

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Mayra de Freitas Galvão

**ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS DA MICROBIOTA FECAL
HUMANA CONTRA ENTEROPATÓGENOS**

Belo Horizonte

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Mayra de Freitas Galvão

ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS DA MICROBIOTA FECAL
HUMANA CONTRA ENTEROPATÓGENOS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Co-orientador

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Belo Horizonte

2015

Aos meus pais, Manuel e Maria da Aparecida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre iluminando meu caminho, me proporcionando muitas bênçãos e conquistas.

Aos meus pais, Manuel e Cidinha, que, com muito carinho, me apoiaram e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Às minhas irmãs, Marina e Manuelle, pela amizade e incentivo. Ao Lucas, por sempre me apoiar nas minhas escolhas e torcer pelas minhas vitórias.

Ao Prof. Dr. Jacques Nicoli, pela oportunidade de realização deste trabalho, paciência, dedicação e orientação, e por ser para todos nós um grande exemplo de professor e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Flaviano Martins, pela co-orientação e apoio. Às Profas. Dra. Elizabeth Neumann e Dra. Sílvia Moura, pela agradável convivência diária.

À Profa. Dra. Paula Prazeres e ao Prof. Dr. Marcelo Resende, por terem aceitado serem avaliadores desse trabalho e por todas as futuras contribuições, e à Profa. Dra. Sílvia Moura, por ter aceitado o encargo de relatora e suplente na banca examinadora.

Aos colaboradores deste trabalho: Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Dr. Álvaro Cantini Nunes, Msc. Sávio Henrique de Cicco Sande, Dr. Marcelo Resende de Souza, por contribuir com a melhoria da nossa pesquisa.

Aos meus familiares pelo carinho e torcida.

Aos queridos amigos que me acompanharam nesta jornada, pelo ombro amigo nas horas de sufoco e pelos momentos alegres e divertidos: ao Rafa, por ter me trazido para o mundo da Microbiologia e da UFMG, sempre me apoiando, orientando; ao Léo, por toda ajuda, disponibilidade e conselhos; à Silvinha e Yasmin, pelo carinho e apoio.

Aos amigos do LEFM, por terem tornado o dia-a-dia no laboratório divertido e por toda ajuda e incentivo: Carol, Bruno, Camila, Mário, Bruna, Andréa, Keila, Karine, Bárbara.

Às grandes amigas, Adriana, Déborah, Mariana, Mayla, Paula, Marcela, Stéphanie, pela amizade e torcida de sempre, e que mesmo distantes se fizeram presentes.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG pelos ensinamentos. À técnica do nosso laboratório, Clélia N. Silva, e aos bioteristas do Laboratório de Gnotobiologia, Marcelo Gomes e Valner Mussel.

Às agências fomentadoras, por tornarem esse trabalho viável: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG).

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes
- Bruna Bernardo Nascimento

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes
- Msc. Sávio Henrique de Cicco Sandes

Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A microbiota do trato intestinal.....	18
1.1.1 Instalação da microbiota.....	18
1.1.2 Composição da microbiota.....	20
1.1.3 Funções da microbiota.....	23
1.2 Modelo animal gnotobiótico.....	25
1.3 A função de resistência à colonização.....	26
1.4 Substâncias antagonistas produzidas pela microbiota indígena.....	28
1.5 Algumas bactérias patogênicas do trato intestinal.....	30
1.6 O gênero <i>Salmonella</i>	33
1.7 Probióticos e <i>Salmonella</i>	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. METODOLOGIA	39
4.1 Desenho experimental.....	39
4.2 Voluntários.....	40
4.3 Animais.....	40
4.4 Aspectos éticos.....	40
4.5 Micro-organismos patogênicos.....	41
4.6 Padronização do teste de antagonismo <i>ex vivo</i>	41
4.7 Isolamento, caracterização e conservação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana.....	42
4.8 Perfil de colonização dos camundongos isentos de germes com a cultura total cultivável da microbiota dominante fecal humana.....	43

4.9 Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	44
4.10 Atividade antagonista do sobrenadante	44
4.11 Teste de antagonismo <i>in vivo</i>	45
4.12 Desafio.....	46
4.12.1 Determinação da translocação de <i>S. Typhimurium</i> em animais isentos de germes monoassociados.....	46
4.12.2 Avaliações histopatológicas em animais isentos de germes monoassociados e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	47
4.13 Identificação molecular dos isolados.....	47
4.13 Análises estatísticas.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Crescimento dos micro-organismos patogênicos.....	49
5.2 Padronização do teste de antagonismo <i>ex vivo</i>	49
5.3 Isolamento, caracterização e conservação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana.....	53
5.4 Perfil de colonização dos camundongos isentos de germes com a cultura total cultivável da microbiota dominante fecal humana.....	54
5.5 Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	55
5.6 Atividade antagonista do sobrenadante	59
5.7 Teste de antagonismo <i>in vivo</i>	70
5.8 Determinação da translocação de <i>S. Typhimurium</i> em animais isentos de germes monoassociados com isolados fecais humanos selecionados.....	78
5.9 Avaliações histopatológicas em animais isentos de germes monoassociados e desafiados com <i>S. Typhimurium</i>	80
6. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. ANEXOS.....	101

RESUMO

O termo “microbiota indígena” refere-se à população de micro-organismos presentes em condições normais nas superfícies e mucosas de um indivíduo onde desempenha funções fundamentais para a saúde do hospedeiro, entre as quais a resistência à colonização (RC) por patógenos. A RC pode ocorrer pela produção de substâncias antagonistas e/ou pela competição por nutrientes e sítios de ligação. Para identificar as bactérias responsáveis e os mecanismos envolvidos na RC, tem-se utilizado o modelo animal isento de germes (IG), pois estudos *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados para o que ocorre *in vivo*. No presente trabalho, após padronização da metodologia, ensaios de antagonismo *ex vivo* contra sete bactérias enteropatogênicas reveladoras, utilizando fezes de 15 humanos saudáveis, confirmaram que a RC tem variação individual, com sete voluntários (46%) apresentando uma alta RC (seis ou mais reveladoras inibidas), quatro voluntários (27%) com RC intermediária (quatro a cinco reveladoras inibidas) e quatro voluntários (27%) com baixa RC (uma a duas reveladoras inibidas). Utilizando ensaios de antagonismo *in vitro* e com sobrenadante de cultura, 14 bactérias isoladas da microbiota fecal dominante dos voluntários com boa RC foram selecionadas para associação em animais IG. No teste de antagonismo *in vivo* contra *Salmonella enterica* sor. Typhimurium, camundongos monoassociados com as linhagens *Enterococcus hirae* (8.2), *Bacteroides thetaiotaomicron* (16.2) e *Lactobacillus ruminis* (18.1) apresentaram reduções significativas nas contagens fecais do patógeno ao longo do desafio. Após cinco dias de infecção, no grupo 8.2, observou-se redução ($p < 0,05$) na translocação de *S. Typhimurium* para o baço, enquanto no grupo 18.1 houve aumento ($p < 0,05$) da translocação para o fígado. Esses resultados foram confirmados pelas avaliações histopatológicas, em que apenas o grupo 8.2 mostrou evidentes sinais de proteção no íleo e no fígado, em relação aos danos causados pelo desafio com *S. Typhimurium* num grupo controle, enquanto que no grupo 18.1 houve lesões significativamente mais intensas. Concluindo, a partir a microbiota fecal dominante de doadores humanos saudáveis apresentando uma elevada RC e utilizando ensaios *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, foi possível selecionar uma bactéria com um potencial alto de RC.

Palavras-chave: resistência à colonização, microbiota fecal humana, antagonismo, *Salmonella Typhimurium*

ABSTRACT

The term "indigenous microbiota" refers to the population of micro-organisms normally present on the surface and mucosa of an individual, where performs functions essential to the health of the host, including the colonization resistance (CR) by pathogens. The CR may occur due to the production of antagonistic substances and/or the competition for nutrients and binding sites. To identify the bacteria responsible and the mechanisms involved in the CR, the germ-free (GF) animal model has been used, because *in vitro* studies cannot always be extrapolated to what occurs *in vivo*. In the present study, after standardization of the methodology, *ex vivo* antagonism tests against seven enteropathogenic indicator bacteria using feces from 15 healthy human volunteers, confirmed that the CR showed individual variation, with seven volunteers (46%) having a high CR (six or more indicators inhibited), four subjects (27%) an intermediate CR (four to five indicators inhibited), and four subjects (27%) a low CR (one to two indicators inhibited). Using *in vitro* antagonism assays and with culture supernatant, 14 strains isolated from fecal dominant microbiota of volunteers with elevated CR were selected for association in GF mice. In the *in vivo* antagonism assay against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, mice monoassociated with *Enterococcus hirae* (8.2), *Bacteroides thetaiotaomicron* (16.2) and *Lactobacillus ruminis* (18.1) strains had significant reductions in fecal counts of the pathogen during the challenge. After five days of infection, the 8.2 group showed a reduction ($p < 0.05$) in the translocation of *S. Typhimurium* to the spleen, while the 18.1 group had an increased ($p < 0.05$) translocation to the liver. These results were confirmed by the histological data, in which only the 8.2 group showed clear protective signs of ileum and liver, compared to the damage caused by challenge with *S. Typhimurium* in a control group, while in group 18.1 there was significantly more intense lesions. Concluding, from the dominant fecal microbiota from healthy human donors having a high CR, and using *ex vivo*, *in vitro* and *in vivo* assays, a bacterium with a high CR potential was selected.

Keywords: resistance to colonization, human fecal microbiota, antagonism, *Salmonella Typhimurium*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – *Brain Heart Infusion*
- BHI-S – *Brain Heart Infusion* suplementado
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CD – *Clostridium difficile*
- CP – *Clostridium perfringens*
- CV – Convencional
- DAEC – *Escherichia coli* difusamente aderente
- EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
- EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
- EP – *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
- FAO/WHO – *Food and Agricultural Organization/ World Health Organization*
- G+C – Guanina + Citosina
- GN – Gnotobiótico
- IG – Isento de germes
- IL-8 – Interleucina 8
- LM – *Listeria monocytogenes*

NIH – *National Institute of Health*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PBS – Solução salina tamponada

RC – Resistência à colonização

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

sIgA – Imunoglobulina A secretória

SF – *Shigella flexneri*

SPI-1 – *Salmonella Pathogenicity Island 1*

ST – *Salmonella* Typhimurium

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TI – Trato intestinal

TLR5 – *Toll-like receptor 5*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

VC – *Vibrio cholerae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição e concentração microbiana ao longo do trato gastrointestinal (MOWAT & AGACE, 2014) – modificado.....	22
Figura 2: Organograma.....	39
Figura 3: Cinética de crescimento dos micro-organismos anaeróbios facultativos.....	49
Figura 4: Teste de antagonismo <i>ex vivo</i> em MRS com fezes de um voluntário.....	50
Figura 5: Frequência de antagonismo <i>ex vivo</i> da microbiota fecal humana contra cada bactéria reveladora.....	53
Figura 6: Frequência de antagonismo <i>in vitro</i> dos isolados dominantes na microbiota fecal humana contra cada bactéria reveladora.....	57
Figura 7: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 3 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	61
Figura 8: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 8 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	62
Figura 9: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 9 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	63
Figura 10: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 15 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	64

Figura 11: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 16 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	65
Figura 12: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 17 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	66
Figura 13: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 18 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	67
Figura 14: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 19 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	68
Figura 15: Contagem de <i>S. Typhimurium</i> (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 22 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B).....	69
Figura 16: População fecal (\log_{10} UFC/g) de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 8.2 (A), 8.7 (B) e 15.6 (C).....	74
Figura 17: População fecal (\log_{10} UFC/g) de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 16.1 (A), 16.2 (B) e 16.3 (C).....	75
Figura 18: População fecal (\log_{10} UFC/g) de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 16.5 (A), 17.5 (B) e 18.1 (C).....	76
Figura 19: População fecal (\log_{10} UFC/g) de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 18.3 (A), 18.4 (B) e 22.1 (C).....	77
Figura 20: População fecal (\log_{10} UFC/g) de <i>S. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 22.4 (A) e 22.7 (B).....	78

Figura 21: Translocação (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* para o baço de camundongos IG previamente monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*)..... 79

Figura 22: Translocação (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* para o fígado de camundongos IG previamente monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*)..... 80

Figura 23: Aspectos histológicos dos íleos de camundongos isentos de germes, monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*) e desafiados com *S. Typhimurium*..... 84

Figura 24: Fotomicrografia dos fígados de camundongos isentos de germes, monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*) e desafiados com *S. Typhimurium*..... 86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Teste de antagonismo *ex vivo* pelo método de difusão em camada de meio seletivo e *spread-plate* com as culturas reveladoras (10^6 UFC/mL)..... 51
- Tabela 2:** Teste de antagonismo *ex vivo* pelo método de difusão em ágar MRS com sobrecamada de BHI ou BHI-S semissólido com as culturas reveladoras (10^6 UFC/mL)..... 52
- Tabela 3:** Classificação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana..... 54
- Tabela 4:** Testes *in vitro* de produção de substâncias antagonistas por bactérias isoladas da microbiota dominante fecal humana..... 56
- Tabela 5:** Identificação por sequenciamento do rDNA 16S das bactérias isoladas da microbiota fecal humana e teste de antagonismo *ex vivo* após a monoassociação com camundongos IG, contra a bactéria reveladora *Salmonella* Typhimurium..... 71

1. INTRODUÇÃO

1.1 A microbiota do trato intestinal

1.1.1 Instalação da microbiota

Os micro-organismos recobrem essencialmente todas as superfícies e mucosas do hospedeiro (com exceção dos pulmões e bexiga), sendo que a sua maioria reside no trato intestinal (TI) e constitui um ecossistema complexo composto de elementos bióticos, como essa microbiota residente ou indígena, e elementos abióticos exógenos (alimento ingerido) e endógenos (secreções e células mortas do hospedeiro) (SOMMER & BACKHED, 2013). O termo microbiota foi definido por SAVAGE (1977) como população de micro-organismos presentes em condições normais nas superfícies e mucosas de um indivíduo.

O trato digestivo humano deixando o seu envoltório fetal é estéril e sua colonização ocorre imediatamente após o nascimento (LAWLEY & WALKER, 2012). Humanos recém-nascidos são colonizados inicialmente na passagem pelo canal do parto por micro-organismos locais maternos (por exemplo, vaginais, fecais ou cutâneos) e durante o aleitamento por micro-organismos presentes no leite em quantidade baixas, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (SERVIN, 2004; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2010). Evidências que o contato inicial com esses micro-organismos durante o nascimento é importante para o desenvolvimento do ecossistema intestinal vem do fato que a microbiota das crianças e a microbiota vaginal de suas mães mostram algumas similaridades. Além disso, crianças que nascem por cesariana apresentam composição microbiana diferente daquelas que nascem por parto normal (MANDAR & MIKELSAAR, 1996).

Durante o parto pela via normal, o recém-nascido entra em contato com os ecossistemas vaginal e fecal da mãe, principal doadora dos micro-organismos necessários para implantação do ecossistema intestinal. Posteriormente, os contatos íntimos entre a mãe e o filho devem permitir uma transferência complementar desses componentes microbianos. Aqui, pode ser levantada a questão da “boa qualidade” das mães como fornecedoras de micro-organismos adequados. Para isto, todas elas não deveriam carrear micro-organismos patogênicos e ser somente portadoras daqueles necessários ao suprimento do ecossistema digestivo do filho. O ambiente, a alimentação e outros seres

humanos (médicos, enfermeiras, familiares) são outras fontes suplementares de micro-organismos que podem ser tanto benéficos como nefastos, dependendo das circunstâncias.

Além do tipo de parto (normal ou cesariana), outros fatores que podem influenciar o bom desenvolvimento da colonização intestinal de um recém-nascido são o tipo de amamentação (no peito ou por fórmula), a idade de gestação no parto (prematuro ou a termo), a utilização de antimicrobianos, assim como uma higiene extrema (teoria da higiene) (NICOLI & VIEIRA, 2004). Fatores específicos e fenotipicamente únicos de cada hospedeiro, tais como tensão de oxigênio e potencial redox luminal, pH, composição de enzimas digestivas e secreções biliares, também podem afetar a composição da microbiota no ambiente luminal (SAAVEDRA & DATTILO, 2012).

Devido ao ambiente oxidativo no TI do recém-nascido, os colonizadores primários são bactérias anaeróbias facultativas como *Escherichia coli*, enterococos, estafilococos e estreptococos, que têm o papel de ajustar as condições ambientais, diminuindo a concentração de oxigênio e o potencial de oxirredução para permitir a colonização subsequente por bactérias anaeróbias obrigatórias, como *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp.. Durante o primeiro ano de vida, a composição da microbiota intestinal é simples e varia amplamente entre os indivíduos e ao longo do tempo. O perfil microbiano estabiliza e começa a se parecer com o “estado adulto” quando a criança atinge um a dois anos de idade (SEKIROV *et al.*, 2010).

Essa fase de instalação da microbiota intestinal no recém-nascido é um período crítico durante o qual uma perturbação nesse ecossistema ainda incompleto e pouco funcional pode ser extremamente prejudicial. A aquisição e colonização bacteriana inadequada ou retardada podem levar a perfis microbianos anormais (e certamente irreversíveis), referidos como disbiose. Essa condição tem sido associada com um perfil persistente de anticorpos dependentes de Th2, redução da resposta inflamatória, função da barreira intestinal insuficiente, síntese deficiente de imunoglobulina A secretória (sIgA), pobre tolerância oral, além de condições patológicas como doenças atópicas, obesidade e doença de Crohn (SAAVEDRA & DATTILO, 2012). A ocorrência de combinações de fatores interferentes durante a colonização, como citados acima, pode explicar, em parte, porque indivíduos adultos apresentam microbiota com funcionalidade protetora diferente. Uma colonização rápida comum à cinética correta é, portanto, fundamental para o estabelecimento de um ecossistema microbiano digestivo com uma composição adequada e com as funções potentes que serão descritas a seguir.

No adulto, a microbiota intestinal pode variar quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função da localização transversal e longitudinal no trato digestivo e da idade do hospedeiro (NICOLI & VIEIRA, 2004; ECKBURG *et al.*, 2005). Transversalmente, esta comunidade microbiana pode estar localizada no lúmen intestinal, no muco que recobre o epitélio, nos espaços das criptas de Lieberkühn ou nas diferentes células que revestem o epitélio (NICOLI & VIEIRA, 2004; SERVIN, 2004). Sabe-se que o peso total da microbiota em um adulto humano é estimado em 1,2 Kg e a atividade metabólica exercida por ela é comparável à do fígado, que é o órgão metabolicamente mais ativo do corpo humano (NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT *et al.*, 2006).

1.1.2 Composição da microbiota

O trato intestinal humano abriga uma comunidade microbiana densa e diversa, composta principalmente de bactérias, mas que também inclui archaeas, fungos, vírus e protozoários, estimando-se conter cerca de 100 trilhões de células (10^{14}), superando o número de células do hospedeiro (10^{13}) por um fator de 10 (DAVE *et al.*, 2012). Nesse ecossistema, encontram-se dois grupos microbianos: a microbiota autóctone (normal, indígena ou residente), constituída de micro-organismos sempre presentes em níveis populacionais estáveis em um nicho anatômico específico e em uma determinada época da vida; e a microbiota alóctone (transiente ou passageira), encontrada de maneira esporádica e transitória em qualquer local anatômico, sendo adquiridos via ingestão de alimentos e bebidas, contato, ou provenientes de localizações anatômicas anteriores (SAVAGE, 1977; NICOLI & VIEIRA, 2004).

A composição e a distribuição dessa comunidade ainda não foram totalmente determinadas, já que a maioria das espécies é anaeróbia obrigatória e de difícil cultivo *in vitro*. No entanto, nos últimos anos, a implantação das técnicas de biologia molecular, bem como os avanços no “Projeto Microbioma Humano”, permitiu não somente conhecer melhor essa composição, como também compreender melhor a funcionalidade microbiana no TI (ECKBURG *et al.*, 2005; DETHLEFSEN *et al.*, 2007; DAVE *et al.*, 2012). No total, a microbiota intestinal consiste de aproximadamente 500-1000 espécies que pertencem a apenas alguns dos filos bacterianos conhecidos. Estudos em fezes humanas e amostras de biópsias do cólon revelaram membros de nove filos distintos. Os filos mais abundantes são os Firmicutes e Bacteroidetes, com menor presença de membros dos filos Proteobacteria, Verrumicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria, Spirochaetes e VadinBE97

(BACKHED *et al.*, 2005; ECKBURG *et al.*, 2005; SOMMER & BACKHED, 2013). Em contraste, na biosfera, há um total de 70 filos bacterianos, o que realça o fato de que a microbiota intestinal humana é restrita a um pequeno subconjunto de filos, mas com um elevado grau de riqueza de espécies e abundância dentro deste núcleo de filos constituintes (DAVE *et al.*, 2012).

Dois gradientes de distribuição microbiana podem ser encontrados no trato gastrointestinal: a densidade microbiana aumenta da região proximal para a distal – com 10^2 - 10^3 células microbianas por grama de conteúdo no estômago e duodeno, 10^3 - 10^7 no jejuno e íleo e 10^9 - 10^{12} no cólon – e ao longo do eixo tecido-lúmen, com poucas bactérias aderidas ao tecido e ao muco, mas com um grande número presente no lúmen. Além disso, a diversidade microbiana aumenta conforme a densidade (SEKIROV *et al.*, 2010; MOWAT & AGACE, 2014) (Figura 1).

Os tipos de atmosfera de crescimento das bactérias variam consideravelmente ao longo do intestino delgado. Na parte proximal (duodeno), são encontradas contagens altas de bactérias anaeróbias facultativas, sendo que os anaeróbios obrigatórios são considerados população subdominante, devido à presença de quantidades elevadas de oxigênio. À medida que se percorre o intestino delgado, as populações totais bacterianas vão aumentando e uma inversão dos tipos de atmosfera de crescimento das bactérias é observada (os anaeróbios facultativos inicialmente dominantes passam a ser subdominantes e o fenômeno inverso é observado para os anaeróbios obrigatórios). Na parte distal (íleo) do intestino delgado, os perfis populacionais se assemelham àqueles do intestino grosso e das fezes (GUARNER, 2012; SOMMER & BACKHED, 2013).

A manutenção de níveis baixos das populações bacterianas nas zonas de absorção do intestino delgado é importante para que não haja competição nutricional entre a microbiota e o hospedeiro. Esse nível populacional baixo é controlado por diferentes mecanismos e fatores inerentes a esses órgãos, como: baixo pH, presença de sais biliares, intenso fluxo do conteúdo luminal, presença de sIgA, presença de compostos antimicrobianos como as defensinas, dentre outros (WALTER & LEY, 2011). Já no intestino grosso, especialmente no cólon, o ambiente permite uma maior abundância microbiana devido à baixa concentração de sais biliares, pH menos ácido, baixo peristaltismo, dentre outros fatores (WALTER & LEY, 2011). Estima-se que o cólon sozinho contenha mais de 70% de todos os micro-organismos do corpo humano (LEY, PETERSON & GORDON, 2006).

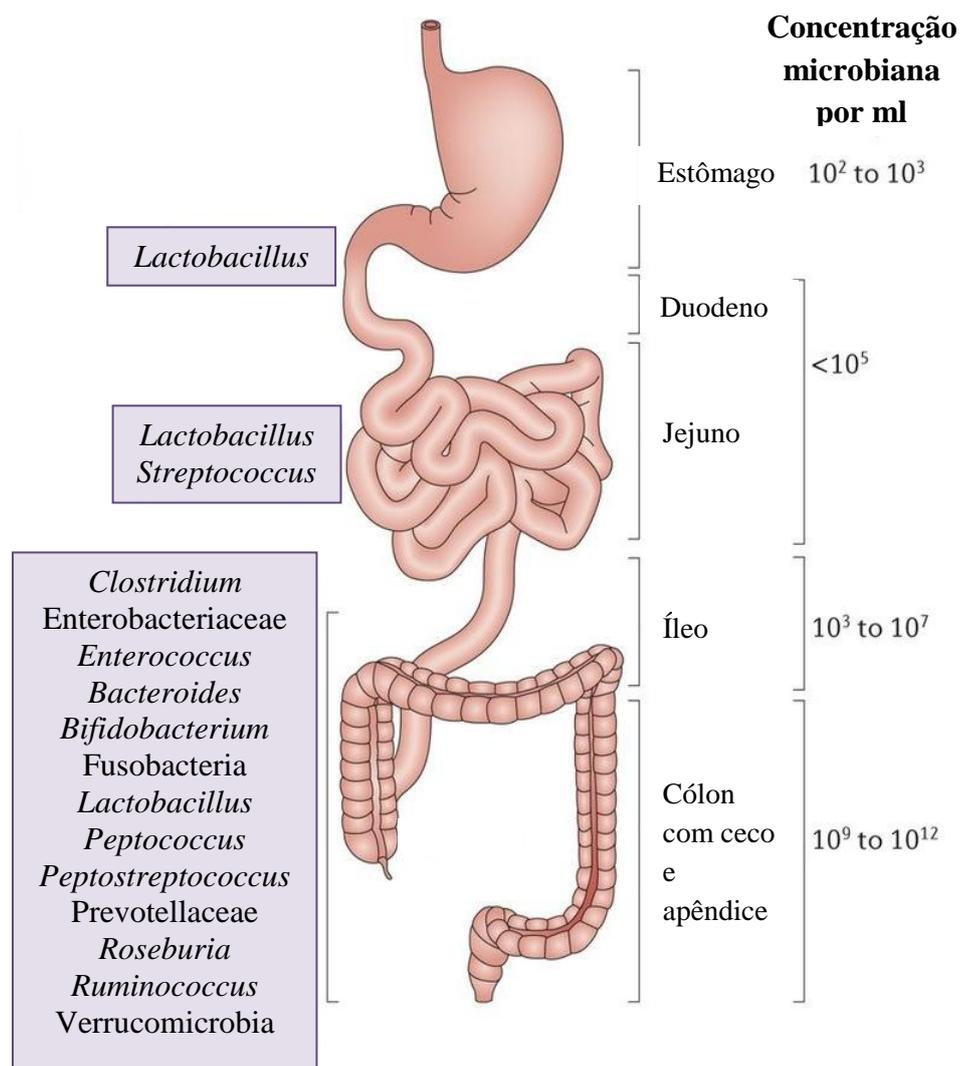


Figura 1: Distribuição e concentração microbiana ao longo do trato gastrointestinal (MOWAT & AGACE, 2014) – modificado.

Três distintos níveis populacionais microbianos podem ser diferenciados no intestino grosso humano: (1) a microbiota dominante (99% da população; 10^9 a 10^{11} UFC/g de conteúdo); (2) a microbiota subdominante (0,99% da população, 10^7 a 10^8 UFC/g de conteúdo) e (3) a microbiota residual (0,01% da população, $< 10^7$ UFC/g de conteúdo) (NICOLI & VIEIRA, 2004). A microbiota dominante é constituída somente por bactérias anaeróbias obrigatórias pertencentes aos filos Actinobacteria (bactérias Gram-positivas com alto conteúdo G+C no genoma), Bacteroidetes (bactérias Gram-negativas) e Firmicutes (bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo G+C no genoma). Já a microbiota subdominante é predominantemente anaeróbia facultativa com componentes pertencentes aos filos Proteobacteria (*E. coli*) e outros Firmicutes (*Enterococcus* spp. e

Lactobacillus spp.). Enfim, a microbiota residual contém uma grande variedade de micro-organismos procarióticos (outras espécies de Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* e *Bacillus*) e eucarióticos (leveduras e protozoários), podendo incluir também componentes potencialmente patogênicos da microbiota como *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens*, etc. (NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT *et al.*, 2006; MARIAT *et al.*, 2009).

Em geral, quanto mais numerosa é a população de uma espécie bacteriana, mais estável ela é no seu nicho ecológico. Por isso, ao nível de gênero, as microbiotas dominantes e subdominantes permanecem relativamente constantes e estáveis no tempo e de um indivíduo para o outro, enquanto que a microbiota residual é extremamente variável. Já ao nível de espécies e linhagens, as populações bacterianas apresentam variações consideráveis, possivelmente como resultado da genética do hospedeiro ou decorrente da colonização inicial (NICOLI & VIEIRA, 2004; DETHLEFSEN *et al.*, 2007). Dessa forma, conclui-se que a microbiota intestinal segue dois padrões de composição: uma variação considerável entre os indivíduos (diversidade inter-individual), enquanto que em um único indivíduo é bastante estável ao longo de períodos prolongados de tempo (estabilidade intra-individual). Flutuações transitórias na composição da microbiota individual podem ocorrer sob algumas circunstâncias como, associadas com doença diarreica aguda, terapia antibiótica ou, em menor grau, induzida por intervenções dietéticas. Contudo, a microbiota tende a voltar para o seu padrão de composição típico, fenômeno que é denominado resiliência (GUARNER, 2012).

1.1.3 Funções da microbiota

A composição da microbiota intestinal dos seres humanos apresenta diferenças interindividuais significativas, embora exista uma comunidade funcionalmente essencial de micro-organismos importantes para a homeostasia do organismo. Tais micro-organismos que interferem na fisiologia do hospedeiro devem estar presentes em quantidades significativas e, por isso, são pertencentes à microbiota dominante ou subdominante (NICOLI & VIEIRA, 2004). Assim, pelo seu tamanho e atividade metabólica, essa comunidade pode ser considerada como um “órgão” fundamental ao seu hospedeiro, responsável por funções metabólicas que as células humanas não são capazes de realizar (GOSALBES *et al.*, 2012).

A microbiota indígena intestinal desempenha funções relevantes para a saúde do hospedeiro as quais podem ser agrupadas em três categorias: (i) função metabólica, (ii) função protetora e (iii) função trófica (GUARNER, 2012).

- (i) Função metabólica: determinadas bactérias da microbiota intestinal são capazes de fermentar oligossacarídeos indigeríveis pelo hospedeiro, polissacarídeos vegetais (fibras), mucinas intestinais e proteínas não digeríveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que, por sua vez, podem ser usados como fonte de energia pelas células do cólon, fígado e músculos (HOLMES *et al.*, 2011). Entre esses ácidos, o butírico é a principal fonte de energia do epitélio intestinal e é relevante na manutenção da saúde do cólon, atuando principalmente sobre os movimentos intestinais e renovação epitelial (WALTER & LEY, 2011). Além disso, a microbiota indígena intestinal está envolvida na síntese de vitaminas K e do complexo B (CONLY *et al.*, 1994). A exemplo disso, os animais isentos de germes requerem 30% a mais de energia na sua dieta comparado com os animais convencionais, sendo necessário, também, a complementação alimentar com vitaminas K e do complexo B para a manutenção do seu peso corporal (ISOLAURI *et al.*, 2004).
- (ii) Função protetora: a presença da microbiota indígena proporciona a proteção do ecossistema contra a implantação de micro-organismos exógenos, fenômeno denominado “resistência à colonização”, sendo esta a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos alóctones e autóctones oportunistas. Essa resistência pode ocorrer devido à produção de substâncias antagonistas como bacteriocinas e ácidos orgânicos, pela competição por nutrientes e sítios de ligação, pelas mudanças no potencial de oxirredução e pH, bem como pela depleção de oxigênio. Ademais, a microbiota atua na imunomodulação do hospedeiro, estimulando o desenvolvimento da imunidade celular e humoral na mucosa intestinal, o que permite uma resposta imune mais rápida e adequada durante uma agressão infecciosa (NICOLI & VIEIRA, 2004; STECHER & HARDT, 2011; SOMMER & BÄCKHED, 2013).
- (iii) Função trófica: a microbiota exerce um importante papel no controle da proliferação e diferenciação de células epiteliais (integridade da barreira da mucosa), na modulação de certas vias neuroendócrinas e na regulação

homeostática do sistema imunológico, além de promover a estabilidade de uma população residente de monócitos e outras células inflamatórias dentro do epitélio e da lâmina própria, que são a linha de frente da resposta imunológica na mucosa intestinal. A microbiota indígena influencia a maturação e o desenvolvimento de órgãos linfóides, como as placas de Peyer; induz uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas e uma maior expressão do receptor poli-Ig na região basal do epitélio da mucosa intestinal, o que acarreta em uma maior concentração de IgA secretória no lúmen (GUARNER, 2012; SOMMER & BÄCKHED, 2013). A alteração dessa microbiota (disbiose) pode refletir no aparecimento de diferentes doenças, variando desde condições psiquiátricas a doenças metabólicas, alergias e autoimunidade (FARTHING, 2004; GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010).

1.2 Modelo animal gnotobiótico

Durante o século XX, os pesquisadores desenvolveram equipamentos e tecnologias apropriados para criar animais experimentais “isentos de germes”, a fim de estudar o impacto da colonização microbiana na fisiologia do hospedeiro. Estes estudos demonstraram que, ao contrário da presunção de Pasteur (1885), a vida dos animais é possível na ausência de colonização microbiana. No entanto, um grande desafio para alcançar a sobrevivência no estado livre de germes foi desenvolver dietas adequadas para atender as necessidades nutricionais na ausência de colonização microbiana (WOSTMANN, 1981). Além disso, os animais isentos de germes não se desenvolveram normalmente em termos de anatomia e fisiologia corporal. Essas descobertas mostraram que a colonização microbiana dos animais pode não ser essencial para a vida, mas a microbiota é crítica para o crescimento e o desenvolvimento normais (GUARNER, 2012).

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

A nomenclatura usada em gnotobiologia é limitada a termos que, por uso geral, é familiar e compreendida pela maioria dos pesquisadores da área. O indivíduo axênico ou isento de germes (IG) é definido como aquele que é livre de toda forma demonstrável de vida aparte da produzida pelo seu próprio protoplasma. A criação de tais indivíduos deve ser feita continuamente em isoladores. O indivíduo gnotobiótico (GN) ou gnotoxênico é aquele inicialmente IG, que é associado intencionalmente somente com um ou mais tipos de micro-organismos previamente caracterizados. Esses animais devem ser também mantidos em isoladores. O indivíduo holoxênico ou convencional (CV) é aquele que apresenta uma microbiota complexa e desconhecida na sua totalidade e é criado sem precauções especiais desde o nascimento (GORDON & PESTI, 1971; GUSTAFSSON, 1984).

Camundongos IG ou GN representam um sistema experimental simplificado para estudar o fenômeno de resistência à colonização e os mecanismos envolvidos no mesmo. Camundongos GN oferecem um potencial considerável como ferramenta no estudo da relação microbiota-hospedeiro porque, além de retratar um hospedeiro livre de germes ou modificado por micro-organismos conhecidos, permite o estudo da relação intermicrobiana dentro do organismo do hospedeiro e pode ser usado no estudo de algum fator exógeno ou endógeno, quando as ações isoladas de tais fatores, afetadas ou não pela microbiota associada no hospedeiro, são de interesse. Esses modelos são importantes, pois o estudo das interações entre linhagens bacterianas *in vitro* nem sempre pode ser extrapolado para o que realmente ocorre - *in vivo* - no trato digestivo de animais (SMITH *et al.*, 2007).

1.3 A função de resistência à colonização

No trato digestivo há uma contínua introdução de inóculos microbianos, patogênicos ou não, carregados com os alimentos e as bebidas ingeridos. Na maioria das vezes, esses inóculos atravessam o trato digestivo sem poder se multiplicar, como consequência do antagonismo e da proteção proporcionado pela microbiota do hospedeiro (NICOLI & VIEIRA, 2004). Este fenômeno foi citado anteriormente como resistência à colonização (RC) (ou efeito de barreira microbiológico), termo que foi introduzido por Van der Waaij *et al.* (1971) para descrever a resistência à fixação de micro-organismos exógenos potencialmente patogênicos.

Embora os mecanismos da RC não estejam totalmente compreendidos, acredita-se que essa barreira mecânica ocorra pela ocupação dos sítios de adesão celulares da mucosa pela microbiota autóctone. Outros mecanismos de proteção também estão envolvidos como a competição por nutrientes disponíveis no meio, a produção de substâncias restritivas (ácidos e metabólitos tóxicos) ao crescimento de bactérias alóctones e a produção de substâncias com ação antimicrobianas (bacteriocinas). Desta maneira, a interferência bacteriana afeta tanto bactérias patogênicas como comensais, uma vez que inibe o crescimento de bactérias normalmente residentes mantendo-as em baixos níveis no trato gastrointestinal. Ressalta-se, no entanto, que a RC nem sempre é eficaz, e as espécies invasoras são por vezes capazes de competir com a microbiota, atingir números suficientes para a colonização do intestino, e causar doença (MALTBY *et al.*, 2013).

Diversos critérios e termos podem definir a RC. Quando uma bactéria exógena, chamada de linhagem alvo, é confrontada a uma barreira constituída de uma ou várias bactérias da microbiota indígena (linhagens inibitórias, da microbiota dominante ou subdominante), várias situações podem ocorrer: (i) RC drástica, quando as linhagens inibitórias eliminam totalmente a linhagem alvo; (ii) RC permissiva, quando a linhagem alvo não é totalmente eliminada e permanece em níveis populacionais baixos no ecossistema digestivo, condição responsável pelo quadro de “portador sadio” e pela presença das populações residuais na microbiota indígena; (iii) RC curativa, quando a linhagem alvo é eliminada ou reprimida pela(s) linhagem(ns) inibitória(s) independentemente da ordem de administração das linhagens; e (iv) RC preventiva, quando a proteção ocorre com a linhagem alvo entrando no ecossistema digestivo depois da(s) linhagem(ns) inibitória(s). Dependendo das espécies bacterianas presentes, a RC pode ser intraespecífica se linhagens alvo e inibitória(s) pertencem ao mesmo gênero ou espécie, ou interespecífica se são de gêneros diferentes. Enfim, a RC contra uma bactéria alvo pode ser resultante da atuação de uma única bactéria inibitória ou de uma associação de um pequeno grupo delas, individualmente inativas (NICOLI & VIEIRA, 2004).

Na literatura científica, não há muitas informações sobre a identidade das bactérias responsáveis pela RC na microbiota fecal humana ou de animais. Os poucos dados foram obtidos com o uso do modelo animal GN que, como salientado anteriormente, é fundamental para este tipo de estudos. Assim, foi demonstrado que uma associação de amostras de *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Fusobacterium necrogenes* da microbiota fecal de camundongos antagonizavam juntas *Clostridium perfringens* em animais gnotobióticos. Quando monoassociadas separadamente a camundongos GN as duas

amostras bacterianas não apresentavam mais atividade inibitória (YURDUSEV *et al.*, 1989). De maneira similar, camundongos GN triassociados com amostras de *B. thetaiotaomicron*, *F. necrogenes* e *Clostridium* sp. isoladas de leitões foram protegidos por RC contra desafios patogênicos com *C. perfringens* A, B, C e D. Curiosamente, a RC foi menos eficiente quando ratos GN foram utilizados (YURDUSEV *et al.*, 1987).

Ruminococcus gnavus, bactéria anaeróbia obrigatória Gram-positiva, é uma das espécies presentes no trato digestivo de 90% dos seres humanos. *Ruminococcus gnavus* E1 foi isolada a partir da microbiota fecal dominante de um homem saudável, e inicialmente identificada como *Peptostreptococcus* sp. Em monoassociação com ratos GN, a linhagem E1 produziu um composto antimicrobiano dependente de tripsina capaz de prevenir a colonização posterior por *C. perfringens* tipo A (NICOLI *et al.*, 1992; RAMARÉ *et al.*, 1993).

Silva *et al.* (2001) avaliaram a frequência de aparecimento de halo de inibição *ex vivo* contra *Vibrio cholerae* ao redor de fezes de 92 voluntários humanos com idade entre 4 e 61 anos (chamado de *ex vivo*, para distinguir dos ensaios *in vitro* e *in vivo*). Essa frequência foi de 20,6% para o grupo total com um valor mais elevado em homens (30,8%) quando comparado com as mulheres (7,5%). Esses resultados poderiam explicar porque numa família tendo ingerido uma mesma água contaminada pela bactéria patogênica, alguns poucos membros não desenvolvem a doença. A partir de um doador que apresentou halo de inibição foram isoladas 26 amostras bacterianas aparentemente diferentes, em meio de cultura universal incubado em anaerobiose. Quando essas bactérias foram associadas a camundongos IG, um halo de inibição foi observado ao redor das fezes desses animais GN. Entre os isolados, dois (*Lactobacillus* e *Peptostreptococcus*) foram capazes de inibir separadamente *V. cholerae* tanto em testes *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.

1.4 Substâncias antagonistas produzidas pela microbiota indígena

Os mecanismos que explicam a função de RC exercida pela microbiota indígena podem ser divididos em duas categorias: direto e indireto. O antagonismo direto pode ser obtido pela produção de metabólitos inibitórios (ácidos orgânicos, H₂S e H₂O₂) ou produtos (bacteriocinas) e/ou a competição por nutrientes ou locais de adesão. O antagonismo indireto resulta de alterações da resposta fisiológica do hospedeiro à microbiota indígena que, por sua vez, influencia na composição do ecossistema microbiano, a exemplo da imunomodulação ou da estimulação do peristaltismo (GOMES

et al., 2006). No entanto, os mecanismos pelos quais os componentes da microbiota exercem este efeito de barreira permanecem em grande parte desconhecidos (como nos casos citados anteriormente de efeito de barreira devido a uma associação de bactérias individualmente inativas).

A produção de compostos antimicrobianos por membros de microbiota indígena é, provavelmente, um dos mais importantes mecanismos responsáveis pelo fenômeno de antagonismo. Ainda que a presença desses metabólitos antimicrobianos tenha sido demonstrada *in vitro*, não está claro se eles são produzidos ou têm atividade *in vivo* (SILVA *et al.*, 2001). Por outro lado, como citado anteriormente, Ramaré *et al.* (1993) verificaram a presença de uma substância antimicrobiana do tipo bacteriocina (*bacteriocin-like*) nas fezes de ratos GN monoassociados com um *Peptostreptococcus* sp. de origem fecal humana (posteriormente identificado como *Ruminococcus gnavus*). Essa substância não era produzida *in vitro* em meios de cultura comerciais não suplementados e sua ação somente aparecia nessas condições quando era adicionada a enzima proteolítica tripsina aos meios. Foi demonstrado que o composto inibitório produzido precisava sofrer uma clivagem pela tripsina para se tornar ativo contra várias bactérias Gram-positivas, como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium septicum* e *Clostridium sordelli*. Esse estudo mostrou pela primeira vez a participação ativa do hospedeiro em uma interação bacteriana que ocorria no TI e demonstrou a importância do modelo *in vivo*.

As bacteriocinas são peptídeos com propriedades antimicrobianas, sintetizados ribossomicamente, liberadas no meio extracelular e que apresentam efeito bactericida ou bacteriostático sobre outras bactérias, de mesma espécie (*bacteriocin*) ou de outros gêneros (*bacteriocin-like*) (SETTANNI & CORSETTI, 2008). Essas substâncias exercem papel importante na competição por nichos de algumas espécies bacterianas, podendo conferir vantagens ecológicas em comunidades bacterianas complexas (WHITFORD *et al.*, 2001). Várias são as pesquisas envolvendo essas famílias de bacteriocinas, seus mecanismos de ação e alvos microbianos. Assim, estudos mostram, por exemplo, a ação da turicina, produzida pelo *Bacillus thuringiensis*, um potente inibidor da bactéria oportunista *C. difficile*, e o efeito antagonista mediado pela produção da colicina por amostras de *E. coli* isoladas do TI de mamíferos frente a *E. coli* conhecidamente patogênicas, evidenciando a importante ação desses fatores antimicrobianos na dinâmica populacional intestinal (SCHAMBERGER & DIEZ-GONZALEZ, 2002; REA *et al.*, 2014).

A fermentação de carboidratos pelos micro-organismos no TI resulta na produção de ácidos orgânicos, que torna o ambiente intestinal bastante desfavorável à proliferação de patógenos. Em mamíferos adultos de algumas espécies, o ácido láctico microbiano produzido no estômago e ácidos graxos voláteis produzidos no ceco influenciam o pH do lúmen nestas áreas (SAVAGE, 1987; SERVIN, 2004). Outros ácidos orgânicos de cadeia curta, como o propionato e o butirato, também são importantes na inibição de enteropatógenos como *E. coli* enterotoxigênica, influenciando principalmente a sua capacidade de produção da enterotoxina. Esse estudo também demonstrou a relação direta dessa inibição com a acidificação do meio, onde os resultados se mostraram melhores à medida que o pH do meio era mais ácido (SHIN *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana destes ácidos é devido à drástica redução de pH do meio a valores incompatíveis com o crescimento da maioria dos micro-organismos patogênicos, sendo que as bactérias lácticas resistem bem a estes valores por serem acidófilas. Além disso, esses ácidos na forma não dissociada podem atravessar a membrana celular microbiana e reduzir o pH intracelular, o que irá interferir com importantes funções metabólicas como a translocação de substratos e a fosforilação oxidativa (NARDI *et al.*, 1999).

O crescimento de alguns micro-organismos em condições de aerobiose leva à formação de metabólitos do oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH^-), que são os principais fatores responsáveis pela toxicidade do oxigênio. Como nem todos os micro-organismos sintetizam a enzima catalase, estes podem ser inibidos pelo H_2O_2 produzido. Algumas das possíveis ações deletérias desses radicais livres de oxigênio podem incluir a oxidação dos compostos sulfídricos celulares, a peroxidação de lipídeos de membrana e danos nos ácidos nucleicos (PIARD & DESMAZEAUD, 1991; VANDENBERG, 1993).

1.5 Algumas bactérias patogênicas do trato intestinal

Clostridium difficile é um bacilo formador de esporos, Gram-positivo e anaeróbio obrigatório, componente residual da microbiota fecal em cerca de 5% dos adultos saudáveis (KOVACS & BERK, 2000; SEBAIHIA *et al.*, 2006). No entanto, é o agente mais comumente conhecido causador da diarreia associada ao uso de antibióticos, que se caracteriza por uma inflamação aguda da mucosa intestinal, ocorrendo entre 5 a 20% de pacientes que receberam antibióticos de amplo espectro (KOTOWSKA *et al.*, 2005). Esta complicação foi, inicialmente, considerada como de gravidade média, até a emergência de

colites pseudomembranasas, que ocorriam em pacientes tratados com clindamicina (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2000). Linhagens patogênicas de *C. difficile* produzem duas exotoxinas protéicas, toxina A e toxina B, sendo que a toxina A parece ser a principal causa de injúrias e inflamações intestinais em modelos animal de ileocolites por *C. difficile* (QAMAR *et al.*, 2001). A esporulação e germinação são eventos chaves no ciclo infeccioso do *Clostridium*, sendo os esporos a maior causa de preocupação no âmbito da saúde e ambientes hospitalares, uma vez que eles sobrevivem em superfícies contaminadas por um tempo prolongado, são resistentes a muitos tipos de desinfetantes e são facilmente transmitidos entre os pacientes (SEBAIHIA *et al.*, 2006).

Clostridium perfringens é um bacilo Gram-positivo, esporulado e anaeróbio obrigatório causador de infecções gastrointestinais, também estando relacionado com diarreia associada ao uso de antibióticos. A doença ocorre devido a uma enterotoxina do patógeno, que quando exposta às células intestinais resulta em dano do tecido e secreção de fluidos eletrolíticos (BERKES *et al.*, 2008). *Clostridium perfringens* é também um componente residual da microbiota fecal em cerca de 40% dos adultos saudáveis e representa um típico caso de patógeno oportunista em humanos, sendo um dos mais comuns agentes bacterianos de doenças veiculadas por alimentos (SMEDLEY *et al.*, 2004).

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, que tipicamente coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos com poucas horas após o nascimento (BERGEY, 2005). As linhagens comensais raramente causam doença, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando a barreira gastrointestinal é rompida. No entanto, há alguns clones de *E. coli* altamente adaptados que adquiriram fatores específicos de virulência, os quais conferem uma maior habilidade de adaptar a novos nichos e permite que eles causem um amplo espectro de doenças. A infecção por esses patótipos podem resultar em três síndromes clínicas gerais: doença diarreica/entérica, infecções do trato urinário (ITUs) e sepse/meningite. Entre os patógenos intestinais existem seis categorias bem descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER *et al.*, 2004). EPEC e ETEC são as bactérias mais importantes, em termos de episódios de diarreia no nível global, embora a EHEC venha se tornando mais significativa em países desenvolvidos (BRUNDER *et al.*, 1997).

Listeria monocytogenes é um pequeno bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo e o agente causador da listeriose, uma infecção oportunista de origem alimentar altamente fatal. Mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos em geral são predominantemente afetados, embora a doença também possa desenvolver-se em adultos saudáveis (GAHAN & HILL, 2005). As manifestações clínicas da listeriose invasiva geralmente são graves e incluem sepse, meningite e meningoencefalite, ou infecção dos fetos em mulheres grávidas. As mulheres infectadas com o patógeno durante a gravidez podem desenvolver sintomas semelhantes aos da gripe leve, ou permanecer assintomáticas. No entanto, a infecção do feto pode resultar em aborto ou nascimento do bebê com listeriose neonatal, uma condição conhecida como granulomatose infantiséptica e caracterizada pelo aparecimento de microabscessos granulomatosos disseminados e altas taxas de mortalidade (VAZQUEZ-BOLANDET *et al.* 2001). Além disso, estudos sobre surtos de origem alimentar tem mostrado que a síndrome de gastroenterite febril pode ser a manifestação clínica principal da infecção por *L. monocytogenes* (AURELI *et al.*, 2000).

Salmonella é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo e um dos patógenos entéricos mais frequentes, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos, cuja patogenicidade depende da espécie, tamanho do inóculo, fatores de virulência da linhagem, hospedeiro envolvido e o estado imunológico do paciente (OCHOA & RODRÍGUES, 2005; COBURN *et al.*, 2007). A salmonelose é uma infecção de importância tanto em saúde pública como em saúde animal, devido ao impacto econômico que ocasiona, sendo que, *S. enterica* causa mais de 1,3 bilhões de doenças anualmente (PÉREZ-SOTELO *et al.*, 2005). Sorotipos de *S. enterica* tipicamente patogênicas são adquiridas oralmente, pelo consumo de comida e água contaminadas e, então, colonizam o intestino podendo causar quatro síndromes: febre entérica ou tifoide (doença sistêmica), enterocolite/diarreia, bacteremia ou carreamento assintomático crônico (COBURN *et al.*, 2007; GRASSL & FINLAY, 2008).

Shigella flexneri é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo e um patógeno facultativamente intracelular, responsável pela disenteria bacilar em seres humanos (BERGEY, 2005). A patogênese de *Shigella* centra-se na capacidade deste organismo em invadir o epitélio do cólon onde induz uma grave inflamação da mucosa (PHILPOTT *et al.*, 2000). *Shigella flexneri* é principalmente transmitida entre hospedeiros via rota fecal-oral até seu sítio infeccioso no cólon, onde após se ligar às células epiteliais, induz sua entrada e se replica no citosol da célula hospedeira. A bactéria então se espalha

diretamente para as células epiteliais adjacentes (GORE & PAYNE, 2010). A shigelose é uma doença que se caracteriza por diarreia aquosa, febre, cólicas intestinais violentas e uma descarga de fezes muco-purulentas e sanguinolentas (MATHAN & MATHAN, 1991). A infecção por *Shigella* sp. é um sério problema de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (KOTLOFF *et al.*, 1999; PHILPOTT *et al.*, 2000).

Vibrio cholerae é uma bactéria em forma de bastonete curvo, Gram-negativo, anaeróbio facultativo, móvel por meio de um único flagelo polar e amplamente distribuída em ambientes aquáticos (BERGEY, 2005; ABD *et al.*, 2007). Em humanos, *V. cholerae* pode colonizar a superfície do intestino, onde secreta uma toxina causando a cólera. Desde 1871 já ocorreram sete pandemias de cólera e esta doença tem sido epidêmica no sul da Ásia por pelo menos 1.000 anos. Os surtos estão associados à contaminação de água e comida. A toxina causa a secreção de água e eletrólitos, resultando em uma diarreia aquosa (WIXON, 2000). A probabilidade de se desenvolver a doença depende da concentração do *V. cholerae* ingerido, sendo que, geralmente, esta espécie necessita de uma dose infecciosa alta de, aproximadamente, 10^8 - 10^9 células para causar uma infecção grave (ABD *et al.*, 2007).

1.6 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias pertencentes à classe γ -Proteobacteria, Família Enterobacteriaceae (BERGEY, 2005). A *Salmonella* foi isolada em 1885, pelo patologista Daniel Salmon, e hoje são conhecidos mais de 2500 sorotipos diferentes (JIMÉNEZ & CASTRO, 2003). A maioria dos sorotipos possui um amplo espectro de hospedeiros, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, os dois principais sorotipos transmitidos do animal para o homem. Já os sorotipos *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são restritos aos seres humanos e causam febre tifóide e paratifóide, respectivamente. A taxa de mortalidade em infecções não tratadas por febre tifóide pode ser de 10 a 15%. Em alguns casos, pacientes podem recuperar, mas permanecem como carreadores da bactéria por anos (MASTROENI & GRANT, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as salmonelas estão entre os patógenos que mais causam impacto a saúde da população, estando associadas a surtos e casos esporádicos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Segundo dados do Ministério

da Saúde, no Brasil, de 1999 a 2008 foram registrados 6.602 surtos de DTA, sendo que *Salmonella* spp. foram associadas a 43% dos casos dos quais o agente etiológico foi identificado. Em relação ao impacto econômico, é o gênero bacteriano que ocasiona maiores perdas na indústria avícola (OCHOA & RODRÍGUES, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2011).

A transmissão de *Salmonella* spp. para o homem ocorre, geralmente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados, embora a transmissão pessoa a pessoa possa ocorrer, ou, ainda, pelo contato com animais infectados e ambientes contaminados com matéria fecal (SHINOHARA *et al.*, 2008; MASTROENI & GRANT, 2011). Após sua ingestão e passagem pelo estômago, a *Salmonella* coloniza o intestino, interagindo e translocando através do epitélio intestinal por três rotas possíveis: (i) invasão ativa dos enterócitos, (ii) invasão das células M e (iii) pelas células dendríticas, que intercalam as células epiteliais. As bactérias, aderidas à superfície das células epiteliais, induzem degeneração nas microvilosidades do enterócito. As linhagens virulentas invadem, preferencialmente, as células M, via expressão do sistema de secreção do tipo III, TTSS (*Type Three Secretion System*), codificado pela ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella*, SPI-1 (*Salmonella Pathogenicity Island 1*), que injeta fatores de virulência na célula alvo. O mecanismo de entrada é caracterizado por um profundo rearranjo do citoesqueleto de actina no local onde a bactéria entra em contato com a célula hospedeira (MARTINOLI *et al.*, 2007; GRASSL & FINLAY, 2008).

Em camundongos, *S. Typhimurium* causa uma doença sistêmica similar à febre tifóide causada pela *S. Typhi* em seres humanos, independente da via de infecção. Classicamente, a cinética de infecção em camundongos se caracteriza por quatro fases. A primeira se traduz pela rápida eliminação de bactérias séricas. Durante a semana seguinte à infecção, *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocitárias. Essa fase precede uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento dos PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) de certos patógenos pelas células fagocíticas. Isso resulta na produção de várias citocinas bem como infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos nos locais de inflamação. Na quarta fase de infecção, se instala a defesa inflamatória adquirida, fazendo intervir as células B e T, assim como os fatores humorais que dela decorrem (SALEZ & MALO, 2004; GRASSL & FINLAY, 2008).

A salmonelose experimental em camundongos utilizando *S. Typhimurium* constitui um excelente modelo de estudo, sendo os resultados obtidos geralmente extrapolados para a compreensão de vários aspectos da infecção produzida por *S. Typhi*, cujo hospedeiro

natural é o homem. Em camundongos inoculados intragastricamente, observou-se que o sítio primário da infecção por *S. Typhimurium* é o íleo terminal, onde a bactéria interage, preferencialmente, com as células das placas de Peyer. A entrada bacteriana é seguida de morte das células M. Então, a salmonela move-se lateralmente ao longo da lâmina própria ou invade os folículos, onde se multiplica. Com o tempo, a infecção progride para os linfonodos mesentéricos, chegando ao fígado e baço, onde as bactérias se multiplicam nos macrófagos residentes nestes órgãos. Essa fase é caracterizada por uma rápida multiplicação bacteriana, o que resulta em hepato e esplenomegalia. O crescimento bacteriano no fígado e baço leva a formação de abscessos contendo predominantemente leucócitos polimorfonucleares, lesões estas que acabam por adquirir forma de granulomas com área central de necrose (HOHMANN *et al.*, 1978; NARDI *et al.*, 1991; OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

1.7 Probióticos e *Salmonella*

O cientista russo Elie Metchnikoff, no início do século XX, observou o efeito benéfico resultante da ingestão de bactérias vivas, o que levou ao conceito de probiótico, definido hoje pela FAO/WHO (2002) como, “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (CEAPA *et al.*, 2013). Para ser considerado candidato ao uso probiótico, um micro-organismo não deve ser patogênico; ser, de preferência, específico ao hospedeiro; ser, de preferência, viável e/ou estável em seu veículo; e não ser capaz de transmitir genes de resistência aos antimicrobianos para outros micro-organismos. Os micro-organismos probióticos são, preferencialmente, aqueles nativos ao consumidor alvo por serem assim mais compatíveis e com menor probabilidade de serem reconhecidos como antígenos pelo seu sistema imune (NAGPAL *et al.*, 2012).

A utilização de micro-organismos probióticos tem atraído grande interesse na pesquisa de doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas, tendo a maioria dos ensaios clínicos como finalidade a prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais em adultos e crianças (MOHAMMADI E MORTAZAVIAN, 2011). A produção de substâncias antagonistas, a inibição da adesão ao epitélio, a manutenção da microbiota intestinal indígena e a modulação da imunidade inata e adaptativa são os principais mecanismos de ação dos probióticos no combate às patogenias entéricas. Os principais efeitos benéficos relacionados à modulação do sistema imune envolvem o aumento da produção de sIgA na

luz intestinal, aumento do estímulo à fagocitose do patógeno e modulação da expressão e produção de citocinas – reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentando níveis de citocinas anti-inflamatórias (LEBLANC *et al.*, 2010; CASTILLO *et al.*, 2011; BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012). Já o principal efeito benéfico não relacionado ao sistema imunológico é o antagonismo contra micro-organismos patogênicos, seja por competição por nutrientes, pelo efeito barreira contra a adesão e invasão do epitélio intestinal ou por produção de substâncias antagonistas (HÜTT *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011).

Em relação ao tratamento de salmoneloses, os agentes antimicrobianos são usados rotineiramente como terapêuticos e profiláticos na saúde humana e animal. No entanto, com o crescente aparecimento de linhagens resistentes a drogas, novas alternativas têm sido pesquisadas, tais como o uso de probióticos. O efeito de probióticos em casos de salmoneloses já vem sendo demonstrado há alguns anos. Estudando o efeito protetor de diversos micro-organismos em ensaios laboratoriais, relatou-se, utilizando modelo animal, que probióticos como *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, *Escherichia coli* EMO, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus bulgaricus* conferem um efeito protetor aos camundongos desafiados com *S. Typhimurium* (RODRIGUES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1999; FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011).

Os modelos animais de desafio com *Salmonella* são extremamente importantes para compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos nas doenças causadas por esta bactéria. Eles permitem avaliar possíveis formas de prevenção e tratamento da salmonelose. Um grande número de pesquisas nessa área tem focado no uso do modelo murino desafiado com *S. Typhimurium* e vários resultados apontam efeito protetor de probióticos contra essa infecção.

2. JUSTIFICATIVA

A microbiota indígena intestinal desempenha funções relevantes para a saúde do hospedeiro, das quais podem ser citadas: a contribuição nutricional, a RC e a imunomodulação do hospedeiro. Uma colonização rápida e adequada após o nascimento é fundamental para o estabelecimento de um ecossistema microbiano com as funções potentes, uma vez que essa comunidade, pelo seu tamanho e atividade metabólica, pode ser considerada como um “órgão” essencial ao seu hospedeiro. No nível de gênero, a microbiota dominante e subdominante permanecem relativamente estáveis no tempo e de um indivíduo para o outro. Contudo, no nível de espécies e linhagens podem ocorrer variações consideráveis. Essas variações refletem no fato de que as funções da microbiota não são potencialmente iguais entre os indivíduos, sendo que isto é particularmente observado para a função de RC, uma função fundamental para a proteção e saúde do trato intestinal humano.

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota indígena intestinal por probióticos, pelos efeitos benéficos sobre o hospedeiro, basicamente os mesmos exercidos pela microbiota indígena do corpo humano. Neste sentido, micro-organismos constituintes dessa microbiota são amplamente utilizados como probióticos e vários estudos documentam o seu uso como forma de prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais. Assim, o isolamento e caracterização de bactérias envolvidas na RC da microbiota fecal humana poderiam levar ao desenvolvimento de produtos contendo probióticos. Concomitante a isso, sabe-se que, atualmente, as doenças diarreicas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e o tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) restringe-se ao uso de solução de reidratação oral.

Nesse contexto, portanto, propõe-se avaliar a ocorrência de antagonismo da microbiota fecal humana contra algumas das bactérias enteropatogênicas mais importantes na saúde pública, identificando e caracterizando os micro-organismos dominantes, a fim de selecionar potenciais probióticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de antagonismo da microbiota fecal dominante de humanos saudáveis contra bactérias enteropatogênicas, por ensaios *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo* em camundongos gnotobióticos, a fim de selecionar bactérias com potencial probiótico.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Padronizar a técnica do ensaio de antagonismo *ex vivo* e avaliar a ocorrência de antagonismo da microbiota fecal de humanos saudáveis contra bactérias enteropatogênicas por esse ensaio.

3.2.2 Isolar, caracterizar e identificar, por testes bioquímicos e por sequenciamento, a microbiota fecal dominante de humanos saudáveis.

3.2.3 Avaliar, qualitativamente, a capacidade antagonista *in vitro* das bactérias isoladas da microbiota fecal dominante contra bactérias enteropatogênicas.

3.2.4 Avaliar, quantitativamente, a capacidade antagonista *in vitro* do sobrenadante de culturas bacterianas contra a bactéria reveladora *Salmonella Typhimurium*.

3.2.5 Avaliar a capacidade antagonista *in vivo* de bactérias isoladas, determinando os níveis populacionais de *S. Typhimurium* em amostras fecais de camundongos monoassociados e desafiados com o patógeno.

3.2.6 Para os grupos de camundongos monoassociados que apresentaram antagonismo estatisticamente significativo, determinar a capacidade de translocação de *S. Typhimurium* para o baço e o fígado e comparar aspectos histológicos do íleo e do fígado.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

A Figura 2 abaixo mostra a sequência cronológica dos experimentos.

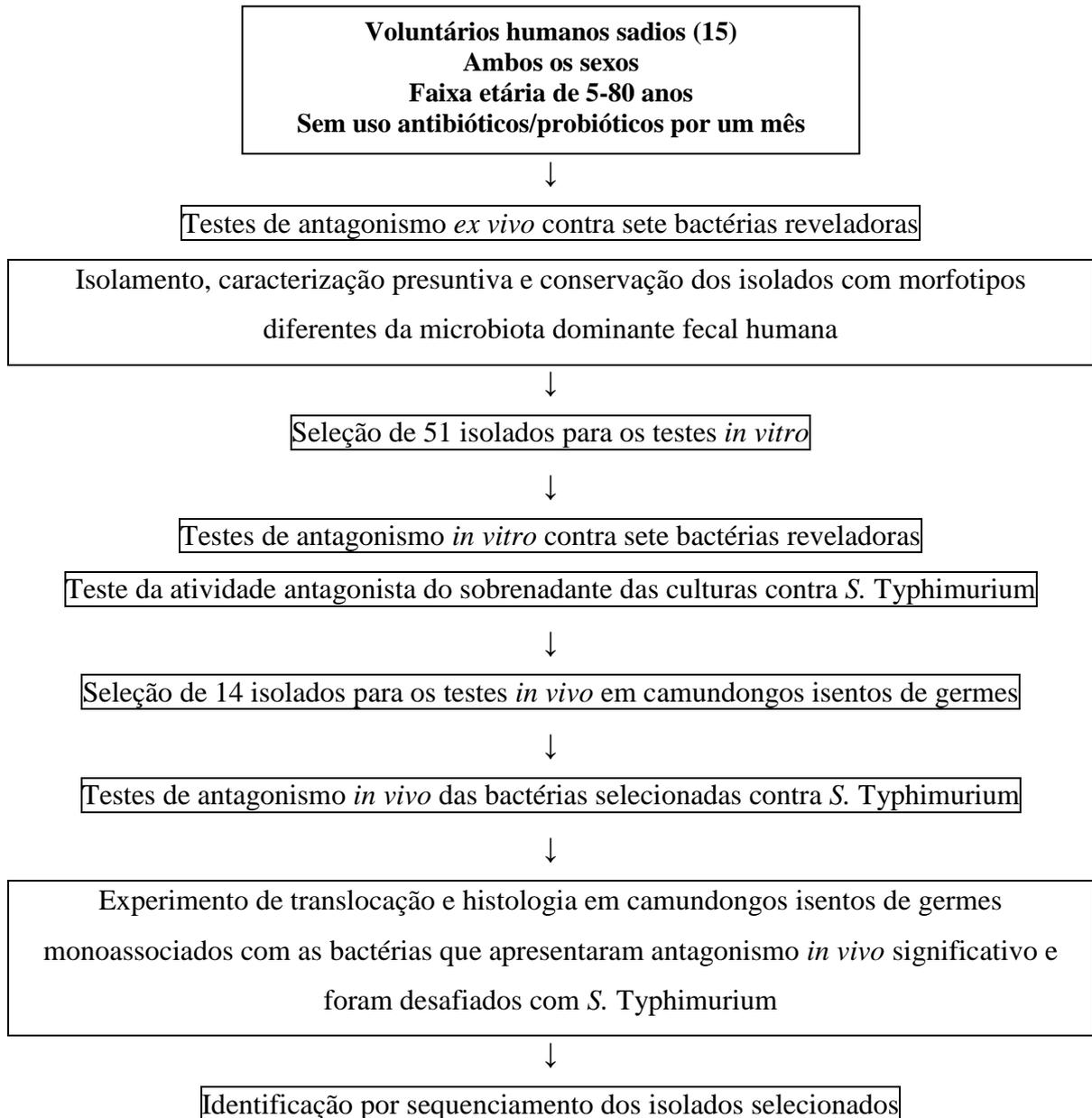


Figura 2: Organograma.

4.2 Voluntários

Amostras fecais foram obtidas de voluntários humanos saudáveis de ambos os sexos, numa faixa etária de 5 a 80 anos, que não haviam utilizado agentes antimicrobianos, outras drogas e/ou probióticos por, pelo menos, um mês antes da coleta. As fezes foram colhidas em um frasco estéril e levadas, no prazo máximo de 1 h, para o LEFM/ICB/UFMG. Cada voluntário preencheu um formulário contendo alguns dados demográficos (endereço, contatos, sexo, idade, profissão, regime alimentar) e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, documento em anexo).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos IG, de 4 a 8 semanas de idade, de ambos os sexos, da linhagem *Swiss NIH* (Taconic, Germantown, EUA). Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sendo mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, EUA) e manuseados de acordo com técnicas já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986).

Para os experimentos, os animais foram mantidos em microisoladores tipo II da marca UNO (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, Holanda) em estante ventilada da marca Alesco, com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por ar condicionado e com um ciclo diurno/noturno de 12 horas. Esses animais experimentais receberam *ad libitum* uma ração sólida autoclavável (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água, esterilizados por calor úmido.

4.4 Aspectos éticos

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA, 2013) e o protocolo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número de Protocolo 118/2014, com validade até 12/08/2019 (documento anexo).

4.5 Micro-organismos reveladores

Foram utilizadas como reveladoras da expressão de antagonismo as linhagens bacterianas *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae*, ambas de origem humana e pertencentes à coleção de cultura do LEFM/ICB/UFMG, e as linhagens de referência de *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) CDC O126, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, todas cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

As bactérias anaeróbias facultativas foram conservadas a -20 °C, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia, Lasing, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. Para os experimentos, as bactérias foram ativadas em caldo BHI, a 37 °C, durante 18 h. As bactérias anaeróbias obrigatórias, *C. difficile* e *C. perfringens*, foram conservadas a -80 °C, em caldo BHI-S (BHI suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 10 µg/mL de hemina e 1 µg/mL de menadiona) (HOLDMAN *et al.*, 1977), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação destas linhagens foi feita em caldo BHI-S, a 37 °C, durante 24-48 h, em câmara de anaerobiose contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂ (Forma Scientific Company, Marietta, EUA).

4.6 Padronização do teste de antagonismo *ex vivo*

O teste de antagonismo *ex vivo* para verificar a presença de substâncias inibitórias difusíveis em amostras de fezes de humanos saudáveis foi realizado pelo método de difusão em camada de gelose (NARDI *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001). Inicialmente, quatro técnicas foram testadas:

- (i) difusão da amostra em camada de ágar bacteriológico e sobrecamada de ágar BHI ou BHI-S semissólido (0,75% de ágar) inoculado com as culturas reveladoras;
- (ii) difusão da amostra em camada de ágar BHI ou BHI-S e inoculação por *spread-plate* das culturas reveladoras;
- (iii) difusão da amostra em camada de meio seletivo (para a cultura reveladora) e inoculação por *spread-plate* das culturas reveladoras, sendo que, os meios utilizados foram: ágar MRS para *L. monocytogenes*, ágar verde brilhante

(BGA) para *S. Typhimurium*, ágar Salmonella Shigella (SS) para *S. flexneri*, ágar TCBS para *V. cholerae*, ágar MacConkey (MC) para *E. coli* e ágar BHI-S para *C. difficile* e *C. perfringens*; e

- (iv) difusão da amostra em camada de ágar MRS (Difco, Detroit, EUA) e sobrecamada de ágar BHI ou BHI-S semissólido inoculado com as culturas reveladoras.

Em todas as técnicas, as amostras de fezes recentemente coletadas de humanos saudáveis (amostras padronizadas para um peso aproximado de 0,5 g) foram incluídas no centro da placa de Petri contendo ágar e as placas foram incubadas por 48 h a 4 °C para difusão de uma possível substância antagonista das fezes. Após a incubação, as células foram mortas por exposição ao clorofórmio por 30 min e as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual. Foi adicionado o inóculo das culturas reveladoras, por *spread-plate* ou adição do meio semissólido contendo 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A seguir, as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 h, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, dependendo da bactéria reveladora e, então, foi efetuada a leitura dos testes avaliando-se a presença ou ausência de halos de inibição ao redor das amostras. O diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital (Digimatic Calipar, Mitutoyo, Japão).

Ao final da análise dos resultados, optou-se por utilizar em todos os ensaios a técnica IV, que apresentou os melhores resultados.

4.7 Isolamento, caracterização e conservação das amostras bacterianas dominantes na microbiota fecal humana

Para obtenção da microbiota fecal dominante humana, uma alíquota da amostra foi introduzida num tubo vazio esterilizado e previamente pesado. Após uma segunda pesagem, foi determinado, por diferença, o peso da amostra fecal. Esse tubo foi introduzido rapidamente em câmara anaeróbia. O conteúdo foi suspenso e homogeneizado em função do peso, numa diluição 10^{-1} em solução salina tamponada (PBS) esterilizada e regenerada (10 min a 100 °C) antes do uso. A partir dessa diluição foram feitas novas diluições decimais no mesmo diluente até 10^{-9} . Em seguida, foi realizado o plaqueamento, pela técnica de *spread-plate*, das diluições 10^{-7} e 10^{-9} em ágar sangue base Brucella suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 10 µg/mL de hemina e 1 µg/mL de menadiona. Após a incubação, a 37 °C, por sete dias, os diferentes morfotipos de colônias

foram isolados e submetidos a uma caracterização por testes morfológicos (coloração de Gram), da catalase e de atmosfera de crescimento. Os isolados de interesse também foram submetidos a testes bioquímicos e fisiológicos usando o sistema VITEK2, conforme metodologia do fabricante (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

Para a determinação da atmosfera de crescimento, as amostras isoladas foram repicadas em ágar sangue suplementado com hemina e menadiona e incubadas a 37 °C, por 48 h nas condições de anaerobiose (câmara anaeróbica), microaerofilia (método da vela em dessecador de vidro) e em aerobiose (estufa bacteriológica). Considerou-se anaeróbia obrigatória a amostra que cresceu somente em condições de anaerobiose; microaerófila, a amostra que cresceu em anaerobiose e em condições de microaerofilia; anaeróbia facultativa a amostra que cresceu nas três condições testadas; e aeróbia a amostra que cresceu apenas em aerobiose.

As linhagens anaeróbias facultativas foram conservadas a -20 °C em caldo BHI, e as anaeróbias obrigatórias foram conservadas a -80 °C em caldo BHI-S, todas adicionadas de 20% de glicerol esterilizado.

4.8 Perfil de colonização dos camundongos isentos de germes com a cultura total cultivável da microbiota dominante fecal humana

Os voluntários 05, 18 e 19 foram inicialmente selecionados para obtenção da microbiota dominante fecal cultivável e posterior colonização dos camundongos IG, a fim de ser realizado um novo isolamento a partir das fezes murinas somente das bactérias que foram capazes de colonizar o TI dos animais.

Alíquotas de fezes dos voluntários foram introduzidas em tubos vazios esterilizados e previamente pesados e, após uma segunda pesagem, foi determinado por diferença o peso da amostra. Esse tubo foi introduzido em câmara anaeróbia e seu conteúdo suspenso e homogeneizado em função do peso, numa diluição 10^{-1} em PBS esterilizada e regenerada (10 min a 100 °C) antes do uso. Em seguida, foram realizadas as diluições decimais e o plaqueamento, pela técnica de *spread-plate*, das diluições 10^{-7} e 10^{-9} em ágar sangue suplementado. Após uma incubação a 37 °C por sete dias, 1 mL de uma solução de PBS esterilizada e regenerada foi aplicada na superfície do ágar na placa com cerca de 100 colônias, que foram raspadas com uma alça de Drigalski para obter uma suspensão dos componentes cultiváveis da microbiota fecal dominante do voluntário. Essa suspensão foi utilizada imediatamente como inóculo para os camundongos IG receptores.

O experimento foi conduzido utilizando um grupo de dois camundongos IG para cada voluntário. Um volume de 0,5 mL da suspensão obtida foi inoculado por via intragástrica em cada animal e, após sete dias da associação, foram coletadas fezes dos camundongos receptores para o isolamento da microbiota dominante. Foi realizado o plaqueamento das diluições 10^{-5} e 10^{-7} das amostras fecais em ágar sangue suplementado, conforme descrito acima para as fezes humanas. Após sete dias de incubação a 37 °C, em anaerobiose, foram obtidos diferentes morfotipos nas placas da diluição 10^{-7} que foram caracterizados como indicado no item 4.7.

4.9 Teste de antagonismo *in vitro*

O teste de antagonismo *in vitro* para verificar a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla (NARDI *et al.*, 1999). Para essa etapa foram selecionadas apenas as bactérias isoladas no item 4.7 de voluntários que apresentaram halos de inibição contra pelo menos cinco bactérias reveladoras no teste de antagonismo *ex vivo* descrito no item 4.6.

Uma micro-gota de 5,0 µL da cultura de cada isolado cultivado em caldo BHI-S ou MRS por 24-48 h, a 37 °C, em anaerobiose ou aerobiose, foi colocada no centro da placa contendo ágar MRS. Após incubação a 37 °C, por 48 h, em anaerobiose ou aerobiose, foi colocado 1,0 mL de clorofórmio em cada tampa com as placas em posição invertida. Após 30 min, as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de 4,0 mL de ágar BHI (para reveladores anaeróbios facultativos) ou BHI-S (para reveladores anaeróbicos obrigatórios) semissólido, inoculado com 10^6 UFC/mL da linhagem reveladora foi colocada sobre o ágar MRS. Após incubação a 37 °C, por 24-48 h, foi efetuada a leitura dos testes, avaliando-se a presença ou ausência de halos de inibição ao redor do *spot*, independentemente do seu tamanho. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo feitas duas repetições, e o diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital.

4.10 Atividade antagonista do sobrenadante

A atividade antagonista do sobrenadante não-concentrado das culturas testadas no item 4.9 foi avaliada pelo método proposto por Hütt *et al.* (2006), a fim de verificar a importância das substâncias inibitórias secretadas no antagonismo contra *S. Typhimurium*.

As bactérias produtoras foram cultivadas em caldo BHI-S e em caldo MRS por 24-48 h, a 37 °C, em condições de anaerobiose. Após centrifugação das culturas a 5000 rpm por 10 min, os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtros com poros de 22 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Um inóculo de 1% da bactéria reveladora, *S. Typhimurium*, crescida em caldo BHI a 37 °C por 24 h, foi adicionado aos microtubos contendo o sobrenadante das culturas bacterianas. Como controle positivo, *S. Typhimurium* também foi adicionada aos caldos BHI-S e MRS. Após 18 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose, foi realizado o plaqueamento em ágar BHI, pela técnica de microgotas (MORTON, 2001), para determinação do número de células viáveis da bactéria reveladora. Além disso, foi realizada a leitura do pH do sobrenadante de MRS e de BHI-S antes (controle) e após o crescimento das culturas produtoras. O experimento foi realizado em triplicatas e com, pelo menos, duas repetições.

4.11 Teste de antagonismo *in vivo*

Para essa etapa foram selecionadas apenas as bactérias que apresentaram halos de inibição contra pelo menos cinco bactérias reveladoras, conforme determinado no teste de antagonismo *in vitro* descrito no item 4.9. A bactéria *Salmonella Typhimurium* foi utilizada como reveladora por já ser um modelo padronizado *in vivo* pelo nosso grupo. O experimento foi conduzido utilizando grupos de dois a três camundongos IG para cada bactéria isolada. Cada grupo de animais recebeu, por gavagem, uma dose única de 0,1 mL contendo 10⁹ UFC/mL da bactéria. O sucesso da monoassociação foi avaliado pela determinação dos níveis populacionais das bactérias monoassociadas nas fezes dos camundongos após 5 e 7 dias da gavagem, pelo plaqueamento por *spread-plate* em ágar BHI-S e incubação a 37 °C em anaerobiose.

Após sete dias de associação, os grupos de animais GN receberam 0,1 mL de uma suspensão contendo 10⁴ UFC da bactéria reveladora *S. Typhimurium* por gavagem. Como grupo controle, animais IG que não foram monoassociados, receberam o inóculo com o patógeno. Logo após a inoculação e nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 10, fezes foram colhidas por estimulação anal, sendo, então, pesadas e suspensas em solução salina 0,9% (numa diluição 10⁻¹) e homogeneizadas. A partir dessa diluição foram feitas novas diluições decimais no mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas por *spread-plate* em ágar Mac Conkey (Acumedia, Lasing, EUA), para enumeração da bactéria patogênica reveladora, e em ágar MRS acrescido de gentamicina

(32 µg/mL), para enumeração da bactéria monoassociada, quando esta era resistente ao antibiótico. As placas foram incubadas a 37 °C durante dois dias, em aerobiose ou anaerobiose. Os resultados foram expressos como média do log₁₀ do número de UFC por grama de fezes (MARTINS *et al.*, 2010).

Além disso, antes e após a monoassociação com as bactérias selecionadas, amostras fecais (10 mg) dos animais GN foram colhidas para o teste de antagonismo *ex vivo* contra *S. Typhimurium*, conforme descrito no item 4.6 (técnica IV).

4.12 Desafio

Os grupos que apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nos níveis populacionais do patógeno nas amostras fecais (item 4.11), foram selecionados para avaliações histológicas e determinação da translocação.

Grupos de quatro a cinco animais monoassociados por sete dias com as bactérias selecionadas e o grupo controle sem monoassociação receberam no dia do desafio um inóculo de 0,1 mL contendo 10⁴ UFC de *S. Typhimurium* crescida por 18 h, a 37 °C, por via intragástrica. A confirmação da viabilidade do inóculo foi feita em ágar MacConkey após 24 h de incubação a 37 °C, em aerobiose (MARTINS *et al.*, 2010). Após cinco dias de desafio com o patógeno, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.12.1 Determinação da translocação de *S. Typhimurium* em animais isentos de germes monoassociados

Amostras de baço e fígado foram pesadas e submetidas a diluições decimais em salina peptonada esterilizada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas foram plaqueadas em ágar MacConkey e incubadas por 24 h a 37 °C, em aerobiose, para enumeração de *S. Typhimurium*. Os resultados foram expressos como média do log₁₀ do número de UFC por grama de órgão de quatro animais de cada grupo experimental (MARTINS *et al.*, 2007).

4.12.2 Avaliações histopatológicas em animais isentos de germes monoassociados e desafiados com *S. Typhimurium*

Os órgãos (íleo e fígado) foram retirados após abertura da cavidade abdominal e lavados em PBS. O processamento do íleo foi realizado de acordo com o método descrito por Calvert *et al.* (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997). Seguindo essa metodologia, o íleo foi isolado e estendido com a serosa em contato com papel de filtro e aberto pela borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Os órgãos foram transferidos para um recipiente contendo a solução de *Bouin* com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 min 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 (rocambolos), com a parte distal disposta na região central do rolo. Os rolos amarrados com linha e o fígado foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 h.

As amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) no Laboratório de Neuro-Imunopatologia Experimental, onde foram examinadas e documentadas. Os cortes histológicos de fígado e íleo foram examinados em microscópio de luz direta Olympus BX51 e as imagens das regiões de interesse foram obtidas por câmera CoolSNAP-Procf (Megacybernetics) em aumentos de 4 e 10x, por meio de um software de aquisição de imagem Image Pro-Express.

4.13 Identificação molecular dos isolados

Os isolados selecionados para o teste de antagonismo *in vivo* foram identificados por técnicas moleculares. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min, lavadas com 1 mL de água deionizada, suspensas em 1 mL de LiCl 5M e mantidas sob agitação durante uma hora. Em seguida, o material foi novamente centrifugado, o precipitado foi lavado com 1 mL de água deionizada e suspenso em tampão protoplasmático (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de sacarose) adicionado de lisozima (10 mg/mL) e mantido a 37°C durante uma hora. A amostra foi mais uma vez centrifugada e o DNA genômico foi obtido utilizando-se o kit Wizard SV Genomic DNA Purification

System (Promega Corporation, Madison, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O método de identificação baseou-se na análise de similaridade de sequências do DNA ribossomal 16S. A região das amostras foi amplificada utilizando 10 μ mols dos iniciadores 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') descritos por Lane (1991), PCR Master Mix (Promega Corporation) com 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 unidades (U) de *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA. A amplificação se deu ao longo de 35 ciclos (95°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min) após a desnaturação inicial (95°C por 2 min) e finalizada pela extensão final (72°C por 5 min). Os amplicons foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation) e sequenciados no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária, UFMG, usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Carlsbad, EUA) para o sistema de sequenciamento automático ABI3130 (Life Technologies). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas pertencentes a linhagens tipo depositadas no GenBank e no RDP (Ribosomal Database project II - http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA), utilizando nível de significância de 5%.

Os testes aplicados foram:

1 – Teste One-way ANOVA, pós-teste Dunnett: para análises da atividade antagonista do sobrenadante.

2 – Teste t pareado: para análises do antagonismo *in vivo*.

3 – Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey: para análises da translocação de *S. Typhimurium* para baço e fígado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento dos micro-organismos reveladores

Após o cultivo das bactérias reveladoras por 24 h, a 37 °C, em aerobiose ou em anaerobiose, observou-se uma contagem média de 10^8 a 10^9 UFC/mL. A curva de crescimento das bactérias anaeróbias facultativas mostra que após 18 h as culturas se encontram em fase estacionária (Figura 3). Dessa forma, padronizou-se usar as culturas reveladoras nessas condições.

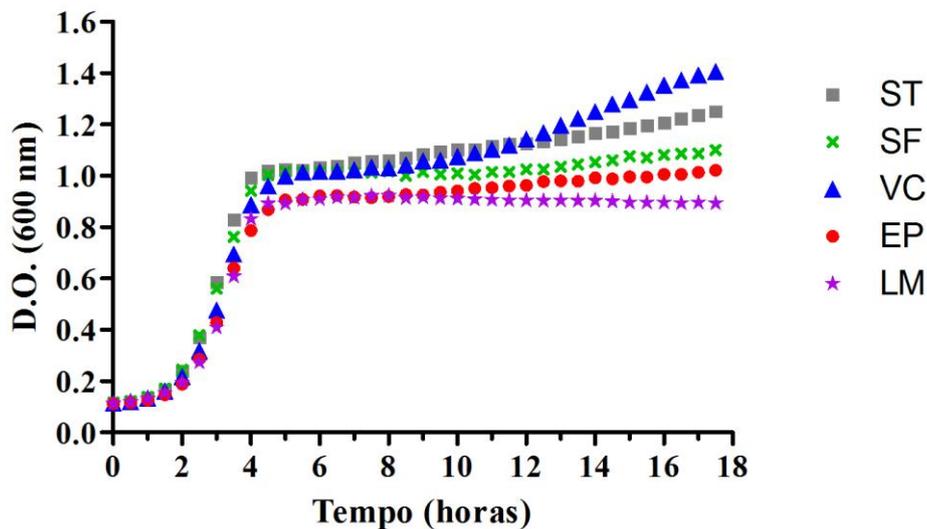


Figura 3: Cinética de crescimento dos micro-organismos anaeróbios facultativos. Legenda: LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, SF = *Shigella flexneri**, VC = *Vibrio cholerae**, EP = *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126. * Linhagens de origem humana pertencentes à coleção de culturas do LEFM.

5.2 Padronização do teste de antagonismo *ex vivo*

Para a padronização do ensaio, foram utilizadas as amostras de fezes de seis dos 15 voluntários. Utilizando as técnicas I e II, não houve caso de inibição. As tabelas 1 e 2 mostram a expressão de halos de inibição observados com o uso das técnicas III e IV, respectivamente. Um exemplo deste antagonismo pela técnica IV é ilustrado na figura 4.



Figura 4: Teste de antagonismo ex vivo em MRS com fezes de um voluntário.

Apenas a técnica IV evidenciou a presença de halos de inibição para todas as bactérias reveladoras e, por isso, foi utilizada para o restante dos voluntários (Tabela 2). Como esperado, os dados mostram uma grande variabilidade na provável capacidade de RC nas fezes dos voluntários testados, com alguns mostrando atividade contra todas as reveladoras (voluntários 8, 15, 16 e 22), enquanto este antagonismo é observado contra somente uma reveladora para outros voluntários (7, 10 e 21). De acordo com a tabela 2, 27% das amostras mostraram atividade antagonista contra as sete bactérias reveladoras, 20% contra seis, 13% contra cinco, 13% contra quatro, 7% contra duas e 20% contra somente uma. A figura 5, baseada nos dados da tabela 2, mostra que, em relação a cada bactéria reveladora, *L. monocytogenes* e *E. coli* enteropatogênica foram inibidas por 80% das amostras, *S. Typhimurium* e *S. flexneri* por 73%, *V. cholerae* por 67%, *C. perfringens* por 47% e *C. difficile* por 40% das amostras.

Sendo assim, padronizou-se usar o ágar MRS como meio de difusão das substâncias antagonistas nos testes *ex vivo*. Esse meio tem a propriedade de acidificar-se devido à presença dos ácidos orgânicos produzidos pelos micro-organismos da amostra, o que pode explicar os melhores efeitos inibitórios. Além disso, nos ensaios de antagonismo

in vitro com micro-organismos isolados, essa técnica já é bem definida e amplamente utilizada.

Para as etapas seguintes de testes *in vitro*, nove voluntários foram selecionados por apresentarem halos de inibição contra pelo menos cinco bactérias reveladoras. Estes foram: 3, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19 e 22 (Tabela 2).

Tabela 1: Teste de antagonismo *ex vivo* pelo método de difusão em camada de meio seletivo e *spread-plate* com as culturas reveladoras (10^6 UFC/mL)

Amostra	LM (MRS)	ST (BGA)	SF (SS)	VC (TCBS)	EP (MC)	CD (BHI-S)	CP (BHI-S)
01	+	+	-	-	-	-	-
03	+	-	-	-	+	-	-
05	+	+	-	-	-	-	-
07	+	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-
19	+	+	-	-	+	-	-

Legenda: (+) = presença de halo de inibição, (-) = ausência de halo de inibição.

LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, SF = *Shigella flexneri**, VC = *Vibrio cholerae**, EP = *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, CD = *Clostridium difficile* ATCC 9689, CP = *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 25723. * Linhagens de origem humana pertencentes à coleção de culturas do LEFM.

Tabela 2: Teste de antagonismo *ex vivo* pelo método de difusão em ágar MRS com sobrecamada de BHI ou BHI-S semissólido com as culturas reveladoras (10⁶ UFC/mL)

Amostra	LM	ST	SF	VC	EP	CD	CP
01	+	+	+	-	+	-	-
03	+	+	+	+	+	+	-
05	+	+	+	-	-	-	+
07	+	-	-	-	-	-	-
08	+	+	+	+	+	+	+
09	+	+	+	+	+	-	+
10	-	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	+	+	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	-	-
18	+	+	+	+	+	+	-
19	+	+	+	+	+	-	-
21	-	-	-	-	+	-	-
22	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) = presença de halo de inibição, (-) = ausência de halo de inibição.

LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, SF = *Shigella flexneri**, VC = *Vibrio cholerae**, EP = *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, CD = *Clostridium difficile* ATCC 9689, CP = *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 25723. * Linhagens de origem humana pertencentes à coleção de culturas do LEFM.

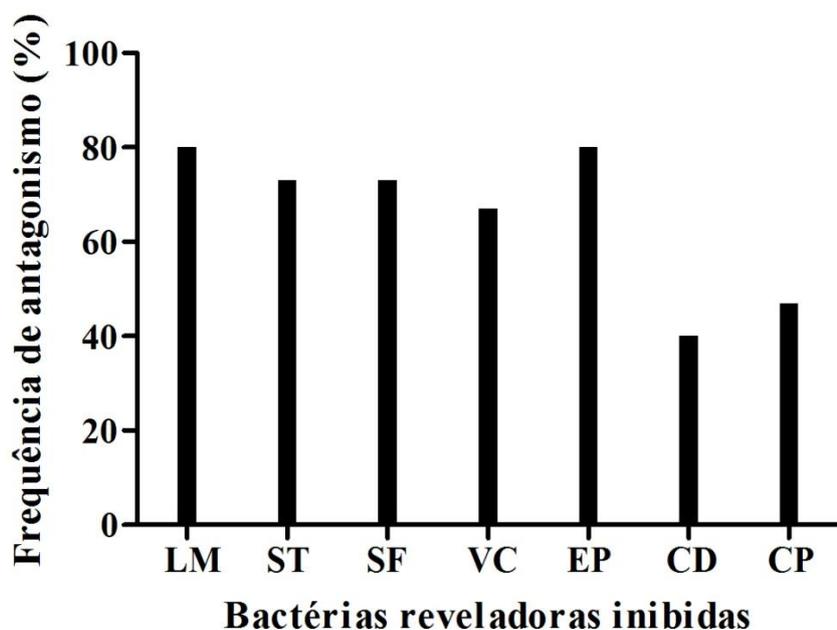


Figura 5: Frequência de antagonismo *ex vivo* da microbiota fecal humana contra cada bactéria reveladora. Legenda: LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, SF = *Shigella flexneri**, VC = *Vibrio cholerae**, EP = *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, CD = *Clostridium difficile* ATCC 9689, CP = *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 25723. * Linhagens de origem humana pertencentes à coleção de culturas do LEFM.

5.3 Isolamento, caracterização e conservação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana

A tabela 3 mostra a classificação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana quanto aos testes de atmosfera de crescimento, de coloração de Gram e da catalase. Algumas bactérias por serem muito sensíveis ao oxigênio não conseguem crescer em meio sólido, portanto, nesse caso, não foi possível realizar o teste da catalase. Para algumas bactérias de interesse foi realizada uma caracterização por testes bioquímicos e fisiológicos pelo sistema VITEK2 (a identificação presuntiva de cada isolado está na tabela em anexo).

A partir das amostras fecais de 15 voluntários, foram obtidos entre quatro a oito morfotipos diferentes de colônias para cada, totalizando 97 isolados, dos quais 3% foram perdidos depois de isolados das placas, provavelmente por serem mais exigentes e não sobreviverem às condições *in vitro*. Em relação à atmosfera de crescimento, 68% dos

isolados foram classificados como anaeróbios obrigatórios, 17% microaerófilos e 15% anaeróbios facultativos; quanto à coloração de Gram, 66% foram Gram-positivos e 34% Gram-negativos; e quanto ao teste da catalase, 21% foram positivos e 79% negativos.

Tabela 3: Classificação dos isolados dominantes na microbiota fecal humana

Teste	Classificação	Número de isolados
Atmosfera de crescimento	Anaeróbio obrigatório	64
	Microaerófilo	16
	Anaeróbio facultativo	14
Coloração de Gram	Positivo	62
	Negativo	32
Catalase	Positivo	17
	Negativo	65
	ND	12

ND: Não determinado

Os resultados aqui apresentados confirmam que a microbiota fecal humana apresenta dois níveis populacionais, similar ao observado nas últimas porções do TI, no qual a microbiota dominante é composta de bactérias anaeróbias obrigatórias e a microbiota subdominante contém, predominantemente, bactérias microaerófilas e anaeróbias facultativas (MACFARLAND, 2000; GUARNER, 2012). Em relação à microbiota fecal dominante, sabe-se que bactérias Gram-negativas são representadas essencialmente pelos gêneros *Bacteroides* e *Fusobacterium*, enquanto *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium* são os principais representantes do grupo de bactérias Gram-positivas (GOMES *et al.*, 2006).

5.4 Perfil de colonização dos camundongos isentos de germes com a cultura total cultivável da microbiota dominante fecal humana

Após o novo isolamento da microbiota dominante das fezes dos camundongos IG receptores, só foram recuperadas bactérias anaeróbias facultativas, identificadas pelo sistema VITEK2 como *Escherichia coli* ou *Enterococcus faecium*. Durante a passagem da microbiota dominante fecal humana cultivável nos camundongos IG, os micro-organismos anaeróbios facultativos se adaptaram melhor às condições no trato gastrointestinal e

prevaleceram sobre os micro-organismos anaeróbios obrigatórios, provavelmente devido à alta concentração de oxigênio num ambiente livre de colonização microbiana. Portanto, decidiu-se utilizar as bactérias que foram isoladas diretamente da amostra fecal humana, sem passar pelos camundongos IG, a fim de estudar uma microbiota dominante mais representativa, como mostrado no item 5.3.

5.5 Teste de antagonismo *in vitro*

A partir dos nove voluntários selecionados (item 5.2), obteve-se um total de 51 bactérias para os testes *in vitro*. Contudo, algumas eram extremamente sensíveis ao oxigênio e/ou não estavam adaptadas para crescer em ágar MRS, assim, nesses casos, não foi possível realizar o teste de antagonismo *in vitro* pelo método de difusão em camada dupla. Tais amostras foram: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 9.1, 9.2, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5, 16.6, 17.2, 17.3, 17.4, 17.7, 18.6 e 19.2.

A tabela 4 mostra a presença dos halos de inibição contra os sete patógenos reveladores, evidenciando, assim, a produção de substância(s) inibitória(s) pelas 28 bactérias avaliadas. Dos 20 isolados (71%) que apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra quatro patógenos ou mais, 16 são bactérias Gram-positivas e apenas quatro são Gram-negativas (16.2, 16.3, 16.5 e 18.3). Entre os oito isolados (29%) que inibiram três patógenos ou menos, seis são bactérias Gram-negativas (8.6, 17.1, 17.6, 19.1, 19.4, 22.3). Curiosamente, os patógenos inibidos por essas seis bactérias Gram-negativas são também Gram-negativos (ST, SF e EP), com exceção do isolado 22.3 que também inibiu CD. Conforme pode ser observado na figura 5, *S. Typhimurium* e *S. flexneri* foram inibidas por 89% dos isolados, *E. coli* enteropatogênica por 82%, *L. monocytogenes* e *V. cholerae* por 46%, *C. difficile* por 50% e *C. perfringens* por 32% dos isolados.

Tabela 4: Testes *in vitro* de produção de substâncias antagonistas por bactérias isoladas da microbiota dominante fecal humana

Isolado (Gram)	LM	ST	SF	VC	EP	CD	CP
8.1 (+)	-	+	+	-	+	+	-
8.2 (+)	+	+	+	+	+	+	+
8.3 (+)	-	-	-	-	-	-	-
8.4 (+)	-	+	+	-	+	+	-
8.5 (+)	+	+	+	-	+	-	-
8.6 (-)	-	+	+	-	+	-	-
8.7 (+)	+	+	+	+	+	-	-
15.6 (+)	+	+	+	+	+	+	+
16.1 (+)	+	+	+	+	+	+	+
16.2 (-)	+	+	+	+	+	-	-
16.3 (-)	+	+	+	+	+	-	-
16.4 (+)	-	+	+	+	+	-	-
16.5 (-)	+	+	+	+	+	-	-
16.7 (+)	-	+	+	-	+	+	-
17.1 (-)	-	+	+	-	-	-	-
17.5 (+)	-	+	+	-	+	+	+
17.6 (-)	-	-	+	-	-	-	-
18.1 (+)	+	+	+	+	+	+	+
18.3 (-)	+	+	+	-	+	+	+
18.4 (+)	+	+	+	+	+	+	+
18.5 (+)	-	+	+	-	-	-	-
19.1 (-)	-	-	-	-	-	-	-
19.4 (-)	-	+	+	-	+	-	-
22.1 (+)	-	+	+	+	+	+	+
22.3 (-)	-	+	-	-	+	+	-
22.4 (+)	+	+	+	+	+	+	-
22.7 (+)	+	+	+	+	+	+	-
22.8 (+)	-	+	+	-	+	-	+

Legenda: (+) = presença de halo de inibição, (-) = ausência de halo de inibição

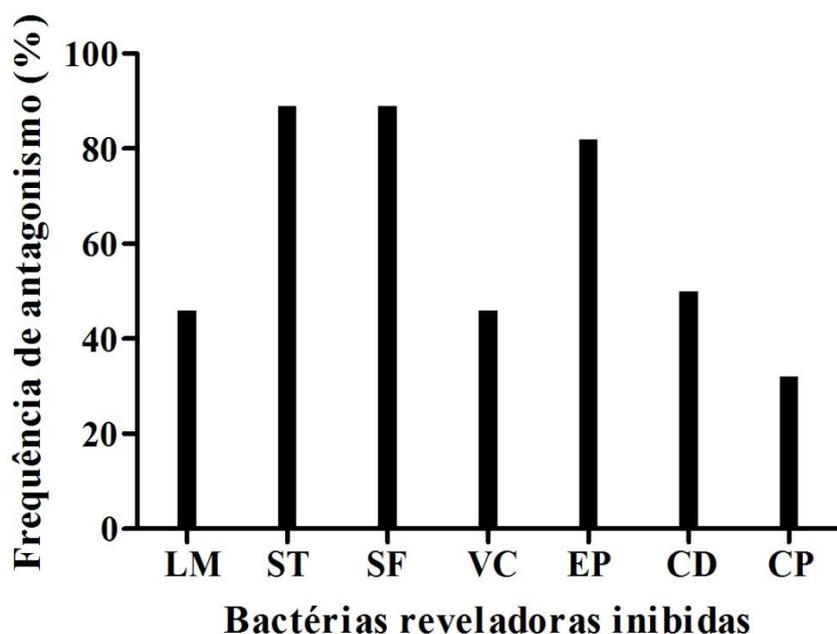


Figura 6: Frequência de antagonismo *in vitro* dos isolados dominantes na microbiota fecal humana contra cada bactéria reveladora. Legenda: LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ST = *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, SF = *Shigella flexneri**, VC = *Vibrio cholerae**, EP = *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, CD = *Clostridium difficile* ATCC 9689, CP = *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 25723. * Linhagens de origem humana pertencentes à coleção de culturas do LEFM.

Os isolados 8.2, 15.6, 16.1, 18.1 e 18.4 apresentaram o maior espectro inibitório, inibindo 100% dos patógenos, enquanto que os isolados 8.3 e 19.1 não inibiram nenhum patógeno. Pode ser observado também que num mesmo voluntário pode existir mais de uma bactéria tendo o mesmo alvo patogênico (por exemplo, no voluntário 18 todas as quatro bactérias 18.1, 18.3, 18.4 e 18.5 inibiram o crescimento de ST e SF). Isto poderia confirmar o conceito ecológico de redundância que no caso de desaparecimento de uma das bactérias protetoras seria compensado pela presença das outras. Interessantemente, três dos isolados bacterianos apresentando a maior capacidade antagonista (8.2, 15.6 e 16.1) correspondem aos voluntários que apresentaram também a melhor capacidade inibitória no teste *ex vivo* (8, 15 e 16). No caso do voluntário 22, a sua capacidade antagonista total poderia ser explicada pela ação complementar dos seus isolados fecais. Contudo, a primeira hipótese não é confirmada no caso do voluntário 18 (que alberga duas bactérias com 100% de capacidade de inibição *in vitro*, mas com 86% de antagonismo *ex vivo*). Mas, isto poderia ser explicado pelo fato de um ensaio positivo *in vitro*, não ser

confirmado *ex vivo* ou *in vivo*, como salientado na introdução dessa dissertação. Uma das explicações é que a produção de compostos antagonistas poderia ocorrer em regiões proximais do TI, com subsequente inativação por enzimas proteolíticas ou substâncias inibitórias (MARTINS *et al.*, 2010). A limitação da extrapolação de dados *in vitro* para *in vivo* vale também para o sentido inverso, como comprovado no trabalho de Ramaré *et al.* (1993). Isto poderia também explicar alguns dados contraditórios no voluntário 19 que apresentou um teste positivo *ex vivo* contra LM e VC, mas não pelas suas bactérias fecais *in vitro*. Enfim, bactérias responsáveis pelo efeito inibitório *ex vivo* contra LM e VC no voluntário 19 podem não ter sido isoladas para poderem ser testadas no ensaio *in vitro*.

A técnica utilizada no presente trabalho permite concluir que as substâncias antimicrobianas produzidas são difusíveis e extracelulares, uma vez que as mesmas difundiram-se no ágar para exercerem seus efeitos sobre as bactérias reveladoras. Entretanto, não foi possível identificar a natureza das substâncias que estariam envolvidas no antagonismo. Assim, os resultados obtidos podem representar a atividade antagonista de uma série de substâncias, atuando separadamente ou em conjunto.

Em um estudo de Gomes *et al.* (2006), bactérias Gram-positivas, isoladas da microbiota fecal dominante de humanos saudáveis, mostraram uma alta frequência de antagonismo *in vitro* contra os enteropatógenos *Salmonella enterica* e *Shigella sonnei*, mas com bastante variação entre os voluntários. Em relação às bactérias Gram-negativas, apenas três, em um total de 143 isolados testados, mostraram atividade antagonista. Esse estudo corrobora com nossos resultados, mostrando que, pelo menos *in vitro*, os componentes Gram-positivos da microbiota fecal dominante apresentam um maior potencial para o antagonismo do que os Gram-negativos.

Um estudo comparativo das propriedades de quatro probióticos mostrou que *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* produziram substâncias antagonistas contra *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. sonnei* e *S. Typhimurium*, sendo que *B. animalis* ainda antagonizou *C. difficile* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já *E. coli* EMO e *S. boulardii* não apresentaram atividade antagonista contra nenhum dos patógenos testados (MARTINS *et al.*, 2009). Esses resultados mostram como o tipo de micro-organismo, ou seja, se é eucariótico ou procariótico, Gram-positivo ou Gram-negativo, pode influenciar nos seus mecanismos benéficos de ação, sendo que, em alguns casos, o fato de não produzir substâncias antagonistas *in vitro* não significa que este micro-organismo não tenha outro mecanismo de ação e possa ser utilizado como um probiótico.

Apesar de existirem dados na literatura mostrando que os resultados de antagonismo *in vitro* não podem ser extrapolados para o antagonismo *in vivo*, estes testes são reconhecidamente úteis quando se deseja fazer uma triagem de possíveis linhagens com potencial uso como probiótico. Além disso, o antagonismo *in vitro* é um dos testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde e da Organização de Agricultura e Alimentos nas Diretrizes para Avaliação dos Probióticos (FAO/WHO, 2002).

5.6 Atividade antagonista do sobrenadante

De acordo com as figuras 7 a 15, a maioria dos sobrenadantes, tanto de BHI-S quanto de MRS, apresentaram reduções sempre significativas ($p < 0,05$) nos pH, mas com variação de intensidade dependendo da bactéria e sempre com um valor final mais baixo no MRS (4,0 a 5,0) quando comparado com o BHI-S (5,5 a 6,5) devido a diferença de pH inicial do meio (5,8 para MRS e 7,4 para BHI-S). Houve uma clara relação entre o pH final mais ácido e reduções significativas ($p < 0,05$) da viabilidade de *S. Typhimurium* (caindo entre 1,0 até 5,0 \log_{10} de UFC/mL) após o cultivo em todos os sobrenadantes de MRS e em alguns poucos sobrenadantes de BHI-S.

As maiores reduções (5,0 \log_{10} de UFC/mL) foram obtidas com isolados bacterianos dos voluntários 8, 16, 18 e 22, entre os quais três (8, 16 e 22) apresentaram justamente as maiores inibições *ex vivo*. Este fato sugere fortemente que os ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo fermentativo dos isolados bacterianos seriam responsáveis pelo fenômeno de inibição da *Salmonella* cuja sensibilidade à acidez é bem conhecida. Como esperado, os isolados que apresentaram a maior acidificação do sobrenadante foram bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus* como 15.6 ou 18.1, por exemplo) ou produtoras de ácido láctico junto com ácido acético (*Bifidobacterium* como 16.1 ou 22.4, por exemplo). A exceção foi para alguns isolados dos voluntários 8 e 16 que aparentemente não pertencem a esses gêneros. Nesses voluntários, as únicas bactérias que não acidificaram o sobrenadante foram, como esperado, bastonetes Gram-negativos (8.6 ou 22.3). Contudo, este mecanismo não poderia ser extrapolado para explicar o antagonismo *ex vivo*, já que o pH do conteúdo intestinal dificilmente desceria abaixo de 6,0. Além disso, os mecanismos de inibição podem ser outros dependendo da bactéria reveladora utilizada no ensaio de atividade antagonista do sobrenadante. Os isolados que conseguiram uma redução de 5,0 ciclos \log_{10} em relação ao controle foram: 8.1, 8.2, 8.4, 8.5, 8.7, 15.6, 16.1, 16.2, 16.3, 16.4, 16.5, 16.7, 17.5, 17.7, 18.1, 18.3, 18.4, 18.5, 22.4,

22.7 e 22.8. Dessas 21 bactérias, 16 eram Gram-positivas (seis bifidobactérias, seis bastonetes não identificados, três lactobacilos e um enterococo) e cinco eram Gram-negativas (bastonetes não identificados).

Por outro lado, a maioria dos sobrenadantes de BHI-S não foi capaz de inibir o crescimento de *S. Typhimurium*, provavelmente porque seus valores de pH variaram entre 5,5 e 7,0. Apenas nos sobrenadantes dos isolados 8.4, 8.6, 8.7, 16.1, 16.2, 16.3, 16.4, 16.5, 16.7, 19.1, 19.4 e 22.4 observaram-se reduções significativas ($p < 0,05$) da viabilidade do patógeno, apesar de mais discretas em relação ao meio MRS, com a maior redução sendo de cerca de 2,0 ciclos \log_{10} no caso do sobrenadante do isolado 16.2.

Em trabalho semelhante, Hütt *et al.* (2006) evidenciaram correlação positiva entre o antagonismo a enteropatógenos e a produção de ácido láctico por lactobacilos e bifidobactérias, assim como correlação negativa entre o valor de pH do sobrenadante com a atividade antagonista, confirmando os resultados aqui demonstrados. Nesse estudo, foi observado que o sobrenadante das culturas com pH ajustado para 7,0 não suprimiram o crescimento de *E. coli*, *S. enterica* e *S. sonnei*. Quando o sobrenadante com pH não-ajustado foi testado, a inibição do crescimento das bactérias alvo diferiram e dependeram da cultura em particular. A atividade antagonista em meio líquido é favorecida pela rápida difusão dos compostos antimicrobianos, com a produção de ácidos orgânicos resultando em redução no pH. A atividade antimicrobiana desses ácidos pode ser explicada pela eficiente entrada da forma não-dissociada pela membrana celular do micro-organismo, com a subsequente dissociação dentro da célula, levando à acidificação do citoplasma e dissipação do gradiente de pH, o que interfere com importantes funções metabólicas da célula (SOUZA *et al.*, 2013).

Os isolados 3.1, 3.2, 8.3, 15.2, 15.3, 16.6, 17.1, 17.6, 18.6, 19.1, 19.2 e 19.4 não cresceram bem no meio MRS e, por isso, a atividade antagonista dos seus sobrenadantes não foi avaliada (setas, figuras 7 a 15).

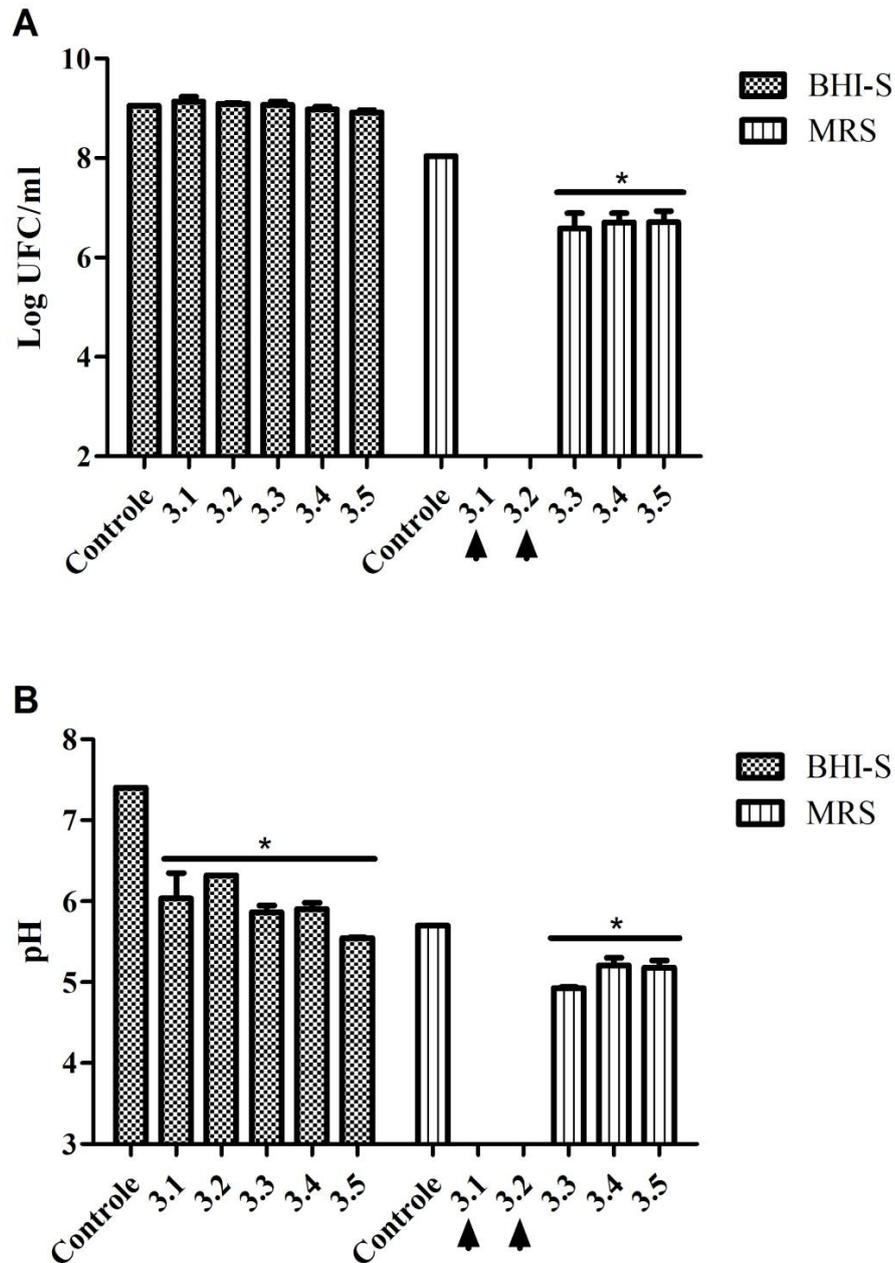


Figura 7: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 3 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

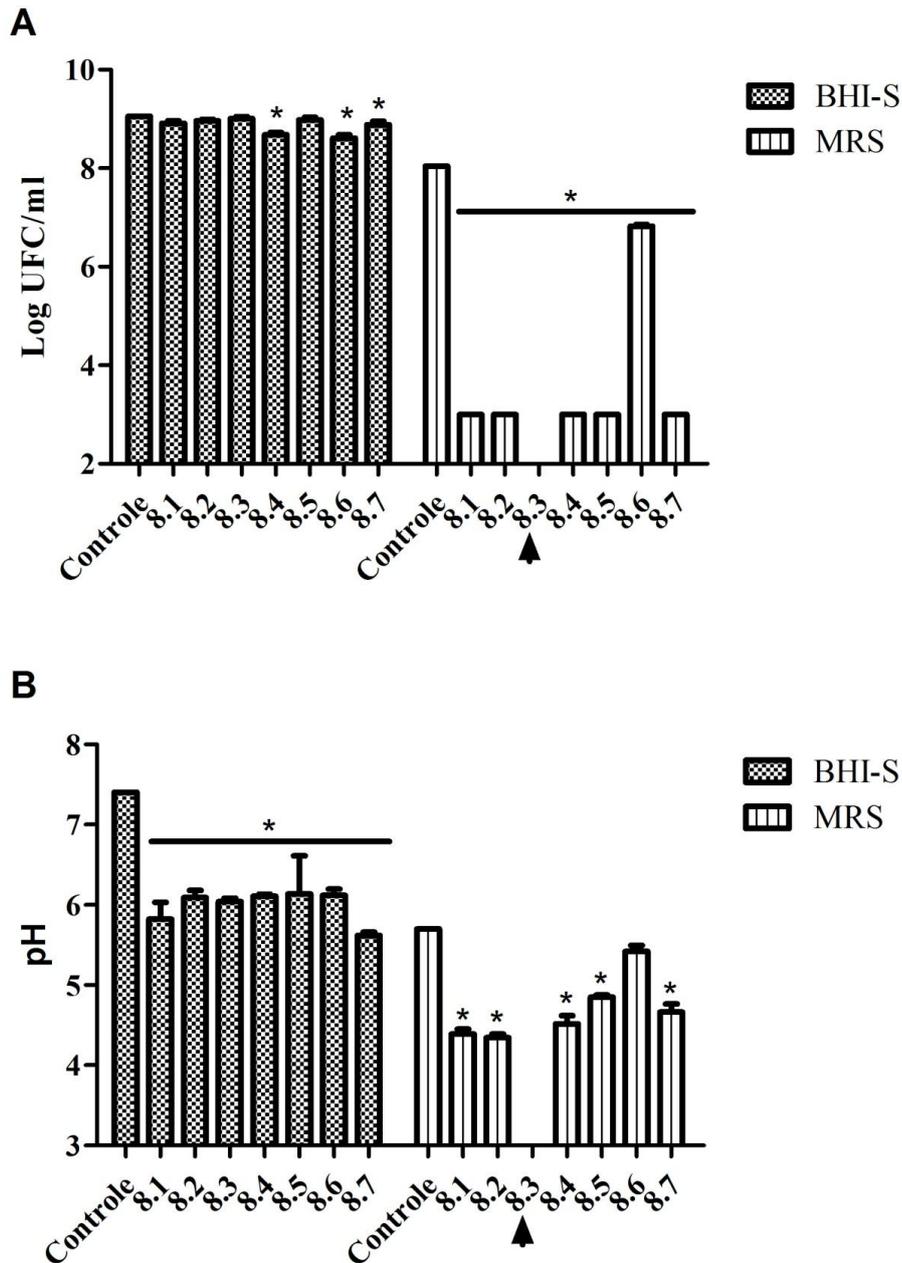


Figura 8: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 8 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

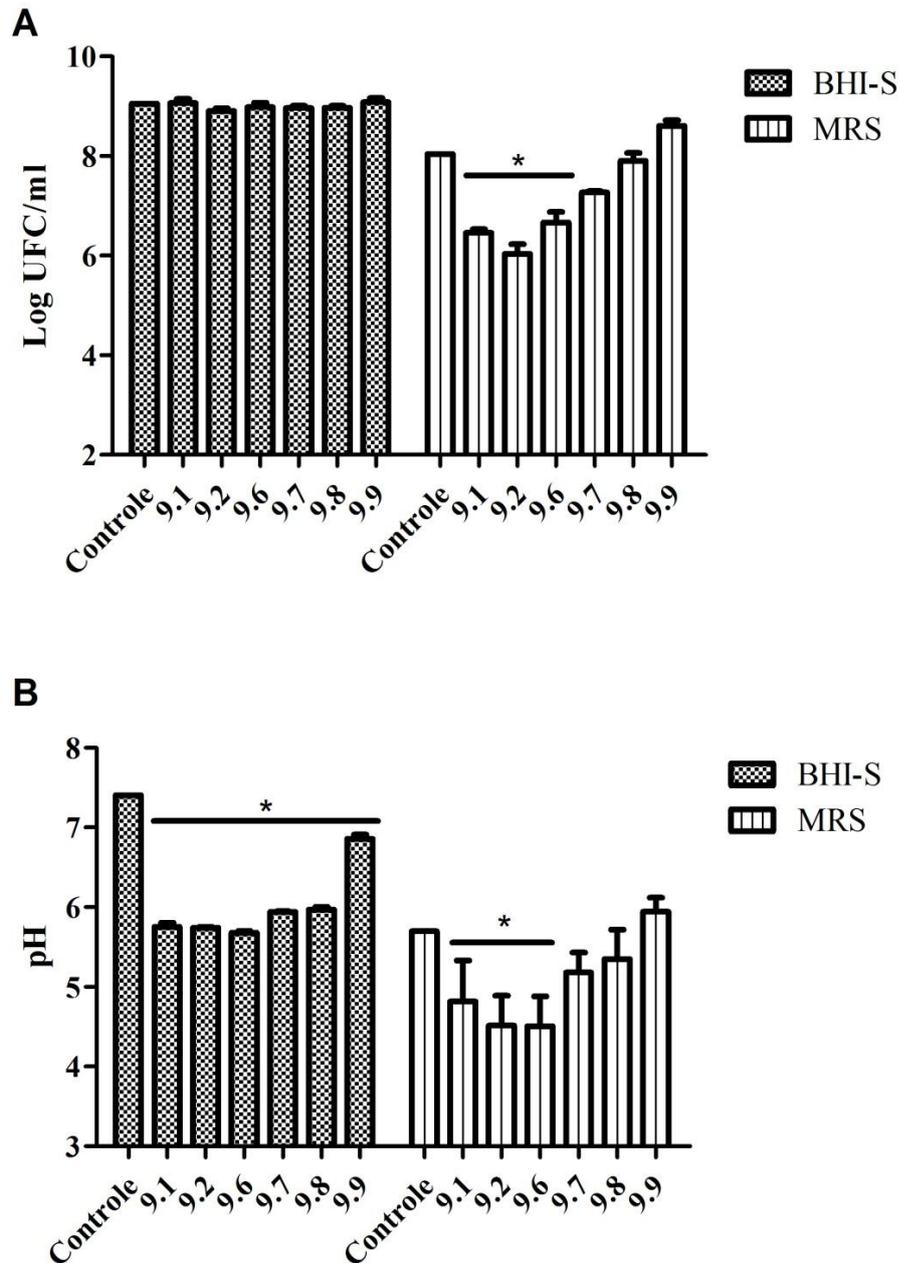


Figura 9: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 9 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

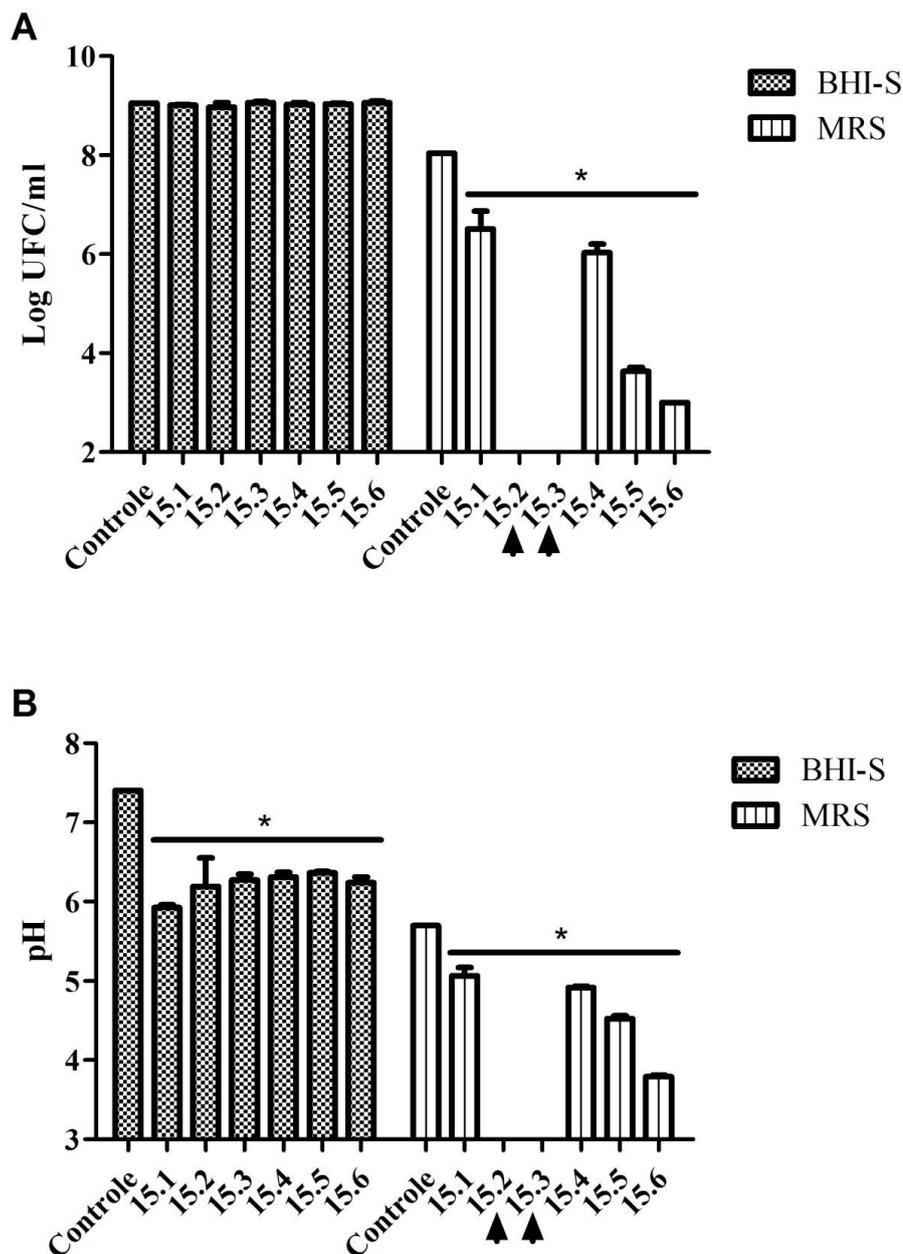


Figura 10: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 15 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

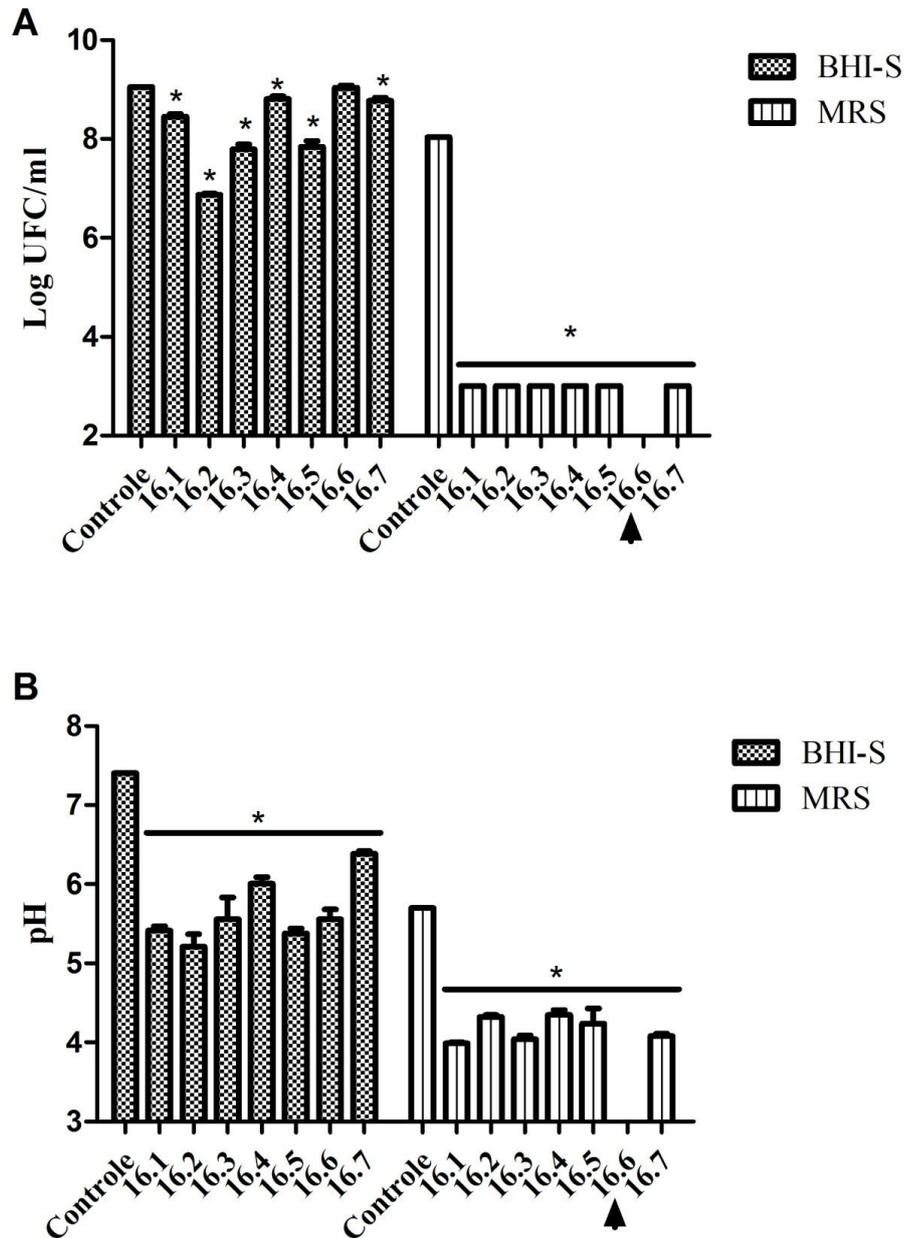


Figura 11: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 16 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

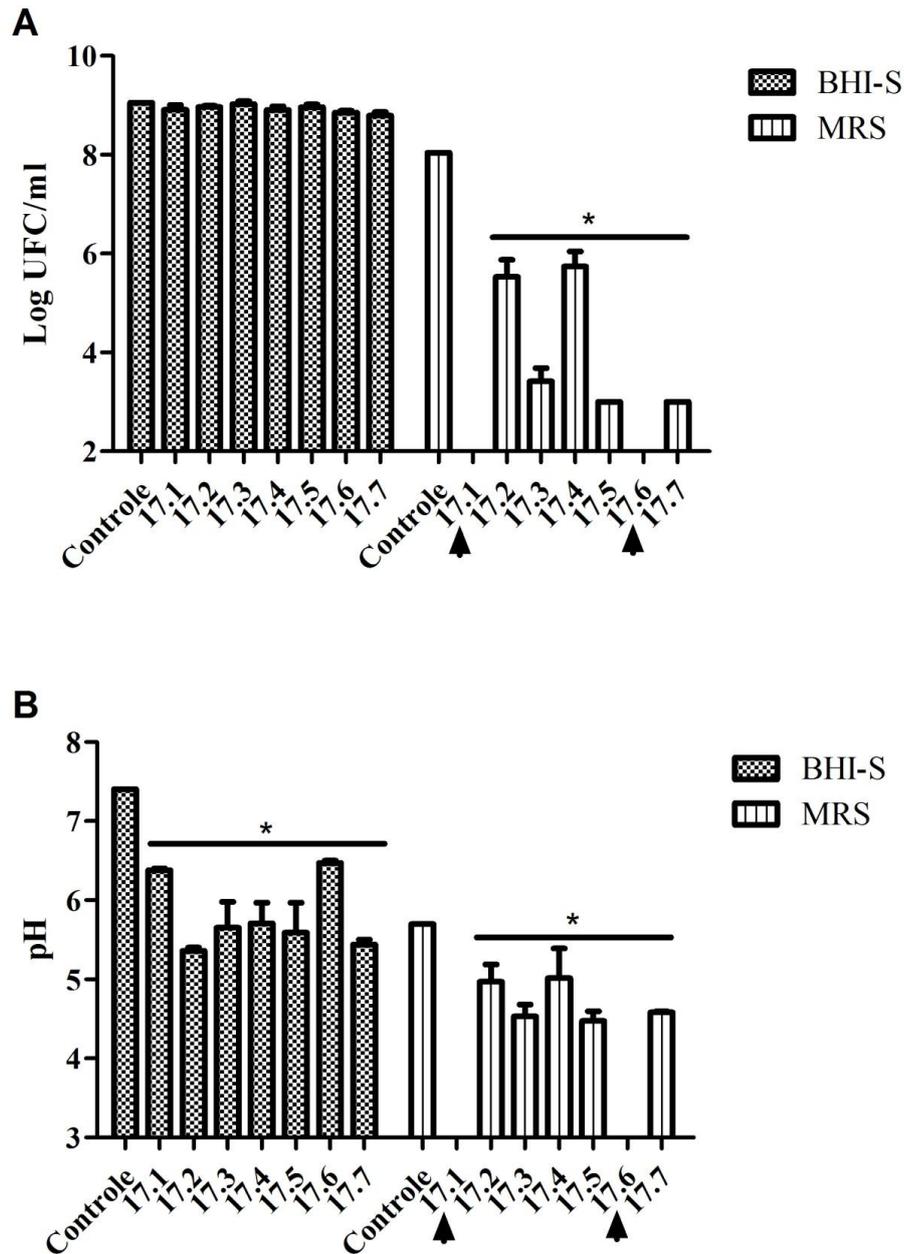


Figura 12: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 17 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

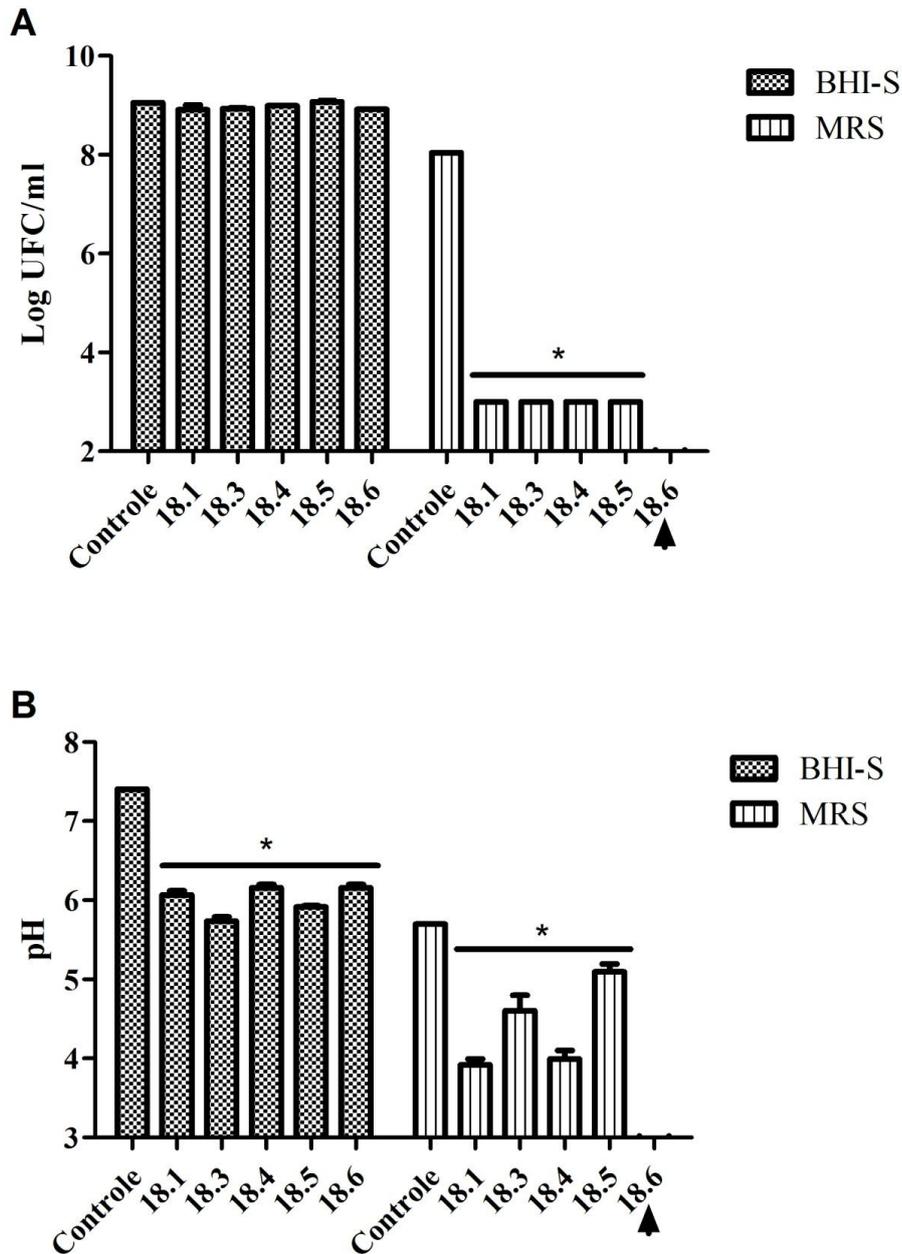


Figura 13: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 18 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

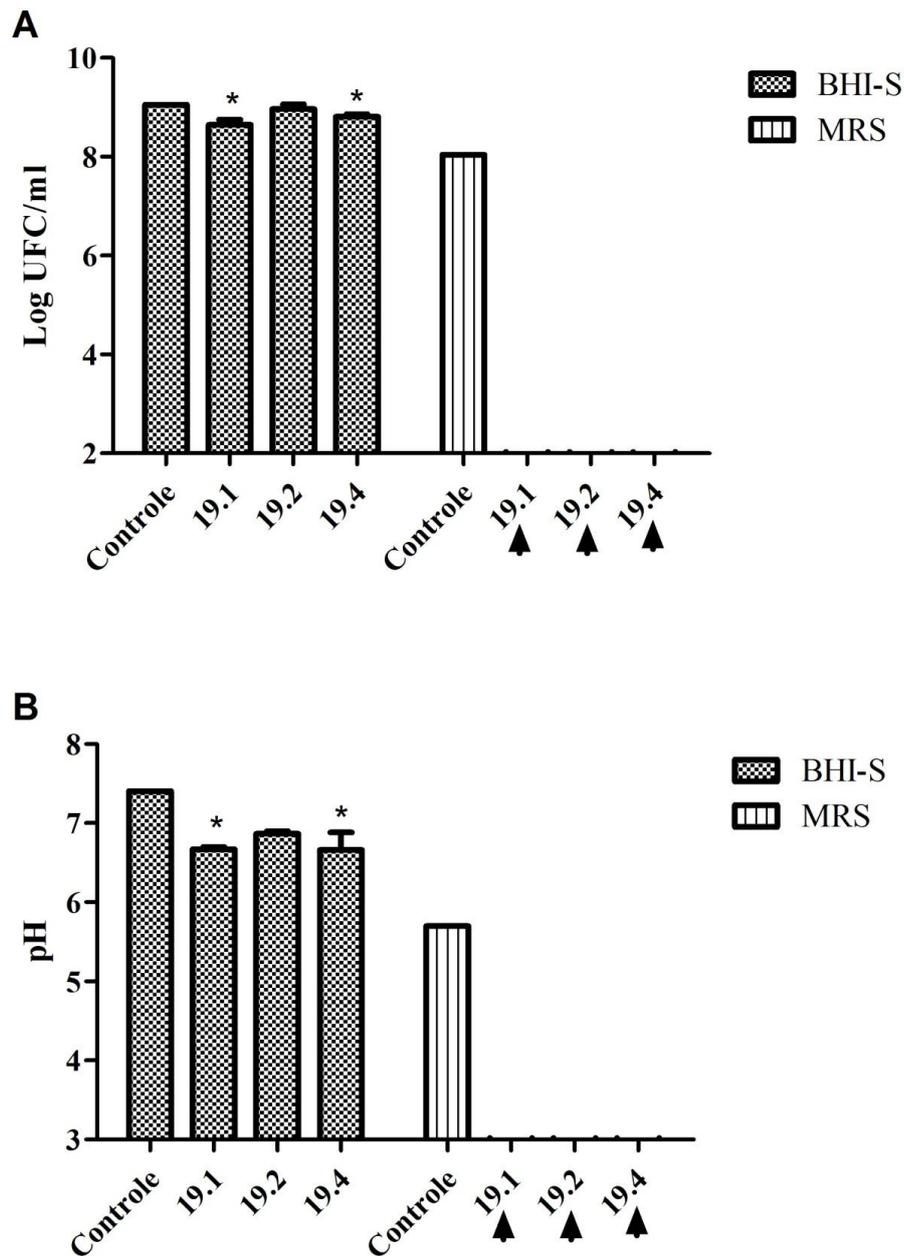


Figura 14: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 19 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

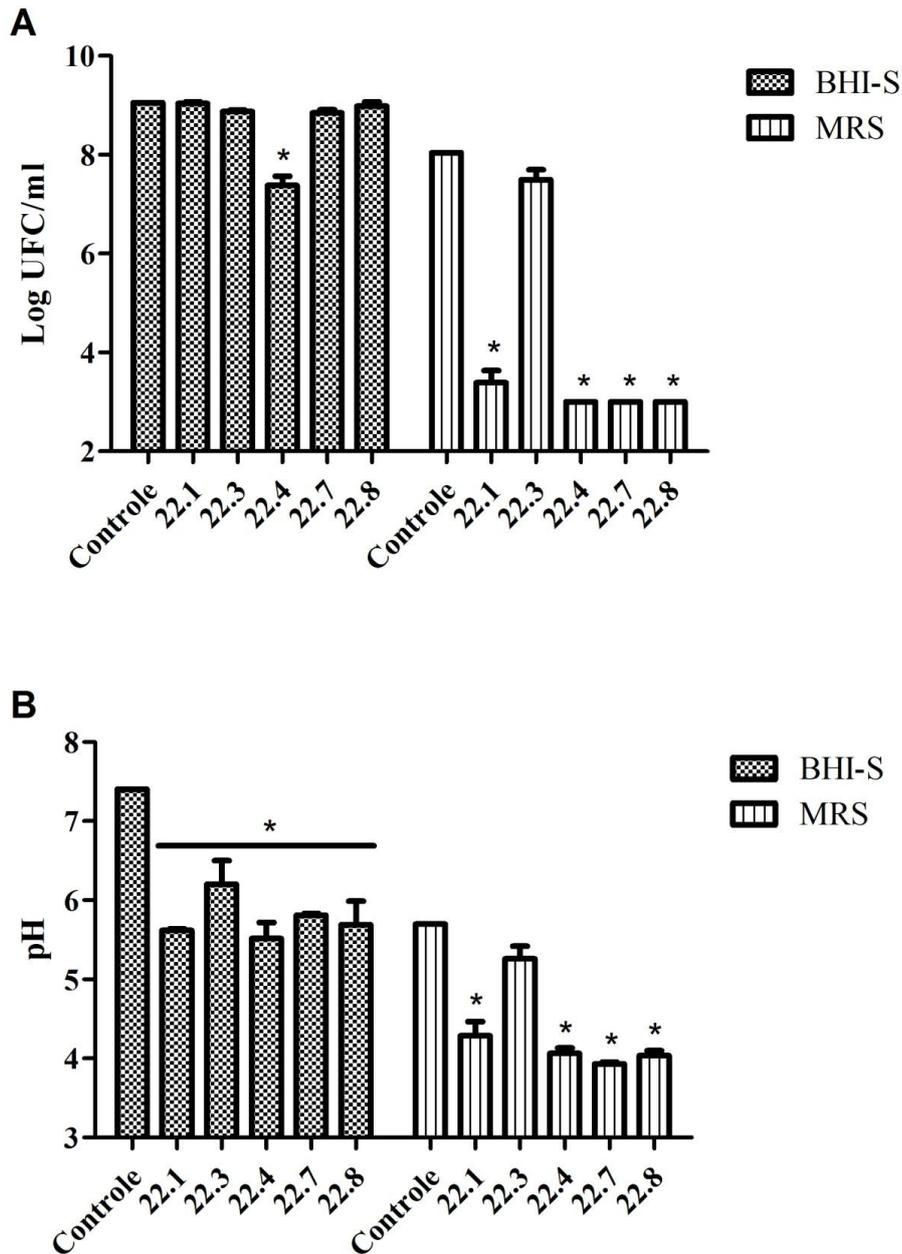


Figura 15: Contagem de *S. Typhimurium* (\log_{10} UFC/mL) após cultivo em sobrenadantes (meios BHI-S e MRS) dos isolados do voluntário 22 (A) e valores de pH dos respectivos sobrenadantes antes da inoculação da bactéria reveladora (B). A seta indica culturas que não cresceram em meio MRS e, por isso, o sobrenadante não foi testado. * Indica diferença significativa entre o grupo controle e experimentais em cada meio ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Dunnett ($n=3$).

5.7 Teste de antagonismo *in vivo*

A partir dos testes de antagonismo *in vitro* (item 5.5), 14 bactérias foram selecionadas por apresentarem halos de inibição contra pelo menos cinco reveladoras, e alta redução de UFC/mL de *S. Typhimurium* no seu sobrenadante de cultura: 8.2, 8.7, 15.6, 16.1, 16.2, 16.3, 16.5, 17.5, 18.1, 18.3, 18.4, 22.1, 22.4 e 22.7.

O sequenciamento do gene 16S rDNA dos 14 isolados revelou a presença de uma espécie de *Enterococcus*, duas espécies de *Lactobacillus*, três espécies de *Bifidobacterium*, quatro espécies de *Bacteroides* e três não foram identificadas (Tabela 5). Conforme pode ser observado, em nível de gênero, a identificação das bactérias 8.2, 15.6, 18.1 e 22.4 foi a mesma que a do VITEK. Os isolados 8.7, 16.2, 16.3, 16.5, 17.5 e 18.3 não haviam sido identificados no banco de dados do sistema VITEK (Tabela em anexo).

Os resultados dos testes de antagonismo *ex vivo* das fezes dos camundongos monoassociados com as bactérias citadas acima estão expressos na tabela 5. Não foi observado nenhum efeito antagonista antes da monoassociação, confirmando o papel da microbiota na presença dos halos de inibição demonstrados no teste. Após a monoassociação, a atividade antagonista *ex vivo* contra *S. Typhimurium* foi visualizada para os grupos colonizados com os isolados 8.2, 16.1, 16.2, 16.3, 16.5, 22.1 e 22.7. De novo, isso corresponde a três dos quatro voluntários que apresentaram 100% de antagonismo *ex vivo* nas suas fezes contra os enteropatógenos testados. Todavia, todos os 14 isolados haviam apresentado atividade antagonista *in vitro* contra *S. Typhimurium* (Tabela 4), reforçando a limitação dos resultados obtidos em ensaios *in vitro* bem como a importância do modelo animal gnotobiótico para confirmar *in vivo* o efeito antagonista *in vitro*. Em estudo semelhante de Martins *et al.* (2010), essa limitação também ficou clara, no qual duas linhagens de *Bifidobacterium*, capazes de produzir substâncias antagonistas difusíveis *in vitro* contra quase todos os dez enteropatógenos testados, inibiram apenas dois patógenos nos ensaios *ex vivo*.

Tabela 5: Identificação por sequenciamento do rDNA 16S das bactérias isoladas da microbiota fecal humana e teste de antagonismo *ex vivo* após a monoassociação com camundongos IG, contra a bactéria reveladora *Salmonella* Typhimurium

Grupos	Identificação	Depois da monoassociação
Controle	-	-
8.2	<i>Enterococcus hirae</i>	+
8.7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-
15.6	<i>Lactobacillus ruminis</i>	-
16.1	ND	+
16.2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+
16.3	<i>Bacteroides dorei</i>	+
16.5	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+
17.5	<i>Bifidobacterium longum</i>	-
18.1	<i>Lactobacillus ruminis</i>	-
18.3	<i>Bacteroides dorei</i>	-
18.4	ND	-
22.1	ND	+
22.4	<i>Bifidobacterium longum</i>	-
22.7	ND	+

Legenda: (+) = presença de halo de inibição, (-) = ausência de halo de inibição
 ND: não determinado

As figuras 16 a 20 mostram os níveis populacionais de *S. Typhimurium* em camundongos IG previamente monoassociados com cada uma das 14 bactérias selecionadas, além dos níveis populacionais das bactérias monoassociadas. Após cinco dias da monoassociação, todas as bactérias alcançaram níveis de aproximadamente 9,0 log₁₀ UFC/g nas fezes. No grupo controle, apenas desafiado com *Salmonella*, o patógeno atingiu níveis variando de 8,0 a 9,0 log₁₀ UFC/g de fezes. Somente os grupos colonizados com as amostras 8.2 (*Enterococcus hirae*), 16.2 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) e 18.1 (*Lactobacillus ruminis*) apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nos níveis populacionais de *Salmonella* ao longo do desafio (Figuras 16A, 17B e 18C). Ainda pode ser observado que os grupos monoassociados com os isolados 8.2 e 16.2 apresentaram antagonismo *ex vivo* positivo, enquanto que o grupo 18.1 não (Tabela 5). Isto poderia ser explicado pelo fato que o ensaio *ex vivo* é baseado na difusão de compostos inibitórios das

fezes e deve-se salientar que outros mecanismos podem eliminar o patógeno bacteriano, como a competição por nutrientes e sítios de adesão.

Da mesma forma, uma atividade antagonista contra *S. Typhimurium* foi relatada por Martins *et al.* (2010) em camundongos IG previamente monoassociados com duas linhagens de *B. animalis* subsp. *lactis*, demonstrada pelas reduções ($p < 0,05$) nos níveis populacionais do patógeno entre 1,0 e 2,0 \log_{10} de UFC/g de fezes. Essa observação estava de acordo com a atividade antagonista contra o mesmo patógeno encontrada em ambos os testes *in vitro* e *ex vivo*. Liévin *et al.* (2000) estudaram a atividade antimicrobiana de 14 linhagens humanas de *Bifidobacterium* contra *S. Typhimurium* e mostraram que apenas duas delas expressaram atividade antagonista *in vitro*. Em camundongos IG, essas duas linhagens colonizaram o trato intestinal e protegeram os animais contra a infecção letal pelo patógeno. No entanto, os níveis fecais de *S. Typhimurium* não foram determinados e comparados com os animais monoassociados, como fizemos no presente estudo, não sendo possível, portanto, confirmar se o efeito protetor foi devido à atividade antagonista *in vivo*.

Por outro lado, Filho-Lima *et al.* (2000) observaram que camundongos IG triassociados com os probióticos *L. acidophilus* H2B20, *S. boulardii* e *E. coli* EM0 apresentaram altos níveis populacionais de *S. Typhimurium* e *S. flexneri*, sem diferença dos animais controle. Resultados similares foram obtidos por Silva *et al.* (2004) em que animais IG colonizados com *B. longum* permaneceram com os níveis de *S. Typhimurium* semelhantes ao grupo controle apenas desafiado, apesar de ter apresentado antagonismo *ex vivo* positivo. Todavia, neste estudo, foi proposto que o efeito protetor observado contra o desafio patogênico teria sido devido à modulação da resposta inflamatória, e não pelo antagonismo direto.

Silva *et al.* (2001) mostraram que *Lactobacillus* sp. e *Peptostreptococcus* sp., isolados da microbiota fecal dominante de um humano saudável, apresentaram atividade antagonista *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* contra *V. cholerae*, sendo capazes de eliminar o patógeno do TI de camundongos GN após cinco dias de desafio. Em trabalho semelhante de Barbosa *et al.* (2006), *C. difficile* foi eliminado do TI de camundongos IG monoassociados com a linhagem de *Peptostreptococcus* A2 sp., após quatro dias de desafio. Nesse estudo, também foi observado halo de inibição contra o patógeno no ensaio *ex vivo*, apesar de essa atividade antagonista não ter sido demonstrada *in vitro*. Nesse caso, a linhagem de *Peptostreptococcus* é capaz de produzir uma substância inibitória contra *C. difficile* apenas no trato digestivo dos animais. Este fato já havia sido descrito por Nicoli *et*

al. (1992) para a linhagem de *Peptostreptococcus* E1 sp., tendo como patógeno revelador o *C. perfringens* tipo A.

Interessantemente, nos três estudos citados acima, *V. cholerae*, *C. difficile* e *C. perfringens* desapareceram do conteúdo fecal dos animais GN em poucos dias, ao passo que não há relatos desse ocorrido em desafios com *S. Typhimurium*. Isso poderia ser explicado pelo fato dos três patógenos serem maus competidores e precisarem de uma alta dose infecciosa para causar doença, sendo que *C. difficile* e *C. perfringens* estão relacionados principalmente com a diarreia associada ao uso de antibióticos. Além disso, os três patógenos têm em comum o fato de causar doença devido à produção de toxinas com diferentes modos de ação, mas que podem resultar em danos teciduais, inflamação e secreção de fluidos eletrolíticos. Por outro lado, *Salmonella* é um patógeno intracelular facultativo, capaz de invadir as células epiteliais intestinais e de sofrer translocação para os macrófagos. Nesse sentido, são necessários mais estudos com o objetivo de comparar o potencial probiótico de um mesmo micro-organismo frente a diferentes patógenos no modelo *in vivo*, uma vez que isso já tem sido bastante realizado em ensaios *in vitro*. No presente estudo, ensaios de antagonismo *in vivo* com as outras seis bactérias enteropatogênicas reveladoras, além de *S. Typhimurium*, não foram feitos devido à falta de tempo num período de Mestrado e à disponibilidade limitada de animais IG.

Os grupos 15.6 (*Lactobacillus ruminis*), 16.3 (*Bacteroides dorei*) e 17.5 (*Bifidobacterium longum*) sucumbiram à infecção por *Salmonella* antes de finalizados os 10 dias de desafio. Curiosamente, já que os isolados testados pertenciam a grupos bacterianos considerados não patogênicos, os animais monoassociados com as amostras 18.4 (*Lactobacillus* sp.) e 18.3 (*Bacteroides dorei*) morreram após um e três dias de desafio, respectivamente, provavelmente devido à colonização inicial e não pelo patógeno.

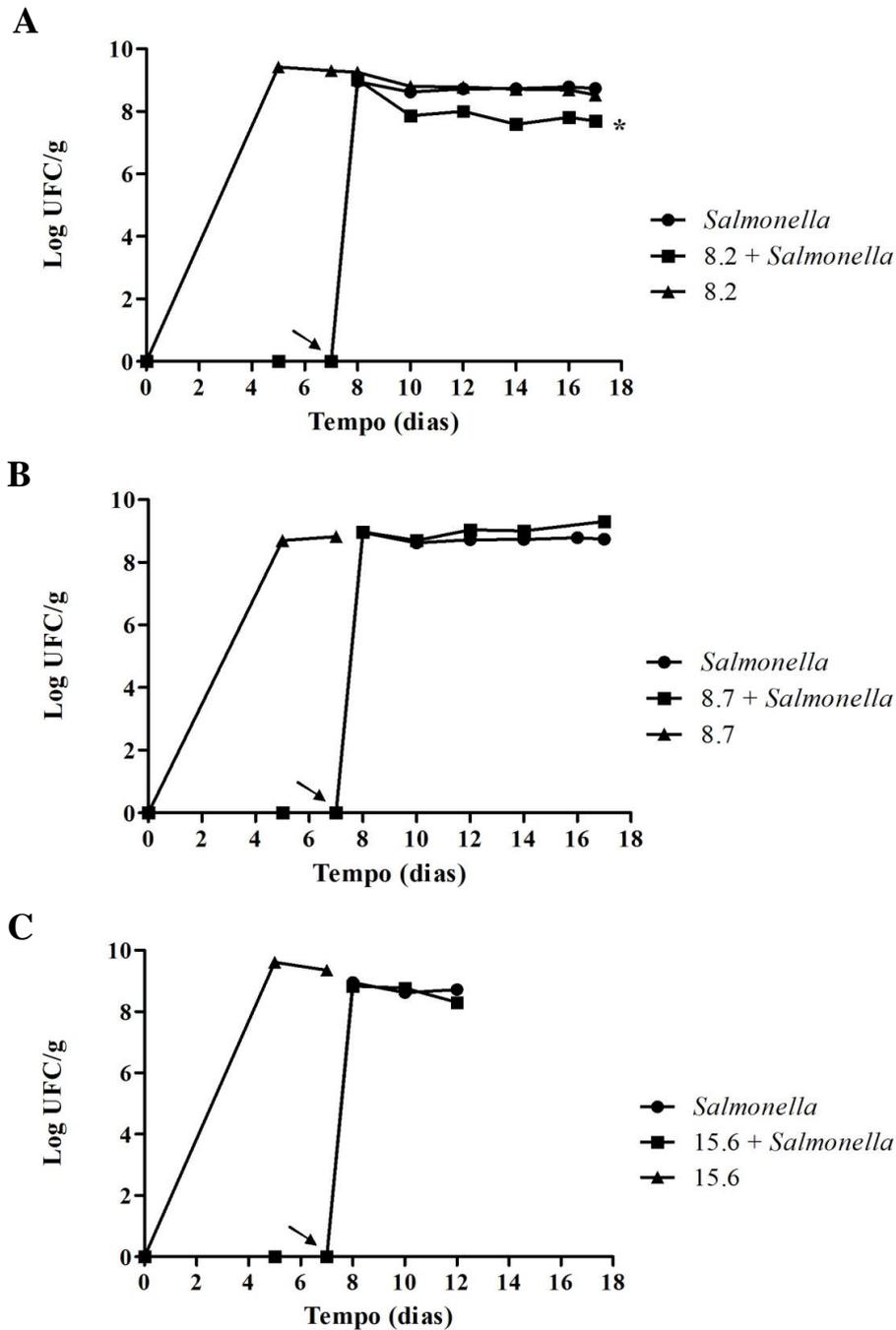


Figura 16: População fecal (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 8.2 (A), 8.7 (B) e 15.6 (C). A seta indica o dia do desafio com o patógeno (dia 7). Círculo fechado (níveis de *Salmonella* em animais não-monoassociados), triângulo fechado (níveis das bactérias monoassociadas), quadrado fechado (níveis de *Salmonella* em animais previamente monoassociados). * Diferença significativa ($p < 0,05$) dos níveis de *Salmonella* entre o grupo previamente monoassociado e o não-monoassociado. Estatística: Teste t pareado.

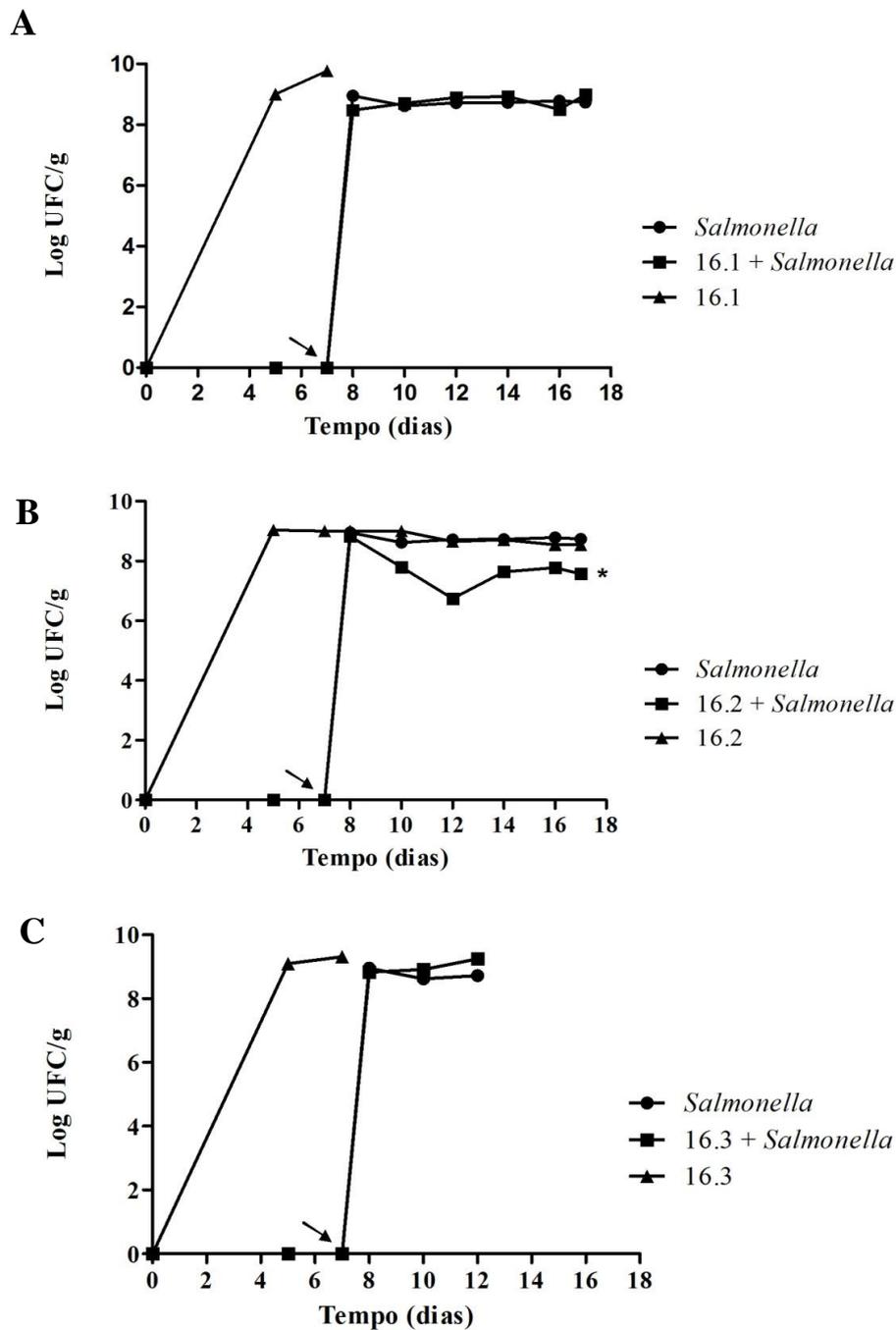


Figura 17: População fecal (log₁₀ UFC/g) de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 16.1 (A), 16.2 (B) e 16.3 (C). A seta indica o dia do desafio com o patógeno (dia 7). Círculo fechado (níveis de *Salmonella* em animais não-monoassociados), triângulo fechado (níveis das bactérias monoassociadas), quadrado fechado (níveis de *Salmonella* em animais previamente monoassociados). * Diferença significativa ($p < 0,05$) dos níveis de *Salmonella* entre o grupo previamente monoassociado e o não-monoassociado. Estatística: Teste t pareado.

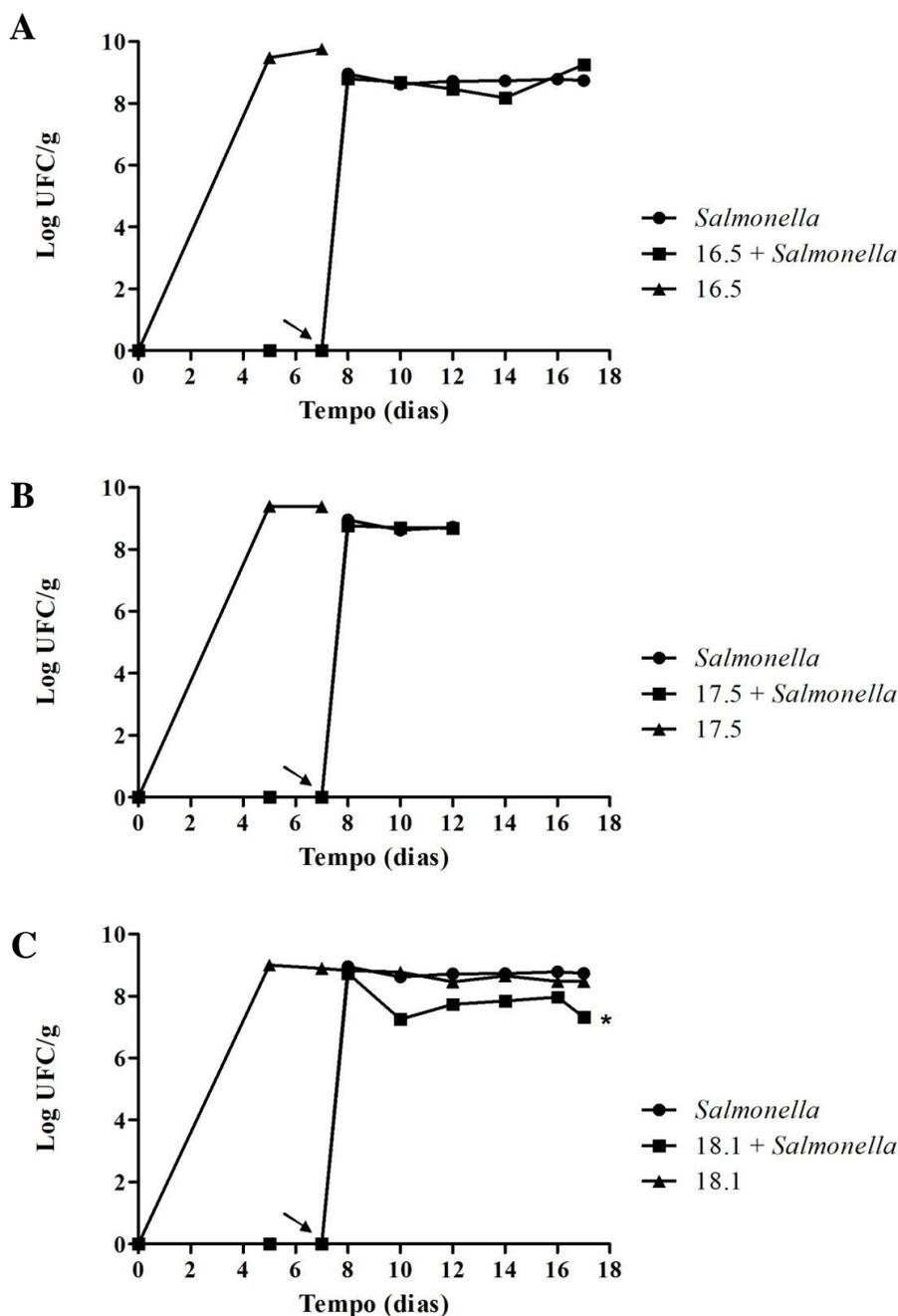


Figura 18: População fecal (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 16.5 (A), 17.5 (B) e 18.1 (C). A seta indica o dia do desafio com o patógeno (dia 7). Círculo fechado (níveis de *Salmonella* em animais não-monoassociados), triângulo fechado (níveis das bactérias monoassociadas), quadrado fechado (níveis de *Salmonella* em animais previamente monoassociados). * Diferença significativa ($p < 0,05$) dos níveis de *Salmonella* entre o grupo previamente monoassociado e o não-monoassociado. Estatística: Teste t pareado.

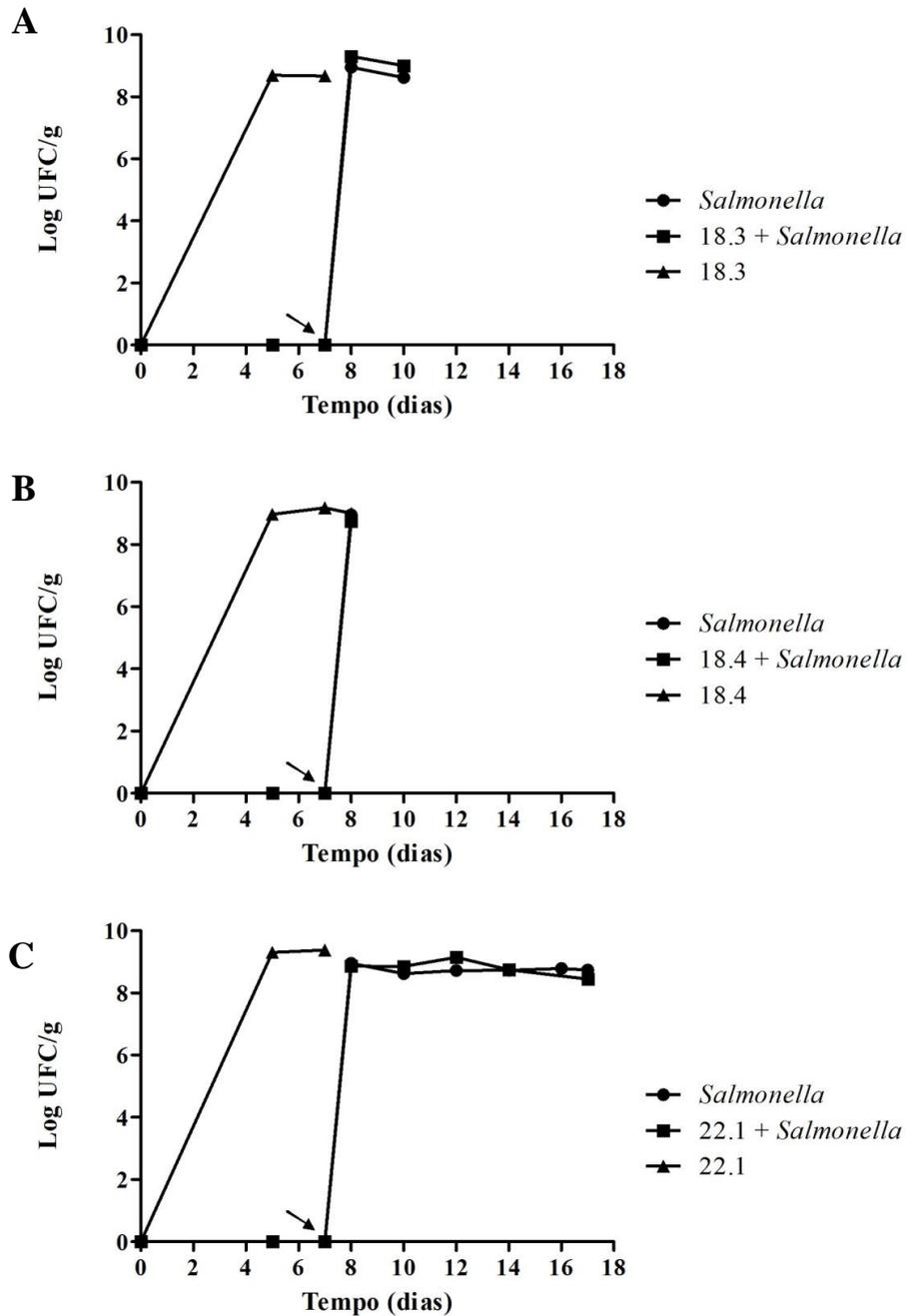


Figura 19: População fecal (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 18.3 (A), 18.4 (B) e 22.1 (C). A seta indica o dia do desafio com o patógeno (dia 7). Círculo fechado (níveis de *Salmonella* em animais não-monoassociados), triângulo fechado (níveis das bactérias monoassociadas), quadrado fechado (níveis de *Salmonella* em animais previamente monoassociados). Estatística: Teste t pareado.

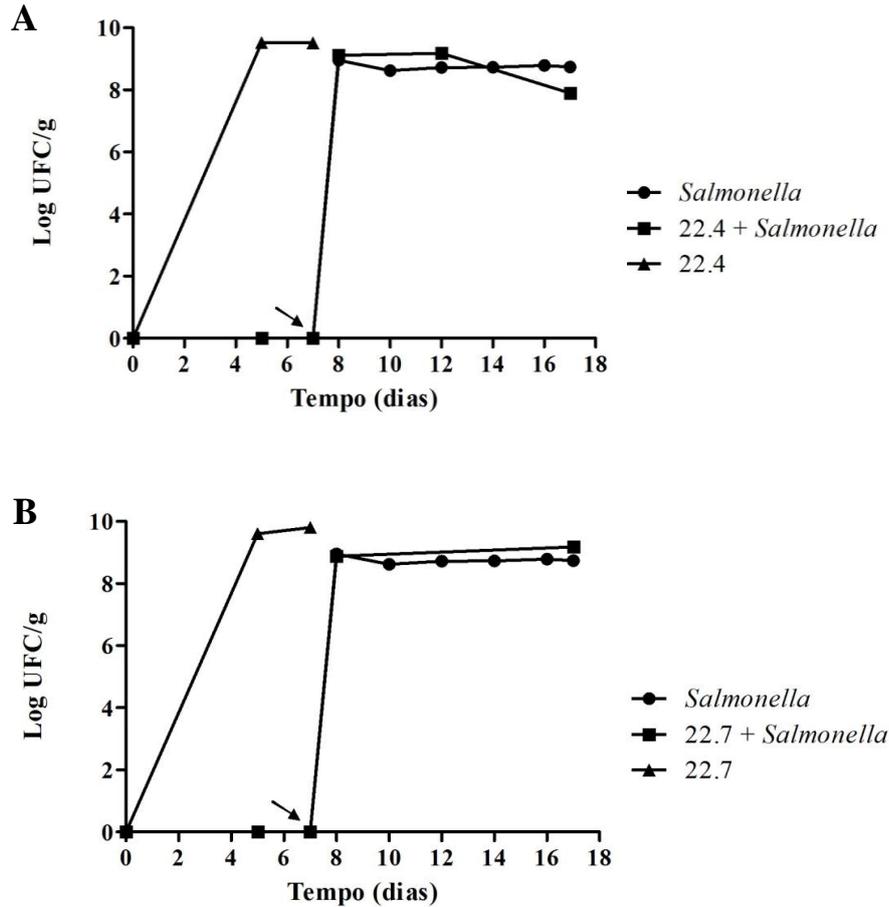


Figura 20: População fecal (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos monoassociados com os isolados 22.4 (A) e 22.7 (B). A seta indica o dia do desafio com o patógeno (dia 7). Círculo fechado (níveis de *Salmonella* em animais não-monoassociados), triângulo fechado (níveis das bactérias monoassociadas), quadrado fechado (níveis de *Salmonella* em animais previamente monoassociados). Estatística: Teste t pareado.

5.8 Determinação da translocação de *S. Typhimurium* em animais isentos de germes monoassociados com isolados fecais humanos selecionados

Baseados nos dados obtidos nos ensaios *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, os isolados 8.2, 16.2 e 18.1 foram selecionados para determinação da translocação para baço e fígado de animais IG monoassociados com essas bactérias e desafiados sete dias depois com *S. Typhimurium* (figuras 21 e 22). Martins *et al.* (2007) encontraram níveis similares de translocação de *S. Typhimurium* para o baço e o fígado em camundongos IG apenas

desafiados com o patógeno, isto é, entre 4,0-5,0 log₁₀ UFC/mL, mostrando que nosso grupo controle reproduziu o quadro de salmonelose. Em relação aos grupos experimentais, os animais monoassociados com a amostra 8.2 (*E. hirae*) apresentaram contagens inferiores ($p < 0,05$) de *S. Typhimurium* no baço quando comparado ao grupo controle, sendo que o mesmo não foi demonstrado no fígado. Já o grupo 18.1 (*L. ruminis*) mostrou contagens mais elevadas ($p < 0,05$) de *S. Typhimurium* que o controle, no fígado. O grupo 16.2 (*B. thtaiotaomicron*) não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle em nenhum dos órgãos. Assim, enquanto que o isolado 8.2 foi capaz de exercer uma pequena proteção contra a translocação do patógeno, o isolado 18.1 teve ação contrária, causando, provavelmente, uma piora no quadro clínico dos animais desafiados.

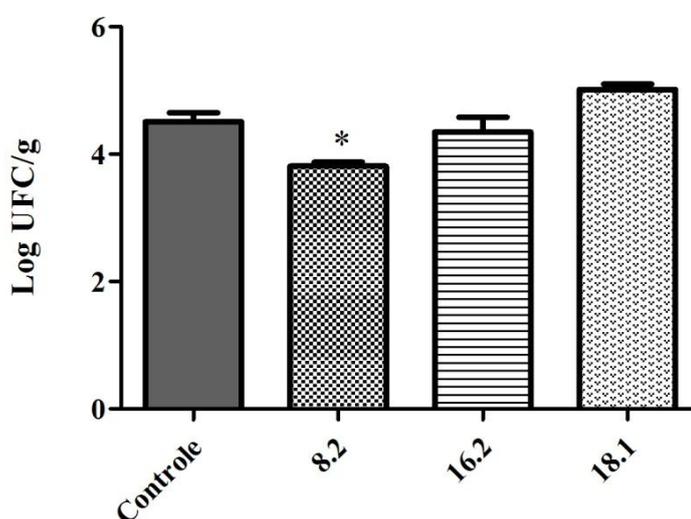


Figura 21: Translocação (log₁₀ UFC/g) de *S. Typhimurium* para o baço de camundongos IG previamente monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thtaiotaomicron*). Controle = animais somente desafiados com *S. Typhimurium*. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os experimentais ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Tukey (n=4).

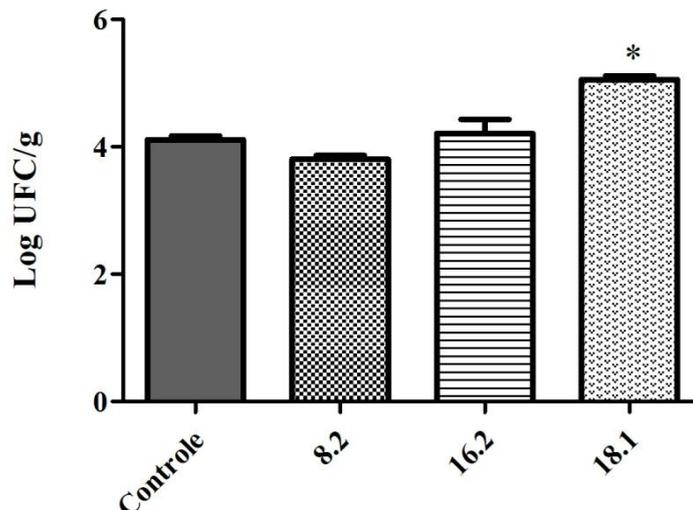


Figura 22: Translocação (\log_{10} UFC/g) de *S. Typhimurium* para o fígado de camundongos IG previamente monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*). Controle = animais somente desafiados com *S. Typhimurium*. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os experimentais ($p < 0,05$). Teste: One-way ANOVA, pós-teste Tukey ($n=4$).

5.9 Avaliações histopatológicas em animais IG monoassociados e desafiados com *S. Typhimurium*

Foram observados no íleo e no fígado efeitos atribuíveis à infecção por *S. Typhimurium* semelhantes aos descritos em camundongos *Swiss* IG por nosso grupo (SILVA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007). O grupo controle desafiado com *S. Typhimurium* apresentou ileíte aguda de grau moderado caracterizado por aumento da celularidade da lâmina própria da submucosa e das vilosidades intestinais, com presença de edema do topo das vilosidades, associado a pequenas áreas de perda do revestimento epitelial, fusão de vilosidades e presença de focos de infiltrados nodulares de células mono e polimorfonucleares. As placas de Peyer foram muito exuberantes e aumentadas em relação aos animais IG não infectados (Figuras 23C e 23D). O fígado neste grupo apresentou caracteristicamente os focos de infiltrado celular misto, dispersos de forma difusa e aleatória no parênquima hepático, sempre associado com degenerações intensas de hepatócitos ao redor, bem como necrose de pequenos grupos de hepatócitos na região inflamada (Figuras 24C e 24D). O cólon não foi analisado, pois, de acordo com

Leblanc *et al.* (2010), *Salmonella* ataca preferencialmente o íleo terminal, com menor extensão de danos sendo observada no cólon.

Os camundongos IG monoassociados com as bactérias 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*B. thetaiotaomicron*) e 18.1 (*L. ruminis*) variaram em termos de resposta, sendo que apenas o grupo 8.2 apresentou evidentes sinais de proteção em relação aos danos causados pelo desafio com o patógeno. Neste grupo, as alterações descritas no íleo são discretas e, em alguns casos, o aspecto assemelhou-se em muito ao grupo controle não infectado (Figuras 23A e 23B). Houve apenas discretas áreas com aumento da celularidade e o volume das placas de Peyer é menos exuberante. Não houve acúmulo de polimorfonucleares e apenas discretas alterações degenerativas e presença de edema de topo de vilosidades (Figuras 23I e 23J). Os fígados dos animais deste grupo apresentaram diminuição do número, tamanho e grau de alterações degenerativas (Figuras 24I e 24J).

O grupo 18.1 (*L. ruminis*) mostrou um padrão de lesão intestinal de grau e extensão comparáveis aos do grupo controle apenas desafiado, não havendo evidências de proteção (Figuras 23C e 23D). No fígado, as lesões foram significativamente mais intensas que o controle desafiado, como fica visível nas figuras, que serão medidas posteriormente (Figuras 24C e 24D). Já no grupo 16.2 (*B. thetaiotaomicron*) não houve evidências de proteção no fígado em relação ao grupo controle desafiado (Figuras 24G e 24H). No íleo, embora haja uma discreta proteção quanto à integridade do epitélio de superfície, o padrão de celularidade não mudou e a reatividade das placas de Peyer também foi semelhante (Figuras 23G e 23H).

L. ruminis tem sido identificado como parte da microbiota intestinal de vários mamíferos, incluindo humanos, e é a única espécie de *Lactobacillus* formalmente reconhecida como móvel (flagelada) que faz parte da microbiota intestinal humana (REUTER, 2001). O filamento do flagelo bacteriano é composto por um polímero de proteínas chamado flagelina, um PAMP que é reconhecido por receptores do tipo *Toll 5* (Toll-like receptor 5 – TLR5) do hospedeiro (HAYASHI *et al.*, 2001). O reconhecimento da flagelina pelas células epiteliais e imunes inatas leva a uma resposta pró-inflamatória tendo como central componente a produção de Interleucina 8 (IL-8) (GEWIRTZ *et al.*, 2001). Dessa forma, Neville *et al.* (2012) mostraram que uma linhagem flagelada de *L. ruminis* estimula uma maior produção de IL-8 por células epiteliais do cólon humano do que uma linhagem não flagelada, evidenciando que a proteína flagelina, mais do que outro componente da superfície celular, foi responsável pela secreção de IL-8. Assim, essa informação poderia explicar porque o grupo monoassociado com o isolado 18.1 (*L.*

ruminis) apresentou uma piora no quadro da salmonelose, com evidente aumento de focos inflamatórios no fígado e maior translocação da *Salmonella*. Por outro lado, isso também explicaria como o grupo 18.1, apesar de não ter apresentado antagonismo *ex vivo* positivo (Tabela 5), mostrou reduções significativas nos níveis populacionais de *Salmonella* no conteúdo fecal (Figura 18C), isto é, a imunomodulação pode ter sido outro mecanismo de antagonismo (indireto) utilizado.

Poucos estudos sobre o antagonismo por bactérias anaeróbias Gram-negativas têm sido descritos. Conforme foi citado acima, Gomes *et al.* (2006) observaram que o antagonismo *in vitro* por bactérias Gram-negativas é um evento raro, e apenas três isolados apresentaram efeito antagonista contra os patógenos reveladores: *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* e *B. eggerthii*, todos pertencentes ao grupo *B. fragilis*. No trabalho de Farias *et al.* (1992), nove espécies do grupo *B. fragilis* foram testadas contra seis linhagens de referência Gram-positivas e 10 Gram-negativas, e mostraram atividade interespecífica apenas contra *Streptococcus sanguis* e *S. pyogenes*. Além disso, em um estudo posterior (Farias *et al.*, 1994), uma bacteriocina produzida por *B. fragilis* foi extraída, purificada e caracterizada. No presente trabalho, o isolado 16.2 (*B. thetaiotaomicron*) apresentou um amplo espectro de ação, inibindo cinco reveladores (LM, ST, SF, VC e EP), além de ter mostrado a maior atividade antagonista contra *S. Typhimurium* no sobrenadante de BHI-S. Assim sendo, tem-se como perspectiva de estudo a amostra 16.2, a fim de identificar a natureza das substâncias que estariam envolvidas no antagonismo.

Os enterococos têm sido utilizados na indústria de alimentos, sendo encontrados em grande número em carnes fermentadas, laticínios e produtos vegetais (GOMES *et al.*, 2008). Dentre as espécies, *E. faecium* é a mais comumente encontrada em produtos veiculando probióticos. Quando comparado com outros micro-organismos probióticos, os enterococos apresentam algumas vantagens quanto à sua resistência e pouca seletividade para crescimento e multiplicação, não sendo exclusivamente acidófilo, microaerófilo e/ou mesófilo como muitos dos micro-organismos ácido-lácticos. Contudo, a utilização desses micro-organismos como probióticos tem sido questionada devido a fatores de virulência de algumas espécies e devido à presença de genes de resistência a antimicrobianos transmissíveis a outras bactérias (REDONDO, 2008). Em um estudo de caracterização de seis linhagens de *Enterococcus* encontradas em produtos probióticos, foi mostrado que todas as linhagens eram *E. faecium* e que nenhuma delas foi resistente à vancomicina. Além disso, foi observada uma clara diferença genética entre essas linhagens probióticas e isolados clínicos, sendo que nenhum gene de virulência foi relatado (NOGUSHI *et al.*,

2011). Nueno-Palop & Narbad (2011) isolaram 70 bactérias da microbiota de humanos saudáveis e relataram que uma linhagem de *E. faecalis* se mostrou como candidato a um potencial probiótico, por ser a mais resistente às condições da digestão e a melhor na adesão às células Caco-2. Contudo, apresentou alguns genes de virulência que são comumente encontrados em enterococos comensais do TI. Dessa forma, são necessários mais estudos a cerca da presença e capacidade de transmissão de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos (principalmente os genes relacionados à resistência à vancomicina) para garantir a segurança do isolado 8.2 (*E. hirae*) como um potencial probiótico.

Muitos estudos têm indicado que desordens fisiológicas e doenças infecciosas são frequentemente associadas com distúrbios da microbiota intestinal caracterizados pela redução da população de bactérias que desempenham um papel essencial no desenvolvimento e bem-estar do hospedeiro. Nesse sentido, há uma constante busca por micro-organismos probióticos que possam conferir benefícios à saúde do homem. Segundo o *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, publicado em conjunto pela OMS e FAO, após a identificação e seleção *in vitro* de probióticos e antes de ensaios clínicos, a utilização de modelos animais é recomendada para a avaliação das características funcionais e de segurança (FAO/WHO, 2002; MARTINS *et al.*, 2012). Assim sendo, com esses resultados pode-se ressaltar novamente a importância do modelo animal IG como um sistema experimental simplificado e excelente para avaliação do potencial probiótico de micro-organismos, permitindo observar as interações ecológicas entre os micro-organismos inoculados no ecossistema gastrointestinal.

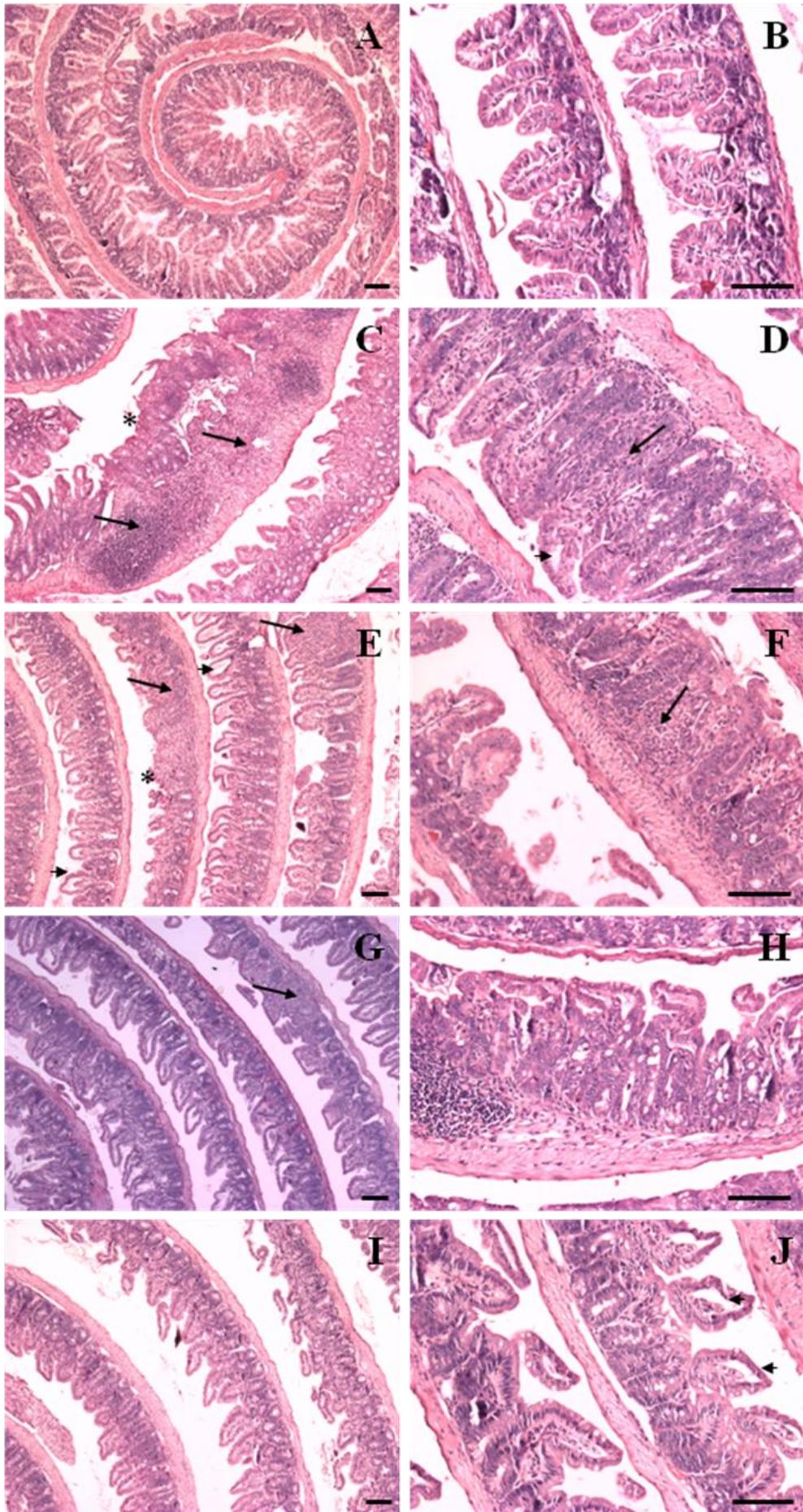


Figura 23: Aspectos histológicos dos íleos de camundongos IG, monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*) e desafiados com *S. Typhimurium*. Animais IG não desafiados (A e B) e apenas desafiados com o patógeno (C e D). Intestino delgado (íleo) de animais IG previamente monoassociados com os isolados 18.1 (E e F), 16.2 (G e H) e 8.2 (I e J), após cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. Seta preta indica agregados linfóides em placas e áreas com aumento da celularidade da lâmina própria, o que resulta em alargamento das vilosidades. Ponta da seta indica edema de topo de vilosidades. Asterisco indica áreas de perda do revestimento epitelial (erosões superficiais). Representativo de quatro animais/grupo. Coloração H&E. Barra de escala = 10 µm. Objetiva: 4x (1ª coluna), 10x (2ª coluna).

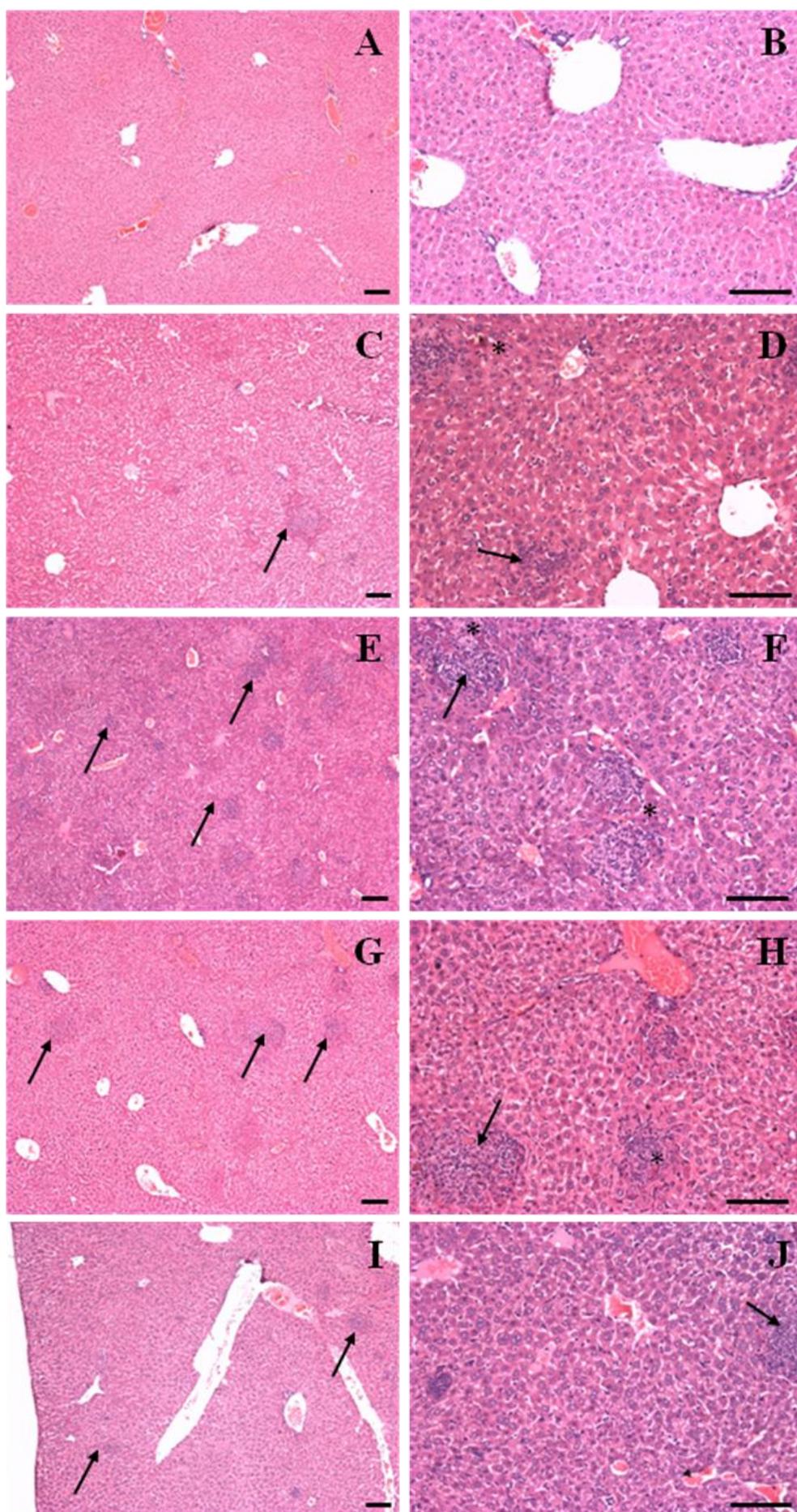


Figura 24: Fotomicrografia dos fígados de camundongos IG, monoassociados com os isolados 8.2 (*E. hirae*), 16.2 (*L. ruminis*) e 18.1 (*B. thetaiotaomicron*) e desafiados com *S. Typhimurium*. Animais IG não desafiados (A e B) e apenas desafiados com o patógeno (C e D). Fígados de animais IG previamente monoassociados com os isolados 18.1 (E e F), 16.2 (G e H) e 8.2 (I e J), após cinco dias de infecção por *S. Typhimurium*. Seta preta indica focos com aumento da celularidade. Note que a frequência dos mesmos varia entre os grupos. Asterisco mostra áreas com presença de alterações degenerativas dos hepatócitos. Representativo de quatro animais/grupo. Coloração H&E. Barra de escala = 10 µm. Objetiva: 4x (1ª coluna), 10x (2ª coluna).

6. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos podem ser resumidos como a seguir:

- No teste *ex vivo* apenas a técnica IV, utilizando o meio MRS para difusão das substâncias antagonistas, evidenciou a presença de halos de inibição para todas as bactérias reveladoras e, portanto, foi utilizada como técnica padrão (objetivo 1).
- Em 15 voluntários humanos, os resultados do teste de antagonismo *ex vivo* sugerem que existem capacidades diferentes de RC entre indivíduos, associada à produção de substâncias antagonistas, indo desde fraca até potente (objetivo 1).
- A partir das amostras fecais dos 15 voluntários foram obtidos 97 isolados, dos quais 28 foram testados quanto à atividade antagonista *in vitro* contra sete bactérias reveladoras e 14 foram selecionados para os testes *in vivo* contra *Salmonella Typhimurium* (objetivos 2 e 3).
- As reduções significativas da viabilidade de *S. Typhimurium* após o cultivo em sobrenadantes de MRS das culturas testadas estão relacionadas ao pH final mais ácido do meio (objetivo 4).
- Somente os animais GN colonizados com as amostras 8.2 (*Enterococcus hirae*), 16.2 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) e 18.1 (*Lactobacillus ruminis*) apresentaram reduções significativas nos níveis populacionais de *Salmonella* ao longo do desafio, sendo que foi observado halo de inibição contra o patógeno no teste *ex vivo* apenas nos grupos 8.2 e 16.2 (objetivo 5).
- Os animais GN monoassociados com a amostra 8.2 (*E. hirae*) apresentaram redução ($p < 0,05$) na translocação de *S. Typhimurium* no baço, enquanto que os animais GN com a amostra 18.1 (*L. ruminis*) tiveram aumento ($p < 0,05$) da translocação no fígado (objetivo 6).
- Apenas os animais GN monoassociados com o isolado 8.2 (*E. hirae*) mostraram evidentes sinais de proteção no íleo e no fígado, em relação aos danos causados pelo desafio com *S. Typhimurium* (objetivo 6).

Esses resultados permitem concluir que um conjunto sequencial de ensaios de antagonismo *ex vivo* e *in vitro*, seguido de teste *in vivo* utilizando animais IG possibilita avaliar o fenômeno de RC da microbiota dominante fecal de voluntários humanos saudáveis, e selecionar possíveis linhagens bacterianas com potencial probiótico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD, H.; SAEED, A.; WEINTRAUB, A.; NAIR, G.B.; SANDSTRÖM, G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 60, p. 33-39, 2007.
- 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 Res.**, v. 290, p. 61-69, 1997.
- AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMASO, S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **New England J. Med.**, v. 342, p. 1236–1241, 2000.
- BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, p. 1915–1920, 2005.
- BARBOSA, F.H.F.; BAMBIRRA, F.H.S.; MARTINS, F.S.; NICOLI, J.R. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação “in vitro”, “ex vivo” e “in vivo” em camundongos gnotoxênicos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, 2006.
- BERGEY’S Manual of Systematic Bacteriology**. Ed. George M. Garrity. Williams & Wilkins, 2th ed., v. 2, p. 1106, 2005.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 16, p. 521-526, 2000.
- BERKES, J.; VISWANATHAN, V.K.; SAVKOVIC, S.D.; HECHT, G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport and inflammation. **Gut**, v. 52, p. 439-451, 2008.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.J.; ROMERO, F.; GIL, A. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. **PLOS One**, v.7, p.1-11, 2012.

- BRUNDER, W.; SCHIMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Molecul. Microbiol.**, v.24, p. 767–778, 1997.
- CALVERT, R.J.; OTSUKA, M.; SATCHITHANANDAM, S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **J. Nutr.**, v. 119, p. 1610-1616, 1989.
- CASTILLO, N.A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A.M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **BMC Microbiol.**, v.11, p.1-12, 2011.
- CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAIKI, L.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J.; OOZEER, R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.27, p. 139–155, 2013.
- CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1046s-1051s, 1999.
- COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunol. Cell Biol.**, v. 2, p. 112-118, 2007.
- DAVE, M.; HIGGINS, P. D.; MIDDHA, S.; *et al.* The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Trans. Res.** 1-12, 2012.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811-818, 2007.
- DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; COSTELLO, E.K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; AND KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 11971–11975, 2010.
- ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.
- EGERT, M.; GRAAF, A.A.; SMIDT, H.; VOS, W.M.; VENEMA, K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. **Trends Microbiol.**, v. 14, p. 86-91, 2006.

- FAO/WHO (Food and Agricultural Organization/World Health Organization) Expert Consultation: **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario (Canada), 2002.
- FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.; DAMASCENO, C.A.; CISALPINO, E.O.; VIEIRA, E.C. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. **Res. Microbiol.**, v. 143, p. 151-159, 1992.
- FARIAS, L.M.; TOTOLA, A.H.; MIRANDA, C.M.; CARVALHO, M.A.; DAMASCENO, C.A.; TAVARES, C.A.; CISALPINO, E.O.; VIEIRA, E.C. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragicilin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. **Res. Microbiol.**, v. 145, p. 9-16, 1994.
- FARTHING, M.J.G. Bugs and the gut: an unstable marriage. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18, p. 233-239, 2004.
- 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. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 365-370, 2000.
- GAHAN, C.G.M.; HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 1345–1353, 2005.
- GAREAU, M.G.; SHERMAN, P.M.; WALKER, W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.7, p. 503-14, 2010.
- GEWIRTZ, A.T.; NAVAS, T.A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P.J.; MADARA, J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1882–1885, 2001.
- GOMES, D.A.; SOUZA, A.M.L.; LOPES, R.V.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R. Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. **Folia Microbiol.**, v. 51, p. 141-146, 2006.
- GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.; DARINI, A.L.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.; DE MARTINIS, E.C.; Prevalence and

- characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiol.**, v. 25, p. 668–675, 2008.
- GORDON, H.A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as tool in the study of host microbial relationships. **Bacteriol. Rev.**, v. 35, p. 390-429, 1971.
- GORE, A.L.; PAYNE, S.M. CsrA and Cra influence *Shigella flexneri* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 78, p.4674-4682, 2010.
- GOSALBES, M.J.; ABELLAN, J.J.; DURBA, A.; *et al.* Metagenomics of human microbiome: beyond 16s rDNA. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, p. 47–49, 2012.
- GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 22-26, 2008.
- GUARNER, F. **The enteric microbiota**. Morgan & Claypool Life Sciences, 2012.
- GUSTAFSSON, B. E. The germ-free: its potential and its problems. *In* COATES, M. E. & GUSTAFSSON, B. E. (eds.). **The Germ-free Animal in Biomedical Research**. London: Laboratory Animals Ltd., p. 1-10, 1984.
- HAYASHI, F.; SMITH, K.D.; OZINSKY, A.; HAWN, T.R.; YI, E.C.; *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature** v. 410, p. 1099–1103, 2001.
- HOHMANN, A.W.; SCHMIDT, G.; ROWLEY, D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. **Infection and Immunity**, v. 22, p. 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, 156 p., 1977.
- HOLMES, E.; LI, J. V.; ATHANASIOU, T.; *et al.* Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. **Trends Microbiol.**, v. 19, p. 349-359, 2011.
- HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p.1324-1332, 2006.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18, p. 299-313, 2004.
- JIMÉNEZ, M.M.S; CASTRO, N.M.C. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. **Infectio**, v. 7, p. 22-29, 2003.

- KOTLOFF, K.L.; WINICKOFF, J.P.; IVANOFF, B.; CLENENS, J.D.; SWERDLOW, D.L.; SANSONETTI, P.J.; ADAK, G.K.; LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **WHO Bull.**, v. 77, p. 651-666, 1999.
- KOTOWSKA, M.; ALBRECHT, P.; SZAUEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 2, p. 583-590, 2005.
- KOVACS, D.J.; BERK, T. Recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis treated with *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in combination with antibiotic therapy: a case report. **J. Am. Board Farm. Pract.**, v. 13, p. 138-140, 2000.
- LANE D.J. **16S/23S rRNA sequencing**. In Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Edited by Stackebrandt E, Goodfellow M. Chichester: Wiley; p. 115-175, 1991.
- LAWLEY, T.D.; WALKER, A.W. Intestinal colonization resistance. **Immunol.**, v.138, p.1-11, 2013.
- LEBLANC, A.M.; CASTILLO, N.A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Intern. J. Food Microbiol.**, v.138, p.223-231, 2010.
- LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v.124, p. 837-848, 2006.
- LI, P.; YU, Q.; YE, X.; WANG, Z.; YANG, Q. *Lactobacillus* S-layer protein inhibition of *Salmonella*-induced reorganization of the cytoskeleton and activation of MAPK signaling pathways in Caco-2 cells. **Microbiology**, v.157, p. 2639-2646, 2011.
- LIÉVIN, V.; PEIFFER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut**, v. 47, p. 646-652, 2000.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1035S-1045S, 1999.

- MACFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 12, p. 193-207, 2000.
- 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**, v. 79, p. 183-189, 2001.
- MALTBY, R.; LEATHAM-JENSEN, M.P.; GIBSON, T.; COHEN, P.S.; CONWAY, T. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine, **PLoS ONE**, v. 8, e53957, 2013.
- MANDAR, R.; MIKELSAAR, M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. **Biol. Neonate**, v. 69, p. 30–35, 1996.
- MARIAT, D.; FIRMESSSE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARAES, V.D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTHER, G.; FURET, J.P. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 1-6, 2009.
- MARTINOLI, C.; CHIAVELLI, A.; RESCIGNO, M. Entry route of *Salmonella* Typhimurium directs the type of induced immune response. **Immunity**, v. 27, p. 975-984, 2007.
- MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 83–92, 2005.
- MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; ARANTES, R.M.E.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 352-359, 2007.
- MARTINS, F.S.; SILVA, A.A.; VIEIRA, A.T.; BARBOSA, F.H.F.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 623-630, 2009.
- MARTINS, 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*. **Arch. Microbiol.**, v. 192, p. 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. **Intern. J. Med. Microbiol.**, v. 301, p. 359-364, 2011.
- MARTINS, F.S.; GENEROSO, S.V.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVA, A.M.; NEUMAN, E.; LIMA-FILHO, J.V.M.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; CARMONA, D.C.; CARDOSO, V.N.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Modelos Animais Gnotobióticos e Convencionais para a Seleção e Avaliação de Probióticos. In: Ferreira CLLF. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. 1ed. Viçosa: Rubio, 2012.
- MASTROENI, P; GRANT, A.J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unraveling host and pathogen determinants. **Expert Rev. Molec. Med.**, v. 13, p. 1-15, 2011.
- MATHAN, M.M; MATHAN, V.I. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S314-S318, 1991.
- MEDEIROS, M.A.N.; OLIVEIRA, D.C.N.; RODRIGUES, D.P.; FREITAS, D.R.C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, p. 555-560, 2011.
- MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M. Review article: Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. **Food Rev. Intern.**, v.27, p.192–212, 2011
- MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F.M.; TEIXEIRA, S.M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 1-9, 2005.

- MORTON, R.D. Aerobic plate count. *In*: DOWNES F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbial examination of foods**. 4 ed. American Public Health Association, cap. 7, p. 63-67, 2001.
- MOWAT, A.M.; AGACE, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 667-685, 2014.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P.V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 334, p.1-15, 2012.
- NARDI, R.M.D.; SANTOS, A.R.M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. **Anaerobe**, v. 5, p. 409-411, 1999.
- NEVILLE, B.A.; FORDE, B.M.; CLAEISSON, M.J.; DARBY, T.; COGHLAN, A.; *et al.* Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile Lactobacilli. **PLoS ONE**, v. 7, e40592, 2012.
- NICOLI, J.R.; RAMARÉ, F.; RAIBAUD, P. Antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp. from human intestinal flora in mice. **Rev. Microbiol.**, v. 23, p. 226-230, 1992.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. *In*: LP Castro; LGV Coelho. (Org.). **Gastroenterologia**. 1 ed. Rio de Janeiro, v. 1, p. 1037-1047, 2004.
- NOGUCHI, N.; NAKAMINAMI, H.; NAKASE, K.; SASATSU, M. Characterization of *Enterococcus* strains contained in probiotic products. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, p. 1469-1473, 2011.
- NUENO-PALOP, C.; NARBAD, A. Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 145, p. 390-394, 2011.
- OCHOA, I. M. F.; RODRÍGUES A. V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Rev. Latinoamer. Microbiol.**, v. 47, p. 25-42, 2005.
- PASTEUR, L. Observations relatives à la note précédente de M. Duclaux. **C.R. Acad. Sci. (Paris)**, v. 100, p. 68, 1885.

- PÉREZ-SOTELO, L. S.; TALAVERA-ROJAS M.; MONROY-SALAZAR H. G.; LAGUNAS-BERNABÉ S.; CUARÓN-IBARGÜENGOYTIA J. A.; JIMENEZ R. M.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN J. C. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 47, p. 70-75, 2005.
- PHILPOTT, D.J.; EDGEWORTH, J.D.; SANSONETTI, P.J. The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. **Phil. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci.**, v. 355, p. 575-586, 2000.
- PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Antibacterial substances and bacteriocins. **Lait**, v. 72, p. 113-142, 1992.
- PLEASANTS, R. R. Gnotobiotics *In*: Melby Jr, E. C., ALTMANN, N. H. **Handbook of Laboratoty Animal Science**. Cleveland, C.R.C press, p. 119-174, 1974.
- QAMAR, A.; ABOUDOLA, S.; WARNY, M.; MICHETTI, P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J.T.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2762-2765, 2001.
- RAMARE, F.; NICOLI, J. R.; DABARD, J.; CORRING, T.; LADIRE, M.; GUEUGNEAU, A.; RAIBAUD, P. Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and *in vitro*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2876-2883, 1993.
- REA, M.C.; ALEMAYEHU, D.; CASEY, P.G.; O'CONNOR, P.M.; LAWLOR, P.G.; WALSH, M.; SHANAHAN, F.; KIELY, B.; ROSS, R.P.; HILL, C. Bioavailability of the anti-clostridial bacteriocin thuricin in gastrointestinal tract. **Microbiol.**, v.160, p.439-445, 2014.
- REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2008 (Dissertação, Mestrado).
- REUTER, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 2, p. 43–53, 2001.
- REYSENBACH, A.L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a mid-atlantic

- ridge hydrothermal vent. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 66, p. 3798-3806, 2000.
- 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. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 81, p. 251-256, 1996.
- SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Medicine Science (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p.107-133, 1977.
- SAVAGE, D.C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technol.**, v. 22, p. 82-87, 1987.
- SAAVEDRA, J. M.; DATTILO, A. M. Early development of intestinal microbiota: implications for future health. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 41, p. 717-731, 2012.
- SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Link: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em março de 2013.
- SCHAMBERGER, G.P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, v. 65, p.1381–1387, 2002.
- SEBAIHIA M.; WREN, B.W.; *et al.* The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. **Nat. Genet.**, v. 38, p. 779-186, 2006.
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 405–440, 2004.
- SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 90, p. 859–904, 2010.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 121, p. 123-138, 2008.
- SHIN, R.; SUZUKI, M.; MORISHITA, Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p.201–206, 2002.

- SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.
- SILVA, M. E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais**. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1986 (Dissertação, Mestrado).
- SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella* Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 331-336, 1999.
- SILVA, S. H.; VIEIRA, E. C.; DIAS, R. S.; NICOLI, J. R. Antagonism against *Vibrio cholerae* by a diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 161-164, 2001.
- SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 29-37, 2004.
- SMEDLEY, J. G.; FISHER, D. J.; SAYEED, S.; CHAKRABARTI, G.; MCCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 152, p. 183-204, 2004.
- SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Sem. Immunol.**, v. 19, p. 59–69, 2007.
- SOMMER, F; BACKHED, F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 227-238, 2013.
- SOUZA, T. C.; SILVA, A. M.; DREWS, J. R. P.; GOMES, D. A.; VINDEROLA, C. G.; NICOLI, J. R. *In vitro* evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, v. 4, p. 179-186, 2013.
- STECHER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 14, p. 82-91, 2011.
- VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS, J. M.; LEKKERKERK-VAN DER WEES, J. E. C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **J. Hyg.**, v. 69, p. 405-411, 1971.

- VANDENBERG, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolics products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 221-238, 1993.
- VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J. *et al.* Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 584–640, 2001.
- VIEIRA, L.Q.; SANTOS, L.M.; NEUMANN, E.; SILVA, A.P.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R. Probiotics protect mice against experimental infections. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 42, p. S168-S169, 2008.
- WALTER, J.; LEY, R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.65, p. 411-429, 2011.
- WHITFORD, M.F.; MCPHERSON, M.A.; FORSTER, R.J.; TEATHER, R.M. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p. 569-574, 2001.
- WIXON, J. Pathogen special: *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Xylella fastidiosa*. **Yeast**, v. 17, p. 307-313, 2000.
- YURDUSEV, N.; NICOLAS, J.L.; LADIRE, M.; DUCLUZEAU, R.; RAIBAUD, P. Antagonistic effect exerted by three strictly anaerobic strains against various strains of *Clostridium perfringens* in gnotobiotic rodent intestines. **Can. J. Microbiol.**, v. 33, p. 226-231, 1987.
- YURDUSEV, N.; LADIRE, M.; DUCLUZEAU, R.; RAIBAUD P. Antagonism exerted by an association of a *Bacteroides thetaiotaomicron* strain and a *Fusobacterium necrogenes* strain against *Clostridium perfringens* in gnotobiotic mice and in fecal suspensions incubated in vitro. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 724-731. 1989.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, voluntariamente do estudo: **Antagonismo contra bactérias patogênicas pela produção de substâncias difusíveis por bactérias da microbiota fecal humana**. Trata-se de um estudo em nível de mestrado vinculado a uma pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

O estudo tem por objetivo avaliar por testes *ex vivo* a capacidade antagonista protetora contra bactérias enteropatogênicas reveladoras dos micro-organismos presentes na microbiota fecal de voluntários humanos sadios.

O participante (a) deverá permitir a coleta de amostras fecais, em vasilhame esterilizado apropriado e com toda respeito à sua intimidade.

Riscos: Não haverá riscos envolvidos para o paciente durante o procedimento de coleta das amostras microbiológicas já que o processo de evacuação fecal é natural. Não haverá em momento algum contato entre o voluntário e as bactérias enteropatogênicas reveladoras já que os testes de antagonismos *ex vivo* serão feitos posteriormente e num outro local (Departamento de Microbiologia da UFMG).

Benefícios: A participação do voluntário neste estudo contribuirá para a determinação do grau de resistência à colonização contra bactérias enteropatogênicas oferecida pelos componentes da microbiota intestinal numa amostra populacional de seres humanos sadios. A determinação destas características é de importante relevância para a gastro-enterologia e a ecologia microbiana do trato digestivo. Além disso, os componentes bacterianos isolados das fezes de voluntários apresentando elevada capacidade de antagonismo protetor contra bactérias enteropatogênicas poderão ser utilizados para o desenvolvimento de produtos probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios para a saúde do hospedeiro.

As dúvidas acerca dos riscos, benefícios, procedimentos serão esclarecidas sempre que solicitadas. O participante terá a liberdade de deixar de participar do estudo se o desejar a qualquer momento, sem quaisquer constrangimentos para si.

As informações obtidas neste estudo serão confidenciais, com preservação da identidade e, serão utilizadas apenas para fins de pesquisa.

Ciente das informações acima, eu _____, aceito participar do estudo “Antagonismo contra bactérias patogênicas pela produção de substâncias difusíveis por bactérias da microbiota fecal humana”.

Prof. Jacques Robert Nicoli – Professor Titular do Departamento de Microbiologia da UFMG - Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901. Telefone: (31)3409.2757.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UFMG

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 118 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Antagonismo contra bactérias patogênicas pela produção de substâncias inibitórias difusíveis por bactérias da microbiota fecal humana”, que tem como responsável Jacques Robert Nicoli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/08/2014. Este certificado expira-se em 12/08/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 118 / 2014, related to the Project entitled “Antagonism against pathogenic bacteria through the production of inhibitory diffusible substances by bacteria from the human fecal microbiot”, under the supervision of Jacques Robert Nicoli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/08/2014. This certificate expires in 12/08/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 12/08/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Tabela: Identificação presuntiva das bactérias isoladas da microbiota dominante fecal de voluntários humanos

Isolado*	Atmosfera de crescimento	Catalase	Coloração de Gram	Identificação (VITEK2)
1.1	Anaeróbio obrigatório	+	- Bacilos	ND
1.2	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocos	ND
1.3	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
1.4	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocos	ND
1.5	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
1.6	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
3.1	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Cocobacilos	ND
3.2	Anaeróbio facultativo	+	+ Cocos	ND
3.3	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
3.4	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocobacilos	ND
3.5	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
5.1	Anaeróbio obrigatório	-	- Cocobacilos	ND
5.2	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
5.3	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
5.4	Anaeróbio obrigatório	-	- Cocobacilos	ND
5.5	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
5.6	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
5.7	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
7.1	Anaeróbio obrigatório	+	- Cocobacilos	ND

7.2	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
7.3	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
7.4	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocobacilos	ND
7.5	Anaeróbio obrigatório	-	- Cocobacilos	ND
7.6	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
7.7	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocobacilos	ND
8.1	Microaerófilo	-	+ Bacilos	Não identificado
8.2	Anaeróbio facultativo	-	+ Cocobacilos	<i>Enterococcus durans</i> (95%)
8.3	Anaeróbio facultativo	+	+ Cocobacilos	<i>Staphylococcus equorum</i> (97%)
8.4	Microaerófilo	-	+ Bacilos	Não identificado
8.5	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	Não identificado
8.6	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	Não identificado
8.7	Microaerófilo	-	+ Bacilos	Não identificado
9.1	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
9.2	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (94%)
9.4	Perdido			
9.6	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (94%)
9.7	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	Não identificado
9.8	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos/cocos	ND
9.9	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Cocobacilos	ND
10.1	Anaeróbio obrigatório	+	- Bacilos	ND
10.2	Anaeróbio obrigatório	+	- Bacilos	ND

10.3	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
10.4	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
10.5	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocos	ND
10.6	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	ND
10.7	Anaeróbio facultativo	-	+ Cocos	ND
12.1	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	ND
12.2	Anaeróbio facultativo	-	+ Cocos	ND
12.3	Anaeróbio facultativo	+	+ Cocobacilos	ND
12.4	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	ND
12.5	Anaeróbio obrigatório	-	- Cocobacilos	ND
12.6	Microaerófilo	+	+ Cocobacilos	ND
12.7	Anaeróbio obrigatório	+	- Cocobacilos	ND
12.8	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
15.1	Microaerófilo	-	+ Bacilos	ND
15.2	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
15.3	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
15.4	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
15.5	Anaeróbio obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
15.6	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (94%)
16.1	Microaerófilo	-	+ Cocobacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (98%)
16.2	Microaerófilo	-	- Bacilos	Não identificado

16.3	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	Não identificado
16.4	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (91%)
16.5	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	Não identificado
16.6	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
16.7	Anaeróbio obrigatório	-	+ Cocobacilos	Não identificado
17.1	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	<i>Escherichia coli</i> (97%)
17.2	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (94%)
17.3	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (91%)
17.4	Anaeróbio obrigatório	-	- Cocobacilos	<i>Bacteroides vulgatus</i> (97%)
17.5	Microaerófilo	-	+ Bacilos	Não identificado
17.6	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	<i>Escherichia coli</i> (97%)
17.7	Anaeróbio obrigatório	ND	- Bacilos	ND
18.1	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (95%)
18.2	Perdido			
18.3	Anaeróbio obrigatório	-	- Bacilos	Não identificado
18.4	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (97%)
18.5	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (93%)
18.6	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
19.1	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	<i>Escherichia coli</i> (97%)
19.2	Anaeróbio obrigatório	-	+ Bacilos	ND
19.3	Perdido			
19.4	Anaeróbio facultativo	+	- Bacilos	<i>Escherichia coli</i> (94%)

21.1	Anaeróbico obrigatório	-	+ Cocobacilos	ND
21.2	Anaeróbico obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
21.3	Anaeróbico obrigatório	-	+ Bacilos	ND
21.4	Anaeróbico facultativo	+	- Bacilos	ND
21.5	Anaeróbico obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
21.6	Anaeróbico obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
21.7	Anaeróbico obrigatório	-	- Cocobacilos	ND
21.8	Anaeróbico obrigatório	ND	+ Bacilos	ND
22.1	Anaeróbico obrigatório	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (91%)
22.3	Anaeróbico facultativo	+	- Bacilos	<i>Escherichia coli</i> (96%)
22.4	Anaeróbico obrigatório	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (88%)
22.7	Anaeróbico obrigatório	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (95%)
22.8	Microaerófilo	-	+ Bacilos	<i>Bifidobacterium</i> spp. (93%)

*O primeiro número do isolado corresponde ao código do voluntário.

ND: não determinado

Não identificado: o sistema VITEK2 não identificou o isolado no seu banco de dados

(n%): probabilidade da identificação pelo sistema VITEK2