

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

Lara de Lima Campos

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR Typhimurium

Belo Horizonte

2022

Lara de Lima Campos

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR Typhimurium

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

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Co-orientadora: Dra. Éricka Lorena de Sales Souza e Melo

Belo Horizonte

2022

043

Campos, Lara de Lima.

Avaliação do efeito probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I- 3856 na resposta inflamatória induzida experimentalmente por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium [manuscrito] / Lara de Lima Campos. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Co-orientadora: Dra. Éricka Lorena de Sales Souza e Melo.

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

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. *Salmonella typhimurium*. 5. Inflamação. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Melo, Éricka Lorena de Sales Souza e. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LARA DE LIMA CAMPOS

Nº REGISTRO: 2020713149

Às 13:30 horas do dia **16 de maio de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Mônica Larucci Vieira (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), o Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins – Orientador e a Dra. Éricka Lorenna de Sales Souza e Melo – Coorientadora, para julgar o trabalho final "**Avaliação do efeito probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 na resposta inflamatória induzida experimentalmente por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium**", da aluna **Lara de Lima Campos**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 16 de maio de 2022

Membros da banca:

Profa. Dra. Mônica Larucci Vieira

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Dra. Éricka Lorena de Sales Souza e Melo
(Coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 17/05/2022, às 08:46, 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 **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 17/05/2022, às 10:04, 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 **Éricka Lorena de Sales Souza e Melo, Usuária Externa**, em 17/05/2022, às 12:22, 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 **Monica Larucci Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 17/05/2022, às 12:29, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 18/05/2022, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1414270** e o código CRC **EBEEA89E**.

Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram presentes durante a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu saúde e força para superar todos os momentos difíceis e desafiadores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, pelo acolhimento no Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, paciência e confiança no meu trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Éricka Lorenna de Sales Souza e Melo, por todo incentivo e disponibilidade.

Aos familiares e amigos, em especial: aos meus pais, Janete, Cristiano e Valquíria (*in memoriam*); minhas irmãs, Ana Clara e Laila; meus avós, Maria Rita, Arcízio e Norma (*in memoriam*); tios e tias; primos e primas; aos pequenos, Bernardo, Alice, Maria Rita e Helena; aos meus parceiros de vida, Marcus, Gabriel, Cíntia e Fábio. Obrigada pelo afeto, conselhos, momentos e conversas. Vocês são minha base!

À Mel, Malu e Amora, pelo amor incondicional e companheirismo de todas as horas. Vocês são os raios de sol que iluminam meus dias!

Aos meus amigos e colegas da UFMG: Maisa, Samantha, Bruno, Aline, Fernanda, Ramon, Vivian, Júlio, Karen e Gabrielle, por todas as risadas, solidariedade e ensinamentos. Sem vocês, eu não teria conseguido.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, em especial a CAPES.

Finalmente, a todos aqueles que embora não citados aqui, contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, minha eterna gratidão!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

As salmoneloses estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade em humanos, sobretudo em países em desenvolvimento. Anualmente, infecções causadas por *Salmonella* são responsáveis por cerca de 2,8 bilhões de casos, que variam desde uma gastroenterite leve (*Salmonella* não-tifoide) até uma doença sistêmica grave (*Salmonella* tifoide). Classicamente, a salmonelose pode ser tratada com antibióticos. Nas últimas décadas, porém, esse padrão-ouro de tratamento tem se mostrado menos eficaz, devido ao aumento alarmante de linhagens resistentes aos antibióticos, aos efeitos desses fármacos na microbiota intestinal do hospedeiro, além da diarreia associada ao uso de antibióticos. Neste contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas é de grande importância. Devido ao papel desempenhado pela microbiota intestinal na manutenção da homeostase do corpo, os probióticos têm sido apontados como uma potencial alternativa terapêutica, uma vez que são capazes de modular o sistema imune e conferir proteção contra a invasão de microrganismos patogênicos. Investigações *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficácia profilática e terapêutica de algumas linhagens probióticas frente ao desafio por *Salmonella*. Embora a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 tenha demonstrado eficácia no controle e tratamento de algumas doenças, como a síndrome do intestino irritável e a candidíase vulvovaginal, não há dados científicos que evidenciem seu efeito probiótico no controle da salmonelose, o que a torna um objeto de estudo inédito e altamente promissor. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na resposta inflamatória induzida experimentalmente por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento oral com a levedura foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade, translocação bacteriana para o fígado e baço, permeabilidade intestinal, níveis de sIgA e recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para os sítios de infecção, além de atenuar as lesões na mucosa intestinal e fígado dos animais. Diante do exposto, concluímos que a levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856 tem potencial para ser considerada como uma nova abordagem terapêutica/adjuvante para o tratamento da salmonelose.

Palavras-chave: probióticos; *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856; *Salmonella* Typhimurium; inflamação intestinal.

ABSTRACT

Salmonellosis are associated with high morbidity and mortality rates in humans, especially in developing countries. *Salmonella* infections are responsible for approximately 2.8 billion cases annually, ranging from mild gastroenteritis (non-typhoidal *Salmonella*) to severe systemic disease (typhoidal *Salmonella*). Classically, salmonellosis can be treated with antibiotics. In recent decades, however, this gold standard of treatment has shown to be less effective, due to the alarming increase in antibiotic-resistant strains, the effects of these drugs on the host's intestinal microbiota, in addition to the diarrhea associated with the use of antibiotics. In this context, the search for new therapeutic alternatives is of great importance. Due to the role played by the intestinal microbiota in maintaining the homeostasis of the body, probiotics have been identified as a potential therapeutic alternative, since they are able to modulate the immune system and provide protection against the invasion of pathogenic microorganisms. In vitro and in vivo investigations have shown the prophylactic and therapeutic efficacy of some probiotic strains compared to the challenge by *Salmonella*. Although the *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 strain has shown efficacy in the control and treatment of some diseases, such as irritable bowel syndrome and vulvovaginal candidiasis, there is no scientific data to evidence its probiotic effect on the control of salmonellosis, which makes it an unprecedented and highly promising object of study. The aim of this work was to evaluate the probiotic effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on the inflammatory response experimentally induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. The results showed that the oral treatment with the yeast was able to reduce the mortality rate, bacterial translocation to the liver and spleen, intestinal permeability, sIgA levels and recruitment of neutrophils and eosinophils to the sites of infection, in addition to attenuating the damage to the intestinal mucosa and liver of animals. In view of the foregoing, we conclude that the yeast *S. cerevisiae* CNCM I-3856 has the potential to be considered as a new therapeutic approach for the treatment of salmonellosis.

Keywords: probiotics; *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856; *Salmonella* Typhimurium; intestinal inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da mucosa intestinal.....	17
Figura 2. Fatores que influenciam a microbiota do trato intestinal de acordo com as diferentes fases da vida.	19
Figura 3. Inibição de patógenos diarreicos pela microbiota intestinal.....	21
Figura 4. Etapas básicas da patogênese de <i>Salmonella</i>	27
Figura 5. Mecanismos de ação dos probióticos.....	32
Figura 6. Desenho experimental da avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i> . ..	39
Figura 7. Desenho experimental da avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na resposta imunológica de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	40
Figura 8. Avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados.....	48
Figura 9. Avaliação da permeabilidade intestinal.	50
Figura 10. Avaliação da translocação bacteriana.....	52
Figura 11. Composição da microbiota intestinal.	57
Figura 12. Avaliação do infiltrado inflamatório por meio da quantificação da atividade de EPO e de MPO.....	61
Figura 13. Determinação da concentração de sIgA no fluido intestinal..	63
Figura 14. Análise histológica do fígado.....	66
Figura 15. Análise histológica do íleo.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios e condições de cultura para a análise qualitativa e quantitativa das fezes dos animais.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
^{99m} Tc	Tecnécio sestamibi
a.C	Antes de Cristo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AMP	Peptídeos antimicrobiano (do inglês <i>Antimicrobial peptides</i>)
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analysis of variance</i>)
APC	Células apresentadoras de antígeno (do inglês <i>Antigen-presenting cells</i>)
AS	Ágar sangue
AS-S	Ágar sangue suplementado
BAL	Bactérias ácido-láticas
BBE	<i>Bacteroides Bile Esculin</i>
BHI	Infusão de Cérebro e Coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)
CEBIO	Centro de Bioterismo
Célula M	Células <i>Microfold</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNCM	Coleção Nacional de Cultura de Microrganismos (do inglês <i>Collection Nationale de Cultures de Microorganismes</i>)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Grupo de camundongos controle, recebendo apenas salina, sem tratamento e/ou desafio
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
DTPA	Ácido dietilenoaminopentacético (do inglês <i>Diethyleneaminopentacetic acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamina
ELISA	Ensaio de Absorção Imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPO	Peroxidase eosinofílica (do inglês <i>Eosinophil peroxidase</i>)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica H10407
FAE	Epitélio associado ao folículo (do inglês <i>Follicle-associated epithelium</i>)
FaFar	Faculdade de Farmácia
FAO	Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOS	Fruto-oligossacarídeo
g	Força gravitacional
g/dia	Grama por dia
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino (do inglês <i>Gut associated lymphoid tissue</i>)
GAPs	Passagens associadas às células caliciformes (do inglês <i>Goblet cell-associated antigen passages</i>)
GF	Isentos de germes (do inglês <i>Germ free</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HM	Hipertônico manitol
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
I-3856	Grupo de camundongos tratados diariamente com <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856, sem desafio
I-3856+ST	Grupo de camundongos tratados diariamente com <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISCs	Células-tronco epiteliais intestinais (do inglês <i>Intestinal epithelial cell</i>)
kg	Quilograma
LABio	Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
LP	Lâmina própria
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m ²	Metro quadrado
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MLN	Linfonodo mesentérico próximo (do inglês <i>Mesenteric lymph nodes</i>)
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
MRS	<i>de Man, Rogosa & Sharp</i>
MUC2	Proteína mucina do tipo 2
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
NB2	Nível de biossegurança 2
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil extracellular traps</i>)
nm	Nanômetros
NOD	Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (do inglês <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
°C	Graus Celsius
PAIs	Ilhas de patogenicidade (do inglês <i>Pathogenicity islands</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PPs	Placas de Peyer
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotação por minuto

SCV	Vacúolos contendo <i>Salmonella</i> (do inglês <i>Salmonella-containing vacuole</i>)
sIgA	Imunoglobulina do tipo A secretória
SPI	Ilhas de patogenicidade de <i>Salmonella</i> (do inglês <i>Salmonella pathogenicity islands</i>)
ST	Grupo de camundongos recebendo solução salina 0,9% e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> ,
TJ	Junções firmes (do inglês <i>Tight junctions</i>)
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i> (do inglês <i>Toll-like receptors</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>)
UA	Unidades arbitrárias
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
YPG	Meio contendo extrato de levedura, peptona e glicose (do inglês <i>Yeast Peptone Glucose</i>)
α	Alfa
γ	Gama

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

- *Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins*

Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia (FaFar), UFMG

- *Profa. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes*

- *Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso*

Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG

- *Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes*

Laboratório de Imunoparasitologia e Morfopatologia, Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

- *Profa. Dra. Samantha Ribeiro Béla*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Epitélio Intestinal	15
1.2 Microbiota do Trato Intestinal	18
1.2.1 Proteção da microbiota intestinal contra infecções diarreicas	20
1.3 <i>Samonella enterica</i>	23
1.3.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	25
1.4 Probióticos.....	29
1.5 A levedura <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856.....	32
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Animais.....	37
4.1.1 Animais convencionais (CV).....	37
4.2 Microrganismos	37
4.2.1 Linhagem bacteriana.....	37
4.2.2 Probiótico	38
4.3 Experimento 1: Avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	38
4.4 Experimento 2: Avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na permeabilidade intestinal e nos parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	39
4.4.1 Determinação da permeabilidade intestinal	40
4.4.2 Avaliação dos parâmetros microbiológicos	40
4.4.3 Avaliação dos parâmetros imunológicos	42
4.4.4 Avaliação dos parâmetros histológicos.....	44
4.5 Planejamento estatístico	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	47
5.2 Avaliação do efeito protetor de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 na permeabilidade intestinal e nos parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	48
5.2.1 Determinação da permeabilidade intestinal	48
5.2.2 Avaliação dos parâmetros microbiológicos	51
5.2.3 Avaliação dos parâmetros imunológicos	58
5.2.4 Avaliação dos parâmetros histológicos.....	63
6 CONCLUSÃO	68
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8 REFERÊNCIAS	70
ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epitélio Intestinal

A superfície mucosa que reveste o trato intestinal representa a principal e mais extensa área corporal, aproximadamente 400 m², em contato com fatores ambientais e antígenos (MCCRACKEN; LORENZ, 2001; NEUDECKER *et al.*, 2017). A barreira epitelial intestinal protege a mucosa do intestino e desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do hospedeiro, uma vez que evita a entrada de macromoléculas e microrganismos potencialmente patogênicos, além de garantir a absorção de nutrientes e o monitoramento do conteúdo luminal (TURNER, 2009; FRANCE; TURNER, 2017).

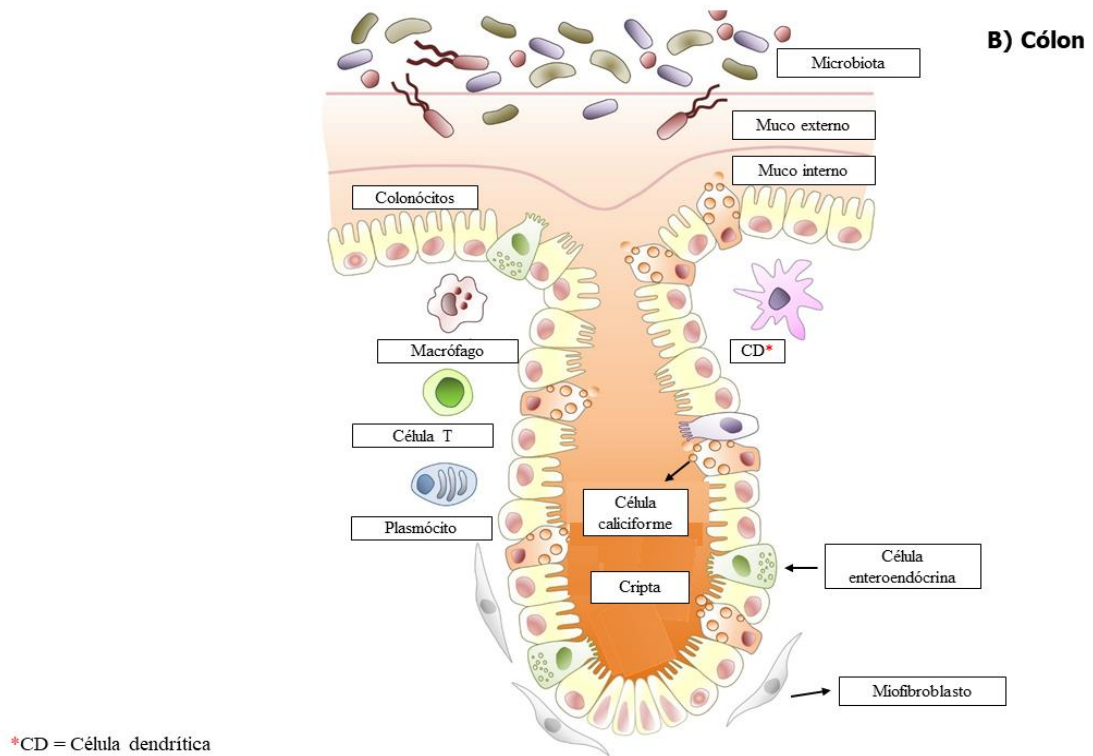
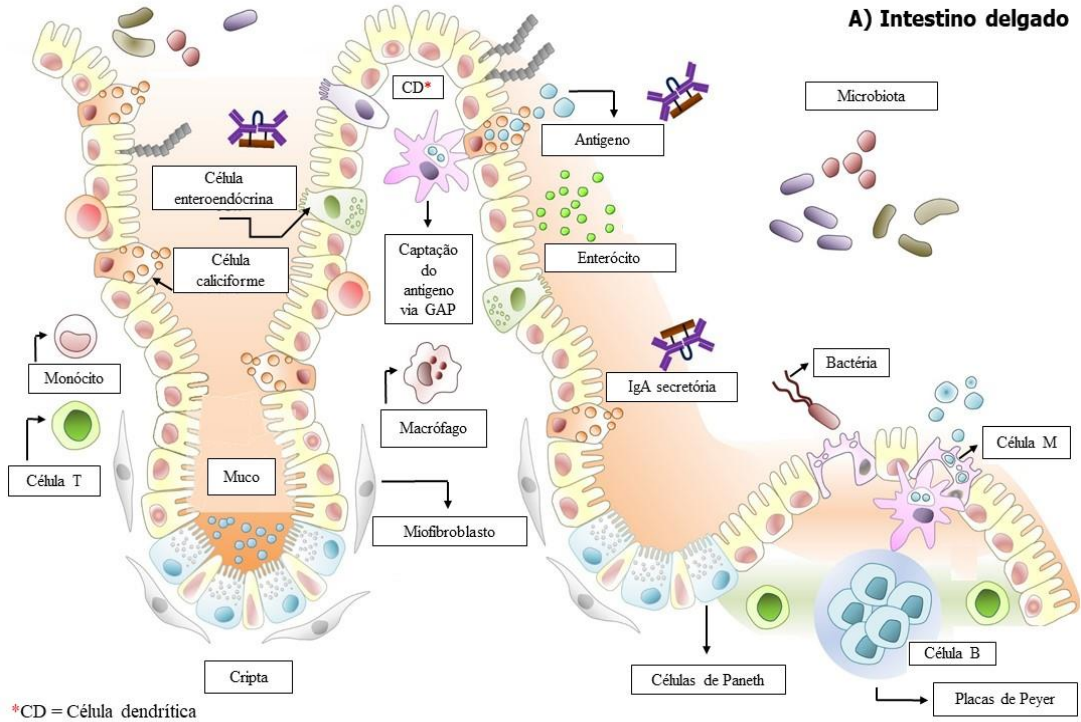
O epitélio intestinal consiste em uma camada única de células, constituída por vários elementos físicos (epitélio), bioquímicos (muco, peptídeos antimicrobianos – AMPs) e imunológicos (imunoglobulina do tipo A secretória – sIgA) altamente integrados, que agem em sinergia para garantir a saúde do hospedeiro (LIEVIN-LE MOAL; SERVIN, 2006; ALLAIRE *et al.*, 2018). Cada célula epitelial mantém associação íntima com suas células vizinhas e sela a superfície do intestino com junções firmes – do inglês *tight junctions* (TJ) (BROZ; OHLSON; MONACK, 2012). O comprometimento da integridade dessa barreira pode impossibilitar o desempenho de suas funções usuais, levando à ativação imune crônica e ao desenvolvimento de doenças locais e sistêmicas, incluindo doença celíaca, câncer colorretal, doença inflamatória intestinal (DII), além de distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes (FASANO *et al.*, 2000; GRIVENNIKOV *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2017).

O epitélio intestinal é exposto diariamente a diversos materiais, como componentes da dieta, antígenos e microrganismos, o que resulta na perda de células e na deterioração desse tecido (MONTGOMERY; MULBERG; GRAND, 1999). Devido ao elevado trânsito de material intestinal, essa camada apresenta uma taxa de renovação tissular constante. Regiões especializadas das criptas intestinais abrigam as células-tronco epiteliais intestinais (ISCs), que são responsáveis pela renovação periódica do epitélio intestinal (SEISHIMA; BARKER, 2019).

A constituição dessa camada epitelial é baseada em algumas linhagens celulares e teciduais características (Figura 1A-B): (i) enterócitos, células

especializadas que apresentam microvilosidades organizadas na membrana apical, que possibilitam a absorção de nutrientes (MCCONNELL *et al.*, 2009; GEHART; CLEVERS, 2019); (ii) células enteroendócrinas, que contêm pequenos grânulos com diferentes hormônios, responsáveis pela regulação da ingestão de alimentos, modulação das funções motoras do intestino, regulação da secreção de órgãos e estimulação da secreção de insulina induzida por glicose (PLOVIER; CANIS, 2017); (iii) células caliciformes, responsáveis pela produção de muco e pela secreção de quimiocinas e citocinas, além da formação de passagens associadas às células caliciformes (GAPs), que direcionam substâncias do lúmen para as células apresentadoras de antígeno (APC) situadas na lâmina própria (LP) (KNOOP; NEWBERRY, 2018); (iv) células de Paneth, responsáveis pela produção de AMPs, que auxiliam na regulação da microbiota intestinal (HU *et al.*, 2015); e (v) células M (*Microfold*), presentes no epitélio associado ao folículo (FAE), que auxiliam na captura e no direcionamento de antígenos do lúmen para as células do sistema imune presentes na LP, para que sejam apresentados e processados, sendo este processo facilitado pela proximidade entre estas células e as placas de Peyer (PPs), massa de tecido linfóide disposta ao longo do intestino delgado. As PPs facilitam a indução de defesa contra patógenos ou tolerância imunológica como resultado da complexa interação entre as células imunes localizadas nos folículos linfóides e o FAE, que circunda as PPs e forma a interface entre o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e o microambiente luminal. O GALT abriga linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas, que regulam as respostas inflamatórias a patógenos e antígenos que violam a barreira intestinal, protegem a mucosa contra microrganismos nocivos e eliminam células mortas e detritos estranhos (BROZ; OHLSON; MONACK, 2012; BEREK; BELLER; CHU, 2016; KIMURA, 2018).

Figura 1. Anatomia da mucosa intestinal. (A) Intestino delgado; (B) Cólon.



Fonte: Adaptado de Allaire *et al.*, 2018.

A imunidade inata e imunidade adaptativa, juntamente com o tecido epitelial, protegem o hospedeiro contra possíveis infecções por patógenos. O sistema imune inato confere uma ação rápida, porém inespecífica, e é mobilizado nos primeiros dias, a fim de controlar a infecção. Em contraste, a resposta imune adaptativa é observada 4 a 7 dias após a infecção e é caracterizada pela formação da memória imunológica (MEDZHITOV, 2001; YAMASHITA, 2017). As células epiteliais, por sua vez, são responsáveis pela secreção de diversas substâncias – muco, defensinas, peptídeos antimicrobianos – que inibem a adesão e previnem o crescimento microbiano indesejado (MAGNUSSON; STJERNSTROM, 1982; LU *et al.*, 2017). O intestino do hospedeiro é capaz de diferenciar a microbiota normal dos microrganismos enterovirulentos, por meio de receptores altamente especializados de detecção de antígenos, denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*). Tais receptores distinguem padrões associados à microbiota indígena (próprio) daqueles relacionados às estruturas moleculares encontradas nos patógenos (não próprio) (DIDIERLAURENT *et al.*, 2002; ALDRIDGE *et al.*, 2005; BIERSCHEK; BOUCHER; SCHRODER, 2017). Os receptores de reconhecimento Toll-like (TLRs) e as proteínas NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) são vias clássicas de reconhecimento de moléculas associadas aos patógenos (ECKMANN, 2005; KAWAI; AKIRA, 2005).

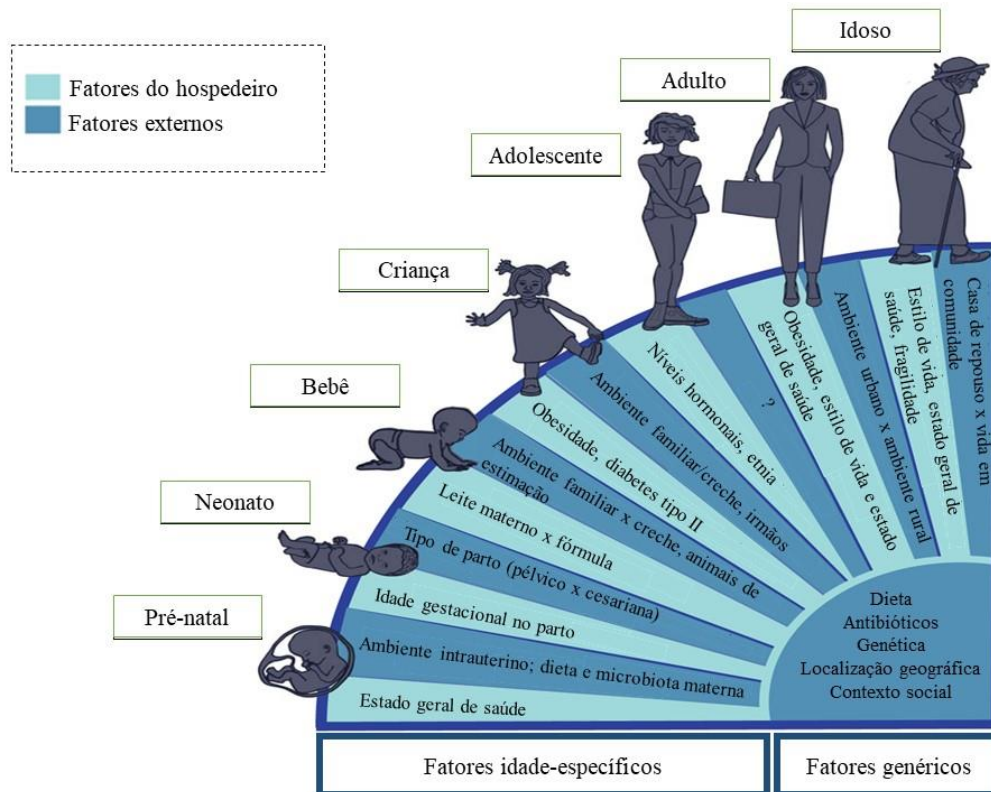
1.2 Microbiota do Trato Intestinal

O trato intestinal humano alberga uma população dinâmica e complexa de microrganismos, a microbiota intestinal, que atua diretamente na manutenção da homeostase corporal e na proteção contra patógenos invasores. Além dessas funções primárias, esses microrganismos também podem atuar na síntese de vitaminas (B e K), na sinalização endócrina e na estimulação do desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016). A microbiota pode ser classificada em autóctone (residente, indígena ou normal) ou alóctone (transitória ou residual), sendo que esta última somente passa pelo intestino, mas não o coloniza como faz a autóctone (SUÁREZ, 2015).

O estabelecimento da microbiota comensal inicia-se logo após o nascimento e pode ser influenciado por diversos fatores (Figura 2), como: tipo de parto, uma vez que o recém-nascido é inicialmente exposto à microbiota vaginal (parto pélvico) ou à microbiota da pele da mãe (parto via cesariana); aleitamento materno; interação com

animais de estimação, além da exposição constante aos microrganismos presentes no ambiente (GREENHALGH *et al.*, 2016; KORPELA *et al.*, 2018; SPROCKETT; FUKAMI; RELMAN, 2018).

Figura 2. Fatores que influenciam a microbiota do trato intestinal de acordo com as diferentes fases da vida.



Fonte: Adaptado de Greenhalgh *et al.*, 2016.

A faixa etária do hospedeiro também influencia diretamente na colonização microbiana do intestino. Nos primeiros dias de vida, a microbiota dos neonatos é preponderantemente composta por microrganismos aeróbios. Com o passar dos anos e a associação a fatores genéticos e ambientais como a localização geográfica, contexto social, dieta e uso de antibióticos, a microbiota sofre processos de maturação que favorecem a colonização por populações anaeróbias obrigatórias e atinge um maior grau de estabilidade, quando comparada aos primeiros anos de vida (Figura 2) (HOOPER, 2004; WALKER *et al.*, 2005; GREENHALGH *et al.*, 2016; KUNDU *et al.*, 2017).

Estudos sugerem que a microbiota intestinal de indivíduos adultos saudáveis é majoritariamente composta por quatro filos bacterianos, sendo que *Firmicutes* e *Bacteroidetes* estão presentes em maior quantidade, e *Actinobacteria* e

Proteobacteria, em menor número (LEY *et al.*, 2008; TAP *et al.*, 2009). Devido à presença abundante de microrganismos comensais, estimativas recentes apontam que a colonização microbiana do intestino apresenta uma relação de 1:1 quando comparada ao número de células do hospedeiro, sendo que fatores como ácido gástrico, nutrientes, oxigênio e peptídeos antimicrobianos influenciam na densidade e na diversidade desses microrganismos (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Sabe-se que a microbiota intestinal afeta diversos aspectos fisiológicos do hospedeiro, incluindo digestão, metabolismo, imunidade e até mesmo o comportamento do indivíduo (SOMMER; BÄCKHED, 2013; DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016). Dessa forma, a disbiose intestinal tem sido associada à patogênese de muitas doenças inflamatórias e infecções, como aquelas causadas por *Salmonella* e outras bactérias enteropatogênicas (LAWLEY; WALKER, 2013).

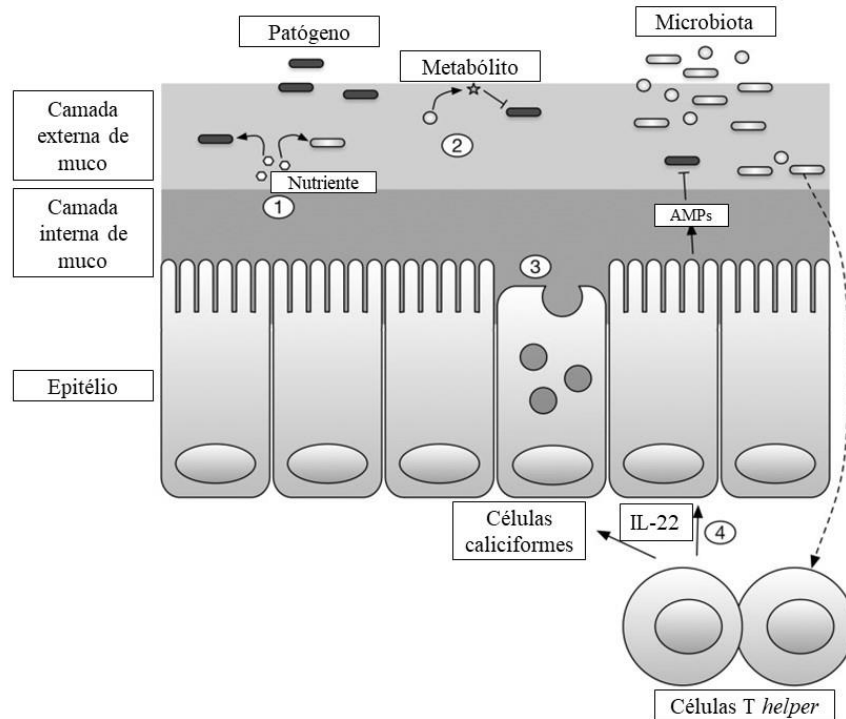
1.2.1 Proteção da microbiota intestinal contra infecções diarreicas

Estudos realizados em animais isentos de germes, que não possuem microbiota, e em animais tratados com antibióticos, que tiveram sua microbiota afetada pela ação dos fármacos, sugerem que uma microbiota intestinal saudável confere resistência contra a colonização por patógenos geralmente associados a alimentos, como *Clostridium difficile*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* diarreio gênica (YURIST-DOUTSCH *et al.*, 2014; KEENEY *et al.*, 2014). No caso de infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, observou-se que o desafio oral com 10 UFC/mL foi letal para camundongos isentos de germes, ao passo que doses de 10^3 - 10^9 UFC/mL foram necessárias para causar a morte de 50% dos animais convencionais cuja microbiota intestinal estava intacta (CARTER; COLLINS, 1974a; NARDI *et al.*, 1989). Em animais submetidos ao tratamento com antibióticos, demonstrou-se que o pré-tratamento com estreptomicina levou ao aumento da colonização e inflamação por *Salmonella* no intestino grosso, aumento da eliminação fecal do patógeno em relação aos animais não tratados e permanência da susceptibilidade à reinfecção pelo patógeno até 21 dias após a suspensão dos antimicrobianos, o que sugere que a colonização por *Salmonella* pode ser potencializada quando a microbiota hospedeira se encontra em estado de desequilíbrio (BARTHEL *et al.*, 2003; CROSWELL *et al.*, 2009).

Os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal fornece resistência (Figura 3) à colonização por microrganismos patogênicos podem ser genericamente

agrupados em duas grandes categorias: inibição direta de patógenos e inibição indireta de patógenos, por meio de efeitos no hospedeiro (VOGT; FINLAY, 2017).

Figura 3. Inibição de patógenos diarreicos pela microbiota intestinal.



Fonte: Adaptado de Vogt & Finlay, 2017.

A microbiota do hospedeiro pode inibir os patógenos de forma direta, via competição por nutrientes. Muitas bactérias comensais utilizam carboidratos produzidos pelo hospedeiro como fonte de carbono, como os glicanos ligados covalentemente à proteína mucina do cólon (MUC2) (JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013). Para tanto, algumas espécies da microbiota intestinal secretam sialidases, enzimas que clivam os resíduos de ácido siálico terminais das mucinas glicanas, disponibilizando moléculas de ácido livre, que podem ser consumidas por qualquer bactéria próxima que possua o maquinário genético necessário para transporte e catabolismo desse composto (LEWIS; LEWIS, 2012). Em estudos preliminares, observou-se uma elevação significativa dos níveis de ácido siálico livre no ceco de camundongos, um dia após o tratamento com antibióticos, o que aumentou a suscetibilidade desses animais à infecção por *Salmonella* e *C. difficile*, que são capazes de consumir ácido siálico, mas não possuem a enzima necessária para liberar esse composto do muco (HOYER *et al.*, 1992; NG *et al.*, 2013).

Certas espécies da microbiota intestinal produzem metabólitos que inibem o crescimento ou reduzem a virulência de patógenos. Essa inibição do crescimento pode ocorrer por meio de mecanismos variados, como: secreção de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas), secreção de metabólitos de moléculas pequenas (ácidos biliares secundários) ou por meio de estruturas inibitórias do contato celular (sistema de secreção do tipo VI) (RUSSELL *et al.*, 2014; BUFFIE *et al.*, 2015; KOMMINENI *et al.*, 2015). Somado a isso, alguns microrganismos comensais também podem produzir moléculas que reduzem a virulência dos patógenos, interferindo na sua capacidade de expressar genes necessários para colonização e invasão de células epiteliais, por exemplo. A produção de metabólitos antivirulência também foi observada em quadros de infecção por *Salmonella* (ANTUNES *et al.*, 2014).

A promoção de efeitos benéficos no hospedeiro, como a manutenção da barreira intestinal por meio da secreção de mucina, por exemplo, também é uma estratégia utilizada para impedir a colonização por patógenos diarreicos (JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013). O epitélio colônico é protegido por uma camada de muco interna (mais próxima da superfície epitelial e livre de microrganismos) e por uma camada externa de muco (mais próxima ao lúmen do cólon e colonizada por uma variedade de espécies microbianas), que agem como uma barreira física na superfície epitelial, além de serem capazes de reter fatores antimicrobianos, como AMPs e sIgA (JOHANSSON *et al.*, 2015; JOHANSSON, HANSSON, 2016). Em camundongos tratados com antibiótico, o afinamento da camada protetora de muco interno foi associado a uma inflamação mais grave em casos de infecção por *Citrobacter rodentium*, o que evidencia a importância da integridade dessa camada (WLODARSKA *et al.*, 2011).

Somado a isso, a microbiota intestinal também é conhecida por estimular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo, alterando a suscetibilidade do hospedeiro a patógenos variados (HONDA; LITTMAN, 2016; THAISS *et al.*, 2016). Em um estudo que analisou o resultado da infecção por *C. rodentium* em camundongos C3H/HeJ e NIH/Swiss, observou-se que as diferenças na composição da microbiota entre as linhagens contribuíram para a variação de suscetibilidade ao patógeno, o que foi vinculado à produção de interleucina (IL)22 pelo hospedeiro, cuja principal função é aumentar a produção AMPs nas células epiteliais intestinais. Níveis mais elevados de IL22 foram identificados no intestino de camundongos

resistentes (NIH/Swiss), ao passo que uma menor quantidade da citocina foi encontrada no intestino de camundongos suscetíveis (C3H/HeJ), evidenciando o importante papel desempenhado pela IL22 na proteção contra a infecção causada pelo patógeno (VALLANCE *et al.*, 2003; SATOH-TAKAYAMA, 2008; ZHENG *et al.*, 2008; WILLING *et al.*, 2011).

1.3 *Samonella enterica*

Espécies de *Samonella* foram inicialmente isoladas e descritas pelo microbiologista americano Daniel Elmer Salmon, no final do século XIX (BRENNER *et al.*, 2000). Trata-se de bacilos flagelados, Gram-negativo, móveis e anaeróbios facultativos, pertencentes à classe γ -*Proteobacteria*, família *Enterobacteriaceae*. Em relação às características bioquímicas, sabe-se que fermentam glicose, são negativos para oxidase e indol, reduzem nitrato a nitrito e produzem sulfeto de hidrogênio. Todos esses aspectos, associados à capacidade de crescer em condições aeróbias e anaeróbias, facilitam a identificação laboratorial desses microrganismos (FRAMER, 1995). Dentre os fatores de virulência expressos por *Salmonella*, pode-se destacar o lipopolissacarídeo (LPS) – componente da membrana externa –, que constitui um forte ativador da resposta imune inata e desempenha um papel importante nas interações hospedeiro-patógeno (NEEDHAM; TRENT, 2013). Embora essas moléculas estejam ancoradas na membrana externa bacteriana, elas são liberadas espontaneamente durante o crescimento do patógeno ou após a exposição da bactéria a antibióticos. Dessa forma, o LPS é responsável por muitos dos sintomas clínicos observados, já que estimula monócitos e macrófagos a produzir grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (BENDER *et al.*, 2013).

A espécie *S. enterica* compreende diversos patógenos de importância médica, que são frequentemente associados a doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em todo o mundo (DOUGAN; BAKER, 2014; EFSA; ECDC, 2017; CDC, 2020). Casos anuais de infecção por *Salmonella* são relatados em diversas matrizes alimentares, incluindo produtos de origem animal – laticínios e produtos cárneos –, bem como em alimentos de origem não animal – cereais, frutas e vegetais (BALK, 2011; HUANG *et al.*, 2018). Os surtos de salmonelose são mais comuns em derivados do leite e de aves domésticas, uma vez que o trato intestinal desses animais é considerado reservatório natural dessas bactérias, devido à sua

alimentação rica em proteínas. A gastroenterite pode ser derivada do cozimento inadequado de ovos e carnes de aves domésticas ou da contaminação cruzada de outros alimentos (SALYERS; WHITT, 1994). Usualmente, *S. enterica* infecta o hospedeiro pela via oral. Já no intestino, a bactéria invade as células M e coloniza as PP, ganhando acesso ao GALT. Atingindo o tecido linfóide associado, *Salmonella* invade os fagócitos, nos quais sobrevive e se replica. Além disso, essas células-alvo também atuam como veículo de disseminação do patógeno para outros sítios corporais (FINLAY *et al.*, 1992; RAUPACH; KAUFMANN, 2001; GUT *et al.*, 2018).

As salmoneloses estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade em humanos, sobretudo em países em desenvolvimento, sendo que a gravidade da doença depende do estado de saúde do indivíduo, bem como dos sorotipos que causam a infecção (BERGEY, 1994; ENG *et al.*, 2015). Anualmente, infecções causadas por *Salmonella* são responsáveis por cerca de 2,8 bilhões de casos de gastroenterites e diarreias (BRENNER *et al.*, 2000; LYNCH *et al.*, 2009). A maioria dos pacientes é acometida por náusea, diarreia, febre e cólicas abdominais, dentro de 12-72 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo que o quadro infeccioso pode perdurar por uma semana (CDC, 2020). Após o final dos sintomas, o indivíduo pode continuar excretando a bactéria por um determinado período, que pode variar de três meses a mais de um ano. Estudos indicam que a gastroenterite pode se agravar e evoluir para infecções sistêmicas em crianças com menos de cinco anos de idade, idosos e pacientes imunodebilitados (MEADOW; SCHNEIDER; BEEN, 1985; SALYERS; WHITT, 1994). O quadro constitui um grave problema de saúde pública e econômico, especialmente em locais onde o acesso a água potável é escasso e a qualidade desta é insatisfatória (SCALLAN *et al.*, 2011).

Entre as manifestações clínicas associadas à infecção por *S. enterica*, a salmonelose não-tifoide (gastroenterite aguda) e a febre tifoide (doença sistêmica) são as mais frequentes (LAYTON; GALYOV, 2007; KEESTRA-GOUNDER; TSOLIS; BÄUMLER, 2015). As doenças causadas por *Salmonella* não-tifoide estão relacionadas a 90 milhões de casos, com estimativa de 155.000 mortes em todo o mundo anualmente, ao passo que as infecções por *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhi e *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Paratyphi, agentes causadores da febre tifoide em seres humanos, são relatados como causa de 16-33 milhões casos de infecções, com aproximadamente 600.000 mortes associadas (BULA-RUDAS; RATHORE; MARAQA, 2015). *Salmonella* Typhimurium, *S. enterica*

subsp. *enterica* sorovar Enteritidis e outros sorotipos da espécie *S. enterica* possuem um amplo espectro de hospedeiros – camundongos, aves, humanos, anfíbios, répteis –, e geralmente causam gastroenterites que podem ser facilmente tratadas com antibióticos (TSOLIS *et al.*, 2011; SALEZ; MALO, 2014; WHO, 2020).

1.3.1 *Salmonella* Typhimurium

Em camundongos, a infecção por *S. Typhimurium* desencadeia uma doença sistêmica com características semelhantes à febre tifoide causada por *S. Typhi* em humanos. Cineticamente, a infecção do animal pode ser dividida em quatro fases: (i) eliminação rápida de bactérias séricas; (ii) replicação ativa do patógeno no interior das células fagocitárias do hospedeiro, na semana seguinte à infecção; (iii) reconhecimento dos patógenos invasores pelas células mononucleadas da linhagem fagocitária, resultando na produção de várias citocinas (TNF, IL1, IL6, IL8, IL12, IFN γ) e na infiltração massiva de células de defesa, como monócitos e neutrófilos polinucleados, nos focos de inflamação; e (iv) defesa inflamatória adquirida, com ação de células B e T, além dos fatores humorais que delas resultam (SALEZ; MALO, 2004; CHAKROUN *et al.*, 2017).

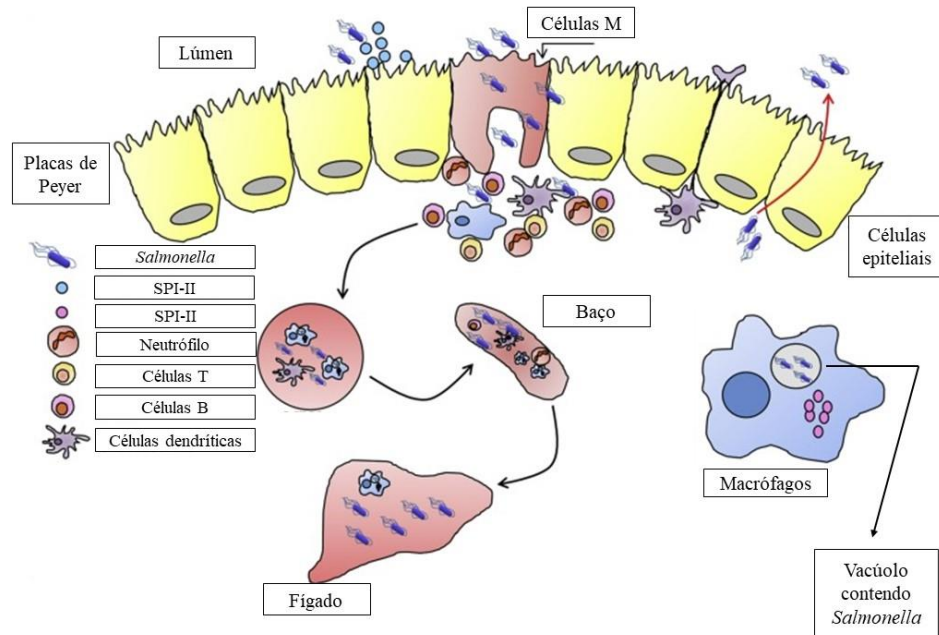
Os mecanismos pelos quais o patógeno age são complexos e muito diversificados. Neste contexto, as ilhas de patogenicidade (PAIs), presentes na superfície da parede celular bacteriana, desempenham um papel importante na infecção, sobrevivência intracelular e disseminação desses microrganismos patogênicos (HACKER; KAPER, 2000). As PAIs são adquiridas por meio da transferência horizontal de genes durante a evolução bacteriana e codificam diversos fatores de virulência – adesinas, toxinas, invasinas e sistemas de captação de ferro – que contribuem diretamente para a patogenicidade de uma série de microrganismos, incluindo *Salmonella*. Nessas bactérias, essas ilhas são conhecidas como SPI (*Salmonella pathogenicity islands*) (PRADHAN; NEGI, 2019). Além das ilhas, a virulência do patógeno também é regulada por um sistema regulador de genes, composto por quinases sensoriais e reguladores transcricionais, responsáveis pela expressão de genes necessários à invasão, sobrevivência no interior de macrófagos e resistência a peptídeos antimicrobianos (LUCAS *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2013).

Após a ingestão, *Samonella* passa por uma série de barreiras – pH gástrico, mucosa intestinal e camada de células epiteliais intestinais – até atingir o intestino

do hospedeiro. A bactéria, então, invade as células hospedeiras por meio de dois mecanismos principais (Figura 4): (i) via células M presentes nas PPs, por um processo passivo denominado transcitose, pelo qual os patógenos conseguem transpor as células do lúmen e atingir o lado basolateral da membrana (BROZ; OHLSON; MONACK, 2012; MABBOTT *et al.*, 2013); ou (ii) por meio da indução de sua própria fagocitose a partir da secreção de proteínas efetoras (SPI-I e SPI-II), que ativam a via de transdução de sinal e desencadeiam a reconstrução do citoesqueleto da célula hospedeira, resultando na extensão externa ou ondulação da membrana da célula epitelial para engolfar a bactéria (FRANCIS; STARNBACH; FALKOW, 1992; VELGE *et al.*, 2012). Somado a isso, as células dendríticas apresentadoras de antígeno enviam sinais para o lúmen, via células epiteliais, que auxiliam no reconhecimento do patógeno pelo linfonodo mesentérico proximal (MLN), onde a resposta imunológica é amplificada (BROZ; OHLSON; MONACK, 2012).

A invasão celular é seguida pela inflamação e infiltração de células imunes – neutrófilos, células T, células B, células dendríticas e macrófagos – no local da infecção (GRASSL; FINLAY, 2008; KAUR; JAIN, 2012). As proteínas efetoras codificadas por SPI-II auxiliam na sobrevivência dessas bactérias no interior das células infectadas (HURLEY *et al.*, 2014). Utilizando as células M como veículo, essas bactérias se translocam para os enterócitos próximos (Figura 4), cruzando a barreira do epitélio intestinal (VELGE *et al.*, 2012). Quando engolfados por células do sistema imune do hospedeiro, esses patógenos alcançam o MLN via corrente sanguínea e sistema linfático, podendo ser disseminados para órgãos como o baço e o fígado, onde residem no interior dos macrófagos, em compartimentos endossômicos especializados, denominados vacúolos contendo *Salmonella* (SCV) (Figura 4) (KAUR; JAIN, 2012). O patógeno pode permanecer nos tecidos por anos, fato este que pode estar relacionado à recorrência da infecção observada em alguns hospedeiros (HURLEY *et al.*, 2014).

Figura 4. Etapas básicas da patogênese de *Salmonella*.



Fonte: Adaptado de Pradhan & Negi (2019).

Estudos preliminares mostraram que o sítio primário de colonização por *S. enterica* em camundongos inoculados via intragástrica é o íleo terminal (CARTER; COLLINS, 1974b) e que as bactérias interagem rapidamente com as células das Placas de Peyer (PPs) (HOHMANN *et al.*, 1978). Além disso, a bactéria invade as células M do epitélio associado aos folículos linfóides e essa entrada é precedida da morte e eliminação das células infectadas (JONES; GHORI; FALKOW, 1994). Com o tempo, as células bacterianas movem-se ao longo da LP ou invadem os folículos, onde ocorre a multiplicação. À medida que a infecção evolui, ela pode afetar os linfonodos, o fígado e o baço do hospedeiro (CARTER; COLLINS, 1974b; NARDI *et al.*, 1991). Em camundongos, *Salmonella* se desenvolve em macrófagos residentes do fígado e do baço.

O estudo da salmonelose em modelo murino utilizando *S. Typhimurium* como agente patogênico é amplamente aceito, uma vez que provoca sintomas muito semelhantes aos causados por *S. Typhi* em humanos (SALYERS; WHITT, 1994). Os resultados obtidos auxiliam na compreensão e entendimento de vários aspectos relacionados à etiologia e patogenicidade da doença (CARTER; COLLINS, 1974b).

Classicamente, o tratamento de salmoneloses envolve a utilização de antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas. Entretanto, o uso terapêutico e como promotor de crescimento em animais de produção, têm

comprometido a eficiência desses fármacos. Somado a isso, constatou-se o surgimento de linhagens resistentes, o que vem limitando as opções de tratamento disponíveis (KLEMM *et al.*, 2016). Neste contexto, o uso de probióticos tem sido apontado como uma alternativa terapêutica promissora, devido ao efeito protetor conferido por algumas linhagens probióticas (*Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus bulgaricus*) frente ao desafio por *Salmonella* e outros patógenos em experimentos *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES *et al.*, 1996; FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011; MULAW *et al.*, 2020).

A proteção proporcionada pelos probióticos em modelo experimental de salmonelose pode estar associada à combinação de alguns mecanismos de ação, como: produção de substâncias antibacteridas contra *Salmonella* e modulação da resposta imune do hospedeiro contra a infecção, observada pelo aumento da produção de anticorpos IgA patógeno-específicos na mucosa intestinal e pelo aumento da atividade de células de defesa (PERDIGÓN *et al.*, 1990a; BERNET-CAMARD *et al.*, 1997). A associação entre *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (atualmente *Lacticaseibacillus casei*) reduziu a translocação de bactérias para o fígado e o baço dos animais, resultando na sobrevivência de todos os camundongos desafiados (PERDIGÓN *et al.*, 1990b). Resultados similares foram obtidos em outro estudo, onde o pré-tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (atualmente *Lacticaseibacillus rhamnosus*) e *Bifidobacterium lactis* HN019 conferiu proteção contra o desafio oral de camundongos por *Salmonella* (GILL *et al.*, 2001). Martins e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com *S. boulardii* aumentou a taxa de sobrevivência, inibiu a translocação bacteriana, protegeu contra danos histológicos e reduziu os níveis de citocinas inflamatórias e a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos nos camundongos desafiados com *Salmonella*. Os autores também revelaram que os efeitos probióticos da levedura eram devidos, pelo menos em parte, à ligação *Salmonella*-probiótico, que resultou na diminuição da ativação das vias de sinalização que levam à inflamação intestinal observada em modelo murino de salmonelose. Em outro trabalho, Tiago *et al.* (2012) mostraram que algumas bactérias enteropatogênicas (*E. coli* e *Salmonella*) foram capturadas na superfície de *S. boulardii*, *S.*

cerevisiae UFMG 905 e *S. cerevisiae* BY4741, sugerindo que este pode ser um mecanismo pelo qual as leveduras probióticas impedem a adesão de patógenos a receptores específicos no epitélio intestinal, evitando, conseqüentemente, a invasão do hospedeiro pelo patógeno.

1.4 Probióticos

Devido à íntima associação entre o trato intestinal e a manutenção da homeostase corporal, o microambiente entérico tem sido amplamente estudado nos últimos anos (BARBARA *et al.*, 2016). Evidências recentes apontam que a microbiota intestinal pode estar associada ao desenvolvimento de alguns distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes, além de doenças como ansiedade, depressão, câncer de cólon e Alzheimer (QUIGLEY, 2017; FLEMER *et al.*, 2018). O fato de a microbiota intestinal ser capaz de influenciar atividades fisiológicas e metabólicas do organismo tem estimulado pesquisas baseadas na modulação desse microambiente, incluindo intervenções baseadas no uso de probióticos (TONUCCI *et al.*, 2017).

Os primeiros relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação humana e animal fazem menção à versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), onde consta que Abraão relacionou o consumo de leite azedo à sua longevidade. Em 76 a.C. Plínio, um filósofo romano, sugeriu o uso de leite fermentado para o tratamento de doenças intestinais (TEITELBAUM; WALKER, 2002). A palavra probiótico origina-se do grego e significa “a favor da vida”. Inicialmente, o termo foi usado para descrever suplementos alimentares microbianos que estimulavam o crescimento de animais domésticos em fazendas (GALDEANO *et al.*, 2009). Atualmente, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem influências positivas sobre a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014).

As bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) estão entre os microrganismos mais estudados como potenciais probióticos e podem ser encontradas em altas quantidades no intestino de homens e animais saudáveis. Grande parte das bactérias utilizadas em preparações probióticas são Gram-positivo e pertencem aos gêneros *Lactobacillus* (*L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B.*

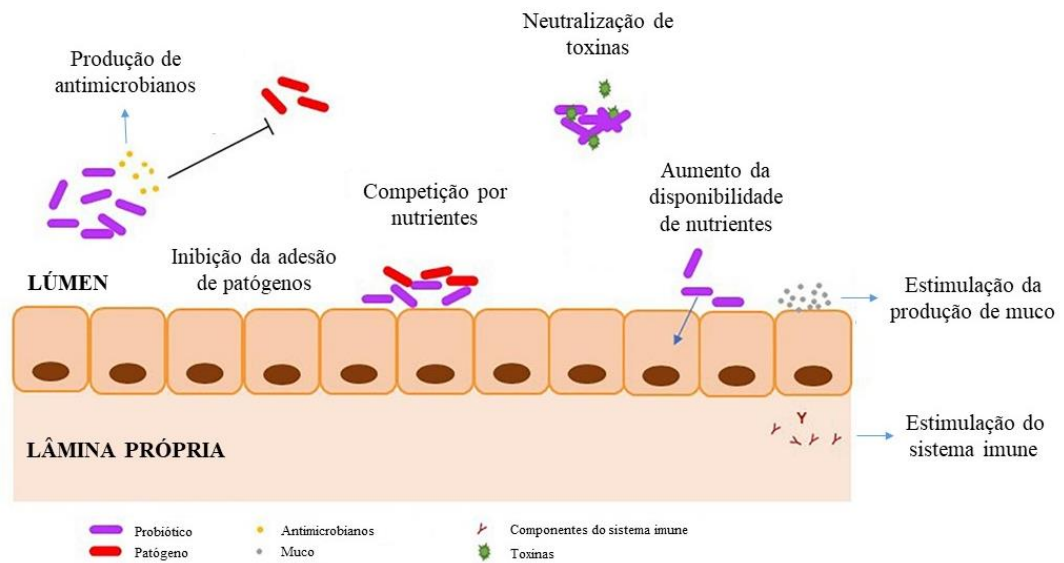
infantis, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Streptococcus* (*S. salivarius* e *S. thermophilus*) e *Lactococcus* (*L. lactis*). Além desses microrganismos, algumas linhagens de leveduras (*S. boulardii* e *S. cerevisiae*) e de bactérias Gram-negativo (*E. coli* EM0 e *E. coli* Nissle 1917) também estão sendo utilizadas (NISSLE, 1959; NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999; SCHULTZ *et al.*, 2004). Culturas simples ou mistas de microrganismos probióticos, em diferentes formulações tecnológicas, estão sendo incluídas na dieta humana e animal (BERG, 1998; VAUGHAN; MOLLET; VOS, 1999).

A classificação de uma dada linhagem microbiana como um bom probiótico depende de uma série de fatores, como: ser capaz de conferir efeitos benéficos ao hospedeiro; modular a resposta imune do intestino, sem modificar a homeostase desse ecossistema; não apresentar toxicidade nem patogenicidade; conter um grande número de células viáveis; ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal superior, ou seja, deve ser tolerante ao pH ácido do estômago e resistente à ação das enzimas digestivas e dos sais biliares; permanecer viável no intestino; apresentar atividade antagonista contra patógenos; e permanecer viável no produto a ser consumido, durante o período de estocagem até o seu consumo (PEARCE, 1974; FULLER, 1989; GONZALEZ *et al.*, 1995; DUNNE *et al.*, 2001; GALDEANO *et al.*, 2007).

A Legislação Brasileira determina que a quantidade mínima viável de microrganismos probióticos deve estar situada entre 10^7 e 10^9 UFC/dose diária do produto consumido (BRASIL, 2007). Para que uma quantidade mínima de 10^7 UFC chegue viável ao intestino, é necessário que o indivíduo consuma uma quantidade ainda maior do probiótico, uma vez que muitos microrganismos não resistem à passagem pelo trato gastrointestinal. Para proteger os microrganismos probióticos da ação de enzimas e do ácido gástrico, a associação entre um prebiótico – açúcares, fibras – e um probiótico é muito comum: os simbióticos. A ingestão diária desses microrganismos é essencial para manter seus níveis artificialmente elevados no ecossistema intestinal, permitindo, desta maneira, a promoção da saúde do hospedeiro (GILLILAND, 1989; SELLARS, 1991). A busca por formulações farmacêuticas ou terapêuticas que garantam a viabilidade dessas células microbianas por um maior período é um dos maiores desafios enfrentados pelos pesquisadores da área de alimentos funcionais (LEE; SALMINEN, 1995).

Entre os mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos (Figura 5), pode-se citar: (i) exclusão competitiva, na qual os microrganismos probióticos competem com patógenos por sítios de fixação e nutrientes, inviabilizando sua adesão e sobrevivência (OUWEHAND *et al.*, 1999; CALLAWAY *et al.*, 2008); (ii) modulação do sistema imune, atuando na prevenção de distúrbios, como reações alérgicas e desordens intestinais (MATSUZAKI; CHIN, 2000; ASHRAF; SHAH, 2014); (iii) produção de substâncias antimicrobianas, estimulando a síntese de muco, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, responsáveis pela inibição do crescimento de vários patógenos (VILLANI *et al.*, 1995; LIAO; NYACHOTI, 2017); e (iv) neutralização de toxinas, onde os probióticos impedem que o patógeno produza suas toxinas ou as anulam, antes que elas possam causar danos aos tecidos do hospedeiro (BRANDÃO *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2017; VIECO-SAIZ *et al.*, 2019).

Figura 5. Mecanismos de ação dos probióticos.



Fonte: Adaptado de Vieco-Saiz *et al.*, 2019.

1.5 A levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856

Sabe-se que a exposição contínua e prolongada aos antibióticos está diretamente relacionada ao surgimento de patógenos resistentes (AMINOV, 2009; DODDS, 2017). Em vista disso, o emprego de microrganismos probióticos como alternativa de tratamento para uma grande variedade de doenças está sendo cada vez mais estudado (LEE *et al.*, 2018). A levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856 é uma linhagem de fermento probiótico, comercializada como Lynside® Pro GI+ (Lesaffre Human Care, Milwaukee, USA), registrada na Coleção Nacional Francesa de Cultura de Microrganismos (CNCM) sob código I-3856 (BLANQUET-DIOT *et al.*, 2012). A espécie foi determinada usando métodos fenotípicos (API® ID32C, Biomerieux Marcy-l'Étoile, França) e genotípicos referenciados (amplificação genética e sequenciamento de DNA 26S) (KURTZMAN; ROBNETT, 1997; 1998).

A levedura foi utilizada como terapia complementar para síndrome do intestino irritável (SII) em um estudo randomizado, que contou com a participação de 100 indivíduos previamente diagnosticados com a doença. Ao final do trabalho, observou-se uma melhora no desconforto abdominal e na consistência das fezes dos pacientes. Esses achados podem estar associados ao fato da levedura probiótica secretar enzimas sacarolíticas que estimulam a produção de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, que exercem um efeito procinético – modulação da motilidade – no intestino delgado (KAMATH; PHILLIPS; ZINSMEISTER, 1988;

MUZNY *et al.*, 2019; GAYATHRI *et al.*, 2020). Além disso, o aumento da expressão e da ativação local do PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*) nas células epiteliais intestinais proporciona uma ação analgésica e anti-inflamatória no intestino, atingindo eficiência máxima com o consumo de uma dose de 10¹⁰ UFC/dia (ROUSSEAU *et al.*, 2010; CHAMBRUN *et al.*, 2015; SPILLER *et al.*, 2017).

A administração oral da levedura probiótica como terapia adjuvante em mulheres acometidas pela candidíase vulvovaginal demonstrou fortes propriedades antimicrobianas – interferência com a adesão do patógeno às células epiteliais vaginais, inibição da atividade da sialidase e redução da esfoliação epitelial vaginal – contra *Candida albicans* e *Gardnerella vaginalis*, bem como um potencial para reduzir a inflamação local causada por esses patógenos. Além disso, o probiótico foi eficiente no controle da proliferação do patógeno, limitando a recorrência da doença (CAYZEELE-DECHERF; PÉLERIN; JÜSTEN, 2017; GABRIELLI *et al.*, 2018; SABBATINI *et al.*, 2020).

Em outro estudo, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 também demonstrou efeito protetor contra a infecção causada por *E. coli* enterotoxigênica H10407 (ETEC), agente etiológico da diarreia do viajante em seres humanos (ROUSSEL *et al.*, 2018). Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o probiótico pode exercer uma atividade anti-infecciosa contra o patógeno por meio de uma abordagem multidirecionada, incluindo a redução do crescimento do patógeno em meios de cultura, via antagonismo direto (ROUSSEL *et al.*, 2018); redução da adesão às mucinas e células epiteliais intestinais (OGAWA *et al.*, 2001); e supressão da inflamação induzida por ETEC (MATSUZAKI; CHIN, 2000). Etienne-Mesmin e colaboradores (2011) também avaliaram o efeito do probiótico na sobrevivência de outra linhagem de *E. coli* (O157:H7) em modelo TIM (TNO; Zeist, Holanda), que mimetiza os processos fisiológicos que ocorrem no trato gastrointestinal humano *in vitro*, e observaram que a administração da levedura levou a uma alta mortalidade bacteriana no estômago e duodeno. O efeito antagônico observado *in vitro* poderia ser explicado por alguns mecanismos, como: (i) competição por nutrientes; (ii) modificação das condições físico-químicas do ambiente digestivo (potencial redox); ou (iii) produção de substâncias inibitórias, como proteases ou etanol. No caso, os autores observaram que a levedura foi capaz de produzir etanol diretamente no

ambiente digestivo humano, sendo letal ao patógeno devido ao rompimento de sua membrana e consequente repressão de seu crescimento celular.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Apesar dos avanços na área da saúde, no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento de enfermidades, as doenças infecciosas ainda são responsáveis por um elevado índice de morbidade e mortalidade em escala mundial, especialmente em locais onde o acesso à água potável e ao saneamento básico são escassos ou até mesmo inexistentes. A espécie *S. enterica* compreende diversos patógenos de importância médica, que são frequentemente vinculados a doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, via contaminação fecal-oral. Entre as manifestações clínicas associadas à infecção por *Salmonella*, a salmonelose não-tifoide (gastroenterite aguda) e a febre tifoide (doença sistêmica) ganham destaque, uma vez que são responsáveis por mais de 2 milhões de mortes anuais e constituem um grave problema de saúde pública a nível mundial. O tratamento clássico das salmoneloses envolve a utilização de antibióticos pertencentes à classe das fluoroquinolonas. Nas últimas décadas, porém, o uso terapêutico excessivo desses fármacos tem atuado como uma forte pressão seletiva nesses microrganismos, estimulando a seleção de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes, comprometendo, assim, a eficiência do tratamento convencional. Neste contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas é de grande importância. Devido à compreensão do papel que a microbiota intestinal desempenha na manutenção da homeostase fisiológica e metabólica do corpo, uma maior atenção foi despendida aos probióticos, uma vez que agem modulando o ecossistema intestinal e estimulando o sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, o tratamento das salmoneloses baseado em adjuvantes microbianos tem sido apontado como uma alternativa terapêutica potencial, devido ao efeito protetor conferido por algumas linhagens probióticas frente ao desafio por *Salmonella* em modelo murino. Embora a linhagem *S. cerevisiae* CNCM I-3856 tenha demonstrado eficiência no controle e tratamento de algumas doenças, como a síndrome do intestino irritável e a candidíase vulvovaginal, por exemplo, ainda não há relatos científicos que comprovem seu efeito protetor no controle da salmonelose, o que a torna um objeto de estudo inédito e promissor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito probiótico da levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856, na resposta inflamatória induzida experimentalmente por *S. Typhimurium* em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito probiótico de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos da linhagem NIH/*Swiss* desafiados com *S. Typhimurium*.
- Verificar o efeito protetor avaliando parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos dos tecidos inflamados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

A manipulação e manutenção dos animais nos experimentos foram realizadas conforme as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL, 2008).

4.1.1 Animais convencionais (CV)

Foram utilizados camundongos da linhagem NIH/*Swiss*, de ambos os sexos, convencionais, de três a quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em mini-isoladores ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). Os camundongos receberam ração sólida (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) esterilizada por calor úmido e tiveram acesso a água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como o controle de aeração, umidade (60-80%) e temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina, administrado via intraperitoneal – i.p.) (WIRTZ *et al.*, 2007). Os experimentos propostos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (Anexo 7.1), sob número 224/2019.

4.2 Microrganismos

4.2.1 Linhagem bacteriana

A linhagem *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi adquirida no Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A bactéria foi conservada no volume de 0,2 mL de glicerol 80% estéril, com 0,8 mL da cultura de 24 h, expandida em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, DIFCO, Detroit, USA), a 37°C e estocada a -80°C . Para o desafio, o patógeno foi cultivado a 37°C durante 24 h, sem agitação. A concentração da bactéria foi ajustada para 10^6 UFC/mL, e cada camundongo recebeu um volume de 0,1 mL dessa diluição, por gavagem, em inóculo único.

4.2.2 Probiótico

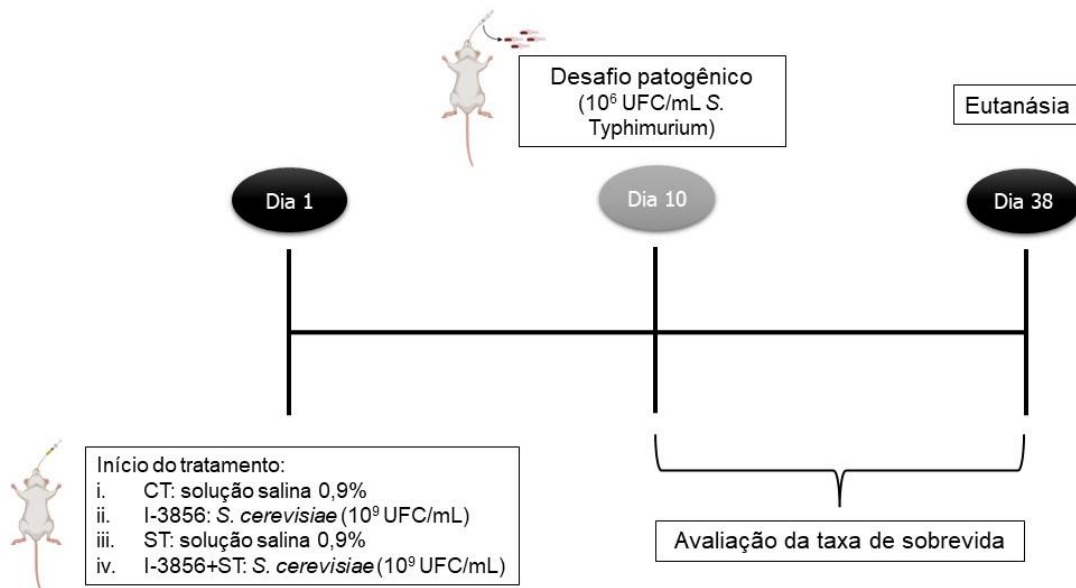
A levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856 foi adquirida no Laboratório *Life Extension Magazine*®, Florida, USA. Essa linhagem de fermento probiótico é comumente utilizada na indústria alimentícia e tem a função de equilibrar e reduzir a pressão do trato intestinal. Uma amostra foi cultivada em caldo YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose), a 37°C, por 24 h, sob agitação constante (rotação de 150 rpm) e concentrada para obter uma quantidade de 10⁹ UFC/mL. Para o tratamento, os animais receberam, diariamente, 0,1 mL dessa concentração.

4.3 Experimento 1: Avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*

A fim de verificar o efeito protetor de *S. cerevisiae* (I-3856) na sobrevivência de camundongos desafiados com *S. Typhimurium* (Figura 6), foram utilizados 72 animais convencionais, divididos em 4 grupos (n = 18 animais por grupo): (i) CT, controle, animais que receberam apenas salina, sem tratamento e/ou desafio; (ii) I-3856, camundongos apenas tratados diariamente com *S. cerevisiae* CNCM I-3856, sem desafio; (iii) ST, camundongos recebendo solução salina 0,9% e desafiados com *S. Typhimurium*; e (iv) I-3856+ST, camundongos tratados diariamente com *S. cerevisiae* CNCM I-3856 e desafiados com *S. Typhimurium*.

A levedura probiótica foi administrada, via intragástrica e na concentração de 10⁸ células (0,1 mL de uma cultura contendo 10⁹ UFC/mL), aos camundongos pertencentes aos grupos I-3856 e I-3856+ST. No 10º dia após o início do consumo do probiótico, o grupo I-3856+ST foi desafiado, juntamente com os animais do grupo ST, que foram gavados somente com solução salina durante esse período de tempo. Para a infecção, uma dose única e numa suspensão de 0,1 mL (10⁶ UFC/mL do inóculo) de *S. Typhimurium* foi inoculada intragastricamente. Diariamente, após o desafio, realizou-se o acompanhamento da mortalidade dos animais. A eutanásia dos camundongos sobreviventes foi realizada no 38º dia do experimento, por meio de deslocamento cervical (MARTINS *et al.*, 2013).

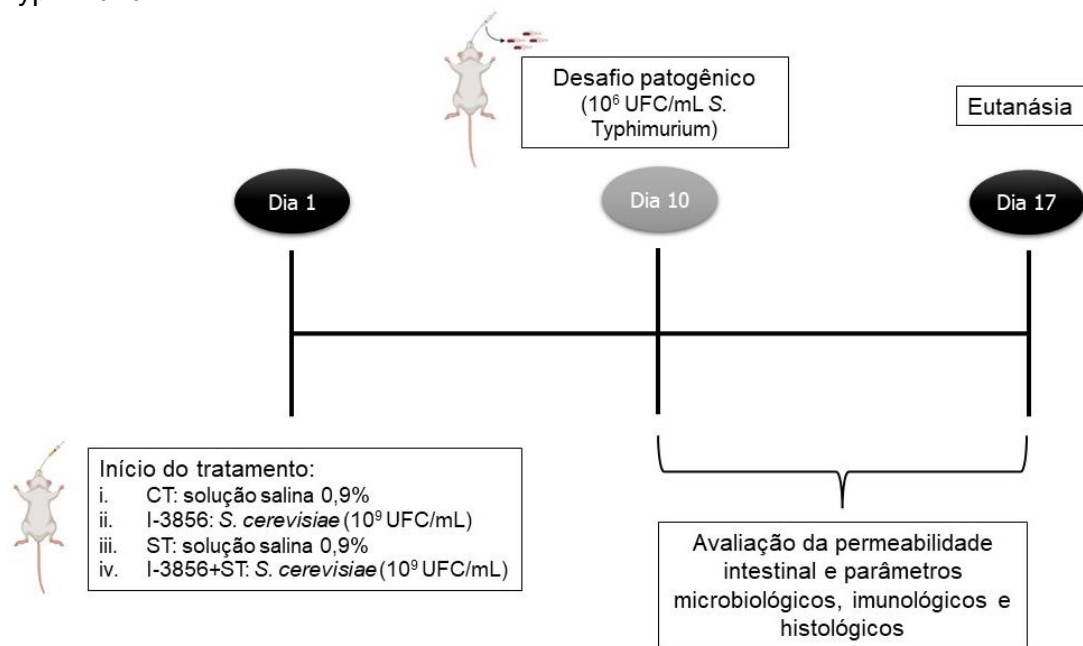
Figura 6. Desenho experimental da avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*.



4.4 Experimento 2: Avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na permeabilidade intestinal e nos parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*

Vinte e oito animais foram divididos em 4 grupos ($n = 7$ animais por grupo): (i) CT, controle, animais que receberam apenas salina, sem tratamento e/ou desafio; (ii) I-3856, camundongos apenas tratados diariamente com *S. cerevisiae* CNCM I-3856, sem desafio; (iii) ST, camundongos recebendo solução salina 0,9% e desafiados com *S. Typhimurium*; e (iv) I-3856+ST, camundongos tratados diariamente com *S. cerevisiae* CNCM I-3856 e desafiados com *S. Typhimurium*. No sétimo dia pós-desafio (pico da inflamação, e quando os animais começam a morrer), todos os camundongos foram anestesiados para coleta de sangue (para avaliação da permeabilidade intestinal). Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O fluido intestinal foi coletado para dosagem de sIgA. As fezes foram coletadas para avaliação da microbiota intestinal por método dependente de cultivo. Fígado e baço foram assepticamente coletados para avaliação de translocação bacteriana. Íleo e fígado foram coletados para análises histológicas e dosagens de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO).

Figura 7. Desenho experimental da avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na resposta imunológica de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*.



4.4.1 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de ^{99m}Tc -ácido dietilenoaminopentacético (DTPA). Após a indução da salmonelose, alíquotas de 0,1 mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc foram administradas, por gavagem, a todos os animais. Quatro horas depois da administração, os camundongos foram anestesiados i.p. Em seguida, 500 μL de sangue foi coletado por punção cardíaca para determinação da radioatividade (VIANA *et al.*, 2010; GENEROSO *et al.*, 2011). Para os cálculos do percentual de dose, utilizou-se um padrão de dose contendo o mesmo volume de ^{99m}Tc -DTPA administrado aos animais, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose no sangue} = \frac{\text{cpm do sangue}}{\text{cpm da dose (Padrão) administrada}} \times 100$$

cpm = contagem por minuto

4.4.2 Avaliação dos parâmetros microbiológicos

4.4.2.1 Determinação da translocação bacteriana

A translocação bacteriana foi avaliada no fígado e baço dos camundongos. Os órgãos foram coletados assepticamente, pesados e diluídos serialmente.

Amostras das diluições 10^{-2} a 10^{-5} foram plaqueadas em ágar MacConkey (Difco), incubadas em aerobiose ($37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$). Após este período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em Log_{10} UFC/g de tecido.

4.4.2.2 Quantificação da microbiota intestinal

Após a coleta das fezes, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em função do peso, numa diluição 10^{-2} , em PBS estéril. A partir dessa diluição, foram feitas novas diluições decimais no mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar sangue suplementado (AS-S) com 0,1% de hemina, 0,1% de menadiona e 0,5% de extrato de levedura (HOLDMAN; CATO; MOORE, 1977), ágar MRS (*De Man, Rogosa e Sharpe*) (Merck) e ágar Bacteroides Bile Esculina (BBE) (Difco) (LIVINGSTON; KOMINOS; YEE, 1978), com incubação de até uma semana, a 37°C , em câmara de anaerobiose, com leituras intermediárias. As mesmas diluições foram usadas, também, para semear, em aerobiose, 0,1 mL em superfícies de placas de ágar sangue (AS), ágar MacConkey (Difco), ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco) acrescido de 0,02% de azida sódica, ágar hipertônico manitol (HM) e ágar Sabouraud suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol. As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C e 48 h, a 28°C (somente Sabouraud). Após a incubação e contagem das colônias crescidas, os dados foram apresentados em log_{10} UFC/g de fezes. A lista dos meios e condições de cultura e finalidades de cada um está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Meios e condições de cultura para a análise qualitativa e quantitativa das fezes dos animais.

Meio de cultura	Atmosfera	Tempo de incubação	Microrganismos
Ágar AS-S	Anaerobiose	2-7 dias	Anaeróbios totais
Ágar BBE	Anaerobiose	2-7 dias	<i>Bacteroides</i> spp.
Ágar MRS	Anaerobiose	2-7 dias	Bactérias ácido-láticas
Ágar Sangue	Aerobiose	2 dias	Aeróbios totais
Ágar MacConkey	Aerobiose	1 dia	Enterobactérias
Ágar BHI azida	Aerobiose	1 dia	<i>Enterococcus</i> spp.
Ágar Sabouraud	Aerobiose	2-3 dias	Leveduras
Ágar HM	Aerobiose	1 dia	<i>Staphylococcus</i> spp.

4.4.3 Avaliação dos parâmetros imunológicos

4.4.3.1 Medida da atividade de MPO

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos dos neutrófilos e a dosagem de sua atividade é utilizada para estimar o índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos (SOUZA *et al.*, 2000; NAUSEEF, 2007). Sumariamente, fragmentos de fígado e íleo dos animais foram removidos e congelados a -80°C . Após o descongelamento, os tecidos foram homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 0,015 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) (100 mg de tecido em 1,9 mL de 10 tampão) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (TissueLyser LT, Qiagen, Hilden, Germany) e centrifugados a 10.600 rpm (Megafuge 8R, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) por 15 minutos a 4°C . O precipitado obtido foi submetido à lise hipotônica (500 μL de solução de NaCl 0,2%, seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, após 30 segundos) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão NaH_2PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e rehomogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Essas amostras foram, novamente, centrifugadas por 15 minutos a 10.600 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO no precipitado ressuscitado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (DO) a 450 nm, utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

4.4.3.2 Medida da atividade de EPO

A atividade da enzima peroxidase eosinofílica foi mensurada, por meio de testes enzimáticos, com a finalidade de indicar a quantidade relativa de eosinófilos presentes nos tecidos após o processo inflamatório (STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985). Para tanto, a cada 100 mg de tecido pesado, adicionou-se 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2), para homogeneização do tecido (TissueLyser LT). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.600 rpm (Megafuge 8R) por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante ao final do processo. O *pellet* recuperado foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 μL de salina 0,2%, seguido pela

adição de 500 μL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Posteriormente, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o, sobrenadante, desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5% para cada 100 mg de amostra. Dessa solução, recolheu-se uma alíquota de 1 mL, que foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essa amostra foi, então, centrifugada novamente a 10.600 rpm por 15 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da EPO. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde foi incubado, em cada poço, 75 μL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) com 75 μL de substrato [1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, (OPD, Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 μM pH 8,0 suplementado de H_2O_2 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 μL de H_2SO_4 1 M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Epoch) com filtro de 492 nm, e os resultados foram expressos como UA.

4.4.3.3 Dosagem de sIgA

A determinação dos níveis de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (MARTINS *et al.*, 2007; PEDROSO *et al.*, 2015). Após o sacrifício dos animais, removeu-se o intestino delgado pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com PBS, pH 7,2, suplementado com inibidores de protease (1 μM de aprotinina; 25 μM de leupeptina; 1 μM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para análises posteriores. Para a determinação de sIgA, utilizou-se anticorpos anti-IgA (M-8769, Sigma) de camundongos desenvolvidos em cabra para revestir as microplacas. Para a detecção, utilizou-se um anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, Sigma). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram realizadas a 492 nm, em leitor de microplacas (Epoch), sendo que a concentração de sIgA foi expressa em $\mu\text{g/g}$ de fluido intestinal.

4.4.4 Avaliação dos parâmetros histológicos

Após o sacrifício, o lóbulo direito do fígado foi coletado e fixado por imersão em solução de formol a 4% por 24 h. O processamento do material biológico foi realizado de acordo com o método descrito por Calvert e colaboradores (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997). Seguindo essa metodologia, os órgãos foram cortados separadamente e estendidos com a serosa em contato com o papel filtro e abertos pela borda anti-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Estes foram, então, transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação. Os órgãos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal em direção à proximal. Os rolos amarrados com linha foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24h. As amostras foram, então, processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica.

4.4.4.1 Coloração HE

Cortes de 4 µm dos órgãos de cada animal foram desparafinados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%), por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo, em seguida, corados por Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com Entellan (Merck) e lamínulas de vidro.

4.4.4.2 Análise das lâminas e fotodocumentação

Todas as lâminas codificadas foram observadas e analisadas sequencialmente pelas Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes (Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG) e Profa. Dra. Samantha Ribeiro Béla (Laboratório de Imunoparasitologia e

Morfopatologia, DCB, UFOP), que não tiveram acesso aos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pelas patologistas. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-10 Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para documentação fotográfica.

4.5 Planejamento estatístico

O N calculado para cada grupo (como descrito a seguir) foi de 11 animais por grupo para o ensaio de mortalidade e 6 por grupo para as análises histológicas, microbiológicas e imunológicas. Como as análises histológicas para a salmonelose foram realizadas em todo o intestino, processado na forma de rolos (rocambos), foi necessário dobrar o N calculado, pois metade dos animais foi utilizado para análises histológicas, e a outra metade teve o intestino coletado para dosagens de MPO e EPO. Para o ensaio de mortalidade utilizou-se 44 animais divididos em 4 grupos, enquanto para os ensaios de análises histológicas, microbiológicas e imunológicas 48 animais separados em 4 grupos, totalizando 92 animais.

Para os ensaios de sobrevivência após infecção por *Salmonella* e administração do probiótico, o cálculo do número de animais por grupo foi realizado segundo fórmula descrita por Charan & Kantharia (2013), que se aplica à comparação entre dois grupos, quando o resultado é qualitativo (no caso, morte ou sobrevivência):

$$n = 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 P(1 - P) / (p_1 - p_2)^2$$

onde:

n= estimativa do tamanho de amostra desejada;

$Z_{\alpha/2} = Z_{0,05/2} = Z_{0,025} = 1,96$ (valor tabela – erro tipo I nível de significância de 5%);

$Z_{\beta} = Z_{0,20} = 0,842$ (valor tabela – poder de 80%);

$p_1 - p_2 =$ diferença na proporção de eventos esperados entre os dois grupos (sobrevivência de 40% dos animais no grupo controle e de 90% no grupo tratado com a linhagem com potencial probiótico) = $0,4 - 0,9 = -0,50$;

$P(1-P) =$ prevalência combinada = $p_1(1-p_1) + p_2(-p_2)/2 = (0,4 \times 0,6) + (0,9 \times 0,1)/2 = 0,165$

Então:

$$n = 2 (1,96 + 0,842)^2 \times 0,165 / (-0,5)^2$$

$n = 10,36$, ou seja, serão necessários 11 animais/grupo.

Para os demais experimentos, o tamanho amostral foi calculado baseando-se no modelo de Cochran (amostragem aleatória simples) (Sing & Masuku, 2014), que sugere a seguinte fórmula:

$$n = (Z \cdot \sigma / e_0)^2$$

onde:

n = estimativa do tamanho de amostra desejada;

Z = representa o valor sob a curva normal que se adota com determinado intervalo de confiança $(1-\alpha)$. Para o intervalo de confiança de 95%, Z será igual a 1,96 (Tabela Z);

σ = desvio padrão;

e_0 = nível de precisão (significância) desejado.

Considerando o nível de significância de 0,05 e desvio máximo de 6%:

$$n = (1,96 \times 0,06 / 0,05)^2$$

$n = 5,531$, ou seja, serão necessários 6 animais por grupo.

Os significados estatísticos dos resultados obtidos foram avaliados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, USA), com a utilização do teste ANOVA para análise de variância entre os grupos, seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecções causadas por *Salmonella* representam um grave problema de saúde pública, uma vez que estão relacionadas a milhares de mortes anualmente, sobretudo em países em desenvolvimento (MAJOWICZ *et al.*, 2010; BUCKLE; WALKER; BLACK, 2012). Diante disso, investigamos, neste estudo, o efeito probiótico da levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856 no controle da resposta inflamatória frente à infecção induzida experimentalmente por *S. Typhimurium* em modelo murino de salmonelose.

5.1 Avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*

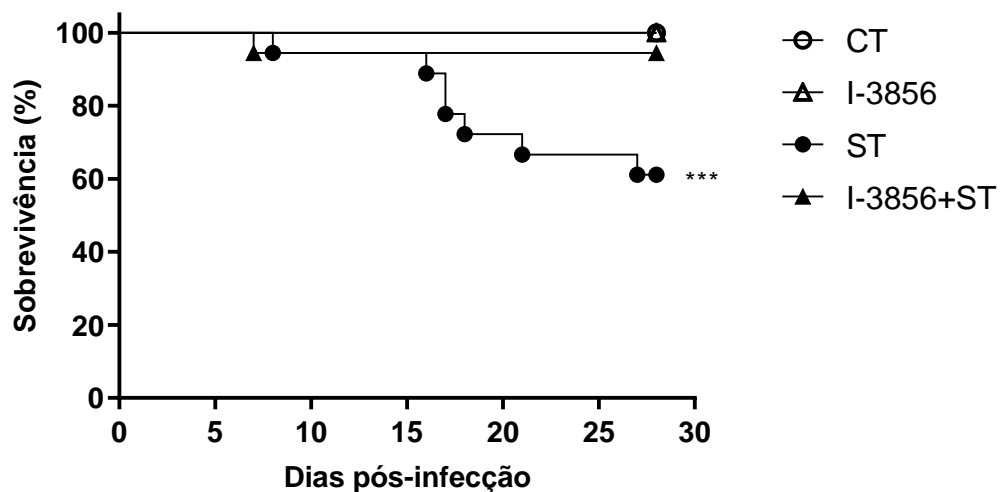
Todos os sorotipos de *Salmonella* compartilham a capacidade de induzir sua própria absorção nas células epiteliais do intestino do hospedeiro, o que os caracteriza como patógenos altamente invasivos e permite que algumas linhagens desenvolvam uma doença sistêmica, que pode, ou não, evoluir para quadros de septicemia e morte do hospedeiro (AMAVISIT, 2003; GALÁN; WOLF-WATZ, 2006; MARTINS *et al.*, 2013). Decorrente disso, altas taxas de mortalidade costumam ser observadas em modelos experimentais de salmonelose e os probióticos vêm sendo propostos como potenciais alternativas terapêuticas para contornar essa situação.

Conforme dados apresentados na Figura 8, o grupo infectado com *S. Typhimurium* e não tratado (ST) apresentou índice de mortalidade de 38,88% (n = 7/18) e de sobrevivência de 61,12% (n = 11/18), sendo que as primeiras mortes começaram a ocorrer no 8º dia pós-desafio. Em contrapartida, o grupo desafiado e tratado, via oral, com *S. cerevisiae* (I-3856+ST) apresentou, respectivamente, índice de mortalidade de 5,55% (n = 1/18) e sobrevivência de 94,45% (n = 17/18), com apenas um óbito no 7º dia após a indução da infecção, período no qual a inflamação causada pelo patógeno é mais grave. Nossos achados mostram que a levedura probiótica foi capaz de aumentar a sobrevivência dos camundongos infectados (p < 0,001), apoiando resultados similares publicados em outros estudos.

Segundo Moura e colaboradores (2001), o tratamento prévio de camundongos com *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 proporcionou um efeito protetor frente ao desafio experimental com *S. Typhimurium*, sendo que algumas propriedades como a competição por sítios de adesão e/ou estimulação do sistema imune do hospedeiro poderiam justificar tal resposta. Em estudo semelhante,

Martins *et al.* (2011) mostraram que a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 induziu uma menor taxa de letalidade (20%) no grupo tratado com o probiótico após o desafio patogênico quando comparado ao grupo não tratado (60%), o que foi associado a uma menor ativação das vias de sinalização inflamatórias, com consequente redução da inflamação, manifestações clínicas, danos teciduais e morte dos animais. A fim de investigar o potencial protetor de outra levedura, *S. boulardii* CNCM I-745, o mesmo grupo demonstrou que o tratamento com o bioterapêutico aumentou a taxa de sobrevivência, propondo que a ligação probiótico-patógeno poderia ser responsável pela redução da ativação das vias de sinalização que resultam na inflamação intestinal em modelo murino de salmonelose (MARTINS *et al.*, 2013).

Figura 8. Avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na mortalidade de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*. ***indica diferença estatística entre os grupos com $p < 0,001$. CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



5.2 Avaliação do efeito protetor de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 na permeabilidade intestinal e nos parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*

5.2.1 Determinação da permeabilidade intestinal

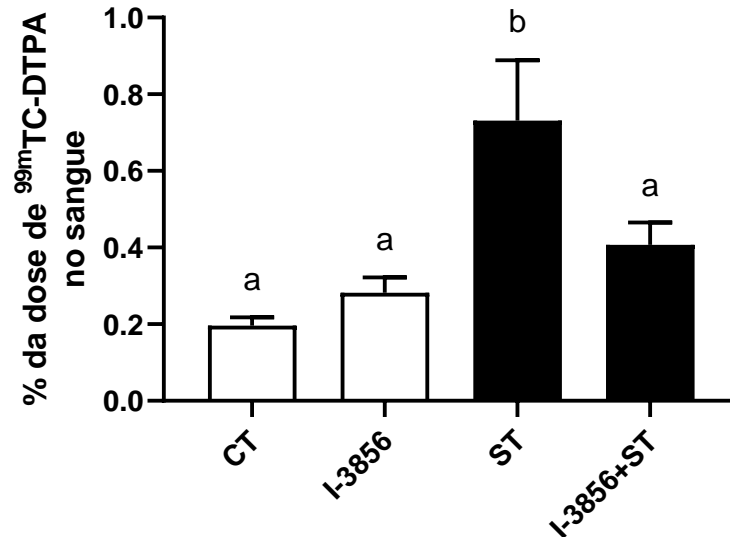
A integridade da barreira epitelial intestinal é imprescindível para a manutenção da homeostase corporal, uma vez que previne a entrada de macromoléculas e patógenos, além de garantir a absorção de nutrientes da dieta (BRANDTZAEG, 2011). As adaptações especializadas da mucosa intestinal de mamíferos cumprem duas funções importantes: por um lado (i) permitem a

coexistência de simbioses sem provocar quadros de inflamação crônica; e, por outro, (ii) fornecem uma resposta inflamatória e defensiva frente a potenciais agentes patogênicos, constituindo uma barreira física externa e uma barreira imunológica funcional interna. A interação dessas barreiras, por sua vez, permite o equilíbrio da permeabilidade intestinal (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; MAYNARD *et al.*, 2012; SCALDAFERRI *et al.*, 2012).

Alguns fatores podem alterar a permeabilidade do intestino e, conseqüentemente, resultar na translocação do conteúdo luminal para a corrente sanguínea e órgãos extraintestinais. Dentre esses fatores, pode-se citar: estilo de vida e dietética; modificações da microbiota intestinal; alterações da camada de muco e dano epitelial (MASSEY; ARTEEL, 2012; MOREIRA *et al.*, 2012; PENDYALA; WALKER; HOLT, 2012). Considerando que o efeito da dieta na permeabilidade intestinal sofre a influência de fatores individuais, como a suscetibilidade genética e a composição da microbiota intestinal do hospedeiro, por exemplo, é válido supor que a inserção de probióticos na alimentação diária tem potencial para auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à barreira intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014).

A infecção com *S. Typhimurium* induz inflamação grave, podendo resultar na disfunção da barreira epitelial intestinal. O comprometimento da integridade dessa barreira pode trazer riscos ao hospedeiro, como uma permeabilidade não seletiva, má absorção de nutrientes e aumento da translocação do patógeno a outros sítios do corpo. Conforme mostrado na Figura 9, a administração da levedura probiótica conferiu proteção à mucosa, reduzindo a permeabilidade intestinal no grupo tratado (I-3856+ST). Em comparação, o grupo desafiado e não tratado (ST) apresentou um agravamento significativo no quadro ($p < 0,05$).

Figura 9. Avaliação da permeabilidade intestinal por meio da medição da radioatividade no sangue após a administração oral de DTPA marcado com Tecnécio. Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



O consumo de probióticos vem sendo associado à promoção da integridade e também à proteção contra a ruptura da barreira intestinal em modelos de experimentação *in vivo*. Wang e colaboradores (2018) observaram que *Lactobacillus plantarum* LTC-113 (atualmente *Lactiplantibacillus plantarum*) conferiu proteção contra a ruptura da barreira intestinal induzida por *Salmonella*, por meio da regulação da expressão de proteínas constituintes das junções firmes, influenciando também na secreção de mediadores inflamatórios e no escore de inflamação frequentemente associado ao patógeno. Em outro trabalho, Terciolo *et al.* (2019), também sugeriram que a levedura *S. boulardii* CNCM I-745 é eficaz na prevenção e tratamento da diarreia associada a antibióticos, desempenhando um papel crucial na preservação e/ou restauração da função da barreira intestinal em distúrbios múltiplos, por meio da preservação das junções firmes presentes na membrana celular. Nossos achados corroboram os estudos citados, já que a administração diária da levedura probiótica reduziu a permeabilidade intestinal nos camundongos tratados com o agente bioterapêutico (I-3856+ST). Com base no exposto, vale ressaltar que a inserção de probióticos na dieta tem notável potencial para atribuir benefícios à fisiologia do indivíduo, contribuindo positivamente para a manutenção da homeostase corporal.

5.2.2 Avaliação dos parâmetros microbiológicos

5.2.2.1 Determinação da translocação bacteriana

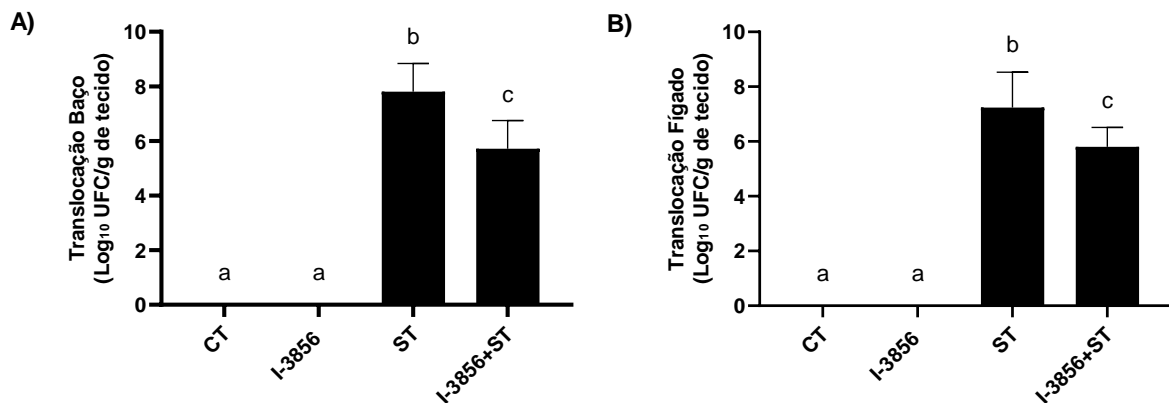
Após a colonização primária do intestino, a infecção por *S. Typhimurium* pode evoluir, permitindo que o patógeno atravesse a barreira do epitélio intestinal – por meio de um processo denominado translocação –, forçando seu engolfamento por células do sistema imune do hospedeiro. Após a sua internalização, a bactéria patogênica passa a residir em compartimentos especializados de macrófagos, podendo alcançar a corrente sanguínea e se disseminar para órgãos como o baço e o fígado (CARTER; COLLINS, 1974b; NARDI *et al.*, 1991; KAUR; JAIN, 2012; VELGE *et al.*, 2012).

Em condições de homeostasia corporal, a translocação bacteriana não ocorre, ou ocorre em baixos níveis (translocação fisiológica), o que pode ser explicado pela ação de alguns mecanismos protetores, como: (i) presença de microbiota indígena, que evita a colonização por microrganismos indesejáveis; (ii) manutenção da integridade da barreira epitelial do intestino, que regula a permeabilidade e, conseqüentemente, a passagem de moléculas, microrganismos e seus produtos (peptideoglicanos, DNA, toxinas) para o meio extraintestinal; e (iii) defesa imunológica natural do corpo, que recruta células de defesa e estimula as vias de sinalização contra potenciais patógenos (DEITCH; BERG, 1987; BERG, 1999). A infecção por *Salmonella*, no entanto, age como um agente estressor e pode resultar na interrupção ou no comprometimento desses mecanismos de proteção, levando a quadros de infecção sistêmica, como observado em nossos resultados, onde o grupo desafiado e não tratado (ST) evidenciou uma maior translocação do patógeno para o baço e fígado ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) em comparação com os animais que consumiram o probiótico diariamente (I-3856+ST). A translocação bacteriana não foi detectada em animais não desafiados (Figura 10).

Correlacionando o tratamento oral à base de probióticos com a ocorrência de translocação bacteriana, Generoso *et al.* (2010) demonstraram, em modelo murino de obstrução intestinal, que *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de prevenir a translocação de microrganismos e possíveis perturbações da integridade da barreira intestinal, concluindo que a levedura probiótica age, provavelmente, por imunomodulação e pela preservação do epitélio intestinal. Martins e colaboradores (2013) observaram que a administração diária de *S. boulardii* evitou a translocação do patógeno por meio da interação *Salmonella*-probiótico. Os resultados sugerem

que tal ligação diminuiu o número de bactérias livres associadas ao epitélio e, conseqüentemente, também reduziu a migração do microrganismo patogênico para sítios extraintestinais, além de evitar a ativação das vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória. Em trabalho similar, Peng *et al.* (2020), avaliaram o efeito probiótico de duas linhagens de *Lactobacillus fermentum* – NCU3087 e NCU3088 – (atualmente *Limosilactobacillus fermentum*) na redução da translocação bacteriana em modelo *in vitro*. Ambas as linhagens apresentaram efeito inibitório significativo na translocação do patógeno, sugerindo a ação de múltiplos mecanismos, como a inibição da adesão do patógeno às células epiteliais, o antagonismo patógeno-probiótico e a preservação da estrutura das junções firmes.

Figura 10. Avaliação da translocação bacteriana para o baço (A) e fígado (B). Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



5.2.2.2 Quantificação da microbiota intestinal

A comunidade microbiana que compõe a microbiota do trato intestinal de um indivíduo adulto saudável é complexa, altamente diversificada e relativamente estável. Esses microrganismos desempenham um papel importante na manutenção da saúde do hospedeiro, já que realizam diversas funções, como: síntese de vitaminas, defesa contra potenciais patógenos, fermentação de componentes alimentares não digeríveis e modulação do sistema imunológico (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010; RIEDER *et al.*, 2017; FASSARELLA *et al.*, 2020). Durante a infecção induzida por *Salmonella*, contudo, a inflamação da mucosa cria um nicho que favorece a expansão da bactéria patogênica sobre a microbiota, resultando em um quadro de disbiose intestinal (GILLIS *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2019; ROGERS; TSOLIS; BÄUMLER, 2020). Diante disso,

analisamos a composição da microbiota por método dependente de cultivo, a fim de verificar se o probiótico administrado foi capaz de modular o ecossistema intestinal dos camundongos.

Os meios sólidos MacConkey, BHI suplementado com azida e Hipertônico Manitol favorecem, respectivamente, o crescimento de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Os resultados indicaram (Figuras 11A, 11B e 11C) uma maior concentração dessas bactérias no grupo desafiado e não tratado (ST) em relação ao grupo que recebeu o probiótico (I-3856+ST), embora o último meio não tenha apresentado diferença significativa. Foi observado que o aumento da concentração dessas bactérias poderia estar relacionado ao quadro disbiótico induzido pela salmonelose e que o tratamento com *S. cerevisiae* diminuiu a contagem bacteriana nos meios MacConkey (*Enterobacteriaceae*) e BHI com azida (*Enterococcus* spp.).

Alterações na ecologia e nas funções da microbiota intestinal são traços comuns em quadros de disbiose. Neste contexto, um novo conjunto de dados emergente está expondo a ligação entre o desequilíbrio da comunidade microbiana do intestino e o aumento de infecções, especialmente por microrganismos Gram-negativo, como os pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (SERINO, 2018). Asahara *et al.* (2004) e Fukuda *et al.* (2011) demonstraram que algumas linhagens de *Bifidobacterium* – *B. pseudocatenulatum* DSM 20439, *B. bifidum* ATCC 15696 e *B. catenulatum* ATCC 27539^T, *B. longum* JCM 1217^T – apresentaram efeito protetor contra *E. coli* produtora de toxina Shiga. Aparentemente, essa proteção se deve, pelo menos em parte, à inibição da translocação da toxina secretada pelo patógeno e ao aumento da produção de acetato, um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) que estimula o sistema imune do hospedeiro. Estudos realizados por Steck *et al.* (2011) e Maharshak *et al.* (2015), indicaram que, quando em disbiose, *Enterococcus faecalis* – bactéria comensal do trato intestinal de mamíferos – aumentava a permeabilidade intestinal em decorrência da expressão de gelatinases, enzimas pertencentes à família metaloproteinase zinco-dependente, que podem mediar processos fisiológicos e patológicos, como casos de inflamação crônica. Os autores associaram a expressão dessas proteinases à degradação de E-caderina, um tipo de proteína da zônula de oclusão que auxilia na manutenção da integridade da barreira epitelial e na promoção da adesão célula-célula. Kobayashi e colaboradores (2015) também documentaram a microbiota disbiótica como um fator patológico que

pode favorecer a colonização por *Staphylococcus aureus* e levar à inflamação eczematosa em camundongos, destacando o eixo da imunidade microbiota-hospedeiro como um possível alvo para futuras terapêuticas na dermatite atópica. He *et al.* (2020), avaliaram os efeitos inibitórios de *L. gasseri* e *L. crispatus* na adesão de sete patógenos que causam infecção do trato genital inferior e constataram que as bactérias probióticas representam alternativas promissoras para a prevenção de infecções, agindo via antagonização da adesão do patógeno ao epitélio, por meio de exclusão e/ou inibição da competição microbiana.

Os meios BBE (Figura 11D) e MRS (Figura 11E) são seletivos, sendo que o primeiro é favorável ao crescimento de *Bacteroides* spp. e o segundo viabiliza o crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL). Uma alta contagem desses microrganismos foi observada em todos os grupos avaliados (CT, I-3856, ST, I-3856+ST).

Ao que tudo indica, o consumo diário de *S. cerevisiae* não influenciou a contagem de BAL e *Bacteroides* no presente estudo, embora outros autores tenham associado o tratamento com probióticos a uma maior colonização por esses microrganismos. Rodríguez-Nogales e colaboradores (2018), mostraram que *S. boulardii* foi capaz de conferir um efeito anti-inflamatório em modelo murino de colite, além de impactar na expressão de microRNAs e na composição da microbiota intestinal. Considerando as bactérias produtoras de ácido lático e acético (gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), os autores observaram que houve uma redução nessas populações bacterianas em camundongos colíticos ao passo que esse cenário foi revertido após o tratamento com a levedura probiótica. Esses gêneros bacterianos auxiliam na manutenção da homeostase do trato intestinal, uma vez que são capazes de produzir ácidos orgânicos a partir da fermentação de carboidratos, podendo interferir diretamente no crescimento de outros microrganismos no meio. Além disso, estima-se que também sejam capazes de ativar células do sistema imune inato e induzir a secreção de citocinas. Oba e colaboradores (2020), avaliaram a relação existente entre a manana – polissacarídeo encontrado na parede celular de leveduras – e supressão da produção de compostos putrefativos (fenóis, indóis e amônia) produzidos pela microbiota intestinal, já que essas substâncias podem desencadear efeitos potencialmente prejudiciais ao hospedeiro, como distúrbios dérmicos e hepáticos. Foi demonstrado que a manana aumentou a abundância de *Bacteroides thetaiotaomicron*, o que culminou na inibição do

crescimento de bactérias patogênicas e na redução da síntese de compostos putrefativos decorrentes da fermentação fecal *in vitro*. Provavelmente, isso se deve ao fato de *B. thetaiotaomicron* possuir um conjunto específico de genes envolvidos na degradação do polímero eucariótico citado.

Os meios ágar sangue e ágar sangue suplementado são dotados de um grande suprimento de nutrientes e permitem o crescimento de diversos grupos bacterianos. Os meios foram incubados em atmosferas diferentes (aerobiose e anaerobiose, respectivamente) e também apresentaram alta contagem nos grupos controle e desafiados, conforme Figuras 11F e 11G. A alta contagem de anaeróbios totais pode estar relacionada ao fato de a mucosa intestinal ser desprovida de oxigênio, favorecendo o predomínio dos grupos microbianos capazes de crescer nessas condições.

O meio Sabouraud, por sua vez, é destinado ao cultivo de fungos filamentosos e leveduras. Os dados (Figura 11H) mostraram uma maior frequência de colonização por leveduras nos grupos que receberam o probiótico (I-3856 e I-3856+ST) em relação àqueles que receberam somente salina (CT e ST), o que pode ser explicado pelo fato de, geralmente, as leveduras não serem parte constituinte da microbiota comensal do intestino de camundongos, sendo, portanto, excretadas juntamente com o bolo fecal. A ingestão diária do probiótico, no entanto, foi essencial para manter seus níveis artificialmente elevados no microambiente entérico.

Embora muitos exemplos de influência bacteriana na saúde do hospedeiro e na modulação imunológica sejam relatados, pouco se sabe sobre o papel dos fungos comensais no ecossistema intestinal. Até o momento, a maioria das pesquisas com fungos baseava-se nas doenças oportunistas causadas por eles, deixando o possível papel desempenhado por esses microrganismos na microbiota pouco esclarecido (KAPITAN *et al.*, 2018). Hoffmann e colaboradores (2013) identificaram 66 gêneros de fungos presentes em amostras de fezes humanas, sendo que os gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Cladosporium* foram os mais abundantes. Estudos adicionais relataram que, embora a composição da comunidade bacteriana seja relativamente estável ao longo do tempo, a população de fungos que habita o intestino murino sofre mudanças significativas durante a vida do animal, sugerindo que as populações micobiontes intestinais são mais variáveis

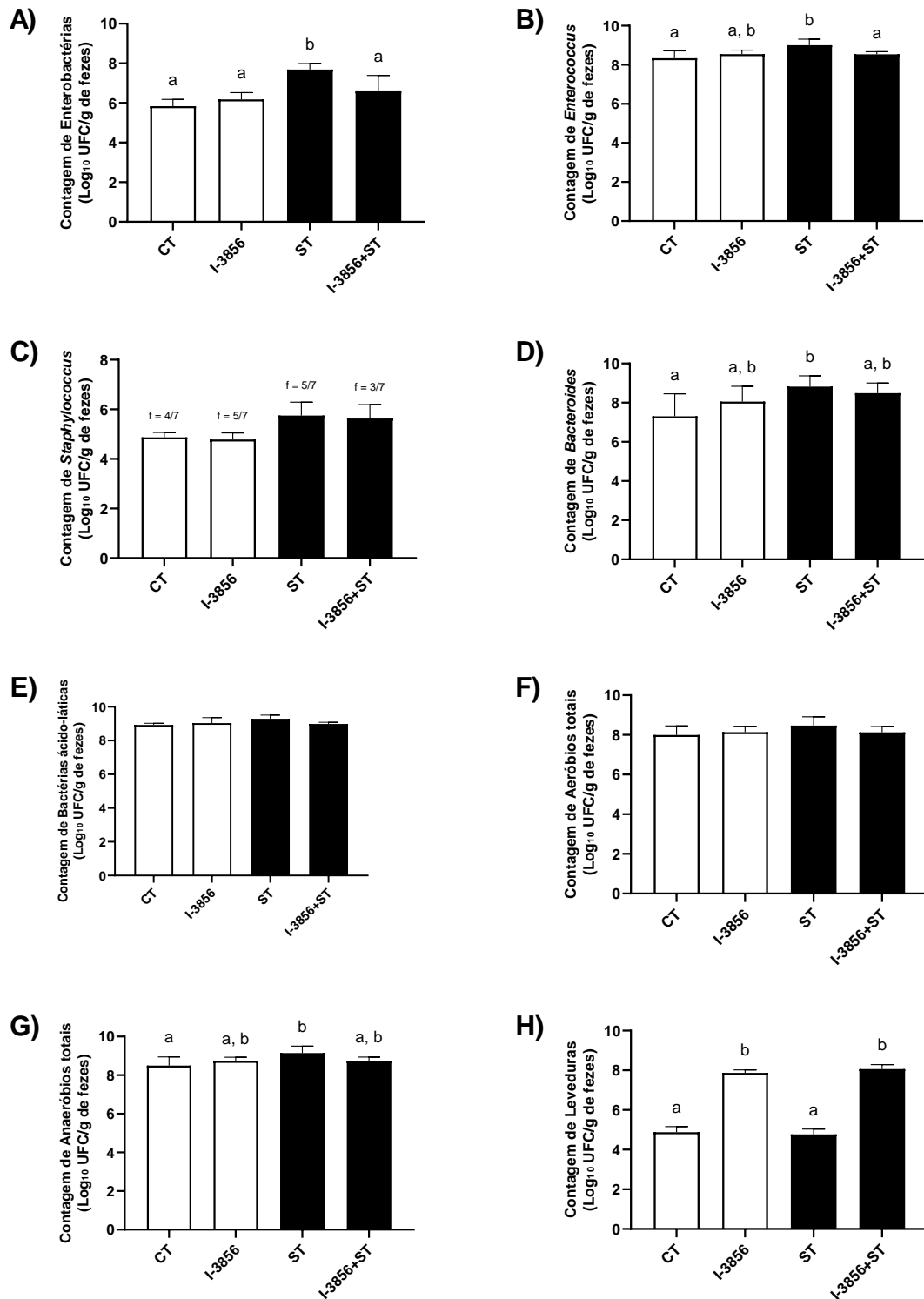
do que as bacterianas e que sua composição pode ser influenciada por fungos ambientais (DOLLIVE *et al.*, 2013; UNDERHILL; ILIEV, 2014).

A notável capacidade fermentativa de algumas espécies fúngicas, sobretudo do gênero *Saccharomyces*, vem sendo explorada desde os primórdios na panificação e fermentação de bebidas alcoólicas (SICARD; LEGRAS, 2011). Atualmente, contudo, os conhecimentos sobre essa levedura têm se expandido, fazendo com que ela também seja empregada na produção de bioenergia e em campos biomédicos (MAGER; WINDERICKY, 2005; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Considerando seu nicho natural – o meio ambiente – e seu uso generalizado na produção de alimentos, é compreensível que essa levedura seja constantemente introduzida no trato intestinal humano, embora não esteja totalmente esclarecido se a ocorrência de *S. cerevisiae* nas fezes indica uma passagem transitória ou permanente no intestino. Devido a sua importância e constantes estudos acerca do genoma, mecanismos de ação e propriedades terapêuticas, linhagens de *Saccharomyces* foram “domesticadas” e vêm sendo utilizadas como terapia alternativa para várias doenças, apresentando resultados satisfatórios e promissores (MARTINS *et al.*, 2007; TIAGO *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-NOGALES *et al.*, 2018; TERCIOLO; DAPOIGNY; ANDRE, 2019).

Atualmente, o único organismo não bacteriano aprovado para o uso como probiótico em humanos é a levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii*, comercializada no Brasil como Floratil®. Essa substância ativa é indicada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, com foco no restabelecimento da microbiota intestinal (KELESIDIS; POTHOUKAKIS, 2012; KAPITAN *et al.*, 2018). Embora muitos estudos venham demonstrando o efeito probiótico da levedura utilizada no presente trabalho – *S. cerevisiae* CNCM I-3856 –, esta ainda é vendida como suplemento dietético nos Estados Unidos, sem aprovação para prescrição médica até o momento, o que reafirma a necessidade de realização de mais estudos complementares em laboratório e ensaios clínicos em humanos (CAYZEELE-DECHERF; PÉLERIN; JÜSTEN, 2017; GABRIELLI *et al.*, 2018; SNIFFEN *et al.*, 2018; MUZNY *et al.*, 2019; GAYATHRI *et al.*, 2020; SABBATINI *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos da análise da microbiota cultivável sugerem que o mecanismo pelo qual a levedura probiótica exerce um papel protetor contra a salmonelose não se deve à modificação da composição da microbiota.

Figura 11. Composição da microbiota intestinal por método dependente de cultivo, representada por Enterobactérias (A); *Enterococcus* (B); *Staphylococcus* (C); *Bacteroides* (D); Bactérias ácido-láticas (E); Aeróbios totais (F); Anaeróbios totais (G); e Leveduras (H). Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



5.2.3 Avaliação dos parâmetros imunológicos

5.2.3.1 Medida da atividade de EPO e MPO

A indução da salmonelose em camundongos está associada à presença de algumas células de defesa imunológica nos órgãos mais afetados pela doença, no caso, o fígado e o íleo. Neutrófilos e eosinófilos desempenham um papel crítico na restauração da homeostase. Em situações de lesão tecidual, são recrutados para a área afetada a fim de neutralizar e/ou eliminar o estímulo potencialmente nocivo. O acúmulo desses leucócitos, entretanto, pode potencializar o dano e a disfunção tecidual, perpetuando a inflamação e suas complicações (SERHAN *et al.*, 2007; LEONEL *et al.*, 2012). As enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) são proteínas liberadas após a degranulação de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente, e têm sido utilizadas como marcadores para quantificação de infiltrado inflamatório nos tecidos e mensuração da resposta imune frente a infecções, uma vez que exercem importante função antimicrobiana no corpo do hospedeiro (STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985; SOUZA *et al.*, 2000; NAUSEEF, 2007). Nossos resultados mostram que o tratamento oral com *S. cerevisiae* reduziu significativamente, no íleo e no fígado, os níveis de EPO e MPO no grupo tratado (I-3856+ST) em comparação ao grupo desafiado e não tratado (ST), como visualizado na Figura 12. Esses achados condizem com dados apresentados em trabalhos semelhantes.

Uma característica comumente observada em biópsias de pacientes com doenças inflamatórias intestinais – como quadros de salmonelose –, são os infiltrados de eosinófilos (BARRIE *et al.*, 2012; HOGAN *et al.*, 2012; STASIKOWSKA-KANICKA *et al.*, 2012). Esses leucócitos granulócitos desempenham papéis importantes tanto na defesa imune inata quanto na defesa imune adaptativa do hospedeiro, exibindo atividade citotóxica contra parasitas, bactérias e fungos (O'BRIEN, 2000; LLOYD *et al.*, 2008). Essas células são capazes de promover a inflamação por meio da liberação de proteínas tóxicas e radicais livres e pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, como, por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas. Além disso, também podem atuar na apresentação de antígenos e no recrutamento de células T (BARRIE *et al.*, 2012). Geralmente, os eosinófilos estão presentes em baixas proporções nos infiltrados leucocitários, embora pareçam estar associados a alterações morfológicas, bem como à evolução das disfunções gastrointestinais (HOGAN *et al.*, 2012). Diante

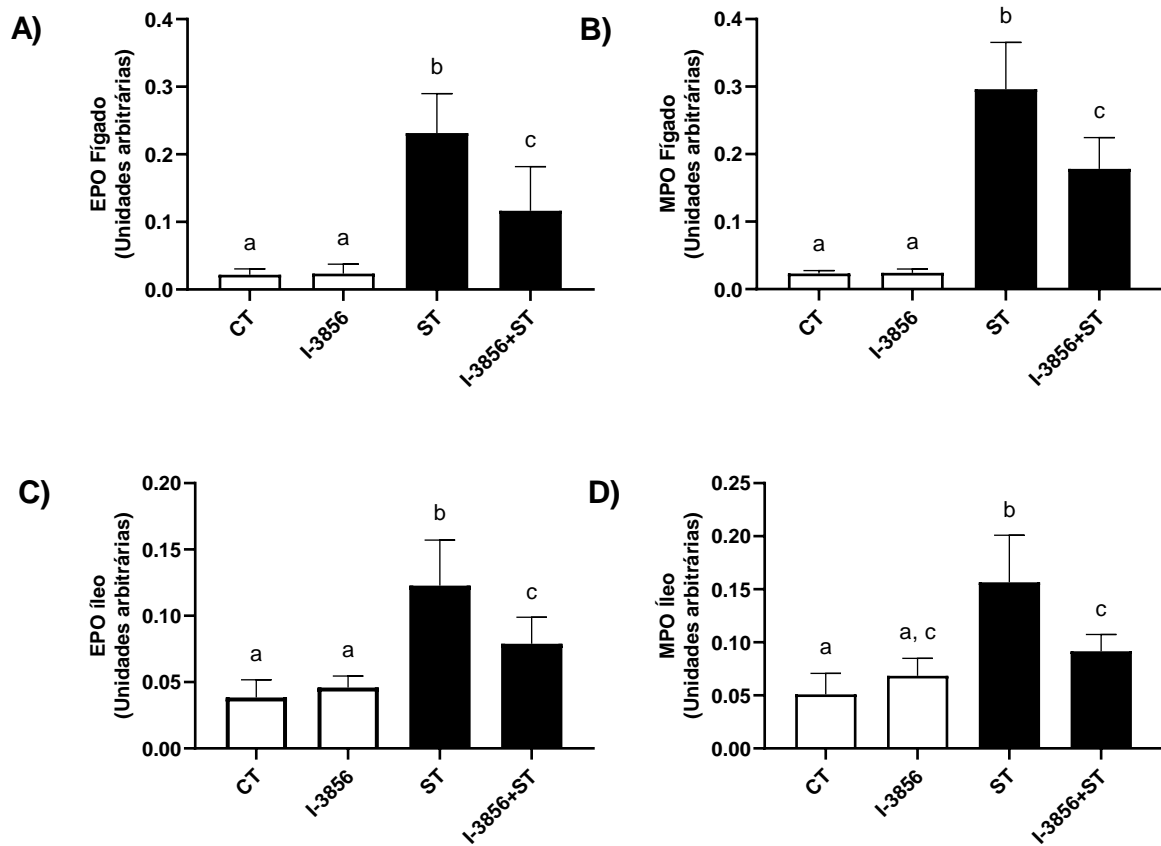
disso, o índice de recrutamento de eosinófilos foi mensurado por meio da quantificação da enzima peroxidase eosinofílica no fígado e íleo dos animais em teste, observando diferença significativa entre os grupos ST e I-3856+ST ($p < 0,01$ para ambos os órgãos avaliados), conforme as Figuras 12A-B. Ao avaliar se a administração de um simbiótico (Simbioflora®), contendo um fruto-oligossacarídeo (FOS) como um prebiótico mais quatro linhagens de microrganismos probióticos (*Lactocaseibacillus paracasei* LPC-31, *Lactocaseibacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium lactis* HN019) poderia auxiliar no controle da inflamação intestinal, Trindade *et al.* (2018) observaram um menor nível de EPO no intestino após o tratamento, indicando que o simbiótico preservou a integridade intestinal, atenuando o processo inflamatório caracterizado pela presença de eosinófilos no infiltrado celular. Porto e colaboradores (2019) relataram que o tratamento oral com *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu o influxo de EPO e MPO para o intestino de animais durante a inflamação induzida pelo tratamento quimioterápico (mucosite), amenizando os danos causados na mucosa intestinal. Abrantes *et al.* (2019) também constataram que a administração de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} resultou na redução da permeabilidade intestinal e níveis mais baixos de EPO e MPO em comparação com o grupo doente, em modelo de colite intestinal, sugerindo que houve migração controlada desses leucócitos para o sítio de inflamação.

O lisossomo de neutrófilos e macrófagos contém peptídeos e proteínas antimicrobianas, como a mieloperoxidase (LLOYD *et al.*, 2008; SERTEYN *et al.*, 2003). Essa enzima exibe atividade durante o processo inflamatório pós-infecção, já que é responsável pela produção de alguns compostos com ação bactericida, como o ácido hipocloroso e outras espécies reativas, que são capazes de oxidar grupos sulfídricos de aminoácidos e inibir processos enzimáticos vitais aos microrganismos patogênicos. MPO é uma peça-chave da defesa imune inata contra patógenos invasores, embora sua produção exacerbada possa promover dano tecidual e, conseqüentemente, a progressão da doença (FLOUDA *et al.*, 2021). Além de atuar diretamente contra patógenos, a mieloperoxidase é um componente necessário para a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são estruturas semelhantes a teias, aptas à captura e eliminação de agentes potencialmente nocivos (YANG *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2018). Considerando que o recrutamento de neutrófilos no intestino e fígado é uma das características mais comuns da

infecção por *S. Typhimurium*, a atividade de MPO foi determinada (Figuras 12C-D). A comparação entre os tratamentos foi significativa para o fígado e íleo, onde observou-se uma redução do recrutamento de neutrófilos nos animais do grupo I-3856+ST em relação àqueles pertencentes ao grupo ST, com valores de $p < 0,001$ para ambos os órgãos analisados. Em um trabalho realizado por Smith *et al.* (2008), os autores inferiram que as propriedades antioxidantes de *Limosilactobacillus fermentum* BR11 foram responsáveis pela redução da atividade de MPO em modelo de mucosite intestinal. Philippe e colaboradores (2011) verificaram que a administração de *Bifidobacterium bifidum* S17 melhorou o escore histológico e reduziu os níveis de MPO, sugerindo que o probiótico foi capaz de inibir parcialmente a forte inflamação intestinal decorrente da indução de colite em modelo murino. Zacarias *et al.* (2017) revelaram que o tratamento oral com *Bifidobacterium lactis* foi capaz de reduzir significativamente a atividade enzimática no íleo e fígado de camundongos desafiados com *Salmonella*. Coutinho e colaboradores (2021) também observaram que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18377 protegeu os camundongos contra o desafio por *Salmonella*, apresentando maior sobrevivência e redução da perda de peso, translocação bacteriana para o fígado, níveis intestinais de sIgA e atividades intestinais e hepáticas de MPO e EPO.

Diante do exposto, é possível inferir que a levedura *S. cerevisiae* CNCM I-3856 protegeu os animais desafiados com *S. Typhimurium* devido ao seu potencial efeito imunomodulador.

Figura 12. Avaliação do infiltrado inflamatório por meio da quantificação da atividade de EPO no fígado (A) e íleo (B) e de MPO no fígado (C) e íleo (D). Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



5.2.3.2 Dosagem de slgA

Tendo em vista que a maioria dos patógenos entra no hospedeiro por meio das superfícies mucosas, componentes como mucina e imunoglobulina secretória (slgA) são muito importantes para manutenção da homeostase dessa barreira, além de constituir a primeira linha de proteção imunológica nessas portas de entrada (WIJBURG *et al.*, 2006; CORTHÉSY, 2013). slgA é um anticorpo estruturalmente programado para resistir à degradação química no ambiente hostil das superfícies mucosas e das enzimas do hospedeiro ou de origem microbiana (BOYAKA, 2017; PABST; SLACK, 2020). Na infecção por *Salmonella*, foi demonstrado que slgA luminal pode bloquear a penetração do patógeno nos tecidos, provavelmente inibindo sua ligação às células epiteliais e células M (CORTHÉSY, 2007).

slgA é secretada por células plasmáticas encontradas na LP intestinal de membranas mucosas, sobretudo no intestino delgado (BRANDTZAEG *et al.*, 1999; FAGARASAN; MACPHERSON, 2015). Com o propósito de controlar a relação

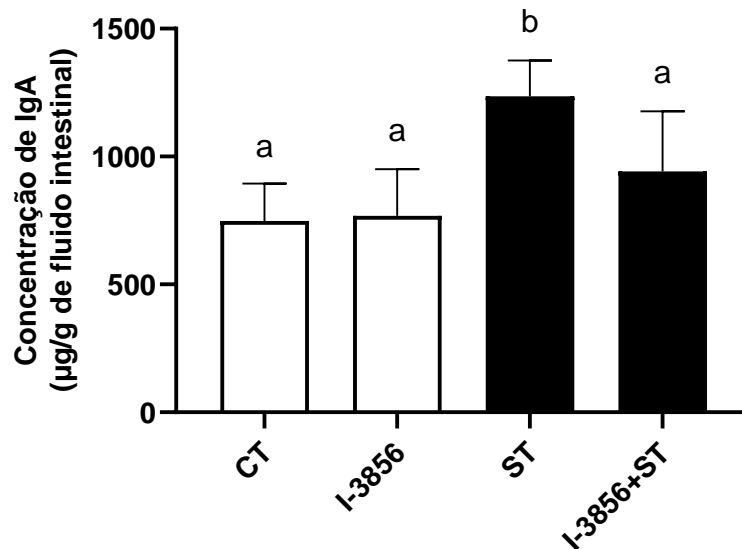
simbiótica existente entre comensais e o hospedeiro, além de evitar que patógenos oportunistas entrem e se disseminem no compartimento sistêmico, sIgA desempenha algumas funções neutralizantes nas superfícies da mucosa intestinal, como: (i) exclusão imunológica, promovendo aglutinação, aprisionamento no muco e/ou depuração do patógeno por atividades peristálticas e mucociliares; (ii) bloqueio do acesso aos receptores epiteliais, interferindo nas etapas iniciais do processo de infecção; e (iii) impacto direto na ativação ou expressão de determinantes de virulência, como a inibição da motilidade baseada em flagelos e a redução da atividade do sistema de secreção tipo III (PHALIPON *et al.*, 2002; BRANDTZAEG, 2003; MANTIS; FORBES, 2010; MANTIS; ROL; CORTHÉSY, 2011).

Em nosso estudo, a quantificação de sIgA no fluido do intestino delgado indicou que o grupo desafiado por *Salmonella* e não tratado (ST) apresentou maior secreção do anticorpo, quando comparado ao grupo desafiado e tratado com o probiótico (I-3856+ST), o que pode ter ocorrido devido à eliminação do patógeno por aprisionamento na superfície da levedura, com conseqüente redução no nível da população de *Salmonella* no intestino (TIAGO *et al.*, 2012). Os achados corroboram dados publicados em trabalhos similares, nos quais o tratamento com um bioterapêutico também foi capaz de reduzir a secreção dessa imunoglobulina. Conforme Steiberg e colaboradores (2014), esses níveis aumentados de sIgA podem estar relacionados à estimulação pelo lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de *S. Typhimurium*. Além disso, os autores também indicaram que os níveis de sIgA no grupo desafiado e submetido ao tratamento com probióticos – *L. salivarius* L38 e *L. acidophilus* L36 – foi semelhante ao observado nos grupos controle e significamente diferente ao observado no grupo desafiado e não tratado. Os resultados sugerem que a administração dessas bactérias probióticas regulou negativamente a produção de anticorpos IgA, indicando um bom marcador imunológico para seleção de novos bioterapêuticos, além de explicar parte dos efeitos benéficos que eles conferem ao hospedeiro.

Santarmaki *et al.* (2017), avaliaram o potencial probiótico de duas linhagens ácido-tolerantes previamente isoladas de laticínios – *L. plantarum* 2035 e *L. plantarum* ACA-DC 2640 – e observaram que ambas conseguiram sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, demonstraram adesão transitória à mucosa intestinal (em um esquema de dosagem e de maneira dependente do tempo) e também foram capazes de reduzir os níveis séricos de IgA por meio da modulação

do sistema imune. Esses resultados sugerem que a estimulação de uma resposta imune pode ser um mecanismo geral para a eficácia dos probióticos, além de auxiliar na manutenção e no fortalecimento do sistema imunológico da mucosa.

Figura 13. Determinação da concentração de sIgA no fluido intestinal. Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



5.2.4 Avaliação dos parâmetros histológicos

Cortes histológicos do intestino e fígado foram analisados, conforme disposto nas Figuras 14 e 15. As amostras dos grupos CT e I-3856 apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade. O fígado dos animais estava íntegro, com espaços portais característicos, indicando a ausência de danos aos hepatócitos e focos inflamatórios no parênquima hepático (Figuras 14A-B e 14C-D, respectivamente). Na análise do íleo, observou-se que as vilosidades da mucosa intestinal estavam preservadas e o epitélio apresentava um aspecto contínuo, sem a presença de espaços que possam caracterizar edemas (Figuras 15A-B e 15C-D, respectivamente). Os achados sugerem que a levedura probiótica não atribuiu nenhuma alteração histopatológica aos órgãos avaliados.

Os animais do grupo infectado e não tratado (ST) apresentaram lesões visíveis tanto no fígado quanto no intestino, o que é característico da inflamação induzida por *Salmonella*. No fígado (Figuras 14E-F), a infecção foi associada a presença de focos inflamatórios nas regiões periportais, além da existência de áreas de infiltrado inflamatório no parênquima hepático, com recrutamento de células de *Küpffer* e leucócitos mono e polimorfonucleares. Os resultados indicam

concordância com dados obtidos no experimento de translocação, onde os animais do grupo ST apresentaram uma maior migração do patógeno para órgãos extraintestinais, o que pode ser evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório e intenso recrutamento de células de defesa. Na avaliação do íleo (Figuras 15E-F), observou-se a existência de necrose epitelial, intensa produção de exsudato decorrente do recrutamento de células de defesa – gerando focos inflamatórios e alterando a conformação das PP –, e alargamento da borda em escova que compõe o epitélio, sugerindo perda de função e alteração estrutural da barreira intestinal. Esses achados se correlacionam com os resultados obtidos anteriormente neste estudo, onde o grupo ST apresentou um aumento significativo da permeabilidade quando comparado ao grupo que foi infectado e tratado com o probiótico (I-3856+ST).

No tratamento com o probiótico, em contrapartida, observou-se dois cenários: (i) animais que apresentaram preservação do fígado e íleo, com histopatologia muito semelhante ao grupo CT; e (ii) animais que apresentaram algum dano hepático e intestinal, semelhante ao grupo ST. Em estudo similar, Cordeiro e colaboradores (2019) também observaram a manifestação característica da doença em 2 dos 5 animais infectados com ST, enquanto os demais (n = 3) apresentaram um aspecto próximo ao normal. Os dados sugerem que, em geral, a administração do probiótico culminou na preservação do parênquima hepático e integridade do epitélio intestinal, com ausência de infiltrado inflamatório ou presença de alguns focos raros, evitando a translocação bacteriana, o recrutamento acentuado de células de defesa e o aumento da permeabilidade intestinal em pelo menos 50% dos camundongos pertencentes ao grupo (n = 9/18), conforme visualizado nas Figuras 14I-J e 15I-J.

As Figuras 14E-F (grupo ST) e 14I-J (grupo I-3856+ST, com áreas representativas de lesão) mostram que houve um aumento intenso da população de células de *Küpfers* nos animais que foram desafiados pelo patógeno. Trata-se de macrófagos residentes no fígado, que desempenham um papel importante na resposta imune do hospedeiro e podem representar até 90% dos macrófagos teciduais que constituem o sistema de fagócitos mononucleares residentes no corpo (KOLIOS *et al.*, 2006). Em condições de homeostasia, comumente se observa mononucleares no parênquima hepático em pequeno número. Nos resultados encontrados, entretanto, a presença desses macrófagos entre as fileiras de hepatócitos refletiu o aumento da migração dessas células, o que é indicativo de

uma resposta inflamatória, como aquela observada na infecção por *S. Typhimurium* (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2004). A fim de avaliar o efeito probiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905, Martins (2008) observou que a levedura retardou a translocação de *S. Typhimurium* para o fígado, além de auxiliar no *clearance* de *E. coli* B41 da corrente sanguínea. Esses achados foram relacionados à capacidade da levedura de estimular o aumento da população de células *Küpfper*, reafirmando a importância desses macrófagos na defesa contra patógenos (RODRIGUES *et al.*, 2000).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o propósito de avaliar o efeito probiótico de diferentes linhagens microbianas frente aos danos teciduais causados por doenças inflamatórias intestinais. Martins *et al.* (2010) observaram que a administração de *S. boulardii* foi capaz de conferir proteção frente ao desafio por *S. Typhimurium*, já que os animais tratados não apresentaram alterações inflamatórias significativas nos tecidos avaliados. Constatou-se que o grupo desafiado e tratado com a levedura probiótica apresentou preservação da arquitetura do intestino, atenuação da translocação bacteriana para o fígado e redução da permeabilidade paracelular de células expostas ao patógeno. Em trabalho similar, Jadhav e colaboradores (2013) demonstraram que a terapia com uma combinação de bactérias probióticas – *L. acidophilus* e *B. bifidum* – conseguiu reduzir o recrutamento de neutrófilos e atenuar a perda de integridade das estruturas que compõe o epitélio, controlando a resposta inflamatória no intestino. Abatemarco-Júnior *et al.* (2018) revelaram que o tratamento com *L. diolivorans* 1Z – uma linhagem bacteriana isolada do Kefir – levou a um menor dano ao fígado e íleo dos animais. Esses achados foram acompanhados por uma maior taxa de sobrevivência e a menores índices de expressão de citocinas e de translocação do patógeno para o fígado. Abrantes e colaboradores (2020) também observaram lesões graves nos camundongos com colite ulcerativa – ulceração na camada epitelial, danos nas criptas, denso infiltrado inflamatório na mucosa, áreas de edema e necrose –, ao passo que a administração de *B. longum* 5^{1A} protegeu o intestino dos animais contra os danos acima citados, contribuindo para a redução da intensidade da inflamação observada no modelo experimental.

O laudo emitido a partir da observação das lâminas coradas por HE evidenciou que o probiótico conferiu proteção contra os danos induzidos ao fígado e íleo de camundongos desafiados com *Salmonella*.

Figura 14. Análise histológica do fígado. Os parâmetros avaliados são evidenciados nas seções CT (A e B); I-3856 (C e D); ST (E e F); e I-3856+ST, indicando áreas sem lesão (G e H) e com lesão (I e J). As setas existentes nas figuras E, F, I e J mostram o intenso recrutamento das células de Kupffer presentes no fígado dos animais pertencentes aos grupos ST e I-3856+ST, com áreas representativas de lesão. As lâminas foram analisadas na objetiva de 4X (A, C, E, G e I), 20X (D, F, H e J) e 40X (B), coradas em HE. CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).

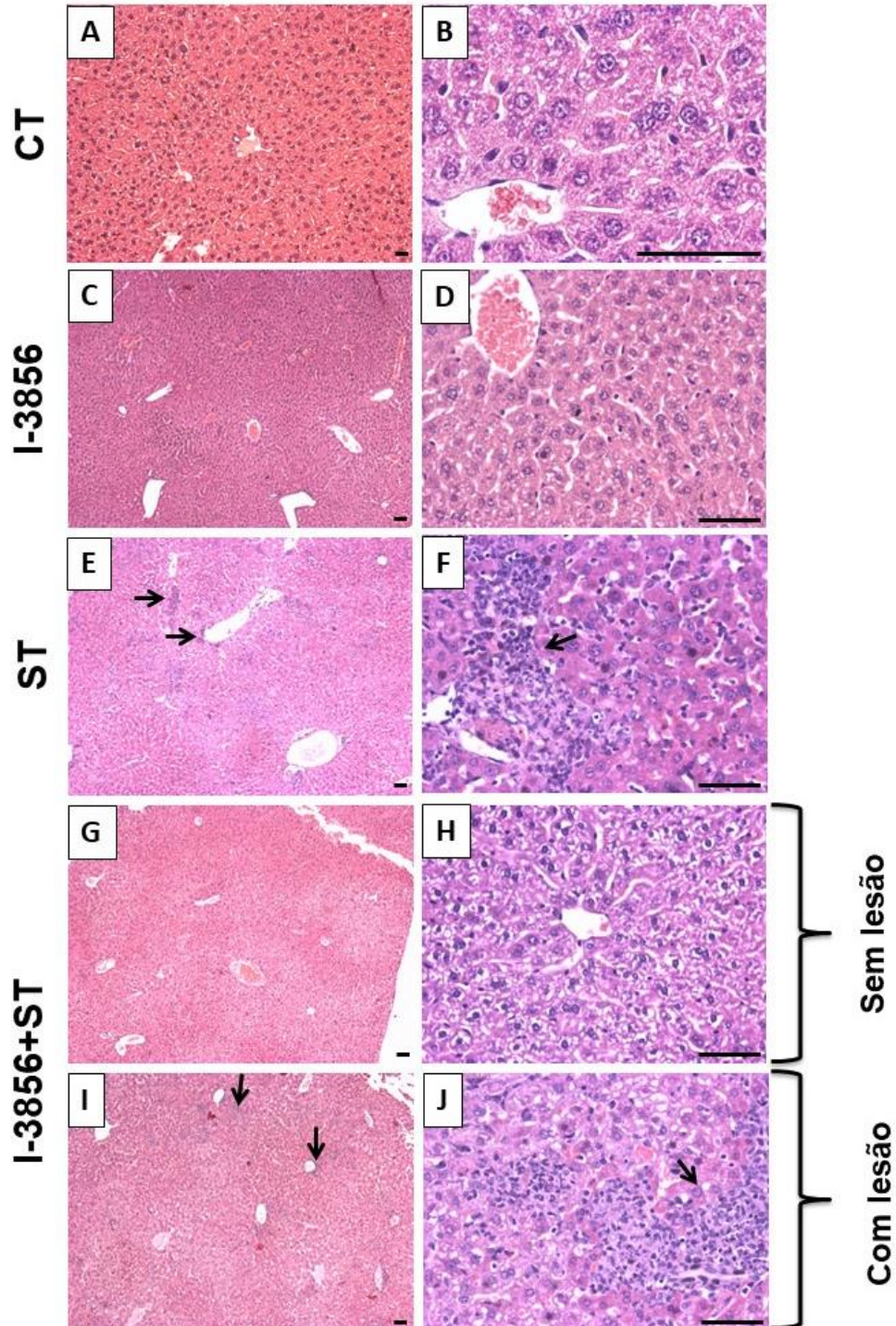
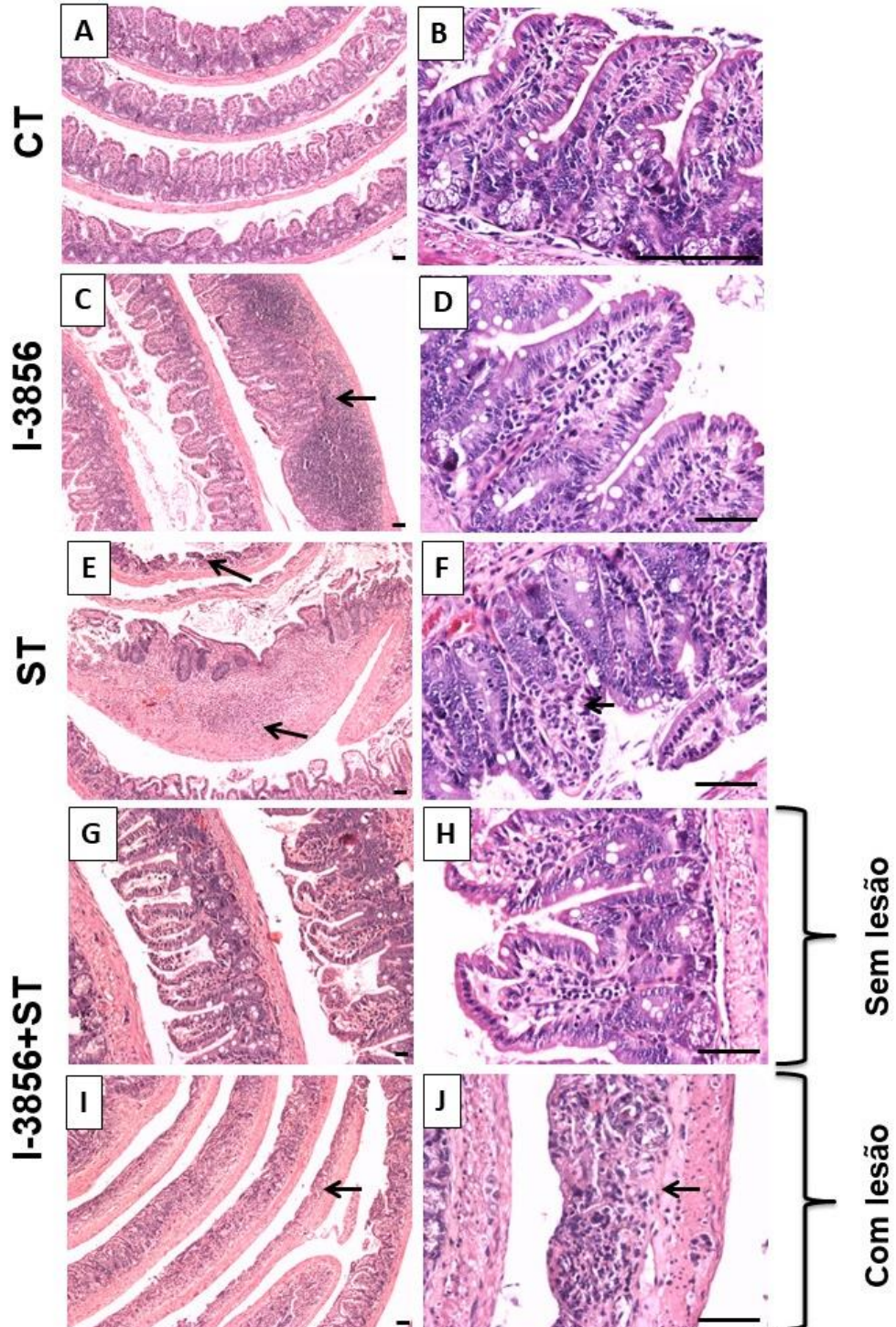


Figura 15. Análise histológica do íleo. Os parâmetros avaliados são evidenciados nas seções CT (A e B); I-3856 (C e D); ST (E e F); e I-3856+ST, mostrando áreas sem lesão (G e H) e com lesão (I e J). As setas indicam, respectivamente: Placa de Peyer sem alterações visíveis (C); intensa produção de exsudato decorrente do recrutamento de monócitos, gerando quadros inflamatórios e alterando a conformação das Placas de Peyer (E); má conformação da lâmina em escova que compõe o epitélio intestinal, sugerindo perda de função e alteração estrutural (F); perda da camada mucosa, perda da conformação das estruturas, elevada produção de exsudato e a aumento da permeabilidade tecidual (I); e, por fim, alteração visível da Placa de Peyer (J). As lâminas foram analisadas na objetiva de 4X (A, C, E e I), 10X (G) e 20X (B, D, F, H e J), coradas em HE. CT (controle salina); I-3856 (controle probiótico); ST (salina + *Salmonella*); I-3856+ST (probiótico + *Salmonella*).



6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração oral de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 exerceu um efeito protetor no controle da resposta inflamatória induzida experimentalmente por *S. Typhimurium*, uma vez que foi capaz de aumentar a sobrevivência dos camundongos desafiados, além de melhorar a maioria dos parâmetros microbiológicos, imunológicos e histológicos avaliados. Os dados disponibilizados podem contribuir para novas investigações, visando o desenvolvimento de alternativas terapêuticas que promovam o bem-estar e o alívio sintomático de pacientes acometidos por inflamações intestinais.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Encontra-se em fase de análise:

- Dosagem de citocinas (IL6, IL10, CXCL1/KC, TNF), para uma melhor compreensão da resposta imunológica dos camundongos frente à infecção com *S. Typhimurium*.
- Análise, *in vivo*, da ligação patógeno-probiótico utilizando animais isentos de germes e técnicas de microscopia eletrônica de varredura.

8 REFERÊNCIAS

- ABATEMARCO-JÚNIOR, M.; SANDES, S.; RICCI, M. F.; ARANTES, R.; NUNES, Á. C.; NICOLI, J. R.; NEUMANN, E. Protective Effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, Isolated From Brazilian Kefir, Against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Experimental Murine Models. **Frontiers in Microbiology**. 4, 9, 2856, 2018.
- ABRANTES, F. A.; NASCIMENTO, B. B.; ANDRADE, M. E. R.; BARROS, P. A. V.; CARTELLE, C. T.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R.; ARANTES, R. M. E.; GENEROSO, S. V.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. Treatment with *Bifidobacterium longum* 51A attenuates intestinal damage and inflammatory response in experimental colitis. **Beneficial Microbes**. 19, 11(1), 47-57, 2020.
- ALDRIDGE, P. D.; GRAY, M. A.; HIRST, B. H.; ANJAM KHAN, C. M. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. **Molecular Microbiology**. 55, 655-663, 2005.
- ALLAIRE, J. M.; CROWLEY, S. M.; LAW, H. T.; CHANG, S. Y.; KO, H. J.; VALLANCE, B. A. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in Immunology**. 39, 677-696, 2018.
- AMAVISIT, D.; LIGHTFOOT, D.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F. Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. **Journal of Bacteriology**. 185(12), 3624- 3635, 2003.
- AMINOV, R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**. 11, 2970-2988, 2009.
- ANTUNES, L. C.; MCDONALD, J. A.; SCHROETER, K. CARLUCCI, C.; FERREIRA, R. B. R.; WANG, M.; YURIST-DOUTSCH, S.; HIRA, G.; JACOBSON, K.; DAVIES, J.; ALLEN-VERCOE, E.; FINLAY, B. B. Antivirulence activity of the human gut metabolome. **mBio**. 5, 01183-14, 2014.
- ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**. 290, 61-69, 1997.
- ARAÚJO, J. R.; TOMAS, J.; BRENNER, C.; SANSONETTI, P. J. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. **Biochimie**. 141, 97-106, 2007.
- ASAHARA, T.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**. 72, 2240-2247, 2004.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 54, 938-956, 2014.
- BALK, R. Characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkeys in commercial processing plants for resistance to antibiotics, disinfectants, and a growth promoter. **Foodborne Pathogens and Disease**. 8, 593-600, 2011.
- BARBARA, G.; FEINLE-BISSET, C.; GHOSHAL, U. C.; SANTOS, J.; VANNER, S. J.; VERGNOLLE, N.; ZOETENDAL, E. G.; QUIGLEY, E. A. The intestinal microenvironment and functional gastrointestinal disorders. **Gastroenterology**. 150, 1305-1318, 2016.
- BARRIE, A.; MOURABET, M. E.; WEYANT, K.; CLARKE, K.; GAJENDRAN, M.; RIVERS, C.; PARK, S. Y.; HARTMAN, D.; SAUL, M.; REGUEIRO, M.;

- YADAV, D.; BINION, D. G. Recurrent blood eosinophilia in ulcerative colitis is associated with severe disease and primary sclerosing cholangitis. **Digestive Diseases and Science**. 58, 222-228, 2012.
- BARTHEL, M.; HAPFELMEIER, S.; QUINTANILLA-MARTÍNEZ, L.; KREMER, M.; ROHDE, M.; HOGARDT, M.; PFEFFER, K.; RUSSMANN, H.; HARDT, W. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. **Infection and Immunity**. 71, 2839-2858, 2003.
- BENDER, J. K.; WILLE, T.; BLANK, K.; LANGE, A.; GERLACH, R. G. LPS structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model. **PLoS one**. 8(8), e73287, 2013.
- BEREK, C.; BELLER, A.; CHU, V. T. Isolation of Eosinophils from the Lamina Propria of the Murine Small Intestine. **Methods in Molecular Biology**. 1422, 213-221, 2016.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 473, 11-30, 1999.
- BERG, R. D. Probiotic, probiotics or 'conbiotics'? **Trends in Immunology**. 6, 89-92, 1998.
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. **Baltimore: Williams & Wilkins copyright**. 1, 368-384, 1994.
- BERNET-CAMARD, M. F.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes non bacteriocin antibacterial substances active *in vitro* and *in vivo*. **Applied and Environmental Microbiology**. 63, 2747-2753, 1997.
- BIERSCHENK, D.; BOUCHER, D.; SCHRODER, K. *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. **Molecular Immunology**. 86, 38-43, 2017.
- BISCHOFF, S. C.; BARBARA, G.; BUURMAN, W.; OCKHUIZEN, T.; SCHULZKE, J. D.; SERINO, M.; TILG, H.; WATSON, A.; WELLS, J. M. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC gastroenterology**. 14, 189, 2014.
- BLANQUET-DIOT, S.; DENIS, S.; CHALANCON, S.; CHAIRA, F.; CARDOT, J.; ALRIC, M. Use of Artificial Digestive Systems to Investigate the Biopharmaceutical Factors Influencing the Survival of Probiotic Yeast During Gastrointestinal Transit in Humans. **Pharmaceutical Research**. 29, 1444-1453, 2012.
- BOYAKA, P. N. Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. **Journal of Immunology**. 199 (1), 9-16, 2017.
- BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; BAMBIRRA, E. A.; AMARAL, S. C.; FIETTO, L. G.; TROPIA, M. J. M.; NEVES, M. J.; SANTOS, R. G.; GOMES, N. C.M.; NICOLI, J. R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 64, 564-568, 1998.
- BRANDTZAEG, P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. **International Journal of Medical Microbiology**. 293(1), 3-15, 2003.
- BRANDTZAEG, P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. **European Journal of Pharmacology**. 668(1), 16-32, 2011.
- BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E. S.; FARSTAD, I. N.; JAHNSEN, F. L.; JOHANSEN, F. E.; NILSEN, E. M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in

- the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? **Immunology Today**. 20(3), 141-51, 1999.
- BRASIL. Diário Oficial da União. Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF, 2007.
- BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2008.
- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**. 38, 2465-2467, 2000.
- BROZ, P.; OHLSON, M. B.; MONACK, D. M. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. **Gut Microbes**. 3, 62-70, 2012.
- BUCKLE, G.; WALKER, C.; BLACK, R. Typhoid fever and paratyphoid fever: systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. **Journal of Global Health**. 2, e010401, 2012.
- BUFFIE, C. G.; BUCCI, V.; STEIN, R. R.; MCKENNEY, P. T.; LING, L.; GOBOURNE, A.; NO, D.; LIU, H.; KINNEBREW, M.; VIALE, A.; LITTMANN, E.; VAN-DEN-BRINK, M. R. M.; JENQ, R. R.; TAUR, Y.; SANDER, C.; CROSS, J. R.; TOUSSAINT, N. C.; XAVIER, J. B.; PAMER, E. G. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. **Nature**. 517, 205-208, 2015.
- BULA-RUDAS, F. J.; RATHORE, M. H.; MARAQA, N. F. *Salmonella* infections in childhood. **Advances in Pediatrics**. 62, 29-58, 2015.
- CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; HARVEY, R. B.; GENOVESE, K. J.; KENNEDY, C. N.; VENN, D. W.; NISBET, D. J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**. 9, 217-225, 2008.
- CALVERT, A. H.; NEWELL, D. R.; GUMBRELL, L. A.; O'REILLY, S.; BURNELL, M.; BOXALL, F. E.; SIDDIK, Z. K.; JUDSON, I. R.; GORE, M. E.; WILTSHAW, E. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. **Journal of Clinical Oncology**. 7, 1748-1756, 1989.
- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **Journal of Experimental Medicine**. 139, 1189-1203, 1974a.
- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. Growth of *Salmonella* in orally infected germfree mice. **Infection and Immunity**. 21, 41-47, 1974b.
- CAYZEELE-DECHERF, A.; PÉLERIN, F.; JÜSTEN, P. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 as a Natural Breakthrough for Vaginal Health: A Clinical Study. **Medical Journal of Obstetrics and Gynecology**. 5, e1112, 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC**. *Salmonella* and food. Available: <<https://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-14/signs-symptoms.html>> Accessed: August 28, 2020.
- CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**. 10(10), 735-44, 2010.
- CHAKROUN, I.; CORDERO, H.; MAHDHI, A.; MORCILLO, P.; FEDHILA, K.; CUESTA, A.; BAKHROUF, A.; MAHDOUANI, K.; ESTEBAN, M. A. Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical

- Salmonella* Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**. 106, 40-49, 2017.
- CHAMBRUN, G. P.; NEUT, C.; CHAU, A.; CAZAUBIEL, M.; PELERIN, F.; JUSTEN, P.; DESREUMAUX, P. A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. **Digestive and Liver Disease**. 47, 119-124, 2015.
- CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**. 4, 303-306, 2013.
- CORDEIRO, M. A.; SOUZA, E. L. S.; ARANTES, R. M. E.; BALTHAZAR, C. F.; GUIMARÃES, J. T.; SCUDINO, H.; SILVA, H. L. A.; ROCHA, R. S.; FREITAS, M. Q.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; PIMENTEL, T. C.; GRANATO, D.; COSTA, R. G. B.; CRUZ, A. G.; MARTINS, F. S. Fermented whey dairy beverage offers protection against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **Journal of Dairy Science**. 102(8), 6756-6765, 2019.
- CORTHÉSY, B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. **Frontiers in Immunology**. 12, 4-185, 2013.
- CORTHÉSY, B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? **Journal of Immunology**. 178(1), 27-32, 2007.
- COUTINHO, J. O. P. A.; QUINTANILHA, M. F.; CAMPOS, M. R. A.; FERREIRA, E.; MENEZES, G. C. A.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A.; VITAL, K. D.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N.; NICOLI, J. R.; TIAGO, F. C. P.; MARTINS, F. S. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 13(5), 1338-1354, 2021.
- CROSWELL, A.; AMIR, E.; TEGGATZ, P.; BARMAN, M.; SALZMAN, N. H. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection. **Infection and Immunity**. 77, 2741-2753, 2009.
- DEITCH, E. A.; BERG, R. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**. 8(6), 475-82, 1987.
- DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J. C.; KRAEHEBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. How the gut senses its content. **Cellular Microbiology**. 4, 61-72, 2002.
- DODDS, D. R. Antibiotic resistance: A current epilogue. **Biochemical Pharmacology**. 134, 139-146, 2017.
- DOLLIVE, S.; CHEN, Y. Y.; GRUNBERG, S.; BITTINGER, K.; HOFFMANN, C.; VANDIVIER, L.; CUFF, C.; LEWIS, J. D.; WU, G. D.; BUSHMAN, F. D. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. **PLoS One**. 8, e71806, 2013.
- DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**. 14, 20-32, 2016.
- DOUGAN, G.; BAKER, S. *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. **Annual Review of Microbiology**. 68, 317-336, 2014.
- DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73, 386-392, 2001.
- ECKMANN, L. Defense molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. **Current Opinion in Gastroenterology**. 21, 147-151, 2005.

- ENG, S. K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N. S. A.; SER, H. L.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**. 8, 284-293, 2015.
- ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; PRIVAT, M.; DENIS, S.; CARDOT, J. M.; ALRIC, M.; BLANQUET-DIOT, S. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. 77(3), 1127-31, 2011.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **European Food Safety Authority Journal**. 15, 1-288, 2017.
- FAGARASAN, S.; MACPHERSON, A. J. The Regulation of IgA Production. In: Mucosal Immunology: Fourth Edition. **Elsevier**. 1-2, 471-484, 2015.
- FASANO, A.; NOT, T.; WANG, W.; UZZAU, S.; BERTI, I.; TOMMASINI, A.; GOLDBLUM, S. E. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **The Lancet**. 355, 1518-1519, 2000.
- FASSARELLA, M.; BLAAK, E. E.; PENDERS, J.; NAUTA, A.; SMIDT, H.; ZOETENDAL, E. G. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. **Gut**. 70(3), 595-605, 2021.
- FILHO-LIMA, J. V. M.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**. 88, 365-370, 2000.
- FINLAY, B. B.; LEUNG, K. Y.; ROSENSHINE, I.; DEL-PORTILLO, F. G. *Salmonella* interactions with the epithelial cells. **American Society for Microbiology**. 58, 486-490, 1992.
- FLEMER, B.; WARREN, R. D.; BARRETT, M. P.; CISEK, K.; DAS, A.; JEFFERY, I. B.; HURLEY, E.; O'RIORDAIN, M.; SHANAHAN, F.; O'TOOLE, P. W. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. **Gut**. 67, 1454-1463, 2018.
- FLOUDA, K.; GAMMELGAARD, B.; DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. Modulation of hypochlorous acid (HOCl) induced damage to vascular smooth muscle cells by thiocyanate and selenium analogues. **Redox Biology**. 41, 101873, 2021.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO AND WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO**. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
Available: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Accessed August 31, 2020.
- FRAMER, J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC. 1, 438, 1995.
- FRANCE, M. M.; TURNER, J. R. The mucosal barrier at a glance. **Journal of Cell Science**. 130, 307-314, 2017.
- FRANCIS, C. L.; STARNBACH, M. N.; FALKOW, S. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella*

- Typhimurium grow under low-oxygen conditions. **Molecular Microbiology**. 6, 3077-3087, 1992.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**. 44, 2-12, 2009.
- FUKUDA, S.; TOH, H.; HASE, K.; OSHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; YOSHIMURA, K.; TOBE, T.; CLARKE, J. M.; TOPPING, D. L.; SUZUKI, T.; TAYLOR, T. D.; ITOH, K.; KIKUCHI, J.; MORITA, H.; HATTORI, M.; OHNO, H. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**. 469, 543-547, 2011.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. 66, 365-369, 1989.
- GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; BALLETT, N.; ROSELLETTI, E.; SABBATINI, S.; MOSCI, P.; DECHERF, A. C.; PÉLERIN, F.; PERITO, S.; JÜSTEN, P.; VECCHIARELLI, A. *Saccharomyces cerevisiae*-based probiotic as novel anti-fungal and anti-inflammatory agent for therapy of vaginal candidiasis. **Beneficial Microbes**. 9, 219-230, 2018.
- GALÁN, J. E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**. 30, 567-73, 2006.
- GALDEANO, C. M.; LEBLANC, A. M.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; PERDIGÓN, G. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. **Journal of Dairy Research**. 76, 446-454, 2009.
- GALDEANO, C. M.; LEBLANC, A. M.; VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. **Clinical and Vaccine Immunology**. 14, 485-492, 2007.
- GAYATHRI, R.; ARUNA, T.; MALAR, S.; SHILPA, B.; DHANASEKAR, K. R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 as an add-on therapy for irritable bowel syndrome. **International Journal of Colorectal Disease**. 35, 139-145, 2020.
- GEDEK, B. R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**. 42, 261-264, 1999.
- GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 16, 19-34, 2019.
- GENEROSO, S. V.; VIANA, M. L.; SANTOS, R. G.; ARANTES, R. M. E.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R.; MACHADO, J. A. N.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**. 50, 261-269, 2011.
- GENEROSO, S. V.; VIANA, M.; SANTOS, R.; MARTINS, F. S.; MACHADO, J. A.; ARANTES, R. M.; NICOLI, J. R.; CORREIA, M. I.; CARDOSO, V. N. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**. 192(6), 477-84, 2010.
- GILL, H. S.; SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L. Protection against translocating *Salmonella* Typhimurium infection in mice by feeding the immune enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. **Medical Microbiology and Immunology**. 190, 97-104, 2001.

- GILLILAND, S. E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science**. 72, 2483-2494, 1989.
- GILLIS, C. C.; HUGHES, E. R.; SPIGA, L.; WINTER, M. G.; ZHU, W.; CARVALHO, T. F.; CHANIN, R. B.; BEHRENDT, C. L.; HOOPER, L. V.; SANTOS, R. L.; WINTER, S. E. Dysbiosis-Associated Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support *Salmonella* Growth. **Cell host & Microbe**. 23(1), 54-64, 2018.
- GONZALEZ, S. N.; CARDOZO, R.; APELLA, M. C.; OLIVER, G. Biotherapeutic role of fermented milk. **Biotherapy**. 8, 126-134, 1995.
- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**. 24, 22-26, 2008.
- GREENHALGH, K.; MEYER, K. M.; AAGAARD, K. M.; WILMES, P. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. **Environmental Microbiology**. 18, 2103-2116, 2016.
- GRIVENNIKOV, S. I.; WANG, K.; MUCIDA, D.; STEWART, C. A.; SCHNABL, B.; JAUCH, D.; TANIGUCHI, K.; YU, G.; ÖSTERREICHER, C. H.; HUNG, K. E.; DATZ, C.; FENG, Y.; FEARON, E. R.; OUKKA, M.; TESSAROLLO, L.; COPPOLA, V.; YAROVINSKY, F.; CHEROUTRE, H.; ECKMANN, L.; TRINCHIERI, G.; KARIN, M. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. **Nature**. 491, 254-258, 2012.
- GUT, A. M.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. **Microbiology**. 164, 1327-1344, 2018.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Reviews in Microbiology**. 54, 641-679, 2000.
- HE, C.; TIANMING, Y.; SHI, Y.; MA, C.; YANG, W.; FANG, L.; SUN, M.; WU, W.; XIAO, E.; GUO, F.; CHEN, M.; YANG, H.; QIAN, J.; CONG, J.; LIU, Z. MicroRNA 301A promotes intestinal inflammation and colitis-associated Cancer development by inhibiting BTG1. **Gastroenterology**. 152, 1434-1448, 2017.
- HE, Y.; NIU, X.; WANG, B.; NA, R.; XIAO, B.; YANG, H. Evaluation of the Inhibitory Effects of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* on the Adhesion of Seven Common Lower Genital Tract Infection-Causing Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. **Frontiers in medicine**. 7, 284, 2020.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. 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**. 11(8), 506-14, 2014.
- HOFFMANN, C.; DOLLIVE, S.; GRUNBERG, S.; CHEN, J.; LI, H.; WU, G. D.; LEWIS, J. D.; BUSHMAN, F. D. *Archaea* and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. **PLoS One**. 17, 8(6), 66019, 2013.
- HOGAN, S. P.; WADDELL, A.; FULKERSON, P. C. Eosinophil in infection and intestinal immunity. **Current Opinion in Gastroenterology**. 29, 7-14, 2012.
- HOHMANN, A. W.; SCHMIDT, G.; ROWLEY, D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. **Infection and Immunity**. 22, 763-770, 1978.

- HOLDMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Anaerobe Laboratory Manual. The Virginia Polytechnic Institute and State. **University Anaerobe Laboratory**. 4, 156, 1977.
- HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**. 535, 75-84, 2016.
- HOOPER, L. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**. 12, 129-134, 2004.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**. 336, 1268-1273, 2012.
- HOYER, L. L.; HAMILTON, A. C.; STEENBERGEN, S. M.; VIMR, E. R. Cloning, sequencing and distribution of the *Salmonella* Typhimurium LT2 sialidase gene, nanH, provides evidence for interspecies gene transfer. **Molecular Microbiology**. 6, 873-84, 1992.
- HU, C. A.; HOU, Y.; YI, D.; QIU, Y.; WU, G.; KONG, X.; YIN, Y. Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. **Animal Nutrition**. 1, 123-127, 2015.
- HUANG, C.; SHI, J.; MA, W.; LI, Z.; WANG, J.; LI, J.; WANG, X. Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. **Food Research International**. 111, 631-641, 2018.
- HUANG, L.; DUAN, C.; ZHAO, Y.; GAO, L.; NIU, C.; XU, J.; LI, S. Reduction of Aflatoxin B1 Toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: A Potential Probiotic Strain Isolated from Chinese Traditional Fermented Food "Tofu". **Public Library of Science**. 12, 109, 2017.
- HURLEY, D.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. *Salmonella*-host interactions and modulation of the host innate immune system. **Frontiers Immunology**. 5, 481, 2014.
- JADHAV, S. R.; SHANDILYA, U. K.; KANSAL, V. K. Exploring the ameliorative potential of probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on dextran sodium sulphate induced colitis in mice. **Journal of Dairy Research**. 80: 21-27, 2013.
- JOHANSSON, M. E.; HANSSON, G. C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **Nature Reviews Immunology**. 16, 639-649, 2016.
- JOHANSSON, M. E.; JAKOBSSON, H. E.; HOLMÉN-LARSSON, J. SCHUTTE, A.; ERMUND, A.; RODRÍGUEZ-PINEIRO, A. M.; ARIKE, L.; WISING, C.; SVENSSON, F.; BACKHED, F.; HANSSON, G. C. Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. **Cell Host & Microbe**. 18, 582-592, 2015.
- JOHANSSON, M. E.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 10, 352-361, 2013.
- JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **Journal of Experimental Medicine**. 180, 15-23, 1994.
- KAMATH, P. S.; PHILLIPS, S. F.; ZINSMEISTER, A. R. Short-chain fatty acids stimulate ileal motility in humans. **Gastroenterology**. 95, 1496-1502, 1988.
- KAPITAN, M.; NIEMIEC, M. J.; STEIMLE, A.; FRICK, J. S.; JACOBSEN, I. D. Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 422, 265-301, 2019.

- KAUR, J.; JAIN, S. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. **Microbiological Research**. 167, 199-210, 2012.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Research & Therapy**. 7, 12-19, 2005.
- KEENEY, K. M.; YURIST-DOUTSCH, S.; ARRIETA, M. C.; FINLAY, B. B. Effect of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. **Annual Review of Microbiology**. 68, 217–235, 2014.
- KEESTRA-GOUNDER, A. M.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Now you see me, now you don't the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. **Nature Reviews Microbiology**. 13, 206-216, 2015.
- KELESIDIS, T.; POTHOUKAKIS, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therapeutic advances in gastroenterology**. 5(2), 111-125, 2012.
- KHAN, M. A.; PHILIP, L. M.; CHEUNG, G.; VADAKEPEEDIKA, S.; GRASEMANN, H.; SWEEZEY, N.; PALANIYAR, N. Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. **Frontier in Medicine**. 13, 5-19, 2018.
- KIMURA, S. Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. **Anatomical Science International**. 93; 23-34, 2018.
- KLEMM, E. J.; GKRANIA-KLOTSAS, E.; HADFIELD, J.; FORBESTER, J. L.; HARRIS, S. R.; HALE, C.; HEATH, J. N.; WILEMAN, T.; CLARE, S.; KANE, L.; GOUDING, D.; OTTO, T. D.; KAY, S.; DOFFINGER, R.; COOKE, F. J.; CARMICHAEL, A.; LEVER, A. M. L.; PARKHILL, J.; MACLENNAN, C. A.; KUMARARATNE, D.; DOUGAN, G.; KINGSLEY, R. A. Emergence of host-adapted *Salmonella enteritidis* through rapid evolution in an immunocompromised host. **Nature Microbiology**. 1, 15023, 2016.
- KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology**. 11, 1551-1557, 2018.
- KOBAYASHI, T.; GLATZ, M.; HORIUCHI, K.; KAWASAKI, H.; AKIYAMA, H.; KAPLAN, D. H.; KONG, H. H.; AMAGAI, M.; NAGAO, K. Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. **Immunity**. 42(4), 756-766, 2015.
- KOMMINENI, S.; BRETL, D. J.; LAM, V. CHAKRABORTY, R.; HAYWARD, M.; SIMPSON, P.; CAO, Y.; BOUSOUNIS, P.; KRISTICH, C. J.; SALZMAN, N. H. Bacteriocin production augments niche competition by *Enterococci* in the mammalian gastrointestinal tract. **Nature**. 526, 719-722, 2015.
- KORPELA, K.; COSTEA, P.; COELHO, L. P.; KANDELS-LEWIS, S.; WILLEMSSEN, G.; BOOMSMA, D. I.; SEGATA, N.; BORK, P. Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. **Genome Research**. 28, 561-568, 2018.
- KUNDU, P.; BLACHER, E.; ELINAV, E.; PETTERSSON, S. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. **Cell**. 171, 1481-1493, 2017.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Journal of Molecular Microbiology**. 73, 331-371, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of clinically important *ascomycetous* yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the

- large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology.** 35, 1216-1223, 1997.
- LAWLEY, T. D.; WALKER, A. W. Intestinal colonization resistance. **Immunology.** 138, 1-11, 2013.
- LAYTON, A. N.; GALYOV, E. E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine.** 9, 1-17, 2007.
- LEE, E. S.; SONG, E. J.; NAM, Y. D.; LEE, S. Y. Probiotics in human health and disease: from nutraceuticals to pharmaceuticals. **Journal of Microbiology.** 56, 773-782, 2018.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology.** 6, 241-245, 1995.
- LEONEL, A. J.; TEIXEIRA, L. G.; OLIVEIRA, R. P.; SANTIAGO, A. F.; BATISTA, N. V.; FERREIRA, T. R.; SANTOS, R. C.; CARDOSO, V. N.; CARA, D. C.; FARIA, A. M. C.; ALVAREZ-LEITE, J. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. **British Journal of Nutrition.** 109, 1396-1407, 2012.
- LEWIS, A. L.; LEWIS, W. G. Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. **Cellular Microbiology.** 14, 1174-1182, 2012.
- LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C. TURNBAUGH, P.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut. **Science.** 320, 1647-1651, 2008.
- LIAO, S. F.; NYACHOTI, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. **Animal Nutrition.** 3, 331-343, 2017.
- LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clinical Microbiology Reviews.** 19, 315-337, 2006.
- LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology.** 13, 448-453, 1978.
- LLOYD, M. M.; VAN REYK, D. M.; DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. Hypothiocyanous acid is a more potent inducer of apoptosis and protein thiol depletion in murine macrophage cells than hypochlorous acid or hypobromous acid. **Biochemical Journal.** 414, 271-280, 2008.
- LU, J. T.; XU, A. T.; SHEN, J.; RAN, Z. H. Crosstalk between intestinal epithelial cell and adaptive immune cell in intestinal mucosal immunity. **Journal of Gastroenterology & Hepatology.** 32, 975-980, 2017.
- LUCAS, R. L.; LOSTROH, C. P.; DIRUSSO, C. C.; SPECTOR, M. P.; WANNER, B. L.; LEE, C. A. Multiple factors independently Regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology.** 182, 1872-1882, 2000.
- LYNCH, M. F.; BLANTON, E. M.; BULENS, S.; POLYAK, C.; VOJDANI, J.; STEVENSON, J.; MEDALLA, F.; BARZILAY, E.; JOYCE, K.; BARRET, T.; MINTZ, E. D. Typhoid fever in the United States, 1999-2006. **Journal of the American Medical Association.** 302, 859-865, 2009.
- MABBOTT, N. A.; DONALDSON, D. S.; OHNO, H.; WILLIAMS, I. R.; MAHAJAN, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology.** 6, 666-677, 2013.

- MAGER, W. H.; WINDERICKX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. **Trends in Pharmacological Sciences**. 26(5), 265-73, 2005.
- MAGNUSSON, K. E.; STJERNSTROM, I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (sIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of *Salmonella* with intestine and granulocytes. **Immunology**. 45, 239-248, 1982.
- MAHARSHAK, N.; HUH, E. Y.; PAIBOONRUNGRUANG, C.; SHANAHAN, M.; THURLOW, L.; HERZOG, J.; DJUKIC, Z.; ORLANDO, R.; PAWLINSKI, R.; ELLERMANN, M.; BORST, L.; PATEL, S.; DOTAN, I.; SARTOR, R. B.; CARROLL, I. M. *Enterococcus faecalis* gelatinase mediates intestinal permeability via protease-activated receptor 2. **Infection and Immunity**. 83, 7, 2762-2770, 2015.
- MAIA, O. B.; DUARTE, R.; SILVA, A. M.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology**. 79, 183-189, 2001.
- MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**. 50, 882-889, 2010.
- MANTIS, N. J.; FORBES, S. J. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. **Immunological investigations**. 39(4-5), 383-406, 2010.
- MANTIS, N. J.; ROL, N.; CORTHÉSY, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. **Mucosal immunology**. 4(6), 603-611, 2011.
- MARTINS, A. K. S.; MARTINS, F. S.; GOMES, D. A.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; CARA, D. C.; NARDI, R. M. D.; NICOLI, J. R. Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. **Archives of Microbiology**. 192, 995-1003, 2010.
- MARTINS, F. S.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TIAGO, F. C. P.; MARTINS, A. K. S.; SILVA, F. C. P.; SOUZA, E. L. S.; SOUSA, L. P.; ARAÚJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune response and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**. 301, 359-364, 2011.
- MARTINS, F. S.; RODRIGUES, A. C. P.; TIAGO, F. C. P.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; ARANTES, R. M. E.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in 10 gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**. 56, 352-357, 2007.
- MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. H. F.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**. 191, 623-630, 2009.
- MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. A.; ARANTES, R. M. E.; TIAGO, F. C. P.; SOUZA, L. P.; ARAÚJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial

- translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**. 15, 270-279, 2013.
- MASSEY, V. L.; ARTEEL, G. E. Acute alcohol-induced liver injury. **Frontiers in Physiology**. 3, 193, 2012.
- MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology & Cell Biology**. 78, 67-73, 2000.
- MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**. 489, 231-241, 2012.
- MCCONNELL, R. E.; HIGGINBOTHAM, J. N.; SHIFRIN, D. A.; TABB, D. L.; COFFEY, R. J.; TYSKA, M. J. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. **The Journal of Cell Biology**. 185, 1285-1298, 2009.
- MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cellular Microbiology**. 3, 1-11, 2001.
- MEADOW, L.; SCHNEIDER, H.; BEEN, M. O. *Salmonella enteritidis* bacteremia in childhood. **Journal of Infectious Disease**. 152, 185-189, 1985.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. 1, 135-145, 2001.
- MONTGOMERY, R. K.; MULBERG, A. E.; GRAND, R. J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**. 116, 702-731, 1999.
- MOREIRA, A. P.; TEXEIRA, T. F.; FERREIRA, A. B.; PELUZIO, M. D. O. C.; ALFENAS, R. D. E. C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**. 108, 801-809, 2012.
- MOURA, L. N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal of Microbiology**. 32, 1, 66-69, 2001.
- MULAW, G.; MULETA, D.; TESFAYE, A.; SISAY, T. Protective Effect of Potential Probiotic Strains from Fermented Ethiopian Food against *Salmonella* Typhimurium DT104 in Mice. **International Journal of Microbiology**. 20, e7523629, 2020.
- MUZNY, C. A.; TAYLOR, C. M.; SWORDS, W. E.; TAMHANE, A.; CHATTOPADHYAY, D.; CERCA, N.; SCHWEBKE, J. R. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. **Journal of Infectious Disease**. 220, 1399-1405, 2019.
- NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 39, 13-126, 1999.
- NARDI, R. M.; SILVA, M. E.; VIEIRA, E. C.; BAMBIRRA, E. A.; NICOLI, J. R. Intragastric infection of germfree and conventional mice with *Salmonella* Typhimurium. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 22, 1389-1392, 1989.
- NARDI, R. M.; VIEIRA, E. C.; CROCCO-AFONSO, L. C.; SILVA, M. E.; BAMBIRRA, E. A.; ANDRADE, A. M.; NICOLI, J. R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germfree mice infected with *Salmonella*

- Typhimurium. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. 31, 239-243, 1991.
- NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**. 219, 88-102, 2007.
- NEEDHAM, B. D.; TRENT, M. S. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. 11, 467-481, 2013.
- NEUDECKER, V.; YUAN, X.; BOWSER, J. L.; ELTZSCHIG, H. K. MicroRNAs in mucosal inflammation. Journal of molecular medicine. **Journal of Molecular Medicine**. 95(9), 935-949, 2017.
- NG, K. M.; FERREYRA, J. A.; HIGGINBOTTOM, S. K.; LYNCH, J. B.; KASHYAP, P. C.; GOPINATH, S.; NAIDU, N.; CHOUDHURY, B.; WEIMER, B. C.; MONACK, D. M.; SONNENBURG, J. L. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. **Nature**. 502, 96-99, 2013.
- NISSLE, A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of *E. coli* therapy (mutaflor). **Journal of Medical Physics**. 4, 1017-1022, 1959.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**. 129, 113-139, 2000.
- OBA, S.; WASHIDA, K.; SHIMADA, Y.; SUNAGAWA, T.; TANIHIRO, R.; SUGIYAMA, H.; NAKAMURA, Y. Yeast mannan increases *Bacteroides thetaiotaomicron* abundance and suppresses putrefactive compound production in *in vitro* fecal microbiota fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 84(10), 2174-2178, 2020.
- OGAWA, M.; SHIMIZY, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**. 68, 135-140, 2001.
- OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**. 9, 43- 52, 1999.
- PABST, O.; SLACK, E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. **Mucosal immunology**. 13(1), 12-21, 2020.
- PEARCE, J. L.; HAMILTON, J. R. Controlled trial of orally administered *lactobacilli* in acute infantile diarrhoea. **The Journal of Pediatrics**. 84, 261-262, 1974.
- PEDROSO, S. H.; VIEIRA, A. T.; BASTOS, R. W.; OLIVEIRA, J. S.; CARTELLE, C. T.; ARANTES, R. M.; NICOLI, J. R. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**. 161, 1950-1960, 2015.
- PENDYALA, S.; WALKER, J. M.; HOLT, P. R. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. **Gastroenterology**. 142, 1100-1101, 2012.
- PENG, Z.; WEI, B.; HUANG, T.; LIU, Z.; GUAN, Q.; XIE, M.; LI, H.; XIONG, T. Screening, Safety Evaluation, and Mechanism of *Two Lactobacillus fermentum* Strains in Reducing the Translocation of *Staphylococcus aureus* in the Caco-2 Monolayer Model. **Frontiers in Microbiology**. 11, 566473, 2020.
- PERDIGÓN, C.; ALVAREZ, S.; MACIAS, M. E. N.; ROUX, M. E.; RUIZ-HOLGADO, A. P. The Oral Administration of Lactic Acid Bacteria Increases the Mucosal Intestinal Immunity In Response to Enteropathogens. I. **Journal of Food Protection**. 53, 404-410, 1990a.

- PERDIGÓN, G.; MARCIAS, M. E. N.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A.P. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Research**. 57, 255-264, 1990b.
- PÉREZ-SOTELO, L. S.; TALAVERA-ROJAS, M.; MONROY-SALAZAR, H. G.; LAGUNAS-BERNABÉ, S.; CUARÓN-IBARGÜENGOYTIA, J. A.; JIMÉNEZ, R. M. O.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. 47, 70-75, 2005.
- PHALIPON, A.; CARDONA, A.; KRAEHENBUHL, J. P.; EDELMAN, L.; SANSONETTI, P. J.; CORTHÉSY, B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. **Immunity**. 17(1), 107-115, 2002.
- PHILIPPE, D.; HEUPEL, E.; BLUM-SPERISEN, S.; RIEDEL, C. U. Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. **International Journal of Food Microbiology**. 9, 149:45, 2011.
- PIMENTA P. F., SOUZA W. Cytochemical localization of acid phosphatase in *Leishmania mexicana amazonenses*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. 18, 127-132, 1985.
- PLEASANTS, J. R. Gnotobiotics. E.C. Melby Jr., N.H. Altmann (Eds.). Handbook of Laboratory Animal Science. **CRC Press**. Cleveland, 1, 119-174, 1974.
- PLOVIER, H.; CANI, P. D. Enteroendocrine Cells: Metabolic Relays between Microbes and Their Host. **Endocrine Development**. 32, 139-164, 2017.
- PORTO, B. A. A.; MONTEIRO, C. F.; SOUZA, É. L. S.; LEOCÁDIO, P. C. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GENEROSO, S. V.; CARDOSO, V. N.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; SANTOS, D. A.; SANTOS, J. R. A.; NICOLI, J. R.; PESSIONE, E.; MARTINS, F. S. Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 84, 117-126, 2019.
- PRADHAN, B.; GUHA, D.; NAIK, A. K.; BANERJEE, A.; TAMBAT, S.; CHAWLA, S.; SENAPATI, S.; AICH, P. 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**. 11, 887-904, 2019.
- PRADHAN, D.; NEGI, V. D. Stress-induced adaptations in *Salmonella*: a ground for shaping its pathogenesis. **Microbiological Research**. 229, e126311, 2019.
- QUIGLEY, E. M. M. Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases. **Current Neurology and Neuroscience Reports**. 17, 94, 2017.
- RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain?. **Microbes and Infection**. 3, 1261-1269, 2001.
- RIEDER, R.; WISNIEWSKI, P. J.; ALDERMAN, B. L.; CAMPBELL, S. C. Microbes and mental health: A review. **Brain, Behavior and Immunity**. 66,9-17, 2017.
- RODRIGUES, A. C. P.; NARDI, R. M.; BAMBIRRA, E. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Bacteriology**. 81, 251-256, 1996.

- RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; GARRIDO-MESA, J.; VEZZA, T.; UTRILLA, M. P.; CHUECA, N.; GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; GÁLVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: Impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 61, 129-139, 2018.
- ROGERS, A.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella* versus the Microbiome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 85(1), e00027-19, 2020.
- ROUSSEAU, C.; BOUGUEN, G.; DUBUQUOY, C.; DUBUQUOY, L.; VANDEKERCKOVE, P.; DESREUMAUX, P. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 decreases intestinal pain through PPAR α activation in the gut. **Gastroenterology**. 13, 138-151, 2010.
- ROUSSEL, C.; SIVIGNON, A.; VALLÉE, A.; GARRAIT, G.; DENIS, S.; TSILIA V.; BALLE, N.; VANDEKERCKOVE, P.; VAN-DE-WIELE, T.; BARNICH, N.; BLANQUET-DIOT, S. Anti-infectious properties of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 on enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain H10407. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 102, 6175-6189, 2018.
- RUSSELL, A. B.; WEXLER, A. G.; HARDING, B. N.; WHITNEY, J. C.; BOHN, A. J.; GOO, Y. A.; TRAN, B. Q.; BARRY, N. A.; ZHENG, H.; PETERSON, S. B.; CHOU, S.; GONEN, T.; GOODLETT, A. L.; MOUGOUS, J. D. A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. **Cell Host & Microbe**. 16, 227-236, 2014.
- SABBATINI, S.; MONARI, C.; BALLE, N.; DECHERF, A. C.; BOZZA, S.; CAMILLONI, B.; PERITO, S.; VECCHIARELLI, A. Anti-Biofilm Properties of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 Probiotics against *G. vaginalis*. **Microorganisms**. 8; 294, 2020.
- SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Medical Sciences**. 20, 1119-1124, 2004.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C. **American Society for Microbiology**. 1, 417, 1994.
- SANTARMAKI, V.; KOURKOUTAS, Y.; ZOUMPOPOULOU, G.; MAVROGONATOU, E.; KIOURTZIDIS, M.; CHORIANOPOULOS, N.; TASSOU, C.; TSAKALIDOU, E.; SIMOPOULOS, C.; YPSILANTIS, P. Survival, Intestinal Mucosa Adhesion, and Immunomodulatory Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains. **Current Microbiol.** 74(9), 1061-1067, 2017.
- SATOH-TAKAYAMA, N.; VOSSHENRICH, C. A.; LESJEAN-POTTIER, S.; SAWA, S.; LOCHNER, M.; RATTIS, F.; MENTION, J.; THIAM, K.; CERF-BENSUSSAN, N.; MANDELBOIM, O.; EBERL, G.; DI-SANTO, J. P. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. **Immunity**. 29, 958-970, 2008.
- SCALDAFERRI, F.; PIZZOFERRATO, M.; GERARDI, V.; LOPETUSO, L.; GASBARRINI, A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 46, 12-7, 2012.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**. 17, 7-15, 2011.

- SCHULTZ, M.; STRAUCH, U. G.; LINDE, H.; WATZL, S.; OBERMEIER, F.; GÖTTL, C.; DUNGER, N.; GRUNWALD, N.; SCHÖLMERICH, J.; RATH, H. C. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 11, 372-378, 2004.
- SEISHIMA, R.; BARKER, N. A contemporary snapshot of intestinal stem cells and their regulation. **Differentiation**. 18, 147-156, 2019.
- SELLARS, R. L. Therapeutic Properties of Fermented Milks. **Elsevier**. 1, 81-116, 1991.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **Public Library of Science**. 14, e1002533, 2016.
- SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**. 21(2), 325-32, 2007.
- SERINO, M. Molecular Paths Linking Metabolic Diseases, Gut Microbiota Dysbiosis and Enterobacteria Infections. **Journal of Molecular Biology**. 430(5), 581-590, 2018.
- SERTEYN, D.; GRULKE, S.; FRANCK, T.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; DEBY-DUPONT, G. Neutrophil myeloperoxidase, protective enzyme with strong oxidative activities. **Annales de Medecine Veterinaire**. 147, 79-93, 2003.
- SICARD, D.; LEGRAS, J. L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**. 334(3), 229-36, 2011.
- SILVA, L. M.; BOTELHO, A. C.; NACIF-PIMENTA, R.; MARTINS, G. F.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. Structural analysis of the venom glands of the armed spider *Phoneutria nigriventer*: microanatomy, fine structure and confocal observations. **Toxicon**. 51(4), 693-706, 2008.
- SINGH, A.; MASUKU, M. Sampling Techniques & Determination of Sample Size in Applied Statistics Research: an Overview. **International Journal of Economics, Commerce and Management**. 2, 1-22, 2014.
- SMITH, C. L.; GEIER, M. S.; YAZBECK, R.; TORRES, D. M.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. **Nutrition Cancer**. 60, 757-767, 2008.
- SNIFFEN, J. C.; MCFARLAND, L. V.; EVANS, C. T.; GOLDSTEIN, E. J. C. Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. **PLoS One**. 13(12); e0209205; 2018.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**. 11, 227-238, 2013.
- SOUZA, D.; CARA, D.; CASSALI, G.; COUTINHO, S.; SILVEIRA, M.; ANDRADE, S.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**. 131, 1800-1808, 2000.
- SPILLER, R.; PÉLERIN, F.; DECHERF, A. C.; MAUDET, C.; HOUSEZ, B.; CAZAUBIEL, M.; JÜSTEN, P. Randomized double blind placebocontrolled trial of *Saccharomyces cerevisiae* in irritable bowel syndrome: improvement in

- abdominal pain and bloating in those with predominant constipation. **Gastroenterology**. 4, 353-362, 2017.
- SPROCKETT, D.; FUKAMI, T.; RELMAN, D. A. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 15, 197-205, 2018.
- STASIKOWSKA-KANICKA, O.; DANILEWICZ, M.; GLOWACKA, A.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. **Advances in Medical Sciences**. 2, 1-7, 2012.
- STECK, N.; HOFFMANN, M.; SAVA, I. G.; KIM, S. C.; HAHNE, H.; TONKONOGY, S. L.; MAIR, K.; KRUEGER, D.; PRUTEANU, M.; SHANAHAN, F.; VOGELMANN, R.; SCHEMANN, M.; KUSTER, B.; SARTOR, R. B.; HALLER, D. *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. **Gastroenterology**. 141(3), 959-71, 2011.
- STEINBERG, R. S.; SILVA, L. C.; SOUZA, T. C.; LIMA, M. T.; OLIVEIRA, N. L.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M.; MIYOSHI, A.; NICOLI, J. R.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C. Safety and protective effectiveness of two strains of *Lactobacillus* with probiotic features in an experimental model of salmonellosis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 11(9), 8755–8776, 2014.
- STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**. 83, 209-215, 1985.
- SUÁREZ, J. E. Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics. **Nutrición Hospitalaria**. 31, 13-19, 2015.
- TANG, T.; CHENG, A.; WANG, M.; LI, X. Reviews in *Salmonella* Typhimurium PhoP/PhoQ two-component regulatory system. **Reviews in Medical Microbiology**. 24, 18-21, 2013.
- TAP, J.; MONDOT, S.; LEVENEZ, F.; PELLETIER, E.; CARON, C.; FURET, J. P.; UGARTE, E.; MUNÓZ-TAMAYO, R.; PASLIER, D. L. E.; NALIN, R.; DORE, J.; LECLERC, M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**. 11, 2574-2584, 2009.
- TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**. 22, p. 107-138, 2002.
- TERCIOLO, C.; DAPOIGNY, M.; ANDRE, F. Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. 12, 67-82, 2019.
- THAISS, C. A.; ZMORA, N.; LEVY, M.; ELINAV, E. The microbiome and innate immunity. **Nature**. 535, 65-74, 2016.
- TIAGO, F. C. P.; MARTINS, F. S.; SOUZA, E. L. S.; PIMENTA, P. F. P.; ARAUJO, H. R. C.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L.; NICOLI, J. R. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **Journal of Medical Microbiology**. 61(9), 1194-1207, 2012.
- TONUCCI, L. B.; SANTOS, K. M. O.; FERREIRA, C. L. L. F.; RIBEIRO, S. M. R.; OLIVEIRA, L. L.; MARTINO, H. S. D. Gut microbiota and probiotics: Focus on diabetes mellitus. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 57, 2296-2309, 2017.

- TRINDADE, L. M.; MARTINS, V. D.; RODRIGUES, N. M.; SOUZA, E. L. S.; MARTINS, F. S.; COSTA, G. M. F.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; FARIA, A. M. C.; CARDOSO, V. N.; MAIOLI, T. U.; GENEROSO, S. V. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial Microbes**. 9(3), 477-486, 2018.
- TSOLIS, R. M.; XAVIER, M. N.; SANTOS, R. L.; BÄUMLER, A. J. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. **Infection and Immunity**. 79, 1806-1814, 2011.
- TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**. 9, 799-809, 2009.
- UNDERHILL, D. M.; ILIEV, I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**. 14, 405-416, 2014.
- VALLANCE, B. A.; DENG, W.; JACOBSON, K.; FINLAY, B. B. Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**. 71, 3443-3453, 2003.
- VAUGHAN, E. E.; MOLLET, B.; VOS, W. M. Functionality of probiotics and intestinal *lactobacilli*: light in the intestinal tract tunnel. **Current Opinion in Biotechnology**. 10, 505-510, 1999.
- VELGE, P.; WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; ABED, N.; BOUMART, Z.; CHAUSSE, A.; GREPINET, O.; NAMDARI, F.; ROCHE, S.; ROSSIGNOL, A. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology**. 1, 243-258, 2012.
- VIANA, M. L.; SANTOS, R. G.; GENEROSO, S. V.; ARANTES, R. M.; CORREIA, M. I.; CARDOSO, V. N. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**. 26, 218-223, 2010.
- VIECO-SAIZ, N.; BELGUESMIA, Y.; RASPOET, R.; AUCLAIR, E.; GANCEL, F.; KEMPF, I.; DRIDER, D. Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. **Frontiers in Microbiology**. 10, 57, 2019.
- VIEIRA, L. Q.; SANTOS, L. M.; NEUMANN, E.; SILVA, A. P.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R. Probiotics protect mice against experimental infections. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 42, 168-169, 2008.
- VILLANI, F.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; SALZANO, G.; MOSCHETTI, G.; COPPOLA, S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**. 25, 179-190, 1995.
- VOGT, S. L.; FINLAY, B. B. Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. **Journal of Travel Medicine**. 24, 39-43, 2017.
- WALKER, A. W.; DUNCAN, S. H.; MCWILLIAM LEITCH, E. C.; CHILD, M. W.; FLINT, H. J. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. **Applied and Environmental Microbiology**. 71, 3692-3700, 2005.
- WANG, L.; LI, L.; LV, Y.; CHEN, Q.; FENG, J.; ZHAO, X. *Lactobacillus plantarum* Restores Intestinal Permeability Disrupted by *Salmonella* Infection in Newly-hatched Chicks. **Scientific reports**. 8(1), 2229, 2018.
- WIJBURG, O. L.; UREN, T. K.; SIMPFENDORFER, K.; JOHANSEN, F. E.; BRANDTZAEG, P.; STRUGNELL, R. A. Innate secretory antibodies protect

- against natural *Salmonella* Typhimurium infection. **The Journal of experimental medicine**. 203(1), 21-26, 2006.
- WILLING, B. P.; VACHARAKSA, A.; CROXEN, M. THANACHAYANONT, T.; FINLAY, B. B. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. **Public Library of Science**. 6, e26988, 2011.
- WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**. 2, 541-546, 2007.
- WLODARSKA, M.; WILLING, B.; KEENEY, K. M.; MENENDEZ, A.; BERGSTROM, K. S.; GILL, N.; RUSSEL, S. L.; VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **Infection and Immunity**. 79, 1536-1545, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO**. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Accessed: August 28, 2020.
- YAMASHITA, T. Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Atherogenesis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. 24, 110-119, 2017.
- YANG, H.; BIERMANN, M. H.; BRAUNER, J. M.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; HERRMANN, M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. **Frontiers in Immunology**. 12, 7:302, 2016.
- YURIST-DOUTSCH, S.; ARRIETA, M. C.; VOGT, S. L.; FINLAY, B. B. Gastrointestinal microbiota-mediated control of enteric pathogens. **Annual Review of Genetics**. 48, 361-382, 2014.
- ZACARIAS, M. F.; SOUZA, T. C.; ZABURL'IN, N.; CARA, D. C.; REINHEIMER, J.; NICOLI, J.; VINDEROLA, G. Influence of Technological Treatments on the Functionality of *Bifidobacterium lactis* INL1, a Breast Milk-Derived. **Probiotic Journal of Food Science**. 82(10), 2462-2470, 2017.
- ZHENG, Y.; VALDEZ, P. A.; DANILENKO, D. M.; HU, Y.; SA, S. M.; GONG, Q.; ABBAS, A. R.; MODRUSAN, Z.; GHILARDI, N.; SAUVAGE, F. J.; OUYANG, W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. **Nature Medicine**. 14, 282-289, 2008.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



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: 224/2019

Título do projeto: Avaliação do potencial probiótico de leveduras e bactérias em modelo experimental de infecção por *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Typhimurium

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Flaviano dos Santos Martins

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 16/09/2019. Validade: 16/09/2019 à 15/09/2024
Belo Horizonte, 16/09/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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