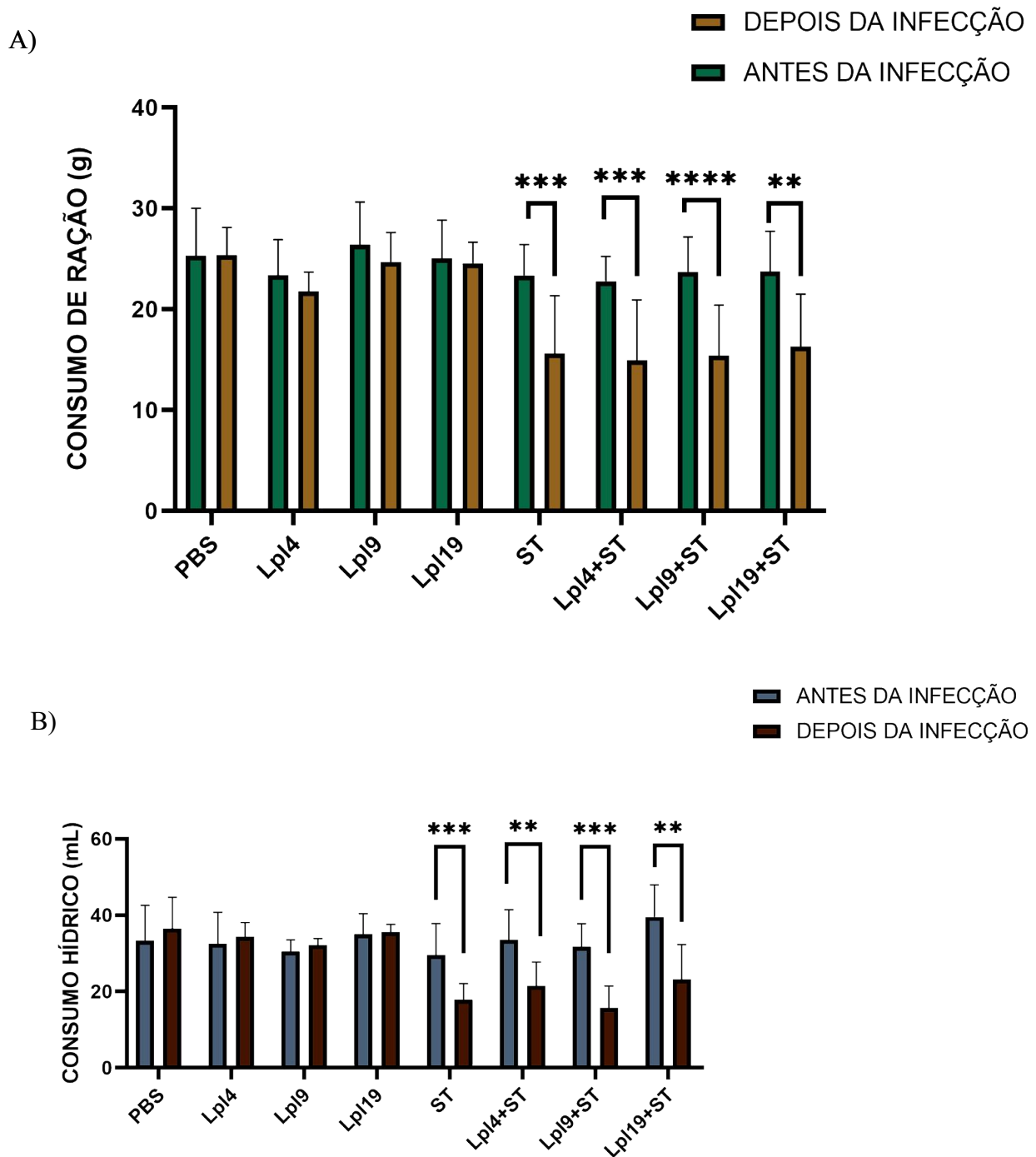
**Figura 7. Efeitos do tratamento com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* no aparecimento de sintomas de distresse causados pela infecção experimental de *S. Typhimurium* em camundongos:** cada critério foi observado diariamente (seis dias) entre os grupos experimentais e as pontuações atribuídas para cada critério variaram entre 0 – 3. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Ns = sem diferença significativa.

O peso de cada animal foi computado e agrupado em seu respectivo grupo experimental para obtermos a variação ponderal. Nesta análise, somente Lpl 19 preveniu a perda de peso do grupo infectado, nos outros grupos não foi observada diferença estatística entre os grupos desafiados ou entre os grupos não desafiados, representado na figura 8.



**Figura 8. Avaliação da variação ponderal:** Efeitos do tratamento com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* na variação ponderal de camundongos infectados por *S. Typhimurium*. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Resultado expresso em gramas (g). Ns = sem diferença significativa. Nível de significância: (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

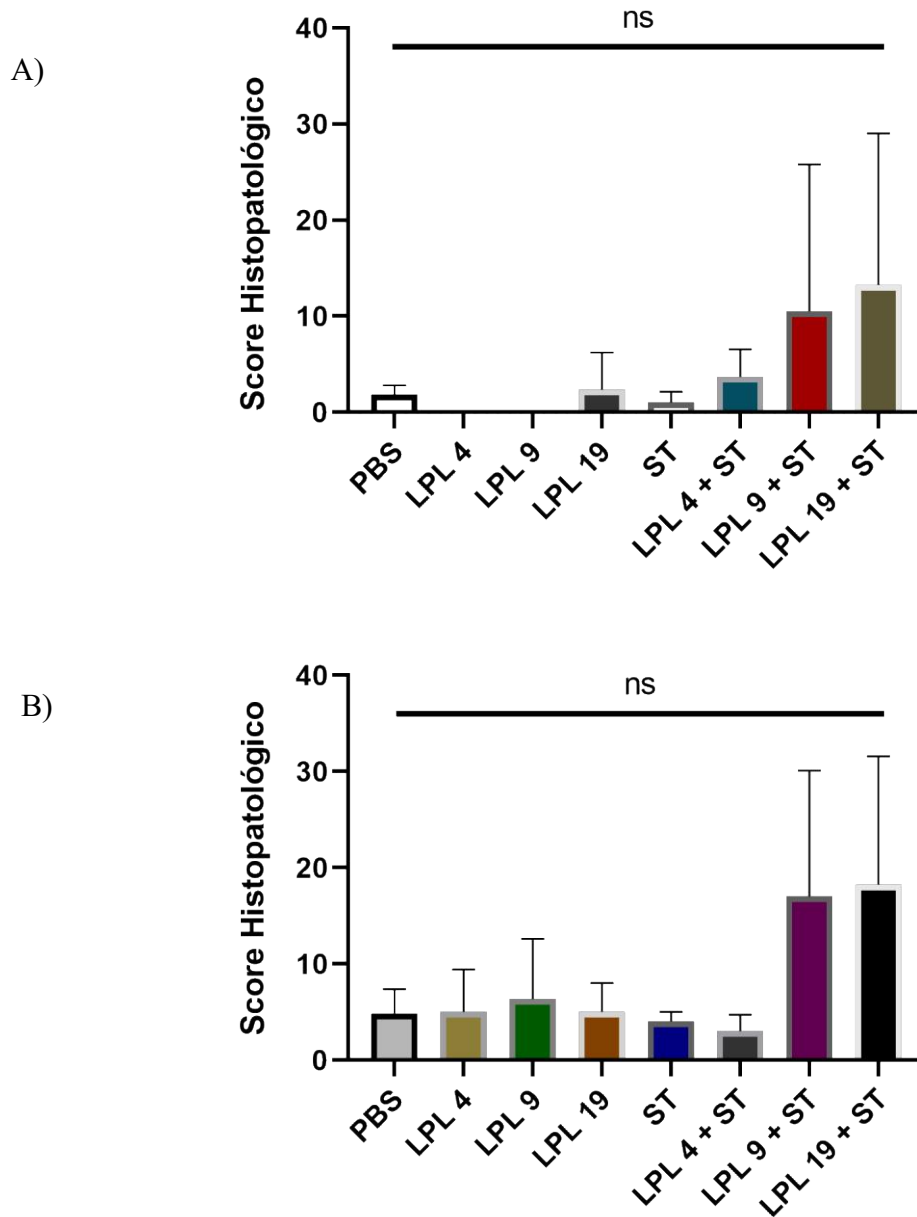
Nossas análises quanto a variação no consumo de ração demonstraram que todos os grupos desafiados apresentaram redução significativa no consumo de ração diária, como visto na figura 9. Por sua vez, a análise de consumo hídrico também indicou redução significativa nos grupos desafiados, como é possível observar na figura 9. Ademais, em ambos os ensaios, o consumo de *Lpb. plantarum* não provocou nenhuma variação significativa nos consumos dos grupos não desafiados.



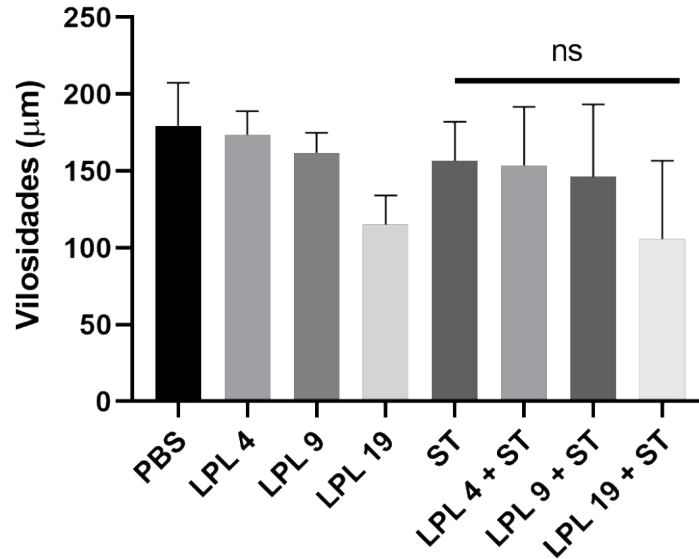
**Figura 9. Avaliação do consumo alimentar e hídrico antes e após o desafio:** Comparativo dos efeitos do tratamento com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum*, antes e após o desafio por infecção experimental de *S. Typhimurium* em camundongos: A) consumo médio de ração, em gramas. B) consumo médio hídrico, em mL. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Nível de significância: (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$ .

### 5.5. Análise histológica e morfometria

As análises histológicas foram realizadas em duas seções distintas do intestino, cólon e íleo. Os resultados apresentados na figura 10, indicam a ausência de diferença estatística entre os grupos experimentais quanto ao score histológico aplicado para as regiões do cólon e íleo. Além disso, o comprimento das vilosidades também foi alvo de análise. As medidas das vilosidades dos grupos desafiados não diferiram estatisticamente entre si, como ilustrado na figura 11.



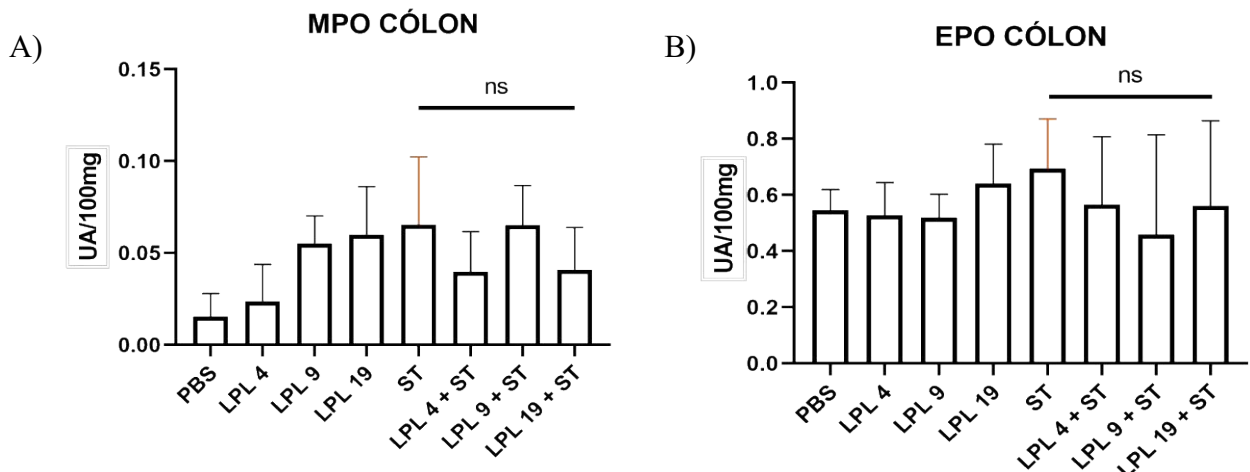
**Figura 10. Análise de score histopatológico:** Comparativo das pontuações obtidas por cada grupo experimental após o tratamento com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* e desafio por infecção de *S. Typhimurium* em camundongos, em A) pontuação obtida por análise da região do cólon e em B) pontuação obtida por análise da região do íleo. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST.

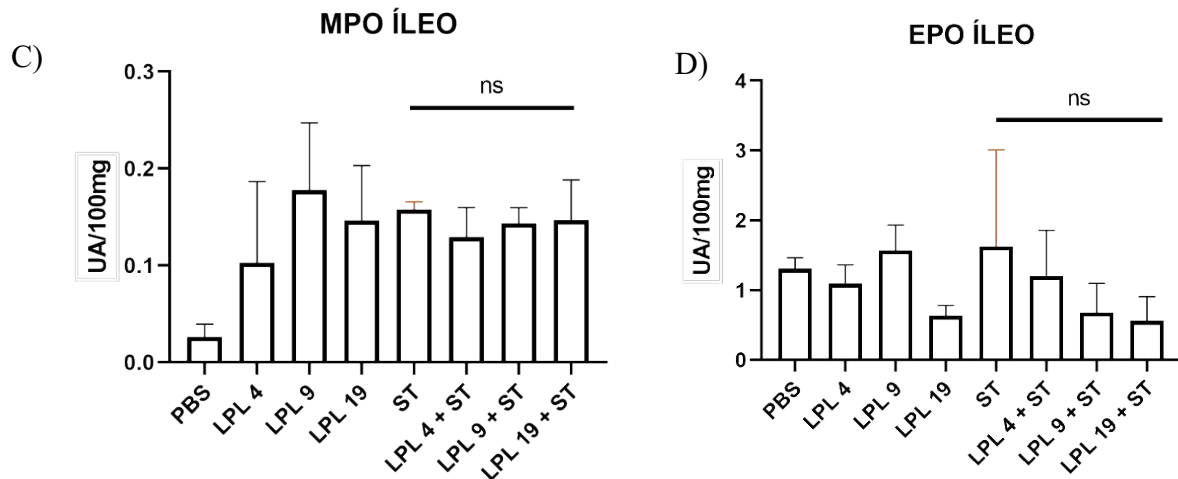


**Figura 11. Análises de comprimento de vilosidades:** Comparativo das medidas (µm) por grupo experimental, após o tratamento com diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* e desafio por infecção de *S. Typhimurium* em camundongos. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST.

### 5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório

A avaliação da presença de infiltrado inflamatório foi realizado por meio da avaliação das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) que foram medidas no cólon e o íleo. Na figura 12, apresentamos as atividades de MPO e EPO, respectivamente, no cólon e íleo, onde não constam diferenças estatísticas entre os grupos desafiados sob tratamento e o controle positivo (ST).

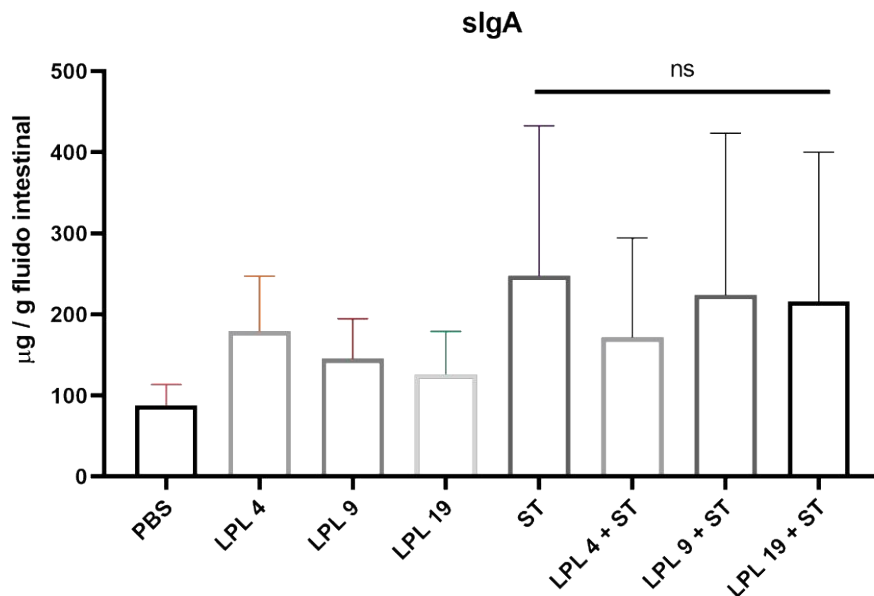




**Figura 12. Presença de infiltrado inflamatório em amostras de tecido de camundongos infectados por *S. Typhimurium*:** A) e B): atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e mieloperoxidase eosinofílica (EPO) na região do cólon. C) e D): atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e mieloperoxidase eosinofílica (EPO) na região do íleo. Diluição utilizada nas amostras: 3x. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA) por 100mg de tecido. Ns: sem diferença estatística.

### 5.7. Dosagem de IgA secretora (sIgA)

Neste ensaio, foi quantificado o conteúdo de sIgA intestinal. Nossas análises não indicaram diferença significativa entre os grupos tratados com *Lpb. plantarum* e o grupo não tratado (ST), como ilustrado na figura 13.

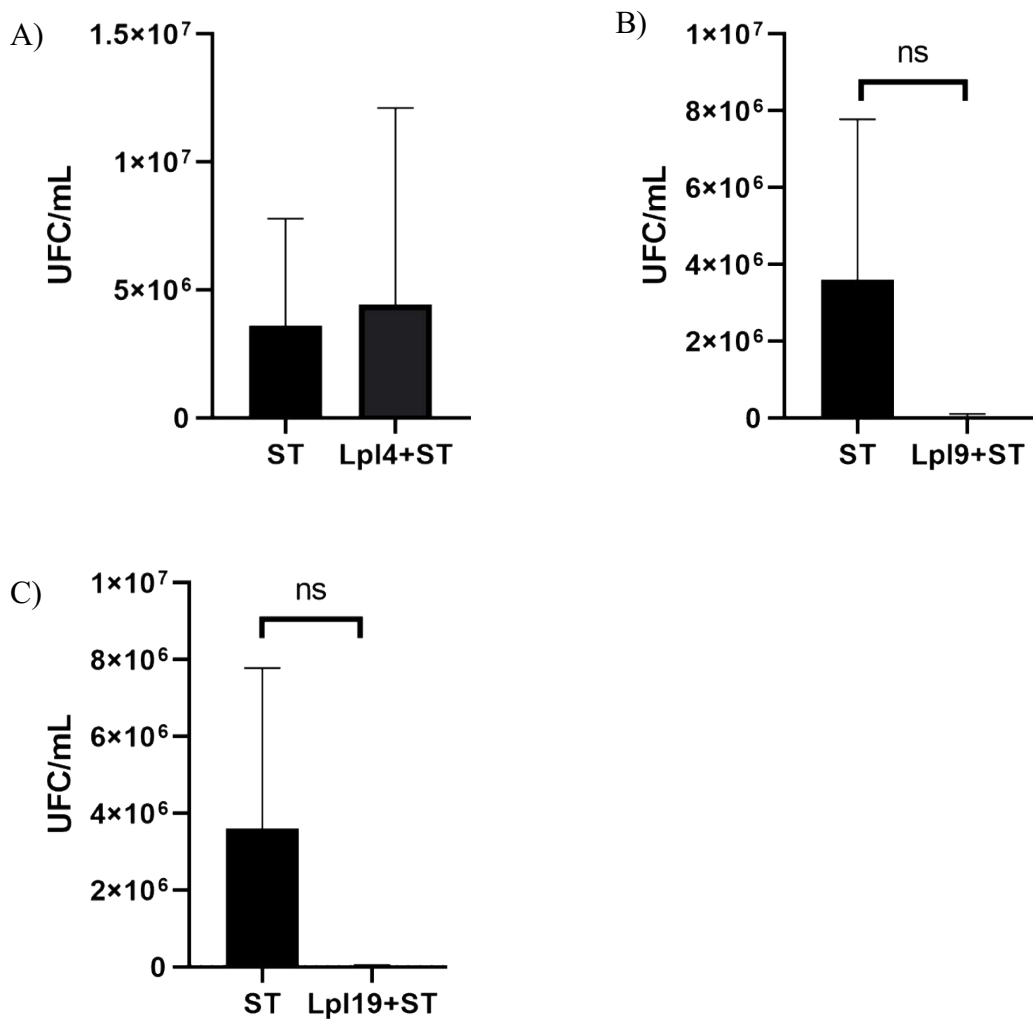




**Figura 13. Níveis de imunoglobulina A secretória no fluido intestinal:** Representação gráfica da concentração de sIgA intestinal em camundongos tratados com linhagens de *Lpb. plantarum* (exceto grupo PBS) e infectados com *S. Typhimurium*. Os resultados estão expressos em  $\mu\text{g}$  de sIgA por grama de fluido intestinal. Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Ns: sem diferença estatística.

### 5.8. Translocação bacteriana

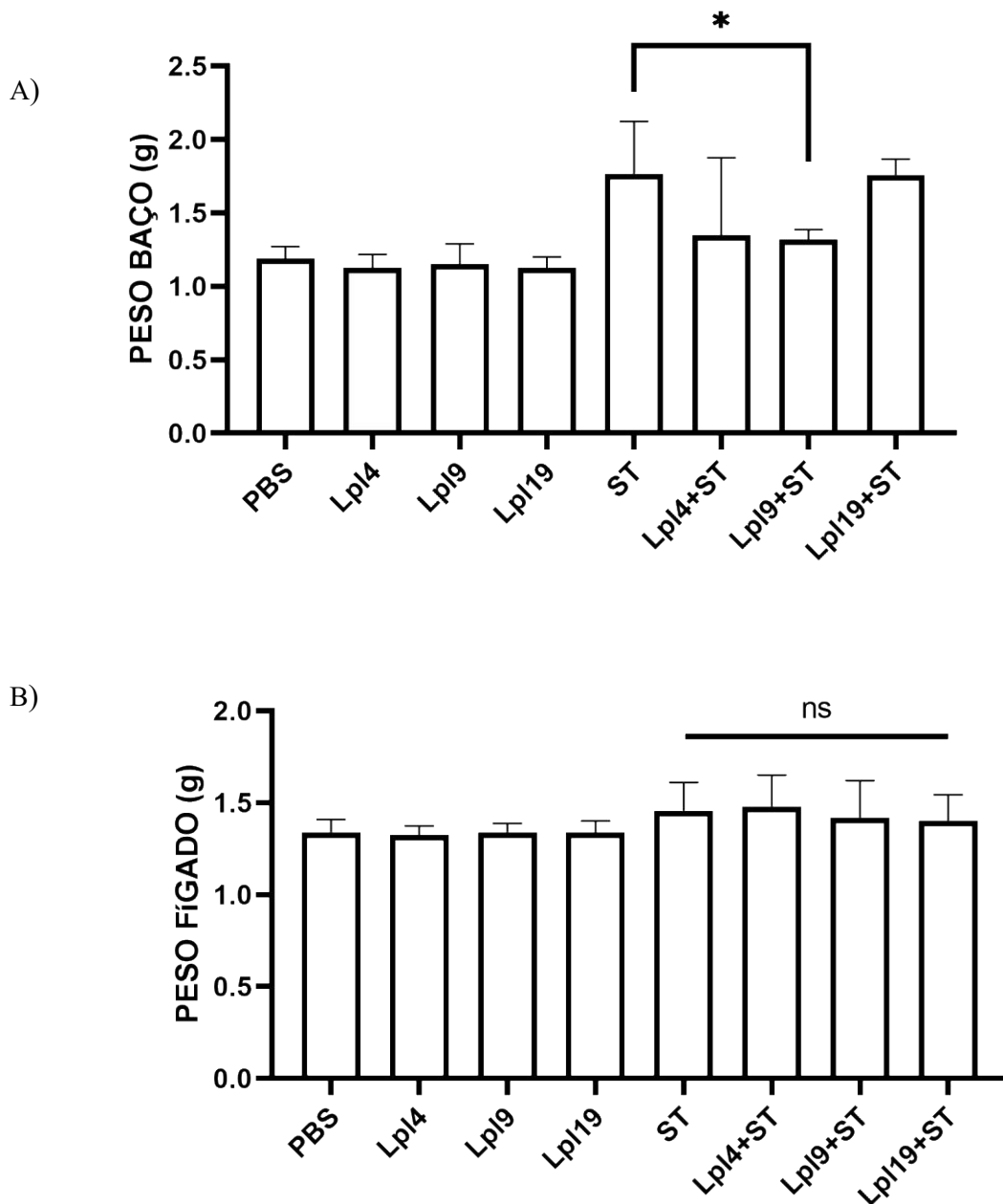
No experimento de translocação, foi avaliada a quantidade de *S. Typhimurium* presente no fígado dos camundongos dos grupos experimentais em tratamento e o controle. Nesta análise, como se pode observar na figura 14, não foi observada redução na translocação bacteriana que apresentasse significância estatística.



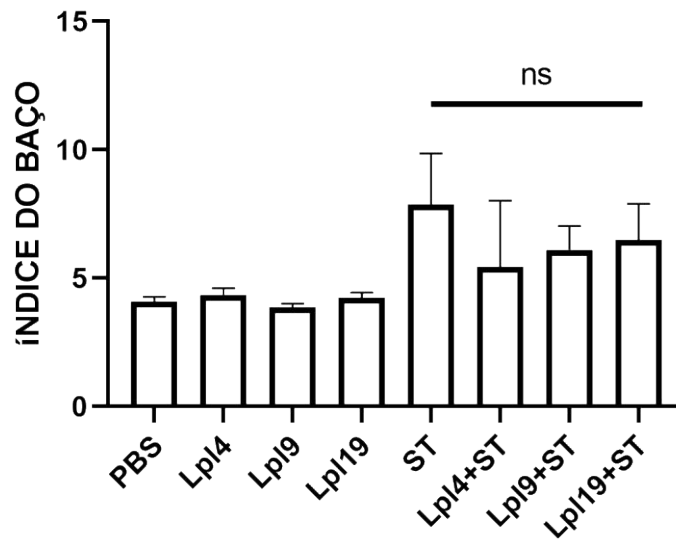
**Figura 14. Taxa de translocação de *Salmonella Typhimurium*.** Quantitativo de translocação bacteriana no fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. Typhimurium* (ST) e tratados com linhagens de *Lpb. plantarum* (Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST). Resultados expressos em unidade formadora de colônia (UFC) por mililitro (mL). Ns: sem diferença estatística.

### 5.9. Índice Massa de Órgãos (IO)

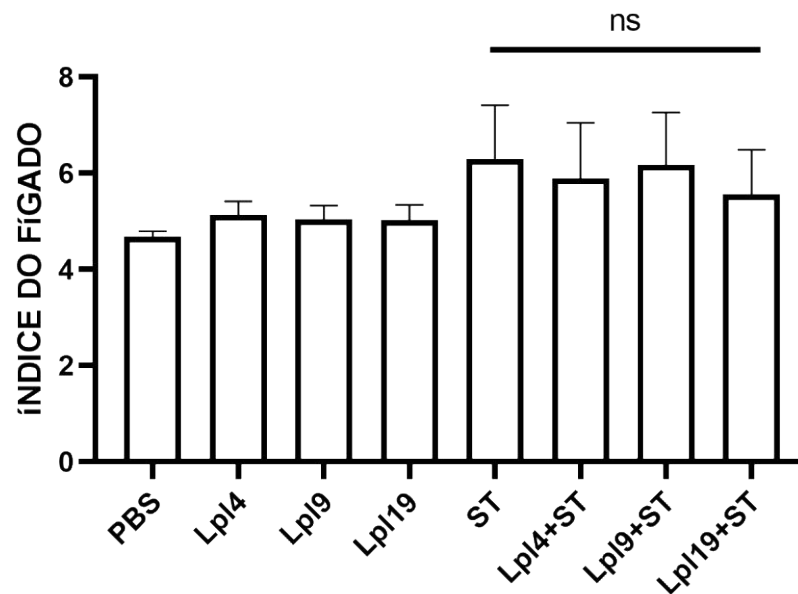
As análises de massa dos órgãos fígado e baço estão representados na figura 15 (A e B). É possível observar que o grupo infectado e tratado com Lpl 9 apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ST, quanto a massa do baço. O mesmo comportamento não foi detectado na análise da massa do fígado. Neste sentido, a figura 15 (C – D) apresenta os resultados do índice de massa de órgãos do fígado e baço, onde não foi possível observar diferença significativa entre o grupo ST e os grupos desafiados e tratados com linhagens de *Lpb. plantarum*.



C)



D)



**Figura 15. Taxa de inflamação visceral.** A) – B) representação da massa do baço e fígado de camundongos infectados por *S. Typhimurium* e tratados com linhagens de *Lpb. plantarum*. C) – D) representação do cálculo de índice de órgão para o baço e fígado de camundongos infectados por *S. Typhimurium* e tratados com linhagens de *Lpb. plantarum*. Resultados expressos em grama ou unidade arbitrária. Nível de significância: \* $p < 0,05$ . Representação dos grupos experimentais não desafiados: PBS, Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 e grupos experimentais desafiados: ST, Lpl 4 + ST, Lpl 9 + ST e Lpl 19 + ST. Ns: sem diferença estatística.

## 6. DISCUSSÃO

A investigação de linhagens de *Lpb. plantarum* como alternativa terapêutica contra gastroenterites causadas por *Salmonella* Typhimurium é muito promissora pois, além de pertencer a microbiota comensal humana, esta espécie de lactobacilos estimula a ativação imunológica e traz benefícios ao TGI, além de possuir cepas utilizadas como ingrediente na preparação de alimentos inseridos no mercado (BOVE *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, investigamos dez linhagens de *Lpb. plantarum* que previamente apresentaram forte indício de um potencial probiótico ao serem avaliadas *in vitro*, no estudo de Coelho–Rocha e colaboradores (2022), incluindo seu perfil de tolerar as condições de estresse do TGI, perfil de segurança, e sua atividade inibitória *in vitro* contra o patógeno *Salmonella* Typhimurium.

Desta forma, buscamos avaliar a presença de efeitos enteroprotetores destas linhagens de *Lpb. plantarum* contra a infecção experimental por *S. Typhimurium* em modelo murino. Segundo nosso planejamento, iniciamos paralelamente os ensaios *in vitro* de coagregação e *in vivo* de mortalidade. Contudo, a medida que obtivemos os resultados do experimento *in vivo* de mortalidade, estes nos sugeriram as três melhores linhagens (Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19) a serem utilizadas nos ensaios posteriores *in vivo*, para investigação de marcadores envolvidos em respostas protetoras, quanto para ensaios complementares *in vitro* para caracterização dos efeitos inibitórios das linhagens.

A habilidade de coagregação confere aos organismos probióticos um contato direto com outros microrganismos. Este contato pode atuar como um mecanismo defensivo ao possibilitar a contenção de patógenos e evitar sua adesão a superfície do epitélio intestinal ou prevenindo sua colonização. Por vezes, este efeito também proporciona um aumento da eficácia de moléculas antimicrobianas secretadas pelas próprias bactérias probióticas ou alocadas como proteínas de superfície celular (JERONYMO-CENEVIVA *et al.*, 2014; ARENA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020). Além disso, mesmo sendo uma habilidade presente em diversas bactérias ácido lácticas, apresenta propriedades tempo-dependente e linhagem específica, como visto em estudos em linhagens *Lactobacillus* em ensaios de coagregação com linhagens patogênicas *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. Typhi* e *Shigella* spp. (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017).

Deste modo, em nosso estudo observamos o efeito da adesão probiótico-patógeno, estimada através de ensaios de contagem UFC, após três horas de co-incubação. Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos, mas que, no entanto, contemplaram um intervalo

de 24 horas (GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2014; MOTHEY *et al.*, 2021). Essa diferença temporal sugere que, em nosso estudo, as cinco linhagens Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14 e Lpl 20 possuem alta afinidade adesiva por *S. Typhimurium* que pode conferir maior rapidez ao processo de formação de coagregados. Diferentemente, Lpl 19 e Lpl 18 não puderam reproduzir o mesmo comportamento. Outros estudos demonstram o potencial de adesão de cinco isolados de BAL, dos gêneros *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus* e *Enterococcus*, aos patógenos *E. coli* enteropatogênica, *S. aureus* e *S. Typhimurium*, após 24 horas, onde foi observado um crescente aumento do percentual de coagregação ao decorrer do tempo e todas as linhagens testadas obtiveram mais 50% de adesão a *S. Typhimurium* (LI *et al.*, 2020). Nossos resultados também podem ser corroborados pelo trabalho de Gandomi e colaboradores (2019) que avaliaram o potencial de coagregação de cinco linhagens de *Lpb. plantarum*, isolados de queijo de ovelha. Destas, duas linhagens apresentaram altas taxas de adesão em *S. Typhimurium*, 49,04% e 29,55%, enquanto que uma linhagem apresentou a menor taxa de adesão, 1,46%. Contudo, esta mesma linhagem foi capaz de gerar altas proporções de coagregação em outros patógenos como *E. coli* e *L. monocytogenes*. Dessa forma pode-se supor que cada linhagem de *Lpb. plantarum* pode possuir um perfil de adesão variável que depende possivelmente do seu background genético.

Adicionalmente, em nosso estudo, foi utilizado um segundo método de análise de coagregação, baseado no valor de DO para suportar os efeitos observados, mas após o período de 24 horas. Neste contexto observamos resultados similares, tanto para as linhagens Lpl 4 e Lpl 9 que obtiveram as maiores porcentagens de coagregação, quanto para Lpl 19 que manteve a menor porcentagem ao final. Como esperado, estas observações também indicam a existência de variação no potencial de adesão entre as diferentes linhagens de *Lpb. plantarum* abordadas neste trabalho. Em hipótese, os efeitos das linhagens de *Lpb. plantarum* poderiam ter correlação com a ação de bacteriocinas, pois a presença de agregação aumenta a concentração de antimicrobianos secretados pelas bactérias lácticas (KAEWNOPPARAT *et al.*, 2013). A presença de compostos antimicrobianos já havia sido sugerido pelos estudos prévios de Coelho-Rocha e colaboradores (2022) que observaram halos de inibição no ágar contendo *S. Typhimurium*, formado pelas mesmas linhagens de *Lactiplantibacillus* sp. Neste sentido, maiores investigações sobre a identificação de genes de bacteriocinas nos genomas destas linhagens foram iniciadas pelo nosso grupo de pesquisa e se encontram em andamento. No entanto, visando compreender os efeitos inibitórios dos componentes secretados pelas linhagens de *Lpb. plantarum*, realizamos um ensaio de inibição *in vitro* do sobrenadante das culturas contra *S. Typhimurium*. Para tanto, as linhagens Lpl 4, Lpl 9 e Lpl 19 foram selecionadas, uma

vez que se mostraram mais promissoras no ensaio *in vivo* de mortalidade. Além disso, para eliminar a acidificação do meio de cultura como causa do efeito inibitório, os sobrenadantes livre de células bacterianas tiveram seu pH ajustado para 7 (neutro). Nesta perspectiva, somente as linhagens Lpl 4 e Lpl 19 apresentaram redução significativa na porcentagem de inibição, quando seus sobrenadantes foram neutralizados. Contudo, mesmo após a neutralização do sobrenadante, todas as três linhagens mantiveram uma porcentagem de inibição acima de 40%. Este comportamento pH-dependente foi similar ao observado por De Jesus e colaboradores (2021), que ao testar *in vitro* o sobrenadante de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 contra *S. Typhimurium*, observou que a porcentagem inibitória do sobrenadante com pH não neutralizado (84%), decaiu para 34% quando neutralizado.

Embora o pH tenha sido uma variável controlada neste experimento, outros fatores também podem influenciar nos efeitos inibitórios do sobrenadante de linhagens candidatas a probióticos, como por exemplo a temperatura. Neste sentido, um estudo relata que o sobrenadante de *Lcb. rhamnosus* EMCC 1105 se mostrou eficaz contra *Clostridium perfringens*, quando testado no método de difusão em ágar, e da mesma forma, conservou suas propriedades antimicrobianas a baixas temperaturas, pois conseguiu eliminar o enteropatógeno *C. perfringens* isolado de carnes de ave refrigeradas, após quatro dias de incubação (HAMAD *et al.*, 2020).

Em relação aos resultados do ensaio *in vivo* em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*, observamos um aumento da sobrevivência dos animais tratados com as linhagens Lpl 4 (70%) e Lpl 9 (80%). Estes resultados confirmam a capacidade de tais linhagens de conterem a infecção e, portanto, podem ser apontadas como as candidatas mais promissoras para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica para o controle da salmonelose. Também observamos que Lpl 19, apesar de proteger somente cerca de 20% dos animais infectados, curiosamente, os camundongos que receberam esta linhagem vieram mais tardiamente a óbito, ou seja, a mortalidade deste grupo iniciou-se somente 11 dias após a inoculação do patógeno. Devido ao comportamento promissor de Lpl 4 e Lpl 9, e o efeito singular causado pela Lpl 19, selecionamos estas três linhagens para os ensaios *in vivo* seguintes, nos quais buscamos avaliar os sintomas clínicos da gastroenterite e marcadores moleculares envolvidos em mecanismos de enteroproteção. Porém, devido a manifestação heterogênea inesperada e a redução do número amostral por conta da mortalidade durante o curso da infecção nos animais, não foi possível concluirmos com exatidão os resultados. Exceto em relação aos resultados obtidos para a Lpl 9 que preveniu a esplenomegalia dos animais

infectados e também a ação de Lpl 19 que reduziu significativamente a variação ponderal dos camundongos.

Estes resultados se assemelham ao trabalho de Acurcio e colaboradores (2017) que utilizou leite fermentado pela linhagem *Lbp. plantarum* B7, em camundongos BALB/c infectados por *S. Typhimurium*, e observou menor perda de peso e redução da taxa de mortalidade. Estes efeitos foram ainda associados à atividade antimicrobiana *in vitro* do sobrenadante assim como no nosso estudo. Além disso, a linhagem B7 também diminuiu as lesões histológicas, translocação bacteriana no fígado e baço e modulou os níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-6).

Quanto ao estímulo na produção de sIgA, não observamos diferenças significativas em nosso estudo após o tratamento com as linhagens bacterianas. A ausência de efeitos sobre a atividade dessa imunoglobulina também já foi relatada anteriormente em outro trabalho, no qual foram utilizadas as linhagens *Lcb. casei* CRL 431 e *Lcb. paracasei* CNCM I-1518, onde suas respectivas frações da parede celular bacteriana, também não tiveram efeito, ao serem testados em BALB/c sensibilizados por *S. Typhimurium*. Entretanto, ainda foram capazes de diminuir a translocação bacteriana para o fígado e baço e foram capazes de estimular a resposta imune celular mediada por células Th1 (LEMME-DUMIT *et al.*, 2021).

Em favor de nossas observações, camundongos BALB/c tratados com bebida láctea fermentada por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R-704, em outro estudo, apresentaram taxa de sobrevivência similar ao visto com Lpl 4 (70%), e este resultado foi associado à redução de translocação bacteriana de 80% e atenuação de lesões histológicas. Entretanto, assim como em nossos tratamentos, não houve redução das atividades de MPO, EPO, no íleo, fígado e baço, e sIgA (CORDEIRO *et al.*, 2019). Podemos supor por este estudo que algumas linhagens potencialmente probióticas podem conter a patogênese de uma infecção mesmo sem apresentar efeitos imunomoduladores.

Esta proteção *in vivo* conferida pelas bactérias lácticas probióticas contra a infecção por *S. Typhimurium*, poderia estar relacionada com a capacidade de aderência de probióticos ao patógeno, habilidade presente nas linhagens Lpl 4, Lpl 9, Lpl 11, Lpl 14 e Lpl 20. Em prol dos resultados observados nestas linhagens, Martins e colaboradores (2013) sugeriram que a capacidade de adesão do probiótico *Saccharomyces boulardii* a *S. Typhimurium* conferia a camundongos *germ-free* Swiss infectados, taxa de sobrevivência de 70% (igual ao visto no ensaio com Lpl 4), menor variação ponderal (efeito similar ao reproduzido por Lpl 19) e efeitos

adicionais de preservação da histologia do fígado e redução de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, KC e TNF –  $\alpha$ , presente no cólon.

Assim como o estudo anterior, os efeitos protetores de *Lentilactobacillus diolivorans* 1Z, isolado de kefir, foram avaliados em camundongos Swiss *germ-free* e do tipo BALB/c infectados por *S. Typhimurium*. Os principais resultados indicaram, à semelhança do nosso estudo com *Lactiplantibacillus* sp., taxa de sobrevivência de 70%, redução da contagem fecal de *S. Typhimurium* em *germ-free*, menor dano histológico no íleo, baixo nível de translocação hepática, imunomodulação com diminuição de expressão de *IFN- $\gamma$*  e *TNF* no íleo e aumento da citocina regulatória *TGF –  $\beta$*  e anti-inflamatória *IL-10* no fígado (ABATEMARCO JÚNIOR *et al.*, 2018). Estes estudos indicam a segurança e baixo potencial de virulência de bactérias lácticas mesmo em contato com animais gnotobióticos. Neste contexto, resultados semelhantes também foram obtidos nos estudos de Acurcio e colaboradores (2020).

Recentemente, em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, Coelho-Rocha e colaboradores (2022) avaliaram nove linhagens de *Lpb. plantarum* (das dez presentes neste estudo) em modelo murino de mucosite induzida por 5-fluorouracil, no qual foi demonstrando a capacidade anti-inflamatória das linhagens. Portanto, isto reforça nossas conclusões sobre o grande potencial probiótico de *Lpb. plantarum*, em especial as linhagens investigadas no presente estudo.

Diante dos experimentos realizados neste estudo, *in vitro*, foram identificadas cinco linhagens de *Lpb. plantarum* com capacidade de coagregação com *Salmonella Typhimurium* e três linhagens apresentaram atividade antimicrobiana presente no sobrenadante, contudo, observamos que a alteração do pH afeta a atividade antimicrobiana do sobrenadante de algumas dessas linhagens.. *In vivo*, duas linhagens foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência para 70% e 80%, além da presença de efeitos positivos sobre a variação ponderal e ausência de esplenomegalia. Em comparativo, estas habilidades corroboram com os achados de estudos envolvendo bactérias do grupo BAL e especificamente, utilizando linhagens da espécie *Lpb. plantarum* que indicam um possível potencial terapêutico e necessidade de maiores investigações envolvendo a espécie *Lactiplantibacillus plantarum*.



## 7. CONCLUSÕES

O tratamento experimental utilizando linhagens de *Lactiplantibacillus plantarum* em camundongos infectados por *Salmonella* Typhimurium demonstrou indicadores de enteroproteção. Observamos altos índices de sobrevivência ao utilizarmos as linhagens Lpl 4 (70%) e Lpl 9 (80%) e além disso, confirmamos que cinco linhagens possuem atividade antimicrobiana *in vitro*. Estes resultados reforçam um possível potencial terapêutico futuro destas linhagens, contudo, é preciso entender melhor os mecanismos de ação e quais condições interferem no desempenho probiótico de cada linhagem.

## 8. PERSPECTIVAS

- Executar ensaio *in vivo* para avaliar os parâmetros, utilizados na segunda etapa, um n amostral maior (n=10);
- Avaliar a histologia do fígado dos animais desafiados;
- Adicionar o estudo da expressão gênica e ELISA de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon, íleo e fígado;
- Dosagem de NAG (n-acetilglucosaminidase), marcador de atividade de macrófagos, no cólon e íleo;
- Realizar ensaio *in vitro* de coagregação com as linhagens Lpl 2, Lpl 3 e Lpl 17;
- Realizar ensaio *in vitro* de atividade antibacteriana do sobrenadante com as linhagens Lpl 2, Lpl 3, Lpl 11, Lpl 14, Lpl 17, Lpl 18 e Lpl 20 com incubação de 24 e 48 horas;
- Realizar ensaio *in vitro* de autoagregação com as dez linhagens de *Lpl. plantarum*;

## REFERÊNCIAS

- ABATEMARCO JÚNIOR, Mario et al. Protective effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, isolated from Brazilian kefir, against *Salmonella enterica* serovar typhimurium in experimental murine models. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2856, 2018.
- ABULREESH, Hussein H. *Salmonellae in the environment*. InTech, 2012.
- ACURCIO, Leonardo Borges et al. Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 436-445, 2017.
- ACURCIO, Leonardo Borges et al. Milk fermented by *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (ST11) modulates the immune response and microbiota to exert its protective effects against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 12, n. 4, p. 1398-1408, 2020.
- ALTIER, Craig. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of microbiology*, v. 43, n. spc1, p. 85-92, 2005.
- ALMEIDA, Fernanda et al. Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, p. 41-44, 2017.
- ALVAREZ-SIEIRO, Patricia et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100, n. 7, p. 2939-2951, 2016.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, v. 2015, 2015.
- ANIAGU, Stanley O. et al. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 1, p. 72-78, 2005.
- ARENA, Mattia Pia et al. Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 23, p. 9949-9958, 2018.
- ATIQ, Ayesha et al. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. *European journal of pharmacology*, v. 843, p. 292-306, 2019.
- BAKOWSKI, Malina A.; BRAUN, Virginie; BRUMELL, John H. *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, v. 9, n. 12, p. 2022-2031, 2008.
- BARTHEL, Manja et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and immunity*, v. 71, n. 5, p. 2839-2858, 2003.
- BAWN, Matt et al. Evolution of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation. *PLoS genetics*, v. 16, n. 6, p. e1008850, 2020.
- BEHERA, Sudhanshu S.; RAY, Ramesh C.; ZDOLEC, Nevijo. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- BEHNSEN, Judith et al. Exploiting host immunity: the *Salmonella* paradigm. *Trends in immunology*, v. 36, n. 2, p. 112-120, 2015.

- BERGONZELLI, Gabriela E. et al. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*, v. 74, n. 1, p. 425-434, 2006.
- BOVE, Pasquale et al. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, n. 2, p. 431-441, 2012.
- BRANDI, Jessica et al. Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- BROWNE, Sara H.; LESNICK, Marc L.; GUINEY, Donald G. Genetic requirements for *Salmonella*-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 7126-7135, 2002.
- BUCKLE, Geoffrey C.; WALKER, Christa L. Fischer; BLACK, Robert E. Typhoid fever and paratyphoid fever: systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. *Journal of global health*, v. 2, n. 1, 2012.
- BUENO, Susan M. et al. *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology*, v. 130, n. 2, p. 273-287, 2010.
- CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CASTILLO, Natalia Alejandra et al. Comparative study of the protective capacity against *S* almonella infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 3, p. 861-876, 2013.
- CHESSA, Daniela et al. Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 13, p. 8118-8124, 2008.
- CHIEPPA, Marcello et al. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine*, v. 203, n. 13, p. 2841-2852, 2006.
- COELHO-ROCHA, Nina Dias et al. Novel probiotic Brazilian strains of *Lactiplantibacillus plantarum* protect intestinal mucositis in experimental mice. 2022.
- COLLADO, Maria Carmen; MERILUOTO, Jussi; SALMINEN, Seppo. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, v. 226, n. 5, p. 1065-1073, 2008.
- CORDEIRO, M. A. et al. Fermented whey dairy beverage offers protection against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 8, p. 6756-6765, 2019.
- COTTER, Paul D.; HILL, Colin; ROSS, R. Paul. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.
- COTTER, Paul D.; ROSS, R. Paul; HILL, Colin. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.
- COUTINHO, Joana OPA et al. Antarctic Strain of *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 Attenuates Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in Mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-15, 2021.

- CRUMP, John A. et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical microbiology reviews*, v. 28, n. 4, p. 901-937, 2015.
- DABA, Ghoson M.; ELKHATEEB, Waill A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, p. 101750, 2020.
- DE JESUS, Luís Cláudio Lima et al. Probiogenomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis cidca* 133: In silico, in vitro, and in vivo approaches. ***Microorganisms***, v. 9, n. 4, p. 829, 2021.
- DE VUYST, Luc; LEROY, Frédéric. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microbial Physiology*, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.
- DJADOUNI, Fatima; KIHAL, Mebrouk. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 3, p. 435-444, 2012.
- DRIDER, Djamel et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.
- DERIU, Elisa et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing for iron. *Cell host & microbe*, v. 14, n. 1, p. 26-37, 2013.
- EHRBAR, K. et al. Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, n. 6-7, p. 479-485, jan. 2001.
- ERIKSSON, Sofia et al. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, v. 47, n. 1, p. 103-118, 2003.
- FEASEY, Nicholas A. et al. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, v. 379, n. 9835, p. 2489-2499, 2012.
- FORD, Laura et al. Increasing incidence of *Salmonella* in Australia, 2000-2013. *PLoS one*, v. 11, n. 10, p. e0163989, 2016.
- FRITSCHKE, Gernot et al. *Slc11a1* (*Nramp1*) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *Journal of leukocyte biology*, v. 92, n. 2, p. 353-359, 2012.
- GALÁN, Jorge E.; BLISKA, James B. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 12, n. 1, p. 221-255, 1996.
- GALÁN, Jorge E.; COLLMER, Alan. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1322-1328, 1999.
- GANDOMI, Hassan et al. Auto and co-aggregation, hydrophobicity and adhesion properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi traditional cheese. 2019.
- GARCÍA-CAYUELA, Tomás et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, v. 57, p. 44-50, 2014.
- GÓMEZ, Natacha C. et al. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. ***Frontiers in microbiology***, p. 863, 2016.

- GRIMONT, Patrick AD et al. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella, v. 9, p. 1-166, 2007.
- HAMAD, Gamal M. et al. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of *Clostridium perfringens* poultry meat infection in Egypt. *Anaerobe*, v. 62, p. 102181, 2020.
- HANDLEY, Pauline S. et al. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, v. 133, n. 11, p. 3207-3217, 1987.
- HASE, Koji et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH<sup>+</sup> bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, v. 462, n. 7270, p. 226-230, 2009.
- HILL, Colin et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2014.
- HOLDEN, David W. Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages. *Traffic*, v. 3, n. 3, p. 161-169, 2002.
- HORMAECHE, C. E. The in vivo division and death rates of *Salmonella typhimurium* in the spleens of naturally resistant and susceptible mice measured by the superinfecting phage technique of Meynell. *Immunology*, v. 41, n. 4, p. 973, 1980.
- HUANG, Fu-Chen. The Interleukins Orchestrate Mucosal Immune Responses to Salmonella Infection in the Intestine. *Cells*, v. 10, n. 12, p. 3492, 2021.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, Sylvie et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the white–Kauffmann–Le minor scheme. *Research in microbiology*, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.
- JAKUBCZYK, Dominika; LESZCZYŃSKA, Katarzyna; GÓRSKA, Sabina. The effectiveness of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD)—a critical review. *Nutrients*, v. 12, n. 7, p. 1973, 2020.
- JERONYMO-CENEVIVA, Ana Beatriz et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 6, n. 3, p. 141-156, 2014.
- KANDLER, Otto. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 49, n. 3, p. 209-224, 1983.
- KANG, Dae-Kyung et al. Identification and characterization of hydrogen peroxide-generating *Lactobacillus fermentum* CS12-1. *Asian-australasian journal of animal sciences*, v. 18, n. 1, p. 90-95, 2005.
- KARAMI, Sahar et al. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International journal of pharmaceutical investigation*, v. 7, n. 3, p. 137, 2017.
- KIVANÇ, M.; YILMAZ, M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turk J Biol*, v. 35, p. 313–324, 2011.
- KNODLER, Leigh A.; STEELE-MORTIMER, Olivia. Taking possession: biogenesis of the Salmonella-containing vacuole. *Traffic*, v. 4, n. 9, p. 587-599, 2003.
- KÖHLER, H. et al. Erratum: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage (*American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* (2007) 293,(G178-G187).

- American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 293, n. 5, p. G1099, 2007.
- KÖNIG, Helmut; FRÖHLICH, Jürgen. Lactic acid bacteria. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Cham, 2017. p. 3-41.
- KULLISAAR, Tiiu et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. International journal of food microbiology, v. 72, n. 3, p. 215-224, 2002.
- KUMAR, Manesh et al. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. International journal of antimicrobial agents, v. 48, n. 3, p. 265-270, 2016.
- LALEMAN, Isabelle; TEUGHEL, Wim. Probiotics in the dental practice: a review. Quintessence Int, v. 46, n. 3, p. 255-64, 2015.
- LEBEER, Sarah; VANDERLEYDEN, Jos; DE KEERSMAECKER, Sigrid CJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.
- LEE, Chul Sang; KIM, Sae Hun. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of *Lactobacillus plantarum* A41 and *L. fermentum* SRK414 as probiotics. Probiotics and antimicrobial proteins, v. 12, n. 2, p. 623-634, 2020.
- LEEKITCHAROENPHON, Pimlapas et al. Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Applied and environmental microbiology, v. 82, n. 8, p. 2516-2526, 2016.
- LEMME-DUMIT, José María et al. Probiotic Bacteria and their cell walls induce Th1-type immunity against *Salmonella typhimurium* challenge. Frontiers in Immunology, p. 1770, 2021.
- LI, Miao et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a wild boar as potential probiotics. Frontiers in veterinary science, v. 7, p. 49, 2020.
- LOPEZ-MEDINA, Marcela et al. *Salmonella* modulates B cell biology to evade CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immune responses. Frontiers in immunology, v. 5, p. 586, 2014.
- LIU, Wenjun et al. Biodiversity of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria. Springer, Dordrecht, 2014. p. 103-203.
- LÖNNERMARK, Elisabet et al. Effects of probiotic intake and gender on nontyphoid *Salmonella* infection. Journal of Clinical Gastroenterology, v. 49, n. 2, p. 116-123, 2015.
- LUDWIG, Wolfgang et al. Revised road map to the phylum Firmicutes. Bergey's manual of systematic bacteriology, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2009.
- MACK, David R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut, v. 52, n. 6, p. 827-833, 2003.
- MAQUEDA, Mercedes et al. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. Current Protein and Peptide Science, v. 5, n. 5, p. 399-416, 2004.
- 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, Flaviano S. et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and infection*, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.
- MARTINO, Maria Elena et al. Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental microbiology*, v. 18, n. 12, p. 4974-4989, 2016.
- MASTROENI, Pietro. Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Current molecular medicine*, v. 2, n. 4, p. 393-406, 2002.
- MEYERHOLZ, David K. et al. Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Veterinary pathology*, v. 39, n. 6, p. 712-720, 2002.
- MICHETTI, P. et al. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infection and immunity*, v. 60, n. 5, p. 1786-1792, 1992.
- MICHETTI, Pierre et al. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium*. *Gastroenterology*, v. 107, n. 4, p. 915-923, 1994.
- MITTRÜCKER, Hans-Willi; KAUFMANN, Stefan HE. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 67, n. 4, p. 457-463, 2000.
- MOKOENA, M.P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1-13, 2017.
- MONACK, Denise M.; BOULEY, Donna M.; FALKOW, Stanley. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*<sup>+/+</sup> mice and can be reactivated by IFN $\gamma$  neutralization. *The Journal of experimental medicine*, v. 199, n. 2, p. 231-241, 2004.
- MONACK, Denise M.; MUELLER, Anne; FALKOW, Stanley. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 9, p. 747-765, 2004.
- MOTEY, Grace Adzo et al. In vitro properties of potential probiotic lactic acid bacteria originating from Ghanaian indigenous fermented milk products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 3, p. 1-13, 2021.
- MUJAGIC, Zlatan et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- NIESS, Jan Hendrik et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, v. 307, n. 5707, p. 254-258, 2005.
- OSSET, Jordi et al. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*, v. 183, n. 3, p. 485-491, 2001.
- PATHMAKANTHAN, Shri et al. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 19, n. 2, p. 166-173, 2004.



- PARTE, Aidan C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5607, 2020.
- PESSIONE, Enrica. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, p. 86, 2012.
- PILLAI, Anjana; NELSON, Richard L. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 1, 2008.
- PRADHAN, Biswaranjan et al. Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1-and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella* typhimurium-induced diarrhea. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 11, n. 3, p. 887-904, 2019.
- PRABHURAJESHWAR, Chidre; CHANDRAKANTH, Revanasiddappa Kelmani. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical journal*, v. 40, n. 5, p. 270-283, 2017.
- OHL, Michael E.; MILLER, Samuel I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual review of medicine*, v. 52, n. 1, p. 259-274, 2001.
- REIS, Bruno P. et al. The attenuated sopB mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. *Veterinary microbiology*, v. 97, n. 3-4, p. 269-277, 2003.
- SANTOS, Renato L. et al. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and infection*, v. 3, n. 14-15, p. 1335-1344, 2001.
- SCHACHTSIEK, Martina; HAMMES, Walter P.; HERTEL, Christian. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 12, p. 7078-7085, 2004.
- SILVA, Célia CG; SILVA, Sofia PM; RIBEIRO, Susana C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 594, 2018.
- SRIKUMAR, Shabarinath et al. RNA-seq brings new insights to the intra-macrophage transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 11, p. e1005262, 2015.
- STORELLI, Gilles et al. *Drosophila* perpetuates nutritional mutualism by promoting the fitness of its intestinal symbiont *Lactobacillus plantarum*. *Cell metabolism*, v. 27, n. 2, p. 362-377. e8, 2018.
- SOOMRO, A. H.; MASUD, T.; ANWAAR, Kiran. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.
- SU, Jin-Hui et al. Distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from pigs with diarrhea in China. *Microorganisms*, v. 6, n. 4, p. 117, 2018.
- TAKAYA, Akiko et al. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 2, p. 690-696, 2003.
- TEJERO-SARIÑENA, Sandra et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, v. 18, n. 5, p. 530-538, 2012.

- TYTGAT, Hanne LP et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG outcompetes *Enterococcus faecium* via mucus-binding pili: evidence for a novel and heterospecific probiotic mechanism. *Applied and environmental microbiology*, v. 82, n. 19, p. 5756-5762, 2016.
- VIJAYA KUMAR, Bathal; VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga; REDDY, Obulam Vijaya Sarathi. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.
- VON WRIGHT, Atte; AXELSSON, Lars. Lactic acid bacteria: an introduction. In: *Lactic acid bacteria*. CRC Press, 2019. p. 1-16.
- WANG, Lihong et al. *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by *Salmonella* infection in newly-hatched chicks. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- WEI, Ming Q. et al. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. **European journal of cancer**, v. 43, n. 3, p. 490-496, 2007.
- WIEDEMANN, Imke et al. Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 4, p. 2809-2814, 2006.
- WILLIAMSON, Deborah A. et al. Increasing antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolates in Australia from 1979 to 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 2, p. e02012-17, 2018.
- ZHANG, Shuping et al. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and immunity*, v. 70, n. 7, p. 3843-3855, 2002.
- ZHANG, Shuping et al. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and immunity*, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2003.
- ZHAO, Ye et al. GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal immunology*, v. 11, n. 3, p. 752-762, 2018.
- ZHENG, Jinshui et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. 2020.

**ANEXO A - Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA)****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

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

**Protocolo CEUA:** 55/2022**Título do projeto:** Avaliação do efeito enteroprotetor de linhagens de Lactiplantibacillus plantarum em modelo murino de infecção induzida por Salmonella Typhimurium.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Biologia Geral**Situação atual:** Decisão Final - AprovadoAprovado na reunião ordinária on-line do dia 23/05/2022. Validade: 23/05/2022 à 22/05/2027.  
Belo Horizonte, 23/05/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)Universidade Federal de Minas Gerais  
[Avenida Antônio Carlos, 6627](#) – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2ª Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**ANEXO B - Classificação Histopatológica Adaptada De Pradhan E Colaboradores (2019)**

<b>Categoria</b>	<b>Critério</b>	<b>Definição</b>	<b>Valor do Score</b>	
<b>Infiltrado de células inflamatórias</b>	<b>Gravidade</b>	<b>Densidade leucocitária na área de infiltração da lâmina própria em figuras histopatológicas avaliadas.</b>		
		<b>Normal: &lt;5%</b>	<b>0</b>	
		<b>Minima: &lt;10%</b>	<b>1</b>	
		<b>Leve: 10-25%; neutrófilos dispersos</b>	<b>2</b>	
		<b>Moderada: 26-50%</b>	<b>3</b>	
			<b>Acentuado: &gt;51%; infiltrado denso</b>	<b>4</b>
	<b>Extensão</b>	<b>Expansão da infiltração leucocitária:</b>		
		<b>Normal</b>	<b>0</b>	
		<b>Mucosa</b>	<b>1</b>	
		<b>Mucosal and Submucosa</b>	<b>2</b>	
		<b>Mucosal, Submucosa e transmural</b>	<b>3</b>	
<b>Alterações Epiteliais</b>	<b>Hiperplasia</b>	<b>Aumento no número de células epiteliais em criptas longitudinais em relação ao número de células epiteliais basais por cripta; visível como alongamento de cripta</b>		
		<b>Normal: &lt;5%</b>	<b>0</b>	
		<b>Minima: &lt;25%</b>	<b>1</b>	
		<b>Leve: 21-35%</b>	<b>2 ou 3</b>	
		<b>Moderada: 36-50%</b>	<b>3 ou 4</b>	
		<b>Acentuado: &gt;50%</b>	<b>4 ou 5</b>	
<b>Perda de células caliciformes</b>	<b>Perda de células caliciformes</b>	<b>Redução do número de células caliciformes em relação ao número de células caliciformes de linha de base por cripta:</b>		
		<b>Normal: &lt;5%</b>	<b>0</b>	
		<b>Minima: &lt;20%</b>	<b>1 ou 2</b>	
		<b>Leve: 21-35%</b>	<b>2 ou 3</b>	
		<b>Moderada: 36-50%</b>	<b>3 ou 4</b>	
		<b>Acentuada: &gt;50%</b>	<b>4</b>	
	<b>Criptite</b>	<b>Neutrófilos entre as células epiteliais da cripta</b>	<b>2 ou 3</b>	
		<b>Sem Neutrófilos entre as células epiteliais da cripta</b>	<b>0</b>	
	<b>Abcessos de cripta</b>	<b>Neutrófilos no lúmen da cripta</b>	<b>3 a 5</b>	
		<b>Sem Neutrófilos no lúmen da cripta</b>	<b>0</b>	
<b>Erosão</b>	<b>Perda de epitélio superficial</b>	<b>1 a 4</b>		
	<b>Sem Perda de epitélio superficial</b>	<b>0</b>		
<b>Arquitetura da mucosa</b>	<b>Ulceração</b>	<b>Defeito epitelial alcançando além da muscular da mucosa</b>	<b>3 a 5</b>	
		<b>Sem ulceração</b>	<b>0</b>	

	<b>Tecido de granulação</b>	<b>Reparação do tecido conjuntivo com novos capilares, circundados por fibroblastos fusiformes, miofibroblastos, macrófagos, neutrófilos e células mononucleares, bem como detritos celulares; pseudopólipos: áreas vilosas hipertrofiadas projetando-se no lúmen</b>	<b>4 ou 5</b>
		<b>Sem granulação</b>	<b>0</b>
	<b>Criptas irregulares</b>	<b>Criptas não paralelas, diâmetros de cripta variáveis, bifurcação e criptas ramificadas</b>	<b>4 ou 5</b>
		<b>Cripta Regular</b>	<b>0</b>
	<b>Perda de cripta</b>	<b>Mucosa sem criptas</b>	<b>4 ou 5</b>
		<b>Sem perda de criptas</b>	<b>0</b>
	<b>Achatamento Viloso</b>	<b>Sem perda no comprimento das Vilosidades, proporção de comprimento de Vilosidade para cripta de 4: 1 ou mais</b>	<b>0</b>
		<b>Leve: proporção de comprimento de vilosidade para cripta de 2: 1 a 3: 1</b>	<b>1 a 3</b>
		<b>Moderada: proporção de comprimento de vilosidade para cripta de 1: 1 a 2: 1</b>	<b>2 a 4</b>
		<b>Atrofia vilosa</b>	<b>3 a 5</b>

## ANEXO C – Produção Bibliográfica

**Autores:** dos Santos Freitas, A., da Silva Fernandes, L. J., Coelho-Rocha, N. D., de Jesus, L. C. L., de Rezende Rodovalho, V., da Silva, T. F., ... & Azevedo, V. (2022). Immunomodulatory and antiinflammatory mechanisms of probiotics. In Probiotics (pp. 321-341). Academic Press.

**Descrição:** Capítulo escrito por nosso grupo de pesquisa que aborda os mecanismos imunomodulatórios e efeitos anti-inflamatórios de organismos probióticos e compõe o livro Probiotics: Advanced Food and Health Applications.



### Probiotics

Advanced Food and Health Applications

2022, Pages 321-341



## Chapter 16 - Immunomodulatory and antiinflammatory mechanisms of probiotics

Andria dos Santos Freitas <sup>a</sup>, Lucas Jorge da Silva Fernandes <sup>a</sup>, Nina Dias Coelho-Rocha <sup>a</sup>, Luís Cláudio Lima de Jesus <sup>a</sup>, Vinicius de Rezende Rodovalho <sup>a</sup>, Tales Fernando da Silva <sup>a</sup>, Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho <sup>b</sup>, Vasco Azevedo <sup>a</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85170-1.00019-1>

Get rights and content

**Autores:** de Jesus, L. C. L., da Silva, T. F., de Assis Glória, R., dos Santos Freitas, A., Américo, M. F., da Silva Fernandes, L. J., ... & Azevedo, V. (2022). Lactic acid bacteria–based beverages in the promotion of gastrointestinal tract health. In *Microbiome, Immunity, Digestive Health and Nutrition* (pp. 373-385). Academic Press.

**Descrição:** Capítulo que aborda o uso de bebidas a base de bactérias lácticas e seus benefícios ao TGI, está inserido no livro *Microbiome, Immunity, Digestive Health and Nutrition: Epidemiology, Pathophysiology, Prevention and Treatment*.



Microbiome, Immunity, Digestive Health  
and Nutrition

Epidemiology, Pathophysiology, Prevention and Treatment

2022, Pages 373-385



## Chapter 26 - Lactic acid bacteria–based beverages in the promotion of gastrointestinal tract health

Luís Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Rafael de Assis Glória<sup>1</sup>, Andria dos Santos Freitas<sup>1</sup>, Monique Ferrary Américo<sup>1</sup>, Lucas Jorge da Silva Fernandes<sup>1</sup>, Gabriela Munis Campos<sup>1</sup>, Gabriel Camargos Gomes<sup>1</sup>, Rhayane Cristina Viegas Santos<sup>1</sup>, Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, Debmalya Barh<sup>1,2</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822238-6.00008-X>











Get rights and content

**Autores:** Batista, V. L., De Jesus, L. C. L., Tavares, L. M., Barroso, F. L. A., Fernandes, L. J. D. S., Freitas, A. D. S., ... & Azevedo, V. (2022). Paraprobiotics and Postbiotics of *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Mitigate 5-FU-Induced Intestinal Inflammation. *Microorganisms*, 10(7), 1418.

**Descrição:** Artigo sobre os efeitos anti-inflamatórios de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 sobre a inflamação intestinal induzida por 5-fluorouracil.

Open Access Article

## Paraprobiotics and Postbiotics of *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Mitigate 5-FU-Induced Intestinal Inflammation

by  Viviane Lima Batista <sup>1,†</sup>  Luís Cláudio Lima De Jesus <sup>1,†</sup>  Láisa Macedo Tavares <sup>1</sup>  Fernanda Lima Alvarenga Barroso <sup>1</sup>  Lucas Jorge da Silva Fernandes <sup>1</sup>  Andria dos Santos Freitas <sup>1</sup>  Monique Ferrary Americo <sup>1</sup>  Mariana Martins Drumond <sup>2</sup>  Pamela Mancha-Agresti <sup>2</sup>  Enio Ferreira <sup>3</sup>  Juliana Guimarães Laguna <sup>1</sup>  Luiz Carlos Júnior Alcantara <sup>1,4,\*</sup> and  Vasco Azevedo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Ecology and Evolution, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Federal Center for Technological Education of Minas Gerais, Belo Horizonte 30421-169, Brazil

<sup>3</sup> Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

<sup>4</sup> Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

\* Authors to whom correspondence should be addressed.

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Luis G. Bermudez Humaran

*Microorganisms* 2022, 10(7), 1418; <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071418>

Received: 21 May 2022 / Revised: 22 June 2022 / Accepted: 1 July 2022 / Published: 14 July 2022

(This article belongs to the Special Issue Novel Probiotic Strains and Bacteriotherapy)

Ativar o Windows