

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**Segurança e Efeito Probiótico de *Weissella paramesenteroides*  
WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com *Salmonella*  
*Typhimurium* em camundongos**

**Luige Biciati Alvim**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes**


**CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Elisabeth Neumann**

Belo Horizonte

2015

**Luige Biciati Alvim**

**Segurança e Efeito Probiótico de *Weissella paramesenteroides*  
WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com *Salmonella*  
*Typhimurium* em camundongos**



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

Belo Horizonte, MG

2015

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Paulo e Leila, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Ao meu irmão, Lucas, pela amizade, afeto e companheirismo de sempre.*

*“Onde poderemos nós alguma vez encontrar alguém que tenha recebido seja de quem for mais benefícios do que aqueles que os filhos receberam dos pais”.*

Xenofonte

## AGRADECIMENTO

A Deus.

Ao meu orientador, professor Álvaro Cantini Nunes, pela oportunidade, orientação, amizade, ensinamentos e confiança.

À minha co-orientadora, professora Elisabeth Neumann, pela orientação, sugestões e conselhos.

Ao professor Jacques Robert Nicoli por todo apoio fornecido.

À professora Rosa Maria Esteves Arantes pelo auxílio com as análises histopatológicas.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e a FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À coordenação, professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitos, pela amizade, companheirismo e auxílio na condução dos experimentos.

A todos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, pela ajuda constante.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Bactérias lácticas (GEBa) pelas discussões acaloradas e os bons momentos.

À Thaís, por todo amor, compreensão e incentivo.

A todos meus familiares,

E principalmente aos meus pais e meu irmão, por todo apoio, carinho e afeto.

**Obrigado!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 SUINOCULTURA.....	14
1.1.1 Microbiota do trato gastrointestinal de suínos.....	14
1.1.2 Aditivos alimentares na suinocultura.....	16
1.2 PROBIÓTICOS .....	17
1.2.1 Histórico e definição.....	17
1.2.2 Identificação e critérios de seleção.....	18
1.2.3 Efetividade de um probiótico.....	20
1.2.4 Mecanismos de ação dos probióticos .....	20
1.2.5 Probióticos para suínos .....	24
1.2.6 Legislação .....	27
1.3 O GÊNERO <i>Weissella</i> .....	28
1.3.1 Histórico .....	28
1.3.2 Características taxonômicas, morfológicas e metabólicas.....	29
1.3.3 Utilização como probiótico.....	30
1.4 O GÊNERO <i>Salmonella</i> .....	31
1.4.1 História, taxonomia e ecologia .....	31
1.4.2 Transmissão e infecção.....	31
1.4.3 Translocação .....	32
1.4.4 Salmonelose em suínos.....	33
1.4.5 Modelo murino de salmonelose.....	34
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3.2.1 Caracterizar as propriedades probióticas <i>in vitro</i> de bactérias do ácido lático isoladas de suínos. ....	37
3.2.2 Selecionar a linhagem com melhor resposta frente aos testes de caracterização <i>in vitro</i> para realização de ensaios <i>in vivo</i> em modelo experimental murino de salmonelose. ....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 TESTES <i>IN VITRO</i> .....	38

4.1.1	Origem das amostras.....	38
4.1.2	Manutenção e ativação das linhagens de BAL.....	38
4.1.3	Produção de peróxido de hidrogênio .....	39
4.1.4	Produção de exopolissacarídeos .....	39
4.1.5	Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	39
4.1.6	Atividade isoantagonista.....	40
4.2	TESTES <i>IN VIVO</i> .....	41
4.2.1	Linhagens bacterianas e condições de cultivo .....	41
4.2.2	Camundongos .....	41
4.2.3	Manejo e aspectos éticos .....	42
4.2.4	Desenho experimental .....	43
4.2.5	Variação de peso e taxa de mortalidade .....	45
4.2.6	Níveis populacionais e translocação de <i>S. Typhimurium</i> .....	46
4.2.7	Atividade antagonista <i>ex vivo</i> .....	46
4.2.8	Análise histopatológica.....	47
4.2.9	Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) total .....	48
4.2.10	Expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas .....	48
4.2.11	Análise estatística .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1	TESTE <i>IN VITRO</i> .....	50
5.1.1	Produção de peróxido de hidrogênio .....	50
5.1.2	Produção de exopolissacarídeos .....	52
5.1.3	Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	54
5.1.4	Atividade isoantagonista.....	57
5.2	CRITÉRIO DE SELEÇÃO DA LINHAGEM PARA OS TESTES <i>IN VIVO</i> .....	59
5.3	TESTES <i>IN VIVO</i> .....	60
5.3.1	Variação de peso e taxa de mortalidade .....	60
5.3.2	Colonização bacteriana e translocação de <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	62
5.3.3	Antagonismo <i>ex vivo</i> .....	66
5.3.4	Análise histopatológica.....	67
5.3.5	Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) total .....	73
5.3.6	Expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas .....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais vias de ação de um probiótico.....	23
<b>Figura 2.</b> Árvore filogenética de bactérias do ácido láctico.....	29
<b>Figura 3.</b> Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio das diferentes linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos. ....	50
<b>Figura 4.</b> Linhagem de bactéria do ácido láctico isolada de suíno cultivada em ágar MRS comum (esquerda) e ágar MRS modificado (direita).....	52
<b>Figura 5.</b> Exemplo de resultado obtido a partir da técnica de disco-difusão utilizada para a determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. ....	55
<b>Figura 6.</b> Variação de peso de camundongos convencionais tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e infectados com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	60
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração de <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 na sobrevivência de camundongos convencionais infectados com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	61
<b>Figura 8.</b> Níveis populacionais de <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 nas fezes de camundongos monoassociados com $10^8$ UFC/mL.....	62
<b>Figura 9.</b> Translocação de <i>Salmonella</i> Typhimurium para o fígado de camundongos gnotobióticos tratados ou não com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4.....	63
<b>Figura 10.</b> Translocação de <i>Salmonella</i> Typhimurium para o baço de camundongos gnotobióticos tratados ou não com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4.....	64
<b>Figura 11.</b> Níveis populacionais de <i>Salmonella</i> Typhimurium nas fezes dos camundongos gnotobióticos tratados ou não com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4.....	65
<b>Figura 12.</b> Índice hepático médio dos grupos experimental e controle de camundongos convencionais tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 após nove dias de infecção com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	67
<b>Figura 13.</b> Índice esplênico médio dos grupos experimental e controle de camundongos convencionais tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 após nove dias de infecção com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	67
<b>Figura 14.</b> Aspectos histológicos do fígado e baço (4X) dos animais convencionais.....	69
<b>Figura 15.</b> Score histopatológico total e por parâmetros no íleo de camundongos convencionais tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e infectados ou não com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	70
<b>Figura 16.</b> Score histopatológico total e por parâmetros no cólon de camundongos convencionais tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e infectados ou não com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	70

<b>Figura 17.</b> Aspectos histológicos do íleo (4X) e cólon (10X) de camundongos convencionais.....	71
<b>Figura 18.</b> Score histopatológico total e por parâmetros no íleo de camundongos isentos de germes tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e infectados ou não com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	73
<b>Figura 19.</b> Score histopatológico total e por parâmetros no cólon de camundongos isentos de germes tratados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e infectados ou não com <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	73
<b>Figura 20.</b> Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no conteúdo intestinal de camundongos monoassociados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 infectados com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	74
<b>Figura 21.</b> Expressão relativa das citocinas Tnfa, Infg, Il17a, Il6, Tgfb1 e Il10 no intestino delgado de camundongos monoassociados com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 infectados com <i>Salmonella</i> Typhimurium. ....	76



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Probióticos utilizados na dieta de suínos e seus efeitos sobre o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, função intestinal e função imune..... 25
- Tabela 2.** Principais produtos probióticos para suínos comercializados no Brasil..... 26
- Tabela 3.** Designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o gênero *Weissella*. 28
- Tabela 4.** Grupos de estudo, esquema de tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infecção com *Salmonella* Typhimurium em camundongos convencionais ..... 43
- Tabela 5.** Grupos de estudo, esquema de tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infecção com *Salmonella* Typhimurium em camundongos isentos de germe ..... 45
- Tabela 6.** Caracterização qualitativa dos perfis de produção de peróxido de hidrogênio das linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos. .... 51
- Tabela 7.** Caracterização qualitativa do perfil de síntese de exopolissacarídeo pelas linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos..... 53
- Tabela 8.** Níveis de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos..... 55
- Tabela 9.** Atividade isoantagonista das linhagens de bactéria do ácido láctico isoladas de suínos que apresentaram os melhores índices em relação aos ensaios *in vitro* ..... 58
- Tabela 10.** Atividade antagonista *ex vivo* de *Weissella paramesenteroides* WpK4 isolada de suíno contra diferentes bactérias reveladoras ..... 66

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

**%** - Percentagem

**μ** – Micro

**°C** – Grau Celsius

**A.C** – Antes de Cristo

**ABIPECS** - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BAL** – Bactérias do Ácido Lático

**BHI** – *Brain Heart Infusion*

**CETEA** - Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CNPSA** – Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves

**COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**CV** – Camundongo convencional

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid*

**ELISA** – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FAO** – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**g** – Grama

**GRAS** – *Generally Recognized As Safe*

**h** – Horas

**Ifng** – Interferon gama

**IG** – Camundongo isento de germes

**Ig** – Imunoglobulina

**IL1** – Interleucina 1

**IL6** – Interleucina 6

**IL10** – Interleucina 10

**IL12** – Interleucina 12

**IL17a** – Interleucina 17a

**L** – Litro

**m** – Mili

**M** – Molar

**MAMPs** – *Microorganism Associated Molecular Pattern*

**MATS** – *Microbial Adhesion to Solvents*

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**mRNA** – *messenger Ribonucleic Acid*

**MRS** – De Man, Rogosa, Sharpe

**NB2** – Nível de Biossegurança 2

**NAFTA** – Tratado Norte-Americano de Livre Comércio

**nm** – Nanômetro

**OD** – *Optical Density*

**OECD** – *Organization for Economic Co-Operation and Development*

**p** – Peso

**PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**PRRs** – *Pattern Recognition Receptors*

**RNA** – *Ribonucleic Acid*

**rRNA** – *ribosomal Ribonucleic Acid*

**sIgA** – *Secretory Immunoglobulin A*

**Tgfb1** – *Transforming Growth Factor Beta 1*

**TGI** – Trato Gastrointestinal

**Tnfa** – *Tumor Necrosis Factors Alpha*

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

**USDA** - *United States Department of Agriculture*

**UV** – Ultra Violeta

**v** – Volume

**WHO** – *World Health Organization*

## RESUMO

A diarreia em suínos causada por *Salmonella* spp. e outros patógenos pode ser um sério problema para os produtores e, por isso, requer prevenção e tratamento. Antimicrobianos vem sendo utilizados para combater estas infecções, entretanto, a possível seleção de resistência bacteriana devido à aplicação de doses sub-terapêuticas destas drogas tem levado as autoridades competentes a proibir seu uso indiscriminado na alimentação animal como tradicionais promotores de crescimento. Assim, os probióticos têm emergido como uma potencial alternativa, pois proporcionam benefícios à microbiota intestinal e mostram capacidade imunomoduladora em seu hospedeiro. Neste contexto, este estudo teve como objetivo selecionar linhagens autóctones de Bactérias do Ácido Lático (BAL) a partir de sua segurança e propriedades probióticas para uso como suplemento alimentar para suínos como uma terapia livre de antimicrobianos. Vinte e quatro BAL dos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* obtidas a partir de fezes, mucosa nasal e oral de suínos foram previamente identificadas e submetidas a testes *in vitro*. Neste trabalho, as linhagens isoladas passaram por outros ensaios de caracterização *in vitro* (teste de produção de peróxido de hidrogênio, síntese de exopolissacarídeo, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e atividade isoantagonista), sendo a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4 o candidato probiótico mais promissor. Esta linhagem cumpriu plenamente os requisitos estabelecidos nos testes preliminares *in vitro*, demonstrando resistência ao pH ácido estomacal e aos sais biliares intestinais, superfície celular hidrofóbica, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e exopolissacarídeos (EPS), forte antagonismo contra patógenos bacterianos e resistência a antibióticos apenas codificada intrinsecamente (oxacilina e vancomicina). Assim, a linhagem WpK4 foi selecionada para ser testada em modelos de infecção experimental com salmonela em camundongos isentos de germe e convencionais. A administração com *W. paramesenteroides* WpK4 em camundongos convencionais e isentos de germe mostrou-se segura, não apresentando sinais de translocação para o fígado e baço, não promovendo lesões nestes órgãos e no intestino, nem aumento da taxa de mortalidade ou perda de peso nos animais. WpK4 mostrou efeito probiótico ao atenuar a perda de peso e mortalidade, assim como promover a proteção do intestino delgado e cólon dos animais infectados com *Salmonella* Typhimurium. Além disso, a linhagem foi capaz de modular a resposta imune por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzir mediadores regulatórios. Estes resultados demonstram as propriedades probióticas de *Weissella paramesenteroides* WpK4, habilitando-a para possível uso em suínos.

**Palavras-chave:** *Weissella paramesenteoides* WpK4, probióticos, suínos, *Salmonella*

## ABSTRACT

Diarrhea in piglets by *Salmonella* spp. and other pathogens can be a serious problem and require prevention and treatment. Antimicrobials have been used to combat these infections; however, the induction of bacterial resistance due to the indiscriminating use of sub-therapeutic doses into animal food has led government authorities to prohibit these traditional growth promoters. Thus, probiotics have emerged as potential substitutes, as they provide benefits to the intestinal microbiota and show immunomodulatory capacity in its host. The aim of this study was to select autochthonous strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from healthy piglets according to their probiotic properties and safety for further use as a food supplement for piglets as a non-drug therapy for controlling gastrointestinal microbiota dysbiosis and stimulating host immune system. Twenty-four LAB of *Lactobacillus* and *Weissella* genera isolated from oral and nasal mucosa and feces of piglets were previously identified and subjected to *in vitro* assays. In this work, strains were *in vitro* tested for hydrogen peroxide production, exopolysaccharide synthesis, antimicrobial susceptibility and isoantagonistic activity. The *Weissella paramesenteroides* WpK4 was considered to be the most promising probiotic candidate, as it presented high resistance to acidic pH and bile salts, a hydrophobic cell surface, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and EPS production, strong antagonism against bacterial pathogens, and only intrinsically-encoded antibiotic resistance (oxacillin and vancomycin). Thus, it was selected for *in vivo* trials in an experimental mouse model of salmonellosis. Conventional and germ-free mice fed with WpK4 showed no signs of bacterial translocation to the liver or spleen and decreased salmonella translocation to these organs. Significantly, WpK4 colonization attenuated the weight loss, fostered the preservation of intestinal architecture and integrity, and promoted survival in mice following infection with *Salmonella* Typhimurium. In addition, WpK4 modulates immune response by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines and induce anti-inflammatory mediators. These findings validate the suitable probiotic properties of the *W. paramesenteroides* WpK4 strain, and provide for its eventual use in piglets.

**Keywords:** *Weissella paramesenteroides* WpK4, probiotics, swine, *Salmonella*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SUINOCULTURA

O crescimento da população mundial e o desenvolvimento econômico, associados à urbanização e à diversificação alimentícia nos países em desenvolvimento, geraram uma demanda suplementar, promovendo uma modificação no consumo de alimentos, com uma proporção de produtos animais crescendo em ritmo mais acelerado (OECD-FAO, 2009). A carne suína, que corresponde a 40% do consumo mundial de proteína animal, tem expressiva participação no atendimento deste contingente, tornando necessário encontrar melhor eficiência produtiva a fim de suprir esta demanda (USDA, 2015).

A criação de suínos ocupa lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio nacional. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com mais de 3,4 milhões de toneladas deste produto em 2013 e um faturamento médio anual de US\$ 1.4 bilhões (ABIPECS, 2015).

Estudos do Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPSA) mostram que o Brasil apresenta o menor custo de produção mundial, cerca de US\$ 0,55/kg, e produz carcaças de qualidade comparada à dos grandes exportadores. Dessa forma, o mercado internacional sinaliza para o crescimento das exportações brasileiras, com possibilidades de abertura de novos mercados como o Tratado Norte-Americano de Livre Comércio (NAFTA), China, África do Sul, Chile, Taiwan, União Européia e Japão (EMBRAPA-CNPSA, 2015).

Devido a uma maior concorrência por novos mercados consumidores de carne suína, o risco de uma perda econômica relacionada à diminuição do desempenho e da saúde dos animais está cada vez maior (Pancheniak, 2005; OCED-FAO, 2009). Neste sentido, vários países têm buscado o aperfeiçoamento das técnicas de manejo e têm direcionado recursos, a fim de desenvolver aditivos alimentares eficientes que, associados, permitam melhorar e intensificar a produção (Costa, Tse e Miyada, 2007).

### 1.1.1 Microbiota do trato gastrointestinal de suínos

O trato gastrointestinal (TGI) dos suínos possui um ecossistema complexo de microrganismos que apresentam sua constituição, sobrevivência e manutenção influenciadas por diversos fatores como, por exemplo, a fase da vida e a genética do animal, a localização

no TGI e a alimentação (Konstantinov et al., 2004; Bauer et al., 2006). O TGI nestes animais é composto, sucessivamente, pela boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus (Dinis, 2010).

As superfícies mucosas dos suínos, assim como acontece em outros mamíferos, são estéreis em condições fetais. A colonização bacteriana inicia-se no momento do parto, à medida que os leitões vão atravessando o canal obstétrico e entram em contato com o muco vaginal e, posteriormente, pelo contato com as fezes e via amamentação (Canibe e Jensen, 2009).

Após o parto, bactérias tolerantes ao pH alto colonizam diferentes seções do TGI, devido à insuficiente secreção de ácido clorídrico pelo estômago. Com o início da ingestão de leite, o pH decresce e somente bactérias resistentes ao ambiente ácido persistem e proliferam no intestino dos animais (Canibe e Jensen, 2009).

Os primeiros microrganismos colonizadores do TGI dos leitões são clostrídios e enterobactérias, sendo relatada a presença de *E. coli* no intestino de leitões duas horas após o nascimento (Inoue et al., 2005). Posteriormente, ocorre uma segunda fase de colonização por bactérias da família Lactobacillaceae que pode perdurar por toda a vida do animal (Petri, Hill e Van Kessel, 2010).

Os gêneros predominantes na microbiota do intestino delgado dos suínos são *Lactobacillus* e *Streptococcus* em densidades de  $10^7$  a  $10^9$  UFC/g de mucosa. Além disso, ao longo de todo o TGI está presente *Bifidobacterium* em uma densidade populacional de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g de mucosa estomacal e  $10^8$  UFC/g de mucosa da porção distal do intestino delgado. No ceco e cólon são observadas quantidades similares de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, além de *Bacteroides* e Eubacteriaceae (Dinis, 2010).

A microbiota do TGI é responsável por induzir alterações fisiológicas e imunitárias importantes no hospedeiro. Estudos revelam que a presença de uma microbiota normal auxilia na formação das junções de oclusão, as quais aumentam a aderência entre células adjacentes, e influenciam a taxa de regeneração celular dos enterócitos (Danielsen et al., 2007; Willing e Van Kessel, 2007).

A relação entre microbiota normal e hospedeiro é bastante sensível, sendo que condições adversas podem facilmente alterar o equilíbrio deste fator e acabar promovendo o aparecimento de doenças que podem ser causadas por membros da própria microbiota, a qual apresenta tanto bactérias benéficas quanto potencialmente patogênicas. Portanto, fatores externos que possam promover o desequilíbrio desta relação e favorecer a proliferação das

bactérias patogênicas devem ser monitorados periodicamente de modo a permitir a manutenção da simbiose existente (Leser et al., 2002).

### 1.1.2 Aditivos alimentares na suinocultura

Entre os componentes que promovem aumento dos custos de produção na atividade suinícola estão a alimentação, os gastos veterinários, a energia, a mão de obra e o transporte (EMBRAPA-CNPSA, 2015). Dentre estes, a alimentação exige uma atenção especial dos suinocultores, uma vez que responde a 70% dos gastos totais, implicando na necessidade de uma formulação precisa das rações e, também, na correta mistura dos ingredientes (Zardo e Lima, 1999).

Uma das técnicas utilizadas com resultados significativos para melhorar os índices zootécnicos e aumentar a produtividade tem sido o uso de aditivos alimentares nas dietas dos suínos (Costa, Tse e Miyada, 2007). Estes aditivos são substâncias que, mesmo não sendo vitais para o organismo, são usadas para proporcionar um incremento no ganho de peso dos animais, apesar de o mecanismo de ação de algumas destas substâncias não ser totalmente entendido (Oliveira et al., 2002).

Dentre os aditivos mais empregados na alimentação de suínos, destacam-se os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos), utilizados há mais de 50 anos como promotores de crescimento em dietas para leitões recém-desmamados para diminuir a incidência de diarreia pós-desmame e promover melhora no desempenho animal (Turner, Dritz e Minton, 2001; Costa, Tse e Miyada, 2007). Entretanto, nos últimos anos, os consumidores e autoridades têm exigido carne sem resíduos químicos, restringindo o uso destes promotores devido à constatação da seleção de resistência em bactérias, o que resulta em menor eficiência dos antimicrobianos na terapia animal e humana (Chiquieri et al., 2007; Soto et al., 2007).

A resistência bacteriana é consequência direta da pressão seletiva imposta pela ampla utilização dos antimicrobianos, os quais promovem uma disseminação preferencial dos microrganismos resistentes devido à vantagem competitiva destes sobre as bactérias susceptíveis, facilitando a disseminação de possíveis genes de resistência entre os microrganismos (Call, Davis e Sawant, 2008).

Assim, a União Européia, durante a década de 70, proibiu o uso de vários antibióticos na alimentação animal, alegando que estes poderiam intervir na terapêutica humana (Castanon, 2007). Atualmente, não é aceita a utilização de qualquer antimicrobiano como



aditivo alimentar nestes países (Ripamonti et al., 2007; Berendsen et al., 2010; Gallo et al., 2010). No Brasil, as restrições foram iniciadas em 1992 e, desde então, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio de Ofícios Circulares (047/1998; 016/2007; 020/2008), Portarias (193, 12/05/1998; 31, 29/01/2002) e Instruções Normativas (10, 27/04/2001; 09, 27/06/2003; 17, 18/06/2004; 11, 24/11/2004; 35, 14/11/2005; 34, 13/09/2007), vetou a utilização da maioria destes aditivos alimentares para animais de produção, dentre eles, avoparcina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclinas e sulfonamidas (MAPA, 2015a).

Após estas proibições, tornou-se evidente a necessidade de se buscar produtos alternativos aos antimicrobianos para suplementação alimentar de suínos, sendo que estes prováveis substitutos deveriam ser capazes de manter as características benéficas dos antimicrobianos, como a promoção de altos índices de produtividade e a qualidade dos produtos finais, além de eliminar as características indesejáveis, como a resistência bacteriana (Kenny et al., 2011).

## 1.2 PROBIÓTICOS

### 1.2.1 Histórico e definição

A utilização de microrganismos com efeitos benéficos a saúde apresenta registros de antes da Era Cristã. De acordo com Costa e Miglioranza (2012), em uma versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), há um relato de que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Ainda, de acordo com estes autores, o historiador romano Plínio (76 A.C) recomendava a administração de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites.

Embora o consumo destes microrganismos ocorra há milhares de anos, apenas no século XX pesquisas científicas passaram a ser realizadas a fim de determinar as reais causas dos benefícios conferidos pelos produtos lácteos fermentados. O pioneiro nestas pesquisas e o responsável por relacionar a presença de bactérias do ácido lático na microbiota intestinal a uma manutenção da saúde foi o ganhador do prêmio Nobel Elie Metchnikoff (1908), um microbiologista russo (Desland et al., 2012).

Metchnikoff descobriu a existência de bactérias do ácido lático no processo de fermentação e produção de leites fermentados e iogurte. Ele, então, correlacionou suas observações com a maior longevidade de camponeses búlgaros que apresentavam em seus

hábitos alimentares o frequente consumo de leite fermentado (Costa e Miglioranza, 2012). Sua teoria admitia a redução de uma suposta intoxicação promovida pela microbiota intestinal que teria efeitos adversos sobre o hospedeiro, devido à modulação desta por meio da ingestão de bactérias lácticas presentes no leite fermentado (Holzapfel e Schillinguer, 2002).

A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “pró-vida”. Este termo foi usado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para definir “uma substância produzida por um microrganismo que estimula o crescimento de outro microrganismo”. Posteriormente, em 1974, Parker definiu probióticos como microrganismos ou substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal (Goldin, 2011). O termo foi popularizado algum tempo depois por Fuller (1989) que descreveu os probióticos como “um suplemento alimentar baseado em microrganismos vivos com efeitos benéficos para o animal hospedeiro ao melhorar seu balanço microbiano intestinal” (Costa e Miglioranza, 2012).

Atualmente, probióticos são definidos como microrganismos vivos com capacidade de conferir benefícios à saúde de seu hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). A maioria dos microrganismos probióticos são Bactérias do Ácido Láctico (BAL), Gram-positivo, geralmente catalase-negativo, não esporulantes, anaeróbios estritos, facultativos ou que crescem em microaerofilia. Assim sendo, os probióticos incluem espécies de BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e outros (Oliveira-Sequeira, Ribeiro e Gomes, 2008).

### 1.2.2 Identificação e critérios de seleção

As BAL são um grupo de microrganismos de grande diversidade ecológica e fenotípica, conseqüentemente, uma grande diversidade taxonômica pode ser notada como reflexo destas características. Devido a isto, uma correta identificação deve ser realizada antes da seleção definitiva de um determinado microrganismo que se pretende utilizar como probiótico (Berger et al., 2007).

A identificação de BAL por métodos fenotípicos é uma tarefa árdua, sendo necessários, por exemplo, cerca de dezessete testes para determinar uma linhagem de *Lactobacillus* ao nível de espécie (Tannock et al., 1999).

De acordo com Klein e colaboradores (1998), a aplicação de ensaios fenotípicos visando à designação das culturas probióticas empregadas em produtos comerciais tem promovido divergências na identificação, sendo observados erros como, por exemplo, *L. johnsonii* e *L. gasseri* relatadas como *L. acidophilus* e *L. paracasei* descrita como *L. casei*.

Como alternativa à utilização dos vários testes fenotípicos, técnicas moleculares têm sido aplicadas, com sucesso, para análise filogenética e identificação de microrganismos dos gêneros de BAL (Floresta, 2003; Lee et al., 2008).

Dentre as abordagens moleculares, várias metodologias têm sido utilizadas, como a PCR-ARDRA (análise de restrição do DNA ribossômico amplificado), a rep-PCR (reação da polimerase em cadeia com seqüências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos) e o sequenciamento do gene 16S do rRNA (Bjorkroth et al., 2002; Moreira et al., 2005; Viegas, 2008; Lee, et al., 2011).

Em relação aos critérios para a seleção de novas linhagens probióticas, devem ser observadas características relativas à segurança, funcionalidade e os aspectos tecnológicos das culturas que serão utilizadas na composição do produto (Saarela et al., 2000; Pancheniak, 2005).

Microrganismos de alguns gêneros de bactérias do ácido lático são mais frequentemente empregados como probióticos por serem considerados seguros (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), pois não são patogênicos e nem capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas como, por exemplo, *Lactobacillus* spp. e *Weissella* spp. (Oliveira et al., 2002). Alguns gêneros de BAL, como *Enterococcus* e *Streptococcus*, apresentam alguns patógenos oportunistas que podem causar eventuais infecções (Salminen et al., 1998).

No que diz respeito à segurança, os microrganismos probióticos devem ser provenientes de animais saudáveis, habitantes normais do intestino, não devem ser tóxicos nem patogênicos e, além disso, é preferível que as linhagens utilizadas sejam hospedeiro-específicas, para que se obtenha uma eficácia máxima do produto (Salminen et al., 1998; Murarolli, 2008).

A funcionalidade da linhagem probiótica está ligada à sua capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal de seu hospedeiro e de sua habilidade antagonista contra patógenos residentes (Turner, Dritz e Minton, 2001; Ruiz-Moyano et al., 2008). Um probiótico deve sobreviver à acidez gástrica e à atividade hidrolítica dos sais biliares e, ainda, serem capazes de reduzir os patógenos aderidos na superfície intestinal (ou em outras mucosas), seja pela produção de compostos antagonistas (bacteriocinas e antibióticos) ou pela competição por sítios de adesão (Morelli, 2000; Saarela et al., 2000; Motta et al., 2006).

Outro aspecto importante na seleção de uma nova linhagem probiótica é a observação de suas propriedades tecnológicas. Um probiótico deve conter microrganismos que apresentam rápido crescimento *in vitro*, fácil manipulação, boas condições de produção

industrial e que sobrevivam no produto final conservando sua função (Pancheniak, 2005). Além disso, deve ser observada a habilidade da cultura em coexistir com a microbiota indígena do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

### 1.2.3 Efetividade de um probiótico

Um probiótico, para ser considerado efetivo, deve apresentar algumas propriedades básicas, tais como: 1) exercer um efeito benéfico à saúde de seu hospedeiro; 2) conter um grande número de células viáveis; 3) resistir às condições adversas do trato gastrointestinal; 4) ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos; 5) ser isolado da mesma espécie animal a que se destina (Saarela et al., 2000; Turner, Dritz e Minton, 2001).

Dados experimentais demonstram que os probióticos são capazes de desenvolver benefícios à saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (Saad, 2006). Observa-se que a ingestão destas culturas de microrganismos promove o controle e estabilização da microbiota intestinal, resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da intolerância à lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (Kaur, Chopra e Saini, 2002; Tuohy et al., 2003).

Atualmente, já existem produtos comerciais contendo probióticos disponíveis para aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães, gatos, etc. A forma mais tradicional de aplicação dos microrganismos probióticos na criação de suínos é por meio de alimentos funcionais. A administração destes produtos geralmente acontece logo após o nascimento, pois nas primeiras horas de vida o trato gastrointestinal do leitão é estéril, havendo pouca secreção de ácido clorídrico, o que permite a proliferação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* e *Clostridium*, principais causadores de morte nos leitões (Santos et al., 2003; Menin et al., 2008; Vannucci e Guedes, 2009).

### 1.2.4 Mecanismos de ação dos probióticos

O modo de ação dos probióticos é bastante diversificado, de acordo com Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker (2008). Os mecanismos que promovem os efeitos benéficos relativos à saúde do hospedeiro compõem no mínimo uma das seguintes categorias: 1) inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana; 2) proteção da barreira epitelial; 3) modulação da resposta imune.

#### 1.2.4.1 Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana

Vários microrganismos probióticos apresentam atividade antagonista contra espécies patogênicas pela síntese de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis (Jin, Marquard e Baidoo, 2000; Silva et al., 2007).

Bacteriocinas são definidas como substâncias produzidas por bactérias que são capazes de inibir a multiplicação de outras bactérias, mesmo em baixas concentrações (Riley, 1998). No caso dos probióticos, existe na literatura uma ampla gama de trabalhos descrevendo a ação antagonista destas substâncias contra vários patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, dentre outros (Jamuna, Babusha e Jeevaratnam, 2005; Garcia et al., 2006; Todorov e Dicks, 2007; Todorov, 2009).

O peróxido de hidrogênio é um antagonista cujo espectro de ação inclui a inibição do crescimento de bactérias patogênicas Gram-negativo, sendo importante para a manutenção do equilíbrio da microbiota pelo combate a bactérias patogênicas, como demonstrado por Pridmore e colaboradores (2008), que observaram a atividade anti-*Salmonella* de *Lactobacillus johnsonii* NCC533 derivada da produção desta substância. Além disso, ele também pode estar associado à capacidade de colonização vaginal, impedindo o estabelecimento de patógenos nesta região (Vallor et al., 2001).

A produção de ácidos orgânicos, como ácidos lático e acético, pelas bactérias utilizadas como probióticos reduz o pH do trato gastrintestinal, prevenindo o crescimento de vários agentes patogênicos e, conseqüentemente, permitindo o desenvolvimento de certas espécies de lactobacilos (Garcia et al., 2006). Um estudo que destaca a relação entre a produção destas substâncias e a inibição de patógenos é o trabalho de De Keersmaecker e colaboradores (2006) que atribui a atividade antimicrobiana da linhagem *Lactobacillus rhamnosus* GG contra *Salmonella enterica* à produção de ácido lático.

#### 1.2.4.2 Proteção da barreira epitelial

A capacidade dos probióticos de promover a proteção da barreira epitelial se deve basicamente a competição por nutrientes e/ou competição entre linhagens patogênicas e microrganismos probióticos pelos mesmos sítios de adesão (exclusão competitiva), além da

indução da síntese de defensinas e muco (Turner, Dritz e Minton, 2001; Oliveira et al., 2002; Saad, 2006).

Na maioria das vezes, os probióticos são selecionados utilizando-se microrganismos da microbiota indígena, aumentando as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro. Assim, um probiótico é capaz de metabolizar de forma mais rápida e eficiente os nutrientes, tornando-os indisponíveis aos patógenos e, conseqüentemente, impedindo a proliferação destes (Spencer e Chesson, 1994; Pancheniak, 2005).

Os microrganismos probióticos presentes no trato gastrointestinal atuam também como uma barreira defensiva do animal, impedindo que microrganismos potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos, uma vez que se aderem às paredes intestinais e reduzem a área de ocupação destes (Saad, 2006). De acordo com Kos e colaboradores (2003), a aderência bacteriana envolve vários fatores, sendo que o processo inicial é baseado em interações físico-químicas, que estão relacionadas às cargas elétricas presentes e a hidrofobicidade da parede celular do microrganismo.

A ligação das linhagens probióticas às células epiteliais do intestino como, por exemplo, as células de Paneth e os enterócitos, estimulam a produção de defensinas e muco, respectivamente, substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra invasão por patógenos (**Figura 1**) (Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker, 2010).

#### 1.2.4.3 Modulação da resposta imune

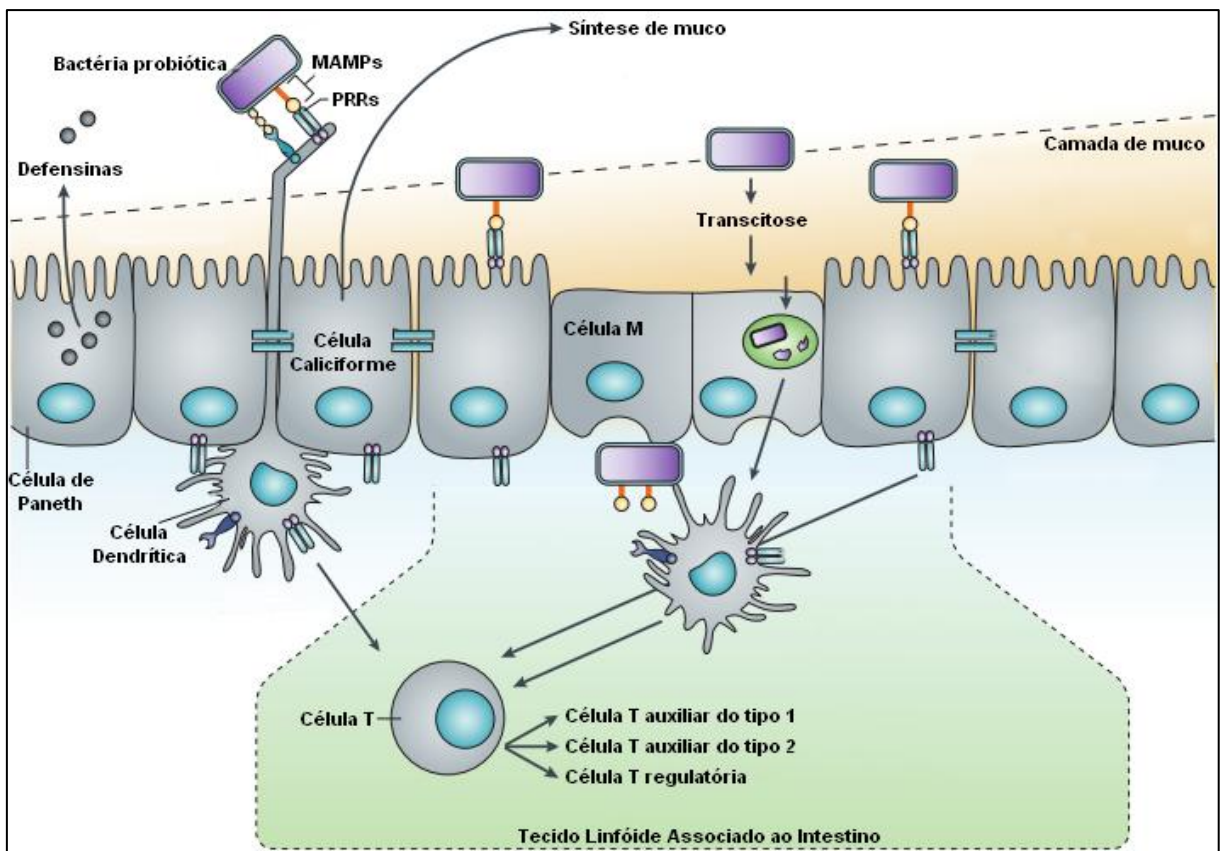
Bactérias probióticas são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro por meio da ativação de macrófagos, proliferação de células T e aumento ou diminuição da produção de imunoglobulinas, anticorpos e citocinas (Gareau, Sherman e Walker, 2010).

A imunomodulação pelos probióticos é resultado da interação de moléculas conservadas da parede celular destes microrganismos (MAMPs) com receptores de reconhecimento do hospedeiro (PRRs), induzindo as vias de sinalização imune, sendo que o tipo de resposta imunológica gerada é diretamente dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga (Cross, 2002; Oelschlaeger, 2010).

A interação do microrganismo probiótico com as células dendríticas é o fator que promove a produção de citocinas, moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipos 1 e 2. Além disso, bactérias probióticas podem atingir o tecido linfóide associado ao intestino atravessando células intestinais especiais (transcitose),

chamadas células M, e interagir diretamente com as células dendríticas, modulando a resposta imune (**Figura 1**) (Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010).

Outro aspecto importante é que, uma vez estabelecido no TGI, o probiótico promove o estímulo à proliferação de células T regulatórias e imunoglobulinas, principalmente sIgA, permitindo um desenvolvimento normal do sistema imune por meio da indução da tolerância a antígenos luminiais, auxiliando no combate a patógenos entéricos, prevenção de doenças autoimunes e alergias alimentares (Shi e Walker, 2004).



**Figura 1.** Principais vias de ação de um probiótico.

Um probiótico é capaz de estimular a produção de defensinas e muco quando em contato com as células de Paneth e com os enterócitos. Além disso, pode interagir com as células dendríticas na lâmina própria através de suas prolongações entre as células epiteliais intestinais e pela transcitose mediada pelas células M. O tipo de interação é dependente da dinâmica do muco intestinal e, independentemente da via, é capaz de induzir a produção de citocinas que podem atuar como adjuvante imune.

Fonte: Adaptado de Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010.

### 1.2.5 Probióticos para suínos

Os avanços científicos relacionados ao desenvolvimento de produtos alimentares têm promovido um crescimento do mercado de probióticos, uma vez que proporcionaram melhoras na qualidade das amostras em termos de estabilidade e vida de prateleira e, ainda, uma maior aceitação das propriedades bioterapêuticas por parte dos consumidores (Komatsu, Buriti e Saad, 2008).

A grande versatilidade e o potencial biotecnológico inerentes às linhagens probióticas é refletida, de certa forma, nas perspectivas econômicas associadas a esses microrganismos. De acordo com o estudo *Probiotics Market (2012-2018)*, desenvolvido pela empresa de consultoria *MarketsandMarkets*, o mercado dos probióticos alcançou ganhos de 23,1 bilhões de dólares no ano de 2012 e tende a crescer para 36,7 bilhões de dólares até 2018, oferecendo oportunidades para o desenvolvimento de alimentos funcionais para dietas humana e animal, assim como terapias e prevenção de doenças (Agheyisi, 2015).

O uso de culturas bacterianas na indústria de suínos apresentou uma notável expansão após as restrições impostas à utilização dos antimicrobianos como promotores de crescimento na agropecuária. Assim, vários estudos sobre a ação dos probióticos na alimentação de suínos têm sido publicados, a fim de se conhecer melhor o efeito destes produtos no desenvolvimento dos animais. A **Tabela 1** apresenta um resumo de diferentes probióticos aplicados na dieta de suínos e algumas medidas da eficiência destes produtos.

De acordo com Oliveira e colaboradores (2002), a eficácia do probiótico é estritamente dependente da quantidade e características das linhagens do microrganismo utilizado na elaboração do produto. Além disso, quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades podem ser perdidas (Loddi, 2001).

Em relação ao Brasil, o mercado de probióticos para suínos ainda é incipiente, sendo comercializados alguns produtos que muitas vezes apresentam microrganismos não caracterizados de forma adequada, sendo pouco estudados e, portanto, não possuindo eficácia comprovada (**Tabela 2**).



**Tabela 1.** Probióticos utilizados na dieta de suínos e seus efeitos sobre o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, função intestinal e função imune

Nome do produto ou linhagem	Ganho de peso	Consumo de ração	Conversão alimentar	Função intestinal	Função imune
<i>B. cereus</i>	+	X	0	+	X
<i>B. coagulans</i>	+	X	+	X	X
Biomate 2B <sup>®</sup>	X	X	X	0	X
Biogen <sup>®</sup>	+	X	+	+	+
BIOSAF <sup>®</sup>	+	0	+	+	+
<i>B. pseudolongum</i> com <i>L. acidophilus</i>	+	X	+	X	+
<i>B. subtilis</i> com <i>B. licheniformis</i>	+	X	+	+	+
Cylactin <sup>®</sup>	+	+	+	X	X
<i>E. faecium</i> M-74	+	0	X	+	X
Lacto-Sacc <sup>®</sup>	X	X	X	+	X
LSP 122	+	X	+	+	+
MCES <sup>®</sup>	X	X	X	+	+
Microferm <sup>®</sup>	0	X	X	X	+
Paciflor <sup>®</sup>	+	X	0	+	X
Probios <sup>®</sup>	X	X	X	0	X
<i>S. cerevisiae</i> I1079	+	X	+	X	+

+: produto melhorou a resposta; 0: produto não melhorou a resposta; X: efeito não medido ou não reportado. Fonte: Adaptado de Turner et al., 2001.

**Tabela 2.** Principais produtos probióticos para suínos comercializados no Brasil

<b>Produto</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Linhagens</b>
Adecav <sup>®</sup>	Agrocav	<i>S. cerevisiae</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. casei</i>
BacSol-Vt <sup>®</sup>	BACSOL	<i>S. cerevisiae</i> <i>B. subtilis</i>
DBI probiótico <sup>®</sup>		<i>L. acidophilus</i> <i>S. faecium</i>
PAS-TR <sup>®</sup>	Imeve	<i>B. toyoi</i> <i>B. subtilis</i>
Polimeve <sup>®</sup>	Imeve	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. bifidum</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i>
Power Sea <sup>®</sup>	Alivet Saúde Animal	<i>B. toyoi</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. bifidum</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>S. cerevisiae</i>
Suicav <sup>®</sup>	Agrocav	<i>B. subtilis</i> <i>B. bifidum</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. lactis</i> <i>S. cerevisiae</i>
Toyocerin <sup>®</sup>	Rubinum	<i>B. toyoi</i>
Florafix <sup>®</sup>	Vencofarma	<i>B. subtilis</i> <i>B. longum</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i>
Biocampo Probiotic <sup>®</sup>	Biomart nutrição animal	<i>B. subtilis</i> <i>B. bifidum</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. lactis</i>

Fonte: Dados do autor.

### 1.2.6 Legislação

Em virtude da diversidade de fatores que influenciam a confecção de um probiótico, algumas normas para avaliação da eficácia do produto foram adotadas pela *Expert Commission on Animal Feeds* (FAO/WHO, 2007).

Primeiramente, os microrganismos constituintes do produto devem ser identificados geneticamente utilizando metodologias reconhecidas internacionalmente e, em seguida, realizados ensaios nos quais o probiótico analisado deve permanecer estável sob diversas condições: um ano em condições de estoque para apresentação comercial; dois meses no alimento comercializado sob a forma peletizada; e por três meses quando submetido à temperatura de armazenamento de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Além disso, também é recomendada a dose mínima de  $10^6$  UFC/g de alimento, bem como a contagem de organismos viáveis na ração, no lúmen intestinal e no trato gastrintestinal depois de finalizada a administração do probiótico (Loddi, 2001).

No Brasil, a avaliação dos produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde compete à Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, vinculada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo com a referida comissão, para que um probiótico seja aprovado, deve ser apresentado um laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade,  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto para consumo, teste de resistência da cultura utilizada em relação à acidez gástrica e sais biliares (ANVISA, 2015).

Além disso, a legislação torna obrigatória que a quantidade do probiótico em UFC contida na recomendação diária do produto pronto para consumo deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação: “O (indicar a espécie do microrganismo) contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2015).

Após a avaliação os produtos podem ser comercializados, sendo aplicados de várias formas como, por exemplo, adicionados aos alimentos, na água de bebida, em cápsulas gelatinosas ou, ainda, pulverizado e como *spray* no caso de uso em animais (Cardozo, 2006).

### 1.3 O GÊNERO *Weissella*

#### 1.3.1 Histórico

Collins e colaboradores (1993), trabalhando com bactérias de salsichas gregas, perceberam que um grupo de microrganismos que eles haviam isolado apresentava características peculiares que não enquadravam em nenhuma classificação existente.

Segundo estes autores, em uma identificação preliminar por meio de testes bioquímicos, as bactérias desconhecidas assemelhavam-se aos microrganismos do gênero *Leuconostoc* pela via de produção de ácido láctico, mas diferiam das espécies deste gênero em várias outras características fisiológicas.

Deste modo, a fim de esclarecer os resultados obtidos, os pesquisadores realizaram o sequenciamento do gene 16S de rRNA destas bactérias. As análises dos valores correspondentes às distâncias evolucionárias entre os microrganismos desconhecidos e grupos de bactérias do ácido láctico, evidenciaram uma forte relação filogenética entre as cepas isoladas de salsicha, algumas linhagens de *Lactobacillus* e a espécie *Leuconostoc paramesenteroides*. Assim, o gênero *Weissella* foi proposto com o intuito de abranger estes microrganismos, sendo a linhagem desconhecida classificada como *Weissella hellenica* (Viegas, 2008).

A designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella* é mostrada na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o gênero *Weissella*

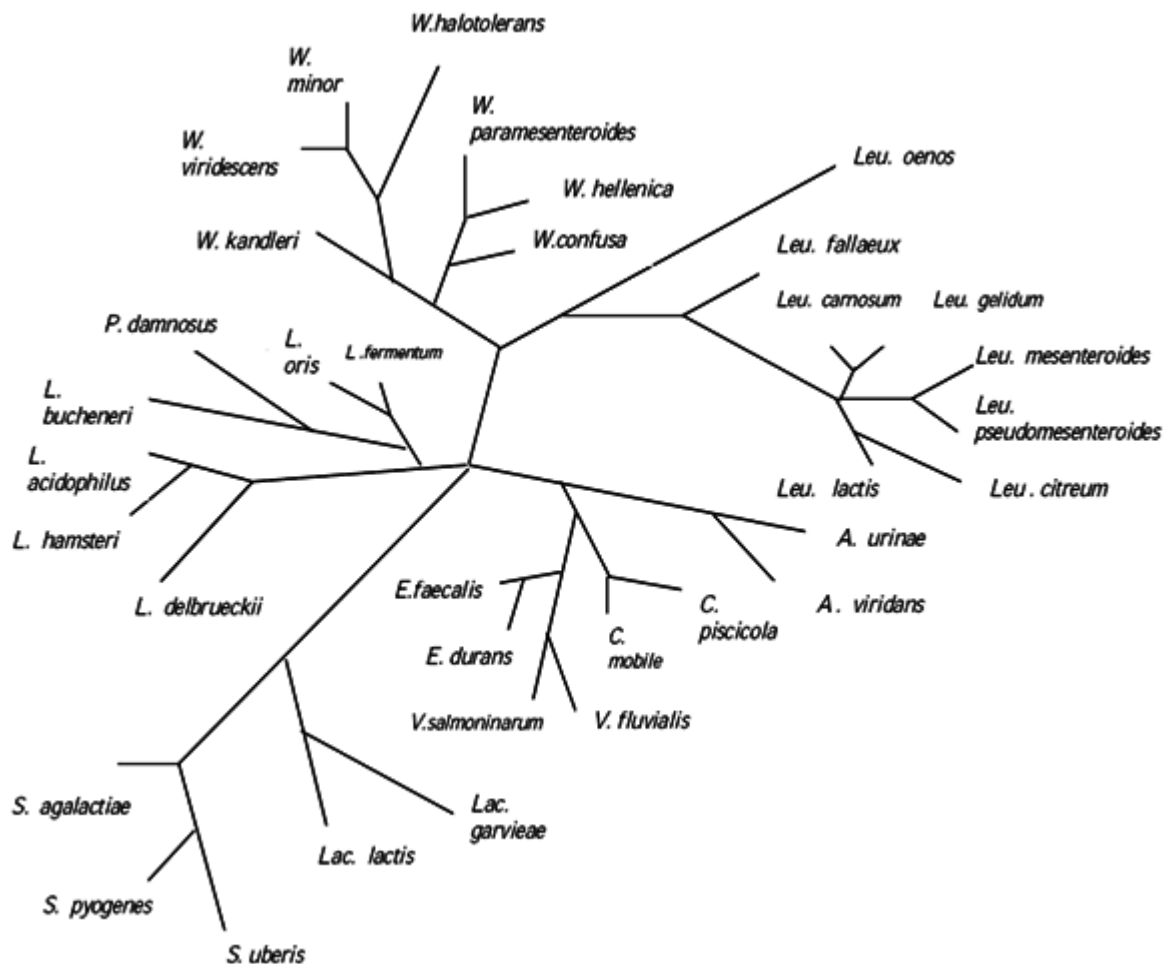
Antiga Designação	Nova Designação
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus confusus</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	<i>Weissella halotolerans</i>
<i>Lactobacillus kandleri</i>	<i>Weissella kandleri</i>
<i>Lactobacillus minor</i>	<i>Weissella minor</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i>

Fonte: Collins et al.,1993.

### 1.3.2 Características taxonômicas, morfológicas e metabólicas

Os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* eram considerados distintos, com pouca possibilidade de sobreposição entre eles. No entanto, estudos filogenéticos mostraram que existe uma inter-relação significativa entre esses gêneros de microrganismos (Chelo, Zé-Zé e Tenreiro, 2010; Fusco et al., 2011).

O gênero *Weissella* pertence à família Leuconostocaceae, ordem Lactobacillales, classe Bacillie, filo Firmicutes (Collins et al., 1993). Assim como os lactobacilos, também é considerado um grupo de bactérias do ácido lático, incluindo microrganismos heterofermentadores obrigatórios, com formato de cocos ou bastonetes, Gram-positivo, catalase negativo, não esporulantes, microaerófilos e geralmente imóveis (Jang et al., 2002; Amari et al., 2012). O gênero *Weissella* forma um agrupamento monofilético, constituindo um novo táxon inter-relacionado a outros gêneros de bactérias do ácido lático (**Figura 2**).



**Figura 2.** Árvore filogenética de bactérias do ácido lático.

A, *Aerococcus*; C, *Carnobacterium*; E, *Enterococcus*; L, *Lactobacillus*; Lac, *Lactococcus*; Leu, *Leuconostoc*; P, *Pediococcus*; S, *Streptococcus*; V, *Vagococcus*; W, *Weissella*.

Fonte: Collins et al., 1993.

Até o momento, foram descritas 16 espécies do gênero *Weissella* (Tajabadi, et al., 2012), isoladas de fontes variadas como o solo, vegetais, carnes, peixes, alimentos fermentados, além do trato gastrointestinal e vaginal humano e de animais (Sirirat, Thosaporn, e Somkiat, 2008; Valerio et al., 2009; Fusco et al., 2011). Além disso, vários trabalhos mostraram a possibilidade da utilização de representantes deste gênero como probióticos (Nam et al., 2002; Lee, 2005; Kang, et al., 2012).

### 1.3.3 Utilização como probiótico

A filogenia dos microrganismos pertencentes ao gênero *Weissella* só foi esclarecida em 1990 (Collins et al., 1993), apesar disto, esse novo grupo é amplamente citado como um importante conjunto de bactérias do ácido lático com potencial probiótico (Kuwano et al., 2005; Srionnual et al., 2007; Pal e Ramana, 2009; Serna-Cock et al., 2012a).

Pesquisas têm demonstrando que as bactérias deste gênero são capazes de prevenir e controlar patógenos bacterianos por meio da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (Srionnual et al. 2007; Espeche et al., 2009; Kang et al., 2012; Serna-Cock et al., 2012b).

A cepa *W. kimchii* PL9023, por exemplo, isolada do trato vaginal de uma mulher saudável, demonstrou apresentar atividade antagonista contra patógenos vaginais como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Lee, 2005).

Espeche e colaboradores (2009) observaram que compostos antimicrobianos produzidos por *W. paramesenteroides* isolada de leite bovino eram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *Streptococcus dysgalactiae*, bactérias conhecidas por causarem poliartrite e mastite em animais.

Além disso, em 2010, foi descrito que a aplicação contínua de linhagens de *Weissella* spp. nas glândulas mamárias de vacas leiteiras poderia ser utilizada como uma alternativa viável em relação ao uso de antibióticos para prevenção e controle de mastite bovina, uma vez que os antibióticos podem promover resistência bacteriana em longo prazo e afetar negativamente a produção e a qualidade do leite (Serna-Cock, Valencia-Hernandez e Campos-Gaona, 2010).

## 1.4 O GÊNERO *Salmonella*

### 1.4.1 História, taxonomia e ecologia

A designação do gênero *Salmonella* foi adotada em 1900 por Lignières, em homenagem a Daniel Elmer Salmon, médico veterinário norte-americano responsável por isolar do intestino de suínos a primeira espécie do gênero, *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis, em 1886 (Griffith, Schwartz e Meyerholdz, 2006).

O gênero *Salmonella* compreende um grupo heterogêneo de microrganismos em forma de bacilos geralmente móveis, Gram-negativo, não esporulantes, anaeróbios facultativos e fermentadores de glicose (Hur, Jawale e Lee, 2012). Taxonomicamente, as salmonelas pertencem à família Enterobacteriaceae, Ordem Enterobacteriales, Classe Gammaproteobacteria e Filo Proteobacteria (Pickler et al., 2012).

Atualmente, são descritas duas espécies e seis subespécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Em cada subespécie, são reconhecidos diferentes sorovares com base na caracterização de seus antígenos somáticos e flagelares, totalizando 2.610 (Guibourdenche et al., 2010).

Os microrganismos deste gênero são fermentadores de glicose, mas incapazes de fermentar a lactose e a sacarose. O pH ótimo para a sua multiplicação fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. A temperatura ideal de crescimento encontra-se na faixa de 35-37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C. Com relação à concentração de sal, as salmonelas não toleram concentrações superiores a 9%. Determinados sorotipos de *Salmonella* apresentam exceções para algumas características comuns do gênero (Figueiredo, 2008).

### 1.4.2 Transmissão e infecção

A salmonela apresenta distribuição ubíqua, utilizando-se do trato intestinal dos animais domésticos e selvagens como reservatório. Estes hospedeiros disseminam a bactéria por meio das suas fezes, contaminando a água, o solo e os alimentos, onde este microrganismo sobrevive durante longos períodos de tempo (Angulo et al., 2000). A transmissão deste agente zoonótico pode ocorrer por contato direto entre animal-homem, animal-animal ou mesmo homem-homem em países subdesenvolvidos através de fezes contaminadas ou por introdução dos agentes nas áreas de produção alimentar (EFSA, 2010).

A transmissão para o hospedeiro ocorre, principalmente, por meio da ingestão de cepas patogênicas de *Salmonella* spp. por meio do consumo de água e/ou alimentos contaminados (Shinohara et al., 2008; Mastroeni e Grant, 2011). Após a ingestão, a salmonela passa pelo estômago e coloniza o intestino, interagindo e translocando pelo epitélio intestinal via invasão ativa dos enterócitos, das células M e por meio de células dendríticas, atingindo o tecido linfóide associado ao intestino, a partir do qual invade os fagócitos residentes, onde se instala e se multiplica pelo corpo (Raupach e Kaufmann, 2001). Além disso, as bactérias aderidas à superfície das células epiteliais da mucosa intestinal induzem degeneração nas microvilosidades dos enterócitos.

Uma vez adquirida a salmonelose, o hospedeiro pode apresentar uma variedade de sinais clínicos que variam de acordo com sua susceptibilidade (condição do sistema imunológico) e da virulência do sorovar de *Salmonella* sp. infectante (Coburn, Grassl e Finlay, 2007). Dentre estes, pode-se observar febre entérica (tifóide), febre paratifoide, enterocolites (diarreia), bacteremia (septicemia) e/ou o hospedeiro se tornar portador assintomático crônico da doença (Martinoli, Chiavelli e Rescigno, 2007; Grassl e Finlay, 2008).

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial. *Salmonella* sp. é uma enterobactéria encontrada em diferentes espécies animais, apresentando ampla distribuição e permanência no ambiente, podendo causar doenças fatais, gerando perdas econômicas, além de persistir em alimentos de origem animal e causar sérios problemas ao homem devido à presença de toxinas alimentares (Weiss et al., 2002; Mastroeni e Grant, 2011). Todos estes fatores contribuem para que este microrganismo assuma um papel importante na saúde pública, sendo a terceira zoonose mais descrita no Brasil, segundo dados da divisão de epidemiologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015b).

#### 1.4.3 Translocação

O trato gastrointestinal (TGI) é um ecossistema complexo onde o epitélio, as células imunes subjacentes e a microbiota autóctone interrelacionam-se. A microbiota intestinal interage com o epitélio do intestino regulando o sistema imune do hospedeiro (Maynard et al., 2012). Entretanto, a mucosa intestinal pode servir como uma porta de entrada para patógenos oportunistas presentes na microbiota que, utilizando mecanismos de virulência altamente sofisticados, contornam as barreiras de defesa do organismo, translocando a barreira epitelial,



invadindo tecidos mais profundos e causando doença sistêmica (Gill, Lin e Rutherford, 2001; Ashida et al., 2011).

A translocação bacteriana é definida como a passagem de bactérias viáveis a partir do TGI para os nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos extra-intestinais como fígado e baço, além do sangue. Esta passagem acontece através das células M, podendo ocorrer entre enterócitos que sofreram alguma injúria (via paracelular) ou por meio dos próprios enterócitos (via transcelular) (Schley e Field, 2002; Gatt, Reddy e Macfie, 2007). A capacidade de translocação é considerada o principal fator responsável pela patogenicidade e infectividade de *S. Typhimurium* (Gill, Lin e Rutherford, 2001).

Evidências sugerem que, apesar de a patologia relacionada ao processo, a translocação de bactérias ou endotoxinas pode se tratar de um mecanismo importante no desenvolvimento da resposta moduladora (não inflamatória) a antígenos da microbiota residente do hospedeiro sendo, portanto, um fenômeno normal (Gatt, Reddy e Macfie, 2007).

#### 1.4.4 Salmonelose em suínos

A epidemiologia da salmonelose no contexto dos suínos deve ser observada como dois problemas distintos: a salmonelose como infecção clínica e a contaminação por *Salmonella* em carcaças suínas e seus produtos (Weiss et al., 2002). Em relação à infecção clínica, os suínos são suscetíveis a uma variedade de sorotipos, sendo Choleraesuis e Typhimurium os principais. A doença apresenta-se na forma entérica, com diarreia, ou na forma generalizada, incluindo vários sistemas, resultado de septicemia (Sobestiansky, Barcellos e Moraes, 1999). Dados indicam que *Salmonella* pode aumentar o custo de produção devido, principalmente, ao aumento do tempo até a venda e ao consumo excessivo de ração. Desta forma, grupos de suínos com uma soroprevalência tida de baixo risco têm sido apontados como de melhor eficiência de produção do que grupos de moderado ou alto risco epidemiológico (Gorton, Kliebenstein e Beran, 2015).

Na associação entre produtos suínos e *Salmonella*, os suínos atualmente são considerados o segundo maior reservatório deste microrganismo entre alimentos de origem animal, depois das aves. Embora as infecções em suínos adultos sejam normalmente assintomáticas, uma vez colonizados, os animais podem liberar o microrganismo nas fezes por várias semanas ou meses (Wall et al., 2010). Entre as fontes de infecções humanas por *Salmonella* spp., 40 a 45% são provenientes de ovos e 10 a 15% de produtos suínos (Hald e Wegener, 1999). Em decorrência disso, observa-se que a ausência dessa bactéria em

alimentos de origem suína é importante para competir no mercado que apresenta uma crescente exigência em relação à qualidade dos produtos sendo, deste modo, necessária a implementação de programas de controle de salmonela em rebanhos suínos (Bessa, Costa e Cardoso, 2004).

#### 1.4.5 Modelo murino de salmonelose

O uso de animais de laboratório nas pesquisas científicas fundamenta-se no somatório de informações e conhecimentos adquiridos sobre eles. São relatadas as utilizações dos animais já nos séculos III e IV A.C. por Hipócrates e Aristóteles (Crissiuma e Almeida, 2006). A importância dos animais de laboratório nas pesquisas e sua contribuição em novas descobertas como na prevenção de doenças, métodos para cura e desenvolvimento de novas técnicas de tratamento cirúrgico é incalculável (Chorilli, Michelin e Salgado, 2007).

No século XIX, o camundongo passou a ser utilizado como animal de experimentação e rapidamente se tornou o mamífero mais usado em laboratório devido ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter curto período de gestação, ser de fácil domesticação e manutenção (Santos, 2002). O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*.

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium é um patógeno natural de roedores, promovendo nos animais lesões muito semelhantes às observadas em vítimas humanas de febre tifóide. Assim, as interações desta bactéria com seu hospedeiro natural, como os camundongos, são consideradas o melhor modelo experimental para o estudo deste enteropatógeno (O'Brien, 1982).

Os camundongos infectados por *S. Typhimurium* desenvolvem uma doença sistêmica cuja cinética encontra-se bem estabelecida. Inicialmente, ocorre uma rápida eliminação de bactérias séricas havendo, então, instalação destas no fígado e baço, onde se replicam nas células fagocitárias, promovendo hepato e esplenomegalia, respectivamente. Posteriormente, há o reconhecimento do microrganismo, por intermédio das células fagocíticas, pelo sistema imune inato por meio dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), o que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNFA, IL1, IL6, IL12 E IFNG) e uma infiltração de monócitos e neutrófilos nos locais de inflamação. Na última fase do processo infeccioso, mecanismos efetores da imunidade adaptativa são gerados, fazendo intervir as células B e T, e os títulos de anticorpos anti-*Salmonella* aumentam (Grassl e Finlay, 2008).

O desafio experimental de *S. Typhimurium* em camundongos constitui um excelente modelo de estudo para compreensão da infectividade e patogenicidade deste enteropatógeno, permitindo a identificação de fatores de virulência, bem como viabilizar as possíveis formas de prevenção e tratamento da salmonelose, tanto em animais quanto em seres humanos (Santos et al., 2001).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A taxa de crescimento dos animais é um dos principais indicadores associados à rentabilidade da produção de carne suína. Reduções na taxa de crescimento e no índice de conversão alimentar pelo animal irão resultar em menor rentabilidade, devido à menor produção e aumento dos custos.

Com a intensificação da produção suinícola, os criadores passaram a adotar um desmame antecipado dos leitões, visando aumentar o potencial produtivo da matriz. Este fator, associado a problemas imunológicos que também afetam os animais nesta fase, visto que sua imunidade ainda não é completamente efetiva, promovem a diminuição no consumo de alimento, ausência ou redução de ganho de peso e, frequentemente, diarreias, morbidez e morte.

Os antimicrobianos melhoradores de desempenho vêm sendo usados nas dietas dos animais desde a década de cinquenta. Entretanto, algumas questões têm despertado a atenção e, ao mesmo tempo, causado preocupação na comunidade científica. O uso contínuo de um determinado antimicrobiano pode aumentar a pressão de seleção microbiana, levando à seleção de resistência bacteriana e, ainda, promover a resistência cruzada (resistência contra um grupo inteiro de antibióticos, devido a mecanismos de ação semelhantes).

Neste contexto, o uso de probióticos na alimentação de suínos visando um melhor desempenho no crescimento e no índice de conversão alimentar dos animais, sem a utilização dos tradicionais promotores de crescimento, pode ser visto como uma alternativa eficaz, uma vez que estes permitem a eliminação de resíduos dos antimicrobianos nas carcaças, atendendo às exigências do mercado para a exportação, além de outros benefícios relevantes, como o controle de diarreia e a imunomodulação do hospedeiro.

Dentre esses microrganismos, as bactérias do ácido lático são mais frequentemente empregadas como probióticos, já que vários gêneros são considerados seguros à saúde (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), pois não são patogênicas e nem capazes de transmitir os fatores de resistência a antimicrobianos, sendo estes aspectos importantes em relação aos riscos de saúde pública e segurança dos produtos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar linhagens autóctones de bactérias do ácido láctico a partir de sua segurança e propriedades probióticas *in vitro* e na infecção experimental com *Salmonella* Typhimurium em camundongos para futuro uso como suplemento alimentar em suíno como uma terapia livre de antimicrobiano.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Caracterizar as propriedades probióticas *in vitro* de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos.
- 3.2.2 Selecionar a linhagem com melhor resposta frente aos testes de caracterização *in vitro* para realização de ensaios *in vivo* em modelo experimental murino de salmonelose.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TESTES *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), localizado no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 4.1.1 Origem das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram vinte e quatro linhagens de *Lactobacillus* e *Weissella* obtidos dos tratos gastrointestinal, nasal e oral de suínos presentes em uma granja, localizada no estado de Minas Gerais, que não haviam recebido tratamento com antimicrobianos. Os isolados foram identificados por suas características morfotintoriais (coloração de Gram), fisiológicas (teste de catalase) e moleculares (ARDRA 16S-23S rRNA e sequenciamento do gene 16S do rRNA). Posteriormente, as BAL foram submetidas à caracterização probiótica preliminar *in vitro*, incluindo testes de sensibilidade ao suco gástrico e sais biliares artificiais, hidrofobicidade da superfície celular e capacidade antagonista contra microrganismos bacterianos patogênicos (Alvim, 2011). Os resultados dos testes são apresentados no **Apêndice A**.

#### 4.1.2 Manutenção e ativação das linhagens de BAL

Os microrganismos, contendo  $10^6$  UFC/mL, foram inoculados em 5 mL de caldo MRS (Difco, Sparks, EUA), incubados a 37 °C em câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% de N<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 a 48 horas, sendo em seguida utilizada uma alíquota de 1 mL adicionada de glicerol esterilizado (15%) para manutenção em Deep Freezer a -80°C (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, EUA).

Para cada um dos testes de caracterização probiótica, os isolados estocados a -80 °C foram ativados por meio de duas passagens em meio MRS caldo a partir de um inóculo de 2% (v/v) contendo  $10^6$  UFC/mL. Em cada uma das passagens, os isolados foram mantidos em câmara de anaerobiose por 18 horas a 37°C para o crescimento.

#### 4.1.3 Produção de peróxido de hidrogênio

A identificação dos isolados produtores de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi realizada três vezes em duplicata, segundo adaptação do método colorimétrico descrito por Rabe e Hillier (2003). Os microrganismos, previamente ativados (item 4.1.2), foram inoculados em placas contendo meio ágar TMB-plus (Brucella ágar 43,0 g, dihidroclorato de tetrametilbenzidina 0,25 g, amido 20,0 g, solução de hemina (0,05%) 10,0 mL, sulfato de magnésio anidro 0,57 g, sulfato de manganês monohidratado 0,12 g, solução de peroxidase (0,1%) 10,0 mL e soro de cavalo 50 mL em 1 litro de água destilada) e incubados *overnight* a 37 °C em câmara de anaerobiose. Posteriormente, as placas foram expostas ao ar durante 30 minutos e a produção de  $H_2O_2$  qualitativamente categorizada como produção (+) para colônias marrons, azuis ou azul-claras e ausência de produção (-).

#### 4.1.4 Produção de exopolissacarídeos

A triagem das linhagens produtoras de exopolissacarídeos (EPS) foi realizada, duas vezes em duplicata, segundo metodologia descrita por Waldherr e colaboradores (2010). Após ativação (item 4.1.2) os isolados foram estriados em placas contendo ágar MRS comum e MRS modificado (MRS sem glicose e suplementado com 8% de sacarose). As placas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C por 18 h e, posteriormente, a produção de EPS observada por meio da comparação da viscosidade entre as colônias inoculadas nos dois meios de cultura. As linhagens foram classificadas qualitativamente em produtoras (+) e não produtoras de EPS (-).

#### 4.1.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade dos microrganismos frente aos diferentes antimicrobianos foi realizada em duplicata, de acordo com a técnica de disco-difusão, seguindo-se as normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana, descritas pelo Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI, 2005).

Os isolados foram ativados (item 4.1.2) e transferidos, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, para tubos contendo solução salina (0,9% p/v) até se obter uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5 na escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Em seguida, utilizando-se suabes, foram feitos inóculos sobre a superfície de placas contendo ágar MRS e foram

distribuídos os discos contendo os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, England) nas seguintes concentrações: amicacina (30µg), ampicilina (45µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (1µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), oxacilina (1µg), penicilina (10U) e vancomicina (30µg). As placas foram incubadas durante 48 horas, a 37 °C.

Após a incubação, o diâmetro do halo de inibição (mm) formado ao redor do disco foi medido com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper) e os isolados classificados em resistentes, moderadamente sensíveis e sensíveis, de acordo com o estabelecido por Charteris e colaboradores (1998) (**Anexo A**).

#### 4.1.6 Atividade isoantagonista

As linhagens dos isolados de suínos que apresentaram os melhores resultados frente aos testes *in vitro* anteriormente descritos, foram analisadas segundo sua atividade isoantagonista e autoantagonista pela técnica de difusão em sobrecamada de ágar (Teixeira, et al., 2010), a fim de prever uma possível administração conjunta destes microrganismos. Autoantagonismo foi definido como a inibição de uma linhagem contra ela mesma e o isoantagonismo como a inibição de uma linhagem contra outra linhagem de BAL. O experimento foi realizado duas vezes, em duplicata.

As placas contendo ágar MRS 1,5% (p/v) (Difco, Sparks, EUA) foram preparadas e armazenadas 24 horas a 4 °C e, em seguida, incubadas durante 12 horas a 37 °C. Os isolados foram ativados (item 4.1.2) e, passado o período de incubação das placas, foram feitos *spots* de 5 µL na superfície do ágar MRS. As placas foram incubadas por um período de 24 horas em anaerobiose, a 37 °C.

Após o período de crescimento dos isolados, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e os isolados expostos ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro), por 30 minutos, para promover a morte das células. Em seguida, as placas foram abertas por 40 minutos para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de meio contendo ágar MRS semi-sólido (0,75% p/v), previamente inoculado com as linhagens reveladoras, foi vertida sobre a placa.

Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37 °C por 24 horas e o halo de inibição formado ao redor do *spot* foi medido com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, São Paulo, Brasil), a fim de determinar a atividade antagonista dos isolados.



## 4.2 TESTES *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitos do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG, no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) e no Biotério de Experimentação (NB2), localizados no Departamento de Microbiologia no ICB/UFMG.

### 4.2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Após a caracterização probiótica *in vitro* das BAL, a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4 foi selecionada para os testes *in vivo*, uma vez que cumpriu plenamente os requisitos estabelecidos nos testes preliminares, demonstrando potencial para ser utilizada como suplemento alimentar para suínos. A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium utilizada nos testes foi isolada e identificada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brasil) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

No ensaio de antagonismo *ex vivo* foram utilizadas linhagens de referência 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): *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853.

Os microrganismos foram conservados em caldo MRS ou BHI (Difco, Sparks, EUA) adicionados de glicerol esterilizado (15%) a -80 °C em Deep Freezer (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, EUA). Antes dos experimentos, as bactérias foram ativadas por duas passagens em caldo MRS ou BHI, sendo mantidos em aerobiose por 24 h a 37 °C.

### 4.2.2 Camundongos

Camundongos isentos de germe (IG) e convencionais (CV) da linhagem Swiss NIH (Taconic, Germantown, EUA) de 21 a 23 dias de idade com peso variando de 16 a 24 g, de ambos os sexos foram utilizados. Camundongos IG foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment

Company, McHenry, EUA) e manuseados assepticamente. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em micro-isoladores Alesco (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands).

Camundongos CV foram obtidos a partir de animais isentos de germe, convencionalizados pela administração de diluições fecais de outros camundongos convencionais, sendo utilizados nos experimentos os animais referentes à segunda geração após a convencionalização. Os animais foram mantidos em micro-isoladores Alesco (Modelo ALE. MIL.01.03, Monte Mor, São Paulo, Brasil) acoplados em estantes ventiladas (Alesco, Modelo ALERKD-70).

#### 4.2.3 Manejo e aspectos éticos

Os experimentos foram realizados respeitando-se as características biológicas e fisiológicas dos camundongos, a fim de manter o bem-estar animal durante todos os procedimentos. A manutenção dos animais no biotério apresentou um ciclo diurno/noturno de 12 horas, temperatura de 22 °C ( $\pm 2$  °C), água e ração autoclavadas *ad libitum* e a troca dos isoladores foi realizada a cada três dias, a fim de permitir a troca de ar e impedir o acúmulo de amônia.

Ao final do período experimental os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com Quetamina (100 mg/kg de peso) e Xilazina (20 mg/kg de peso) (Syntec, Cotia, Brasil) e, posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical. Os animais foram submetidos à laparotomia em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas, para coleta de baço, fígado, intestino delgado, intestino grosso e conteúdo intestinal.

A pesquisa aqui apresentada está certificada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) como um subprojeto do projeto intitulado “Determinação do potencial imunomodulatório de lactobacilos, frações da parede bacteriana e proteína S recombinantes de novos isolados com potencial probiótico”, protocolado sob o número 203/2009, aprovado em 09/12/2009 (**Anexo B**). Além disso, todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2015).

#### 4.2.4 Desenho experimental

##### 4.2.4.1 Camundongos convencionais

O experimento com camundongos convencionais foi realizado para avaliar o efeito do tratamento com *W. paramesenteroides* WpK4 na morbidade e mortalidade dos animais durante um desafio experimental com *S. Typhimurium*. Assim, os camundongos foram divididos em quatro grupos compostos por oito animais cada, sendo quatro fêmeas e quatro machos, que receberam diferentes tratamentos, por via intragástrica, durante vinte dias. Foi avaliada a variação de peso, mortalidade, aspectos histopatológicos e os níveis de sIgA total no intestino.

O protocolo de tratamento e infecção foi dividido em três fases: tratamento pré-desafio (1° ao 10° dia), desafio (11° dia) e tratamento pós-desafio (12° ao 20° dia), conforme descrito na **Tabela 4**. Os animais foram eutanasiados logo após o tratamento pós-desafio, no 21° dia.

**Tabela 4.** Grupos de estudo, esquema de tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infecção com *Salmonella* Typhimurium em camundongos convencionais

Grupo	Tratamento Pré-desafio (1° ao 10° dia)	Desafio (11° dia)	Tratamento Pós-desafio (12° ao 20° dia)
<b>CvCt</b>	0,1 mL de salina 0,9%	0,1 mL de salina 0,9%	0,1 mL de salina 0,9%
<b>CvWp</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4	0,1 mL de salina 0,9%	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4
<b>CvWS</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4	10 <sup>6</sup> UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4
<b>CvSt</b>	0,1 mL de salina 0,9%	10 <sup>6</sup> UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>	0,1 mL de salina 0,9%

CvCt: controle negativo; CvWp: tratamento com *W. paramesenteroides* WpK4; CvWS: tratamento com *W. paramesenteroides* WpK4 desafiado com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Foram utilizados oito camundongos convencionais por grupo de tratamento.

Os grupos experimentais tratados (desafiados ou não desafiados) receberam diariamente um inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/mL de *Weissella paramesenteroides* WpK4 resuspendidos em salina estéril (0,9% p/v), enquanto os grupos controles (não tratados) foram inoculados apenas com 0,1 mL de solução salina (0,9% p/v). A viabilidade e as contagens da

linhagem foram confirmadas pelo plaqueamento em meio ágar MRS (Difco, Sparks, EUA), após 24 horas de incubação a 37 °C.

O desafio experimental foi realizado pelo inóculo de uma dose de  $10^6$  UFC/mL de *S. Typhimurium* ressuspendido em salina estéril (0,9% p/v) no 11º dia, por via intragástrica, preparado a partir de uma cultura ativada por duas passagens em meio BHI, crescida por 18 horas a 37 °C, submetida a diluições sucessivas em salina tamponada estéril. A viabilidade dos inóculos e as contagens bacterianas foram confirmadas pelo plaqueamento em meio ágar MacConkey ou MRS (Difco, Sparks, EUA), após 24 horas de incubação a 37 °C. Os grupos não desafiados, ao invés do inóculo de *S. Typhimurium* receberam 0,1 mL de solução salina (0,9% p/v), também por via intragástrica.

Dez dias antes do início dos procedimentos com os animais CV foi realizado um processo de vermifugação, a fim de prevenir e evitar infecções por parasitas que poderiam influenciar nos resultados dos experimentos. O anti-helmíntico Albendazol 0,5% (Tortuga, São Paulo, Brasil) foi colocado na mamadeira dos camundongos por 24 horas, sendo substituído por água filtrada após este período, e uma solução de Triatox 0,5% (Cooper Vets, Hastings, Reino Unido) foi borrifada sobre a maravalha e na gaiola dos animais. Todo o procedimento foi repetido a cada três dias.

#### 4.2.4.2 Camundongos isentos de germes

No ensaio com os camundongos isentos de germe analisaram-se os efeitos preventivo e terapêutico da linhagem WpK4 durante o desafio experimental com o enteropatógeno. Foi avaliada a colonização bacteriana, translocação do patógeno, aspectos histopatológicos, antagonismo *ex vivo* e o perfil imunomodulador.

Os camundongos IG foram divididos em cinco grupos experimentais compostos por oito animais cada, de ambos os sexos, e receberam diferentes tratamentos, por via intragástrica, durante sete dias. Os grupos experimentais e o esquema de tratamento realizado estão representados na **Tabela 5**.

Os grupos de estudo referentes aos animais IG tratados (desafiados ou não desafiados) foram inoculados intragastricamente com uma única dose contendo  $10^8$  UFC/mL de *W. paramesenteroides* WpK4. Assim como no desafio experimental com os animais CV, nos camundongos IG também foi realizado um inóculo de *S. Typhimurium* por gavagem, porém, a dose administrada foi de  $10^2$  UFC/mL no 7º dia. A viabilidade dos inóculos e as contagens bacterianas foram confirmadas pelo plaqueamento em meio ágar MacConkey ou MRS (Difco,

Sparks, EUA), após 24 horas de incubação a 37°C. Os grupos não desafiados e/ou não tratados não receberam nenhum inóculo. Os camundongos foram eutanasiados um e quatro dias após o desafio a fim de analisar a cinética da infecção. O experimento com os animais isentos de germe foi realizado em duplicata.

**Tabela 5.** Grupos de estudo, esquema de tratamento com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infecção com *Salmonella* Typhimurium em camundongos isentos de germe

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento (1º dia)</b>	<b>Desafio (7º dia)</b>	<b>Eutanásia</b>
<b>GfCt</b>	-	-	D1 e D4
<b>GfWp</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4	-	D1
<b>pWpSt</b>	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4	10 <sup>2</sup> UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>	D1 e D4
<b>tWpSt</b>	-	10 <sup>8</sup> UFC/mL de WpK4 + 10 <sup>2</sup> UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>	D1 e D4
<b>GfSt</b>	-	10 <sup>2</sup> UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>	D1 e D4

GfCt: controle negativo; GfWp: tratamento com *W. paramesenteroides* WpK4; pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e desafiado com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*; “-“: ausência de tratamento; D1: eutanásia um dia após o desafio; D4: eutanásia quatro dias após o desafio. Foram utilizados oito camundongos isentos de germe por grupo de tratamento. Quatro animais foram eutanasiados no dia D1 e os outros quatro no dia D4.

A fim de garantir o estado de monoassociação dos animais gnotobióticos, todo experimento foi realizado sob condições assépticas, sendo o controle de contaminação feito pela análise de coloração de Gram das fezes dos animais em cada manipulação. Para isso, as fezes foram coletadas por estimulação anal, colocadas em tubos contendo caldo BHI e incubadas em aerobiose a 37 °C por 18 horas, antes da observação microscópica da suspensão.

#### 4.2.5 Variação de peso e taxa de mortalidade

A variação de peso promovida pelos diferentes tratamentos foi avaliada a partir da pesagem dos camundongos convencionais no início (Dia 1) e no final do experimento (Dia 21), assim como em mais seis dias no intervalo entre estas duas pesagens.

A capacidade de WpK4 proteger os camundongos CV contra o desafio experimental por *S. Typhimurium* também foi analisada. Para isso, os animais do grupo tratado e desafiado (CvWS) foram comparados aos do grupo desafiado e não tratado (CvSt), a fim de avaliar a taxa de mortalidade decorrente da infecção com o patógeno utilizado durante o experimento.

#### 4.2.6 Níveis populacionais e translocação de *S. Typhimurium*

Os níveis populacionais de WpK4 e *S. Typhimurium* foram determinados em camundongos gnotobióticos após a monoassociação. As fezes foram recolhidas por estimulação anal, pesadas e submetidas a diluições decimais em salina (0,9% p/v) esterilizada. Alíquotas de 100 µL das diluições  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram plaqueadas por *spread plate* sobre ágar MRS para WpK4 (1, 5, 7, 9 e 11 dias de monoassociação) e MacConkey para *Salmonella* (1 e 4 dias após o desafio) e as placas incubadas a 37 °C por 48 horas em aerobiose. Os resultados foram expressos como média do Log de UFC/g de fezes. O ensaio foi conduzido sob condições assépticas, sendo utilizando fezes de três animais monoassociados, em duplicata.

Nos dias um e quatro após o desafio com *S. Typhimurium*, os camundongos gnotobióticos foram eutanasiados (quatro animais por grupo em cada dia), sendo o baço e o fígado dissecados em condições assépticas, pesados, triturados e homogeneizados, separadamente, em tubos contendo solução salina tamponada esterilizada. Diluições seriadas foram realizadas e uma alíquota de 100 µL das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  plaqueadas por *spread plate* em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em aerobiose para enumeração bacteriana, sendo os resultados expressos em Log de UFC/g de tecido.

#### 4.2.7 Atividade antagonista *ex vivo*

O ensaio para detecção do efeito antagonista *ex vivo* da linhagem WpK4 foi realizado pela técnica de difusão em sobrecamada de ágar (Vasconcelos, Nicoli e Nardi, 2003) seis dias após a monoassociação dos animais IG. As bactérias patogênicas utilizadas como reveladoras estão descritas no item 4.2.1.

Amostras fecais de camundongos gnotobióticos monoassociados com WpK4 foram coletadas por estimulação anal e colocadas no centro de uma placa contendo ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) e, então, incubadas sob refrigeração a 4 °C por 24 horas. Após este período, o conteúdo foi exposto ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro) por 30

minutos e as placas abertas para evaporação do clorofórmio residual. Uma sobrecamada de meio BHI semi-sólido (0,75%) (Difco, Sparks, EUA), inoculado com as bactérias reveladoras previamente ativadas, foi vertida sobre as placas que, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 18 horas. Foi analisada a presença de halo de inibição ao redor das fezes, sendo o diâmetro da zona inibitória determinado com um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, São Paulo, Brasil).

#### 4.2.8 Análise histopatológica

Os pesos do fígado e baço foram registrados no último dia do experimento dos camundongos CV para determinação dos índices hepático e esplênico, respectivamente, sendo os resultados expressos como peso do órgão (mg) por peso corporal (g) (Zhou et al., 2000). Foram realizados exames histológicos de amostras do baço, fígado, íleo e cólon de quatro camundongos por grupo de experimentação, tanto CV quanto IG. O íleo distal e o cólon foram estendidos em papel filtro com a serosa voltada para baixo e abertos longitudinalmente, removendo-se todo seu conteúdo sem danos à mucosa. Os fragmentos foram pré-fixados em solução de Bouin com 2% (v/v) de ácido acético glacial por aproximadamente 10 minutos. O material pré-fixado foi colocado sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a mucosa voltada para dentro, de modo a formar rolos da porção distal em direção à proximal. Os rolos foram fixados por imersão em solução de formol 10% (v/v) por 24 horas (Arantes e Nogueira, 1997). As amostras de intestino delgado, cólon, fígado e baço foram destinadas à rotina histológica para inclusão em parafina, seguido de microtomia (dois cortes de secções histológicas consecutivas com 4 µm de espessura) e coloração com Hematoxilina e Eosina para estudos morfológicos.

As imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de uma vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente por uma mesma patologista (Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG) que não teve acesso ao significado dos códigos, sendo as amostras decodificadas apenas após o laudo ter sido emitido (Martins et al., 2009). Um valor numérico foi atribuído às mudanças observadas

no intestino (mucosa e lâmina própria) e cada animal recebeu um *score* equivalente à soma de todas as alterações verificadas (máximo de 15). Seções do íleo e colon foram avaliadas de acordo com os seguintes parâmetros, classificados de 0 (normal) a 3 (lesão grave): grau de infiltração celular do epitélio intestinal e lâmina própria, erosão epitelial, edema da lâmina própria, hiperemia e mudança na arquitetura do órgão. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão dos *scores*.

#### 4.2.9 Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) total

Os níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) no conteúdo intestinal dos camundongos CV e IG foram analisados pelo método de ELISA, em triplicata, conforme descrito por Martins e colaboradores (2007). O intestino delgado dos camundongos foi removido por meio de cortes nas junções gastroduodenal e ileocecal, sendo o fluido intestinal coletado, pesado e diluído na proporção de 500 mg do conteúdo intestinal para 2,0 mL de salina fosfatada (pH 7,2), contendo 1% (v/v) de inibidor de protease (P-8340, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA). O material foi centrifugado a 2000 x g, por 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

Para dosagem das sIgA totais, as placas de ELISA foram inicialmente revestidas com anticorpos anti-IgA (M-8769, Sigma, St Louis, MO, EUA), as amostras do fluido intestinal foram diluídas (1:400) em PBS-Tween e, posteriormente, diluições sucessivas (1:2) foram realizadas e adicionadas em duplicata aos poços das placas. A detecção foi feita por anticorpos anti-IgA de camundongo conjugado com peroxidase (A-4789, Sigma, St Louis, MO, EUA) e a concentração de sIgA foi estabelecida pela utilização de um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EUA),

A absorbância das amostras foi determinada pela leitura de OD<sub>492nm</sub> realizada em leitor de ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) e os resultados expressos como µg de sIgA/g de conteúdo intestinal, calculado a partir da curva padrão.

#### 4.2.10 Expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas

Um e quatro dias após a infecção com *S. Typhimurium*, camundongos gnotobióticos monoassociados com WpK4 foram eutanasiados para quantificação relativa dos níveis de mRNA dos genes *Il6*, *Il10*, *Il17a*, *Ifng*, *Tgfb1* e *Tnfa*, de acordo com Steinberg et al. (2014).



Fragmentos do intestino delgado (proximal, medial e distal) medindo 1-2 cm foram coletados dos animais, imersos em RNAlater (Ambion, Austin, Texas, EUA) e armazenados em freezer a -20 °C para posterior extração do RNA total. O RNA total foi isolado usando Trizol (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA isolado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para avaliação da integridade e, posteriormente, quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific, Inc., Bremen, Alemanha). Apenas amostras de RNA total com mais de 200 µg/mL e uma razão A260/A280 entre 1,7 e 2,1 foram usadas. O DNA genômico foi removido pela utilização de Turbo DNase I antes da transcrição reversa, realizada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, ambos de acordo com instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O cDNA resultante foi amplificado por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) usando o kit SYBR Green PCR Master Mix 2X, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os primers gene-específicos para as citocinas e os genes de referência ACTB e GAPDH utilizados como normalizadores para os dados de expressão foram descritos por Giulietti et al. (2001). Os níveis de expressão do grupo controle dos animais isentos de germe (GfCt) foram usados como calibradores e a expressão relativa de mRNA para cada citocina foi obtida pelo método de quantificação relativa derivado (Hellemans et al., 2007). Os resultados foram expressos como a média e o desvio padrão da expressão relativa de mRNA para cada citocina normalizada pelo nível de expressão do gene de referência.

#### 4.2.11 Análise estatística

Antes do tratamento estatístico os dados obtidos foram avaliados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). As amostras paramétricas foram submetidas à análise de variância com um (*one-way anova*) ou dois critérios (*two-way anova*), seguidas pelo teste de Tukey e Bonferroni, respectivamente, para comparação das médias.

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

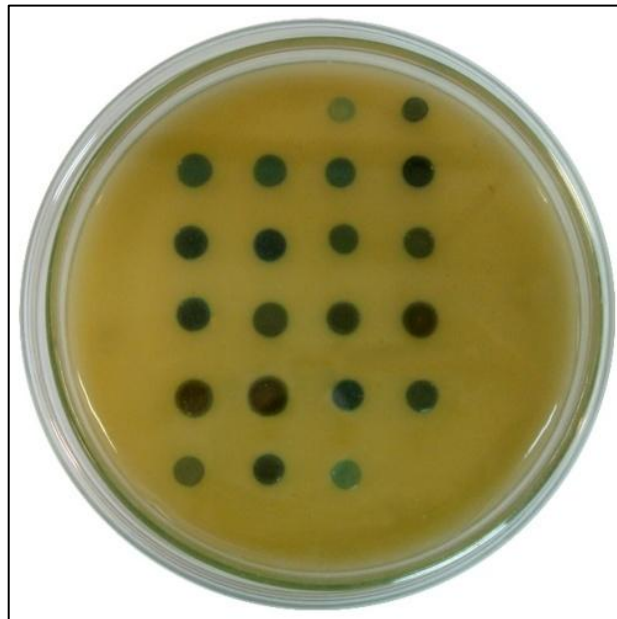
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE *IN VITRO*

#### 5.1.1 Produção de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um importante agente antagonista contra bactérias patogênicas, representando um mecanismo de defesa antimicrobiano não-específico eficaz mesmo em baixas concentrações (Martín e Suárez, 2010).

Desta forma, avaliar a produção de  $H_2O_2$  em isolados bacterianos que podem vir a ser empregados como probióticos, constitui-se uma etapa importante do processo de seleção, uma vez que a atividade antagonista é amplamente requerida para estas linhagens (Ruiz-Moyano et al., 2008; Desland et al., 2012). Os resultados referentes ao teste de síntese de peróxido de hidrogênio (**Figura 3**) pelas BAL isoladas de suínos são apresentadas na **Tabela 6**.



**Figura 3.** Perfis da síntese de peróxido de hidrogênio das diferentes linhagens de bactérias do ácido lático isoladas de suínos.

Fonte: Dados do autor.

**Tabela 6.** Caracterização qualitativa dos perfis de produção de peróxido de hidrogênio das linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos.

ISOLADO	PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *
<i>W. paramesenteroides</i> WpA	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpB	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpC	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpD	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpE	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpF	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpI	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpH1	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpJ4	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpK4	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpX	+
<i>W. cibaria</i> WcL	+
<i>W. cibaria</i> WcM	+
<i>W. cibaria</i> WcN	+
<i>L. acidophilus</i> LaH4	+
<i>L. acidophilus</i> LaL4	-
<i>L. brevis</i> LbS	+
<i>L. brevis</i> LbW	+
<i>L. plantarum</i> LpG1	+
<i>L. plantarum</i> LpG4	+
<i>L. plantarum</i> LpR	+
<i>L. paraplantarum</i> LprG	+
<i>L. reuteri</i> LreZ	+
<i>L. rossiae</i> LrA1	-

\* (+) linhagem produtora; (-) linhagem não produtora. Experimento realizado em duplicata.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é utilizado pelas enzimas peroxidases para oxidação de halogênios e isocianetos, que transforma estas substâncias em potentes compostos antibacterianos, promovendo a morte do microrganismo patogênico por meio da ruptura das membranas celulares e interrupção da síntese protéica (Thallinger et al., 2013).

Na literatura, assim como detectado neste trabalho, vários pesquisadores apontaram as BAL como eficientes sintetizadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vallor et al., 2001; Chaillou et al., 2005; Branco et al., 2010). Pridmore e colaboradores (2008) constataram que das dez cepas de *Lactobacillus* spp. analisadas, todas eram capazes de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados semelhantes também foram encontrados em linhagens de BAL isoladas de diferentes mucosas de aves e bovinos, constatando síntese de peróxido de hidrogênio em 75% e 80% dos casos, respectivamente (Moreira, 2005; Sandes, 2012).

Além disso, bactérias do ácido láctico têm sido descritas como boas produtoras de peróxido de hidrogênio, pois este composto é produzido naturalmente pelo metabolismo

destes microrganismos sob certas condições de crescimento e, como estas bactérias não sintetizam a catalase, o  $H_2O_2$  produzido acumula-se, podendo, então, inibir patógenos que não possuem esta enzima (Barbosa et al., 2011).

### 5.1.2 Produção de exopolissacarídeos

A síntese de EPS por linhagens de bactérias do ácido lático com potencial probiótico tem se mostrado interessante tanto do ponto de vista funcional quanto em relação às características tecnológicas para estes microrganismos, já que esses polímeros extracelulares promovem a aderência da bactéria a superfícies biológicas, apresentam propriedades benéficas para o hospedeiro, além de preservar as qualidades sensoriais e os valores nutricionais dos produtos nos quais estão presentes (Ruas-Madiedo, Hegenholtz e Zoon, 2002; Waldherr et al., 2010).

Os exopolissacarídeos são produzidos a partir do metabolismo primário de carboidratos, sendo o dissacarídeo sacarose descrito como a melhor fonte de estímulo para produção de EPS por bactérias do ácido lático (Badel, Bernard e Michaud, 2011). Assim, visando estimular a síntese de EPS para triagem das linhagens produtoras, foi realizada a adição de sacarose ao meio de cultura e a viscosidade das colônias inoculadas no meio normal e suplementado comparadas, sendo atribuído (+) para as linhagens produtoras e (-) para as não produtoras (**Figura 4**). Os resultados do ensaio são apresentados na **Tabela 7**.



**Figura 4.** Linhagem de bactéria do ácido lático isolada de suíno cultivada em ágar MRS comum (esquerda) e ágar MRS modificado (direita).

A produção de exopolissacarídeo foi reconhecida pela visualização de colônias com aspecto viscoso (direita). Experimento realizado em duplicata.

**Tabela 7.** Caracterização qualitativa do perfil de síntese de exopolissacarídeo pelas linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos.

ISOLADO	PRODUÇÃO DE EPS*
<i>W. paramesenteroides</i> WpA	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpB	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpC	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpD	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpE	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpF	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpI	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpH1	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpJ4	-
<i>W. paramesenteroides</i> WpK4	+
<i>W. paramesenteroides</i> WpX	+
<i>W. cibaria</i> WcL	+
<i>W. cibaria</i> WcM	+
<i>W. cibaria</i> WcN	+
<i>L. acidophilus</i> LaH4	-
<i>L. acidophilus</i> LaL4	+
<i>L. brevis</i> LbS	-
<i>L. brevis</i> LbW	-
<i>L. plantarum</i> LpG1	-
<i>L. plantarum</i> LpG4	-
<i>L. plantarum</i> LpR	-
<i>L. paraplantarum</i> LprG	-
<i>L. reuteri</i> LreZ	-
<i>L. rossiae</i> LrA1	-

\* (+) linhagem produtora; (-) linhagem não produtora. Experimento realizado em duplicata.

Os isolados de suínos analisados, em geral, não se mostraram eficientes na síntese de exopolissacarídeo pelo teste realizado. De acordo com o descrito por Badel, Bernard e Michaud (2011), este resultado encontra-se em conformidade com outros trabalhos, uma vez que as bactérias do ácido láctico não são eficientes produtores de EPS quando comparadas a outros microrganismos como, por exemplo, a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* que sintetiza um tipo de polímero extracelular do qual são comercializadas mais de 20 mil toneladas por ano (Sutherland, 2002).

Entretanto, apesar de a baixa produção de EPS descrita para BAL, 29% dos isolados deste estudo apresentaram colônias viscosas quando cultivadas em meio suplementado com sacarose, característica de linhagens com capacidade de síntese do composto analisado.

Dentre estes isolados estão uma cepa de lactobacilos, *L. acidophilus* LaL4, e seis do gênero *Weissella* (*W. paramesenteroides* WpD, WpK4 e WpX e *W. cibaria* WcL, WcM e WcN).

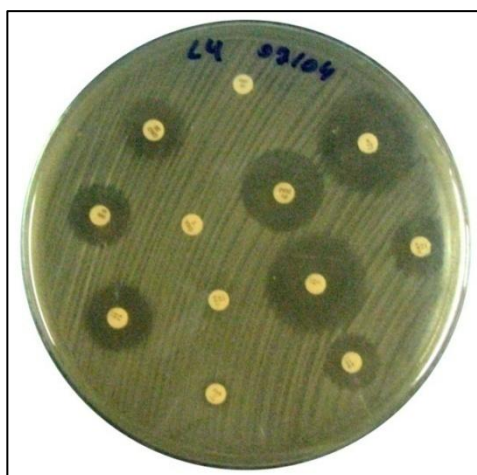
O fato de muitos gêneros de BAL apresentarem o *status* GRAS faz com que os biopolímeros sintetizados por estas bactérias sejam altamente visados pelas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, pois facilitam a aprovação de produtos com esta substância em sua composição por órgãos sanitários fiscalizadores (Ruas-Madiedo, Hegenholtz e Zoon, 2002; Waldherr et al., 2010).

Exopolissacarídeos originados de bactérias do ácido lático podem ser empregados como aditivos alimentares por suas propriedades biotecnológicas como, por exemplo, geleificante, estabilizante e espessante, proporcionando uma textura adequada e características sensoriais desejáveis ao produto, somados ao fato de serem microrganismos facilmente cultivados e de fácil manipulação (Vu et al., 2009). Além disso, já foram descritas propriedades antitumorais, antivirais, anticoagulante e atividade imunomodulatória de EPS produzidos por BAL (Welman e Maddox, 2003; Singha, 2012).

### 5.1.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Bactérias do ácido lático isoladas de animais e utilizadas como probióticos têm sido alvo de vários estudos no que diz respeito à análise da presença de resistência antimicrobiana (Barton, 2000; Danielsen e Wind, 2003; Belletti et al., 2009). A preocupação existente é em relação à aquisição de resistência não intrínseca a certos antimicrobianos e à transmissão desta para microrganismos patogênicos, o que poderia vir a comprometer a eficiência destes compostos na terapia humana (Turner, Dritz e Minton, 2001; Costa, Tse e Miyada, 2007; Junior et al., 2010).

A determinação da susceptibilidade dos isolados de suínos aos agentes antimicrobianos foi realizada de acordo com a técnica de disco-difusão (**Figura 5**). Os resultados são mostrados na **Tabela 8**. Os índices de sensibilidade e resistência aos antibióticos que não foram descritos na tabela de classificação estão apresentados no **Apêndice B**.



**Figura 5.** Exemplo de resultado obtido a partir da técnica de disco-difusão utilizada para a determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

**Tabela 8.** Níveis de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens de bactérias do ácido láctico isoladas de suínos

ISOLADO*	ANTIMICROBIANO								
	AMI	AMP	ERI	CTF	CLO	OXA	PEN	VAN	
<i>W. paramesenteroides</i> WpA	R	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpB	R	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpC	R	S	S	S	S	R	S	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpD	R	S	S	S	S	R	R	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpE	R	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpF	R	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpH1	R	S	R	MS	S	R	R	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpJ4	R	S	R	MS	S	R	R	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpK4	S	S	S	MS	S	R	MS	R	
<i>W. paramesenteroides</i> WpX	MS	R	MS	R	R	R	R	R	
<i>W. cibaria</i> WcL	MS	S	S	MS	S	R	R	R	
<i>W. cibaria</i> WcM	R	S	S	MS	S	R	R	R	
<i>W. cibaria</i> WcN	R	S	S	MS	S	R	R	R	
<i>L. acidophilus</i> LaH4	R	S	R	S	S	R	MS	R	
<i>L. acidophilus</i> LaL4	R	S	S	MS	S	R	MS	R	
<i>L. brevis</i> LbS	MS	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>L. brevis</i> LbW	S	S	S	S	S	R	S	R	
<i>L. plantarum</i> LpG1	R	S	S	S	S	R	R	R	
<i>L. plantarum</i> LpG4	R	S	S	S	S	R	S	R	
<i>L. plantarum</i> LpR	R	S	MS	S	MS	R	MS	R	
<i>L. paraplantarum</i> LprG	R	S	S	S	S	R	MS	R	
<i>L. reuteri</i> LreZ	S	S	S	S	S	R	R	R	

R: resistente; S: sensível; MS: moderadamente sensível; AMI: amicacina (30µg); AMP: ampicilina (45µg); ERI: eritromicina (15µg); CTF: ceftriaxona (30µg); CLO: cloranfenicol (30µg); OXA: oxacilina (1µg); PEN: penicilina (10U); VAN: vancomicina (30µg). \*Os isolados *W. paramesenteroides* WpI e *L. rossiae* LrA1 não apresentaram crescimento suficiente para o teste. Experimento realizado em duplicata.

A análise dos resultados demonstra que o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos utilizados é espécie-dependente. Excetuando-se o inibidor de síntese de peptidoglicano, penicilina, os níveis de sensibilidade e resistência de cada uma das espécies (Grupo *plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *W. cibaria* e *W. paramesenteroides*) frente aos antimicrobianos foram praticamente iguais. Este tipo de relação já foi descrito na literatura por Danielsen e Wind (2003).

Todos os isolados suínos testados apresentaram resistência à vancomicina e à oxacilina, bem como altas porcentagens de resistência à amicacina (72,7%). Os resultados encontrados estão de acordo com numerosas pesquisas que frequentemente relatam um elevado grau de resistência dos gêneros de bactérias do ácido lático aos antimicrobianos das classes dos glicopeptídeos (vancomicina), aminoglicosídeos (amicacina) e penicilina (oxacilina) (Barton, 2000; Bywater, 2005; Ammor, Flórez e Mayo, 2007; Belletti et al., 2009).

A resistência à vancomicina tem sido demonstrada como sendo intrínseca às bactérias do ácido lático, sendo que estudos com *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes origens apontaram resistência em 100% das linhagens testadas (Mathur e Singh, 2005; Ouoba, Lei e Jensen, 2008). Microrganismos pertencentes a outros gêneros de BAL (*Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*) também foram destacados como portadores desta resistência intrínseca à vancomicina (Wright, 2003; Mathus e Singh, 2005).

Elevados índices de resistência à amicacina também foram demonstrados em vários gêneros de BAL (Charteris et al., 1998; Ammor, Flórez e Mayo, 2007). Linhagens probióticas como, por exemplo, *L. delbrueckii* UFV H2b20 isolado do trato gastrointestinal humano, foram relatadas como resistentes à amicacina (Ferreira, 2006).

Em acordo com os resultados aqui expostos, autores encontraram também baixa susceptibilidade de BAL à oxacilina (Coppola et al., 2005; Rodríguez-Alonso et al., 2009). Segundo Teuber e colaboradores (1999), mesmo a penicilina e a oxacilina pertencendo ao mesmo grupo de antimicrobianos (beta-lactâmicos), a resistência a este último geralmente é maior. Este fato foi constatado por este estudo, no qual os isolados suínos que foram totalmente resistentes à oxacilina apresentaram apenas 41% de resistência à penicilina.

Todos os isolados apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos, com exceção da cepa *W. paramesenteroides* WpK4 que apresentou resistência apenas para dois antimicrobianos (oxacilina e vancomicina). A linhagem *W. paramesenteroides* WpX foi a que demonstrou resistência a um maior número de compostos, seis dos oito analisados, sendo apenas moderadamente sensível à amicacina e à eritromicina. A presença de microrganismos multirresistentes na microbiota suína é um fator preocupante, uma vez que estes podem



disseminar marcadores de resistência, devido à transferência gênica horizontal por elementos genéticos móveis, para grupos de bactérias relacionadas como *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (Barton, 2000; Moreira, 2005).

Em relação à sensibilidade, exceto a linhagem multirresistente *W. paramensenteroides* WpX, todos os isolados analisados (95,5%) apresentaram-se susceptíveis à ampicilina, ceftriaxona e ao cloranfenicol, além de 86,4% terem sido inibidos pela presença de eritromicina no meio de cultura. Bactérias do ácido láctico sensíveis a estes antimicrobianos têm sido comumente reportadas em artigos científicos (Ferreira, 2006; Klare et al., 2007; Fukao e Yajuma, 2012).

Temmerman e colaboradores (2002), também utilizando o método de disco-difusão para análise do nível de susceptibilidade de isolados de BAL, encontraram 90% das linhagens resistentes ao cloranfenicol e 84% resistentes à eritromicina. Além disso, Danielsen e Wind (2003) relataram alta sensibilidade de *Lactobacillus* spp. frente à presença do inibidor de síntese de parede ampicilina, assim como relatado neste trabalho.

De maneira geral, os resultados expostos confirmam a diversidade de perfis de resistência e sensibilidade em relação aos antimicrobianos nas bactérias do ácido láctico de diferentes origens, além de demonstrar a necessidade de uma inspeção mais rigorosa à utilização dos antimicrobianos nos sistemas de criação de suínos, uma vez que foi encontrada ampla gama de bactérias multirresistentes.

#### 5.1.4 Atividade isoantagonista

A composição de probióticos em um produto pode ser muito variável, sendo encontradas tanto preparações monolinhas como multilinhas. Os probióticos monolinhas são definidos como apresentando uma única cepa de determinada espécie, já os multilinhas contém diferentes cepas de uma espécie ou, até mesmo, bactérias de variados gêneros (Timmerman et al., 2004).

Alguns autores descrevem que a funcionalidade de um probiótico multilinha pode ser mais consistente que outro monolinha, argumentando que culturas mistas têm maior chance de colonização do trato gastrointestinal e podem demonstrar propriedades probióticas sinérgicas (Sanders, 1993; Famularo et al., 1999; Rolfe, 2000).

Assim, a fim de avaliar a possibilidade de administração conjunta de microrganismos com potencial probiótico, os isolados de suíno que apresentaram os melhores índices em relação aos ensaios *in vitro* anteriormente descritos (**Apêndice A**), foram submetidos à análise

da atividade isoantagonista. As linhagens avaliadas foram: *W. paramesenteroides* WpK4, *L. acidophilus* LaH4, *L. brevis* LbS, *L. brevis* LbW, *L. plantarum* LpG1 e *L. rossiae* LrA1. Os resultados estão descritos na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Atividade isoantagonista das linhagens de bactéria do ácido láctico isoladas de suínos que apresentaram os melhores índices em relação aos ensaios *in vitro*

ISOLADO*	Linhagem Reveladora					
	WpK4	LaH4	LbS	LbW	LpG1	LrA1
WpK4	-	-	-	-	-	+
LaH4	-	-	-	-	-	-
LbS	-	-	-	-	-	-
LbW	-	-	-	-	-	-
LpG1	+	-	-	-	-	-
LrA1	-	-	-	-	-	-

\**W. paramesenteroides* WpK4, *L. acidophilus* LaH4, *L. brevis* LbS, *L. brevis* LbW, *L. plantarum* LpG1 e *L. rossiae* LrA1; (+) presença de inibição; (-) ausência de inibição. Experimento realizado em duplicata.

Os parâmetros observados foram a capacidade autoantagonista e isoantagonista dos isolados. Nenhuma dos microrganismos avaliados apresentou atividade inibitória contra ele mesmo (autoantagonismo), propriedade já descrita na literatura como uma característica de bactérias do ácido láctico (Guedes Neto et al., 2005; Guo et al., 2010).

Houve uma baixa atividade isoantagonista entre os microrganismos avaliados, sendo que apenas duas das linhagens inibiram o crescimento de outra. Este resultado já era esperado, pois em muitos casos a ação de BAL é proveniente do ácido láctico e microrganismos pertencentes a este grupo, geralmente, são indiferentes à presença desta substância no meio (Jin, Marquard e Baidoo, 2000; Silva et al., 2007).

A inibição de *L. rossiae* LrA1 por *W. paramesenteroides* WpK4 talvez possa ser atribuída à presença do ácido láctico, uma vez que dentre todas as linhagens isoladas de suíno, *L. rossiae* LrA1 apresenta uma das menores tolerâncias ao baixo pH (**Apêndice A**). Já a inibição promovida por *L. plantarum* LpG1 em *W. paramesenteroides* WpK4 pode ser relacionada a outra substância antagonista, pois *W. paramesenteroides* WpK4 foi uma das poucas linhagens que demonstrou resistência ao pH ácido (**Apêndice A**).

Várias combinações contendo os microrganismos analisados poderiam ser empregadas na produção de um probiótico multilinhagens com melhores características funcionais, sendo que exceto os isolados *W. paramesenteroides* WpK4 com *L. rossiae* LrA1 e *L. plantarum* LpG1 com *W. paramesenteroides* WpK4 não poderiam estar presentes na mesma formulação.

Entretanto, apesar de a compatibilidade preliminar observada *in vitro*, a viabilidade destas preparações deve ser estudada *in vivo*, a fim de observar o efeito sinérgico ou inibitório destas linhagens, antes de aplicadas como um probiótico multilinhagens.

## 5.2 CRITÉRIO DE SELEÇÃO DA LINHAGEM PARA OS TESTES *IN VIVO*

Aspectos relativos à segurança, funcionalidade e propriedades tecnológicas, são os principais critérios avaliados na seleção de microrganismos com características probióticas com finalidade industrial (Saarela et al., 2000; Turner, Dritz e Minton, 2001; Oelschlaeger, 2010).

A observação do comportamento *in vitro* específico da linhagem que se pretende utilizar como probiótico tem sido eficiente como um processo de seleção preliminar (Morelli, 2000; FAO/WHO, 2002; Mirlohi et al., 2009). Assim, os critérios utilizados neste trabalho para seleção de linhagens probióticas foram baseados na avaliação *in vitro* dos isolados bacterianos de suínos.

Todas as linhagens foram testadas, independentemente do seu desempenho nos ensaios paralelos, visando imparcialidade dos resultados, bem como, contribuir para o conhecimento comportamental de cada linhagem dentro das condições avaliadas. A síntese dos resultados obtidos *in vitro* é apresentada no **Apêndice A**.

*Weissella paramesenteroides* WpK4 cumpriu plenamente os requisitos estabelecidos nos teste *in vitro* de caracterização de linhagens probióticas, apresentando resistência ao suco gástrico, tolerância aos sais biliares, alta hidrofobicidade da parede celular, amplo antagonismo contra patógenos bacterianos, produção de peróxido de hidrogênio, síntese de exopolissacarídeos, sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na terapia humana e animal, além da possibilidade de ser aplicado como um probiótico multilinhagens.

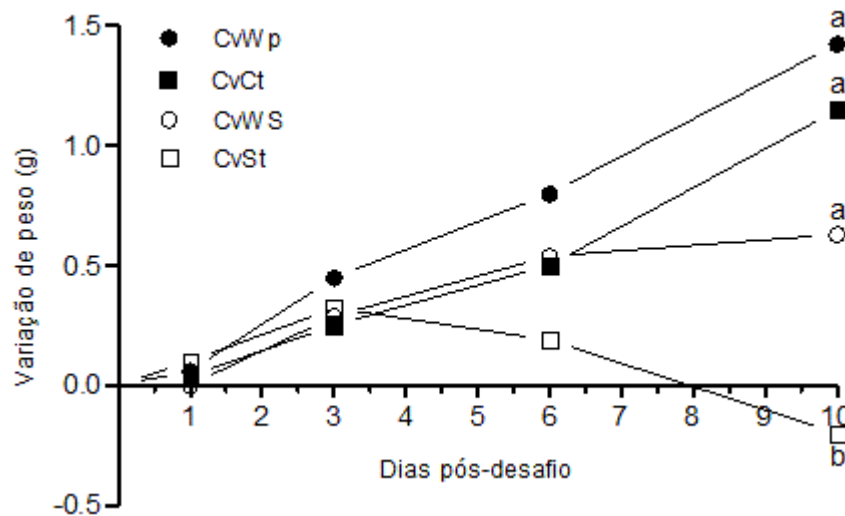
Deste modo, este isolado foi selecionado para os testes *in vivo* em camundongos convencionais e isentos de germe, pois demonstrou potencial para ser utilizado como suplemento alimentar para suínos, podendo ser administrado por via oral, uma vez que poderia resistir às condições adversas do TGI.

### 5.3 TESTES *IN VIVO*

#### 5.3.1 Variação de peso e taxa de mortalidade

A utilização de aditivos alimentares nas dietas dos animais tem sido uma das técnicas aplicadas com resultados significativos para promover melhora nos índices zootécnicos e aumentar a produtividade (Costa, Tse e Miyada, 2007).

A variação de peso resultante da suplementação alimentar de camundongos convencionais com *W. paramesenteroides* WpK4, desafiados ou não com *S. Typhimurium*, foi avaliada durante o período de infecção dos animais, a fim de verificar a influência deste tratamento. Na **Figura 6**, observa-se que camundongos que receberam a linhagem WpK4 (CvWp) tiveram ganho de peso semelhante ao grupo controle (CvCt). Além disso, entre os animais desafiados, aqueles alimentados com WpK4 (CvWS) tiveram uma perda de peso significativamente menor ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos animais não tratados (CvSt).



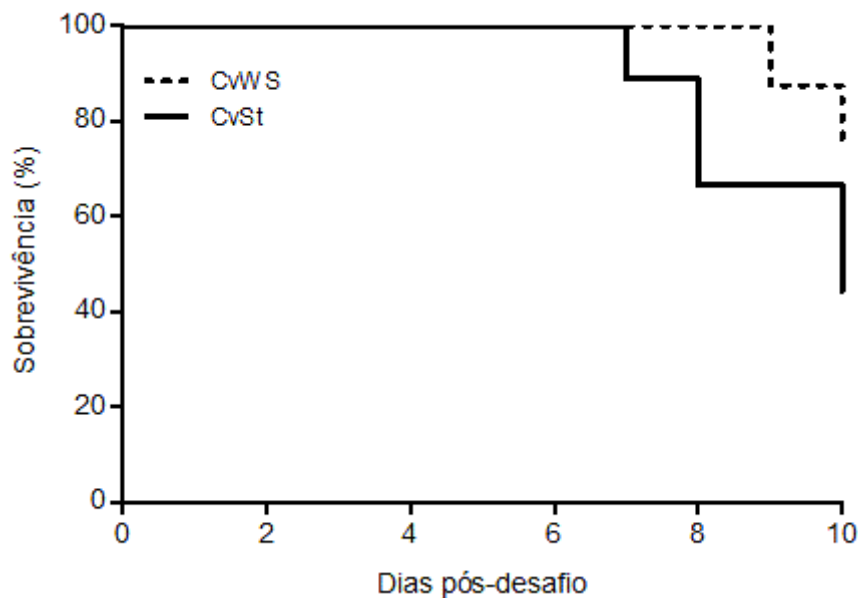
**Figura 6.** Variação de peso de camundongos convencionais tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infectados com *Salmonella Typhimurium*. CvWp: tratamento com WpK4; CvCt: controle negativo; CvWS: tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Foram analisados oito animais por grupo de tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Estes resultados são mais efetivos que os relatados para a cepa probiótica *L. delbrueckii* UFV-H2b20 que, utilizando condições experimentais muito próximas, demonstrou perda de peso dos animais tratados após cinco dias de infecção com *S. Typhimurium* (Moura et al., 2001) e semelhantes aos encontrados para linhagem probiótica *L. casei* CRL 431, conhecida por estimular o sistema imune e prevenir a infecção de

camundongos por enteropatógenos, descrita como capaz de promover menor perda de peso de animais infectados com *S. Typhimurium* por sete dias (LeBlanc, Castillo e Perdigon, 2010).

Um estudo avaliando a administração oral de três linhagens probióticas (*L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 e *Bifidobacterium lactis* HN019), independentemente, sobre a variação de peso de animais convencionais, também encontraram resultados semelhantes a este trabalho, reportando que embora tenha sido observado ganho de peso dos animais tratados em relação ao controle, esta diferença não foi significativa (Zhou et al., 2000).

Os camundongos desafiados e não tratados (CvSt) apresentaram ainda, somado à perda de peso, alta taxa de sobrevivência, sendo que a primeira morte neste grupo aconteceu no sétimo dia após o desafio. Nos animais tratados com WpK4 e desafiados com *S. Typhimurium* (CvWS) a primeira morte foi observada apenas no nono dia (**Figura 7**).



**Figura 7.** Efeito da administração de *Weissella paramesenteroides* WpK4 na sobrevivência de camundongos convencionais infectados com *Salmonella Typhimurium*.

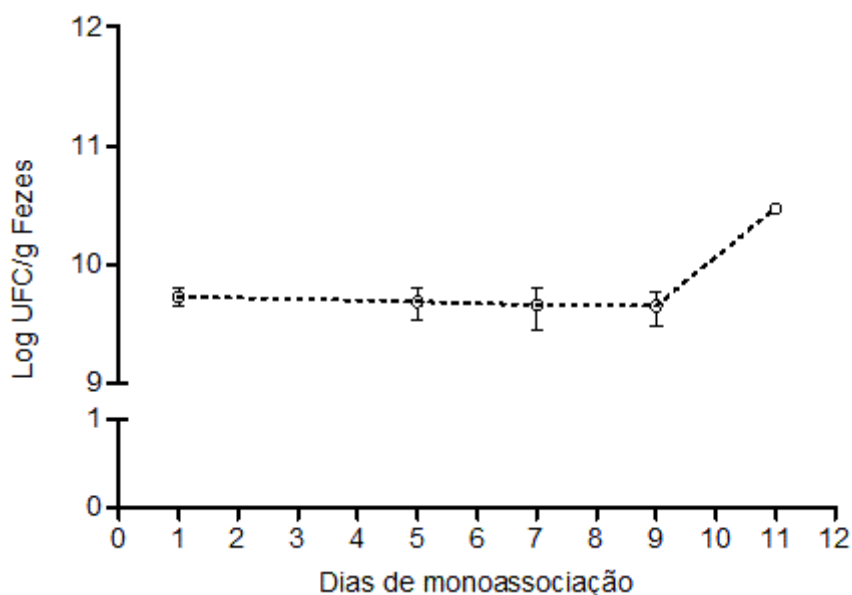
CvWS: tratamento com WpK4 e desafio com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Foram analisados oito animais por grupo de tratamento.

A administração oral de *W. paramesenteroides* WpK4 nos camundongos demonstrou uma sobrevida dos animais infectados ( $P=0,07$ ) não estatisticamente significativa. A mortalidade total foi de aproximadamente 60% no grupo não tratado (CvSt) para 25% no grupo tratado (CvWS). Nos grupos controle (CvCt) e tratado não desafiado (CvWp) houve uma sobrevivência de 100% dos animais. A não observância de diferença estatística entre os grupos muito provavelmente foi devido ao curto espaço de tempo do experimento de

mortalidade, já que este ensaio geralmente é realizado com 28 dias ou até que aconteça a morte de todos os animais do grupo infectado, o que não aconteceu neste estudo.

### 5.3.2 Colonização bacteriana e translocação de *Salmonella* Typhimurium

WpK4 mostrou-se capaz de colonizar o trato gastrointestinal dos animais monoassociados, mantendo altos níveis populacionais (**Figura 8**). Apenas 24 horas após a inoculação já foi observado um aumento do microorganismos nas fezes dos camundongos gnotobióticos, o qual se manteve estável até o nono dia, sendo, ainda, detectado um ligeiro crescimento ( $10^{10}$  UFC/g de fezes) no décimo primeiro dia de monoassociação.



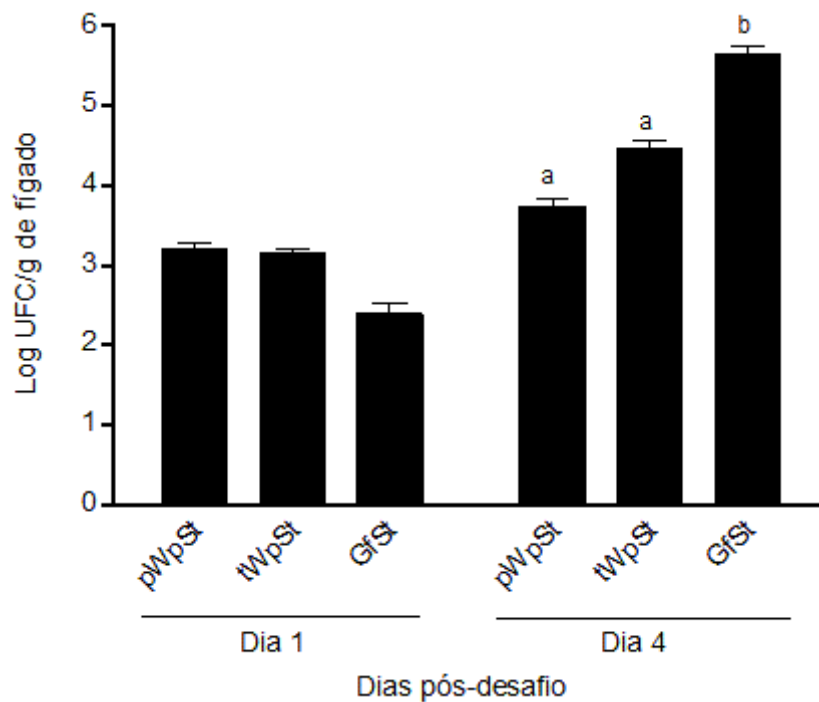
**Figura 8.** Níveis populacionais de *Weissella paramesenteroides* WpK4 nas fezes de camundongos monoassociados com  $10^8$  UFC/mL. As contagens foram realizadas nas fezes de quatro animais em cada dia analisado.

Os resultados encontrados corroboram os achados dos testes de caracterização probiótica preliminar realizada *in vitro*, os quais descreviam a linhagem WpK4 como capaz de superar as condições adversas do trato gastrointestinal, apresentando resistência à acidez gástrica e tolerância à atividade hidrolítica dos sais biliares, bem como potencial para adesão ao epitélio intestinal, apontado pelo estudo de hidrofobicidade da parede celular (**Apêndice A**).

O principal determinante da patogenicidade promovida pela salmonela é sua capacidade de translocação para órgãos do hospedeiro (Gill, Lin e Rutherford, 2001). Após a

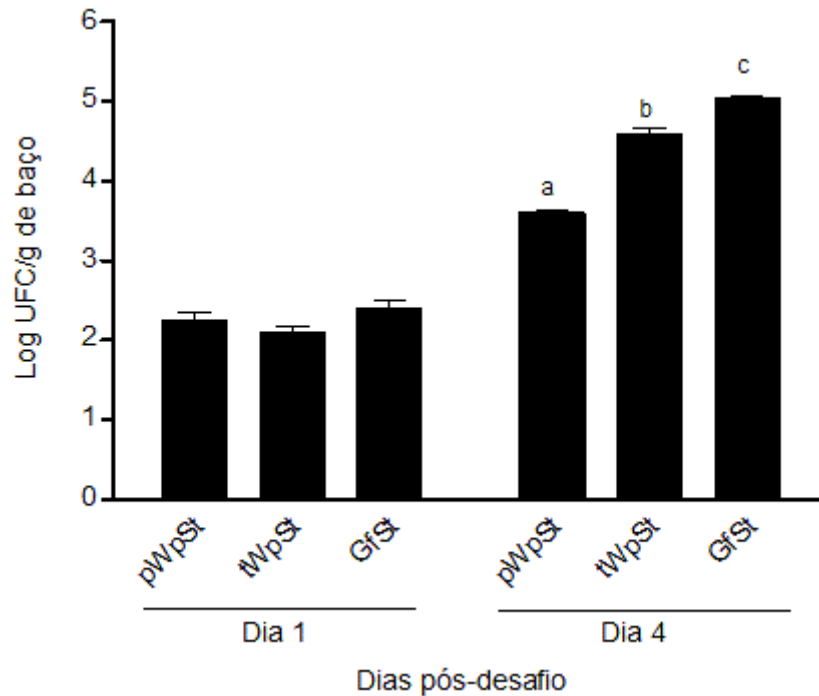
infecção, o enteropatógeno promove a morte das células M constituintes da mucosa intestinal, gerando rupturas nas junções do epitélio, o que permite a invasão de enterócitos adjacentes e a migração para outros sítios anatômicos, como o fígado e o baço, onde a bactéria se multiplica no interior dos fagócitos (Dougan et al., 2011).

Assim, o efeito protetor de WpK4 sobre a capacidade de colonização e translocação de *S. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos também foi avaliado. Foram realizadas contagens de *S. Typhimurium* no fígado e baço (**Figuras 9 e 10**) e analisados os níveis populacionais do enteropatógeno no TGI dos diferentes grupos experimentais (**Figura 11**) um e quatro dias após a infecção dos animais.



**Figura 9.** Translocação de *Salmonella Typhimurium* para o fígado de camundongos gnotobióticos tratados ou não com *Weissella paramesenteroides* WpK4.

pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As contagens foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento por dia. Colunas seguidas por letras distintas em cada dia analisado diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 10.** Translocação de *Salmonella Typhimurium* para o baço de camundongos gnotobióticos tratados ou não com *Weissella paramesenteroides* WpK4.

pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As contagens foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento por dia. Colunas seguidas por letras distintas em cada dia analisado diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

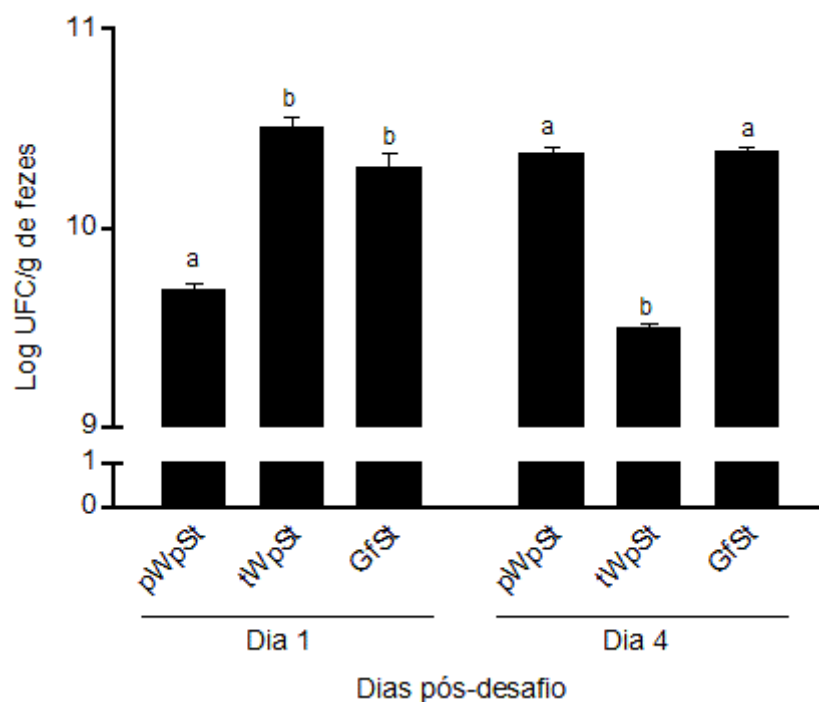
A administração de WpK4 em camundongos IG promoveu uma redução estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) nas contagens de *S. Typhimurium* em relação aos animais não tratados, no quarto dia de infecção. Os níveis de translocação foram similares no fígado e baço, sendo que o grupo pré-tratado (pWpSt) demonstrou redução de aproximadamente 100 vezes na carga bacteriana em relação ao grupo não tratado (GfSt). No grupo que recebeu simultaneamente *S. Typhimurium* e WpK4 (tWpSt) também foi observada redução da translocação, entretanto, esta se apresentou em menor grau, aproximadamente 10 vezes.

Gill e colaboradores (2001) relataram que o tratamento com linhagens probióticas antes do desafio com enteropatógenos é necessário para conferir uma proteção ótima contra translocação e infecção sistêmica. Segundo eles, o probiótico pode apresentar efetividade caso seja administrado após o desafio, entretanto, a resposta obtida provavelmente não será tão eficaz quanto se o pré-tratamento houvesse sido realizado, como observado neste trabalho.



Além disso, outros estudos têm mostrado que certas linhagens de BAL são capazes de reduzir a infecção sistêmica promovida pela administração oral de patógenos entéricos como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*, indicando que a proteção mediada por microrganismos probióticos contra infecção do TGI pode ser efetiva contra diferentes enteropatógenos (Zhou et al., 2000; Wei et al., 2010).

Em relação às contagens de *S. Typhimurium* nas fezes, assim como descrito na literatura, o enteropatógeno foi capaz de se estabilizar e manter um alto nível populacional nas fezes dos animais ( $10^{10}$  UFC/g), tanto tratados quanto não tratados com a bactéria do ácido láctico (Moura et al., 2001; Silva et al., 2004) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Níveis populacionais de *Salmonella Typhimurium* nas fezes dos camundongos gnotobióticos tratados ou não com *Weissella paramesenteroides* WpK4.

pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As contagens foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento por dia. Colunas seguidas por letras distintas em cada dia analisado diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Além disso, observou-se que os animais pré-tratados com WpK4 (pWpSt) apresentaram uma menor contagem quando comparados aos outros grupos no primeiro dia de infecção ( $P < 0,05$ ). Já o grupo inoculado simultaneamente com *S. Typhimurium* e WpK4 (tWpSt) promoveu uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) nos níveis populacionais de salmonela no último dia analisado.

### 5.3.3 Antagonismo *ex vivo*

A inibição do crescimento de bactérias patogênicas é uma das principais propriedades desejáveis para linhagens probióticas de bactérias do ácido lático, sendo a produção de substâncias antimicrobianas descritas como os componentes responsáveis pelo antagonismo e efeito protetor destes microrganismos (Vasconcelos, Nicoli e Nardi, 2003; Lin et al., 2007; Guo et al., 2010).

Na técnica de difusão em sobrecamada de ágar, utilizada neste trabalho, a linhagem analisada é separada dos microrganismos indicadores por uma camada de ágar semi-sólido que impede o contato direto entre elas. Desta forma, é possível avaliar a produção de substâncias extracelulares e difusíveis (ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio, etc.), uma vez que o composto gerado deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre as bactérias patogênicas (González et al., 1993 apud Pereira e Gómez, 2007). Os resultados referentes ao antagonismo *ex vivo* da linhagem WpK4 frente a diferentes patógenos são apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Atividade antagonista *ex vivo* de *Weissella paramesenteroides* WpK4 isolada de suíno contra diferentes bactérias reveladoras

Reveladora	Diâmetro do halo (mm)*
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	12,99 ± 1,33 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	10,46 ± 0,94 <sup>a,b</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25723	10,55 ± 0,22 <sup>a,b</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	9,08 ± 0,48 <sup>b</sup>
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ATCC 14028	11,03 ± 0,44 <sup>a,b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0 <sup>c</sup>

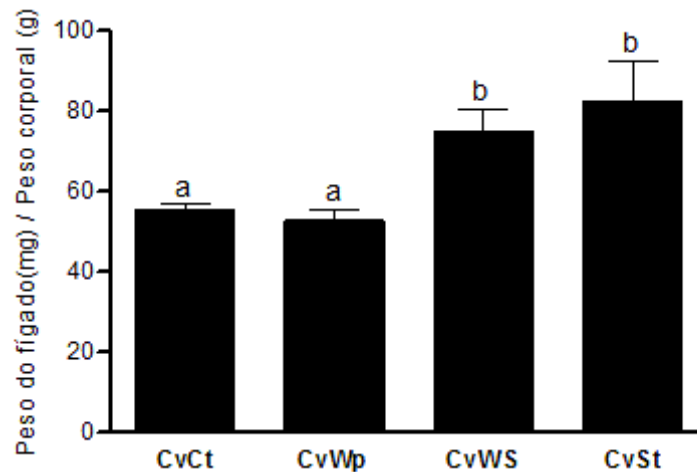
\*Resultados seguidos por letras distintas diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

WpK4 apresentou a formação de halos de inibição contra cinco dos seis patógenos analisados, sendo que a bactéria indicadora *S. aureus* foi a única que não apresentou inibição. Já o patógeno que demonstrou a maior sensibilidade foi *B. cereus* (13 mm).

As bactérias reveladoras *E. coli* e *S. enterica*, apontadas como patógenos de maior impacto sobre a suinocultura moderna, foram fortemente inibidas, como já demonstrado em experimentos utilizando estes microrganismos como indicadores tanto em testes *in vitro* como *ex vivo* (Vasconcelos, Nicoli e Nardi, 2003; Martins et al., 2006; Klose et al., 2010).

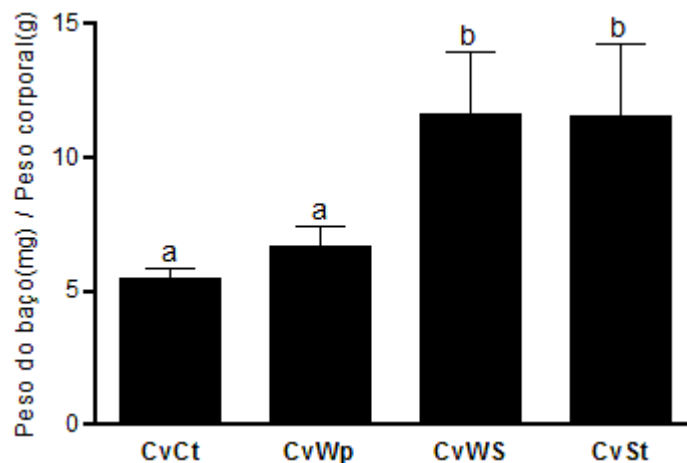
### 5.3.4 Análise histopatológica

A linhagem WpK4 mostrou-se segura em todos os parâmetros analisados. A administração de WpK4 não promoveu aumento do fígado e baço dos camundongos convencionais não desafiados, como demonstrado pelos índices hepático e esplênico, respectivamente (**Figuras 12 e 13**).



**Figura 12.** Índice hepático médio dos grupos experimental e controle de camundongos convencionais tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 após nove dias de infecção com *Salmonella* Typhimurium.

CvCt: controle negativo; CvWp: tratamento com WpK4; CvWS: tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Foram analisados oito animais por grupo de tratamento. Colunas seguidas por letras distintas em cada dia analisado diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 13.** Índice esplênico médio dos grupos experimental e controle de camundongos convencionais tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 após nove dias de infecção com *Salmonella* Typhimurium.

CvCt: controle negativo; CvWp: tratamento com WpK4; CvWS: tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Foram analisados oito animais por grupo de tratamento. Colunas seguidas por letras distintas em cada dia analisado diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

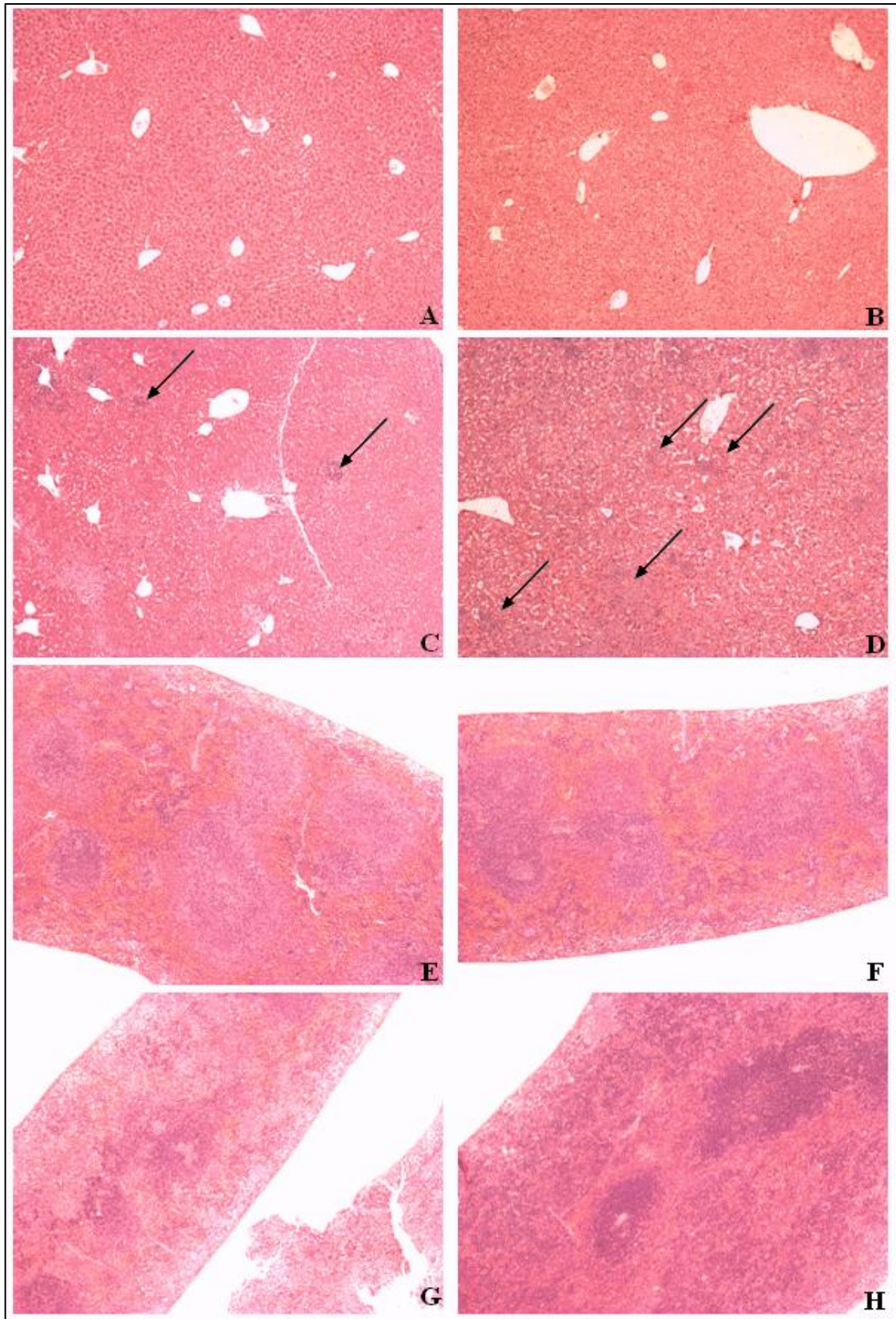
A hepatomegalia e esplenomegalia são frequentemente relatadas como indicativos indiretos de infecção bacteriana. Logo, como o tratamento com WpK4 não promoveu aumento destes índices, pode-se dizer que em relação a estes parâmetros a linhagem é segura. Já o aumento do fígado e do baço era esperado para animais infectados por *S. Typhimurium*, uma vez que este microrganismo é um parasita intracelular obrigatório que se desenvolve dentro de macrófagos localizados nestes órgãos (Raupach e Kaufmann, 2001; Grassl e Finlay, 2008).

A análise histológica nos animais convencionais demonstrou o fígado dos animais controle com arquitetura lobular preservada, cápsula íntegra e sem alterações de celularidade ou do aspecto dos hepatócitos (**Figura 14A**), semelhante ao observado nos camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 (**Figura 14B**).

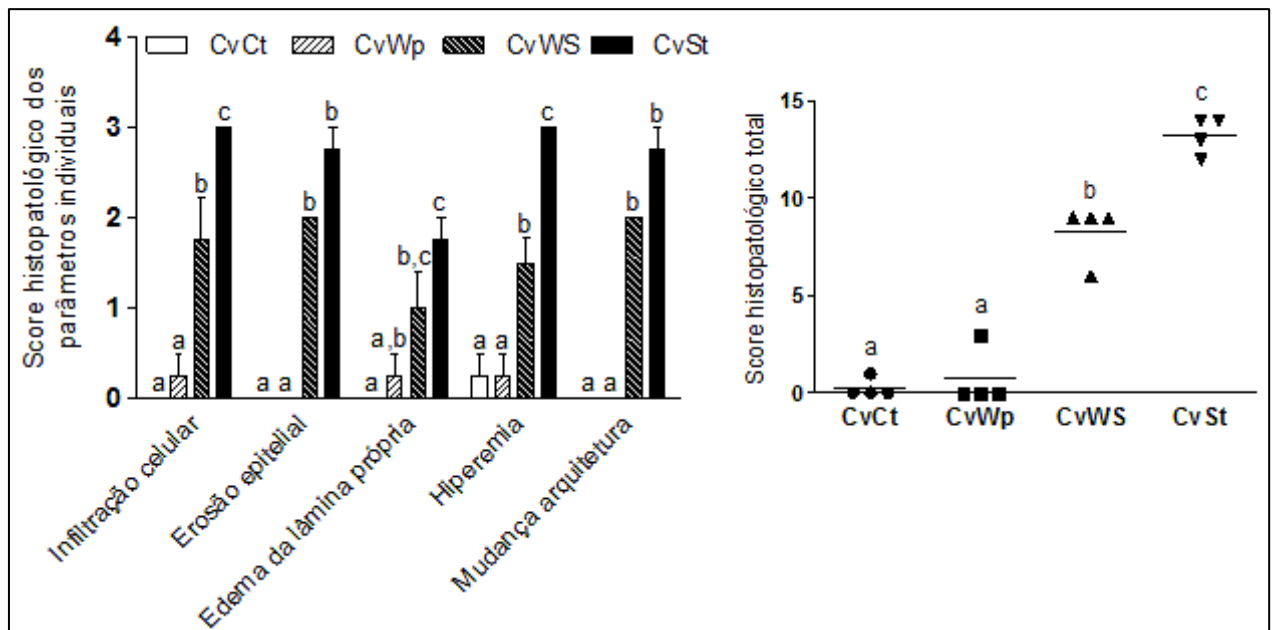
Em relação aos animais desafiados com *S. Typhimurium* e não tratados (CvSt), observou-se intenso infiltrado inflamatório com grande representatividade de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e macrófagos. Houve dilatação e congestão dos espaços sinusoidais que foram interrompidos por focos de infiltrados inflamatórios densos, associados à intensa alteração degenerativa dos hepatócitos, que se mostraram com vacuolização citoplasmática e grandes áreas de necrose hepatocitária (**Figura 14D**). Por outro lado, os camundongos desafiados e tratados com WpK4 (CvWS) apresentaram alterações degenerativas e necrose de grau mais discreto, apesar de não haver grande redução do padrão e intensidade do infiltrado inflamatório (**Figura 14C**).

No baço dos animais controle (CvCt), assim como o grupo tratado não desafiado (CvWp), não foram observadas alterações da arquitetura, celularidade ou do aspecto da polpa branca e vermelha (**Figura 14E e 14F**). Os baços dos animais infectados com *S. Typhimurium* (tratados ou não) não apresentaram diferenças significativas. Ambos exibiram discreta hiperplasia reacional com discreto aumento da área ocupada por folículos linfóides, não diferindo muito dos animais controle (**Figura 14G e 14H**).

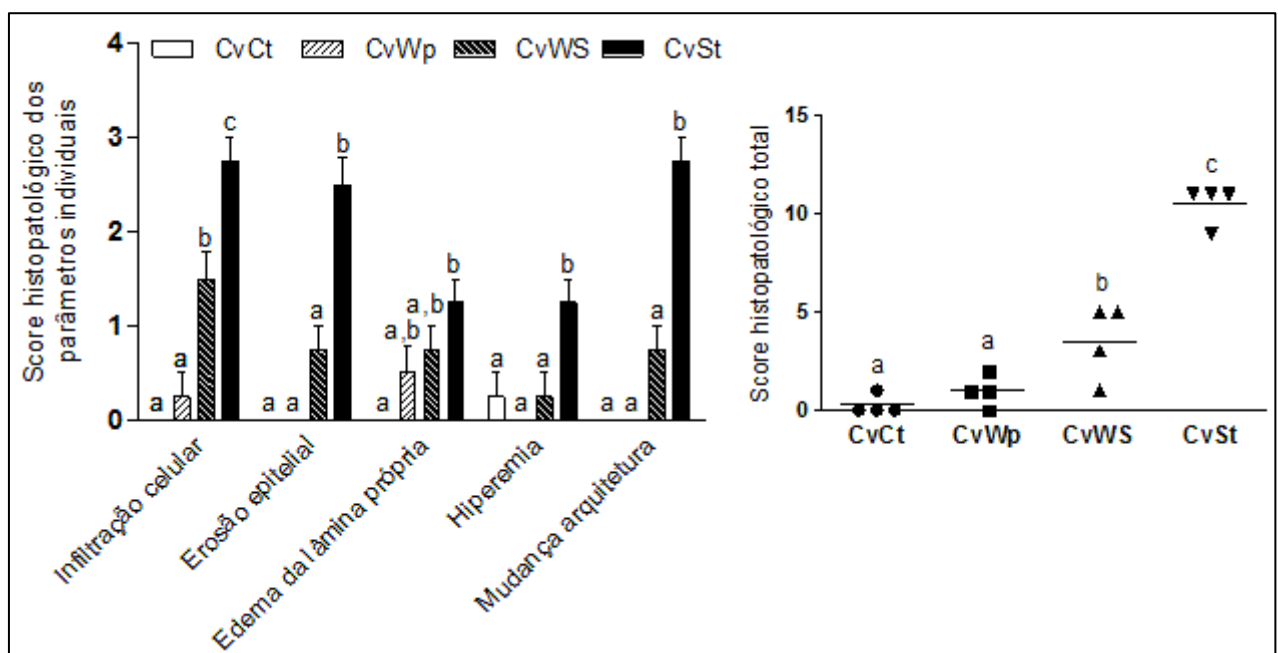
Em relação ao íleo e cólon, os resultados das análises histopatológicas nos camundongos convencionais estão apresentados nas **Figuras 15 e 16**, respectivamente, sendo os achados clínicos exemplificados na **Figura 17**.



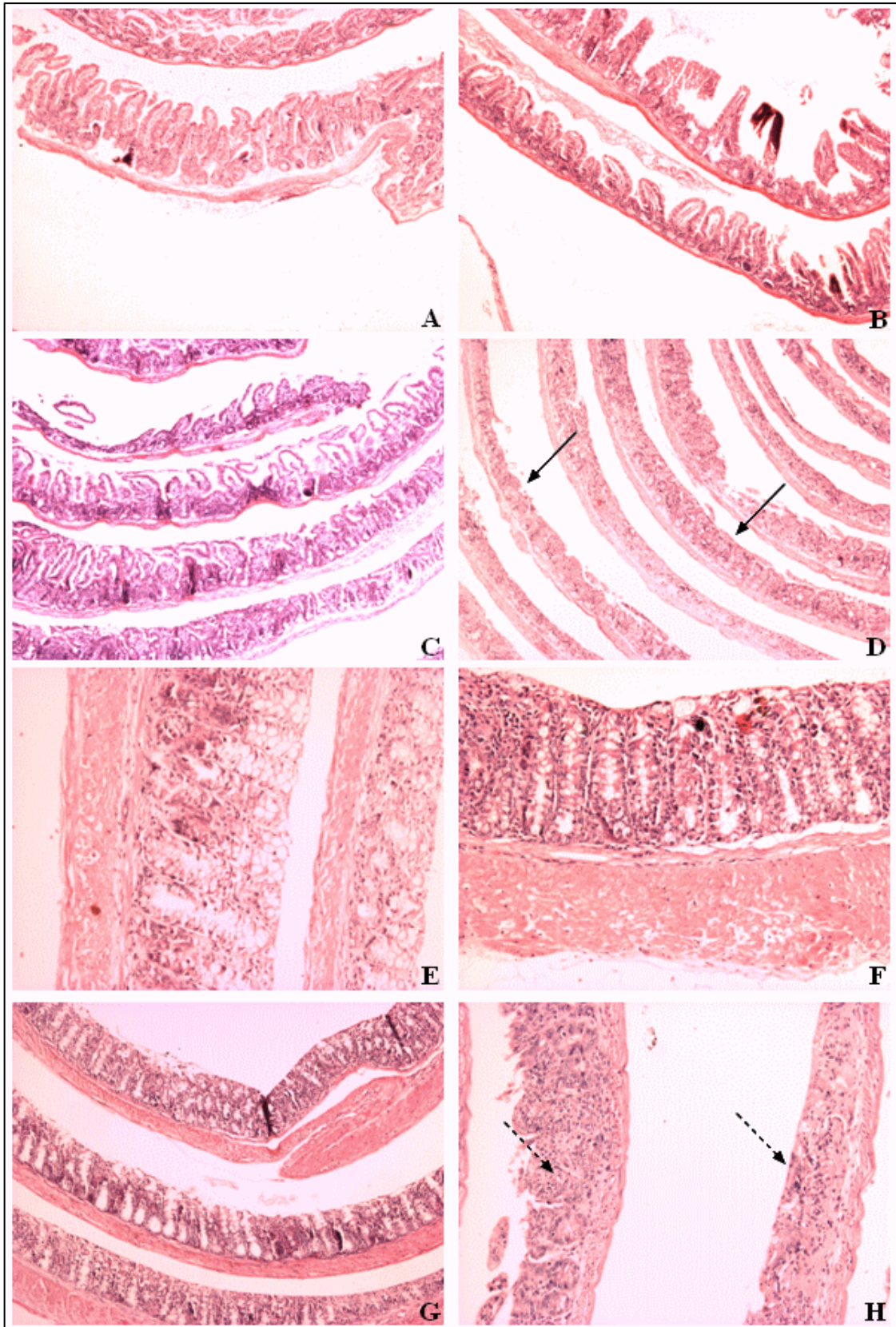
**Figura 14.** Aspectos histológicos do fígado e baço (4X) dos animais convencionais. Fígado: (A) grupo controle, (B) grupo tratado não desafiado, (C) grupo tratado e desafiado, (D) grupo desafiado não tratado. Baço: (E) grupo controle, (F) grupo tratado não desafiado, (G) grupo tratado e desafiado, (H) grupo desafiado não tratado. **Setas:** infiltrado inflamatório misto, difusos. Coloração com Hematoxilina-Eosina.



**Figura 15.** Score histopatológico total e por parâmetros no íleo de camundongos convencionais tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infectados ou não com *Salmonella* Typhimurium. CvCt: controle negativo; CvWp: tratamento com WpK4; CvWp: tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As análises foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento. Letras distintas diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 16.** Score histopatológico total e por parâmetros no cólon de camundongos convencionais tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infectados ou não com *Salmonella* Typhimurium. CvCt: controle negativo; CvWp: tratamento com WpK4; CvWp: tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; CvSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As análises foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento. Letras distintas diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



**Figura 17.** Aspectos histológicos do íleo (4X) e cólon (10X) de camundongos convencionais. **Íleo:** (A) grupo controle, (B) grupo tratado não desafiado, (C) grupo tratado e desafiado, (D) grupo desafiado não tratado. **Cólon:** (E) grupo controle, (F) grupo tratado não desafiado, (G) grupo tratado e desafiado, (H) grupo desafiado não tratado. **Setas contínuas:** perda de arquitetura da borda em escova com necrose de vilosidades. **Setas tracejadas:** perda de arquitetura com discreta atrofia glandular e presença de polimorfonucleares. Coloração com Hematoxilina-Eosina.

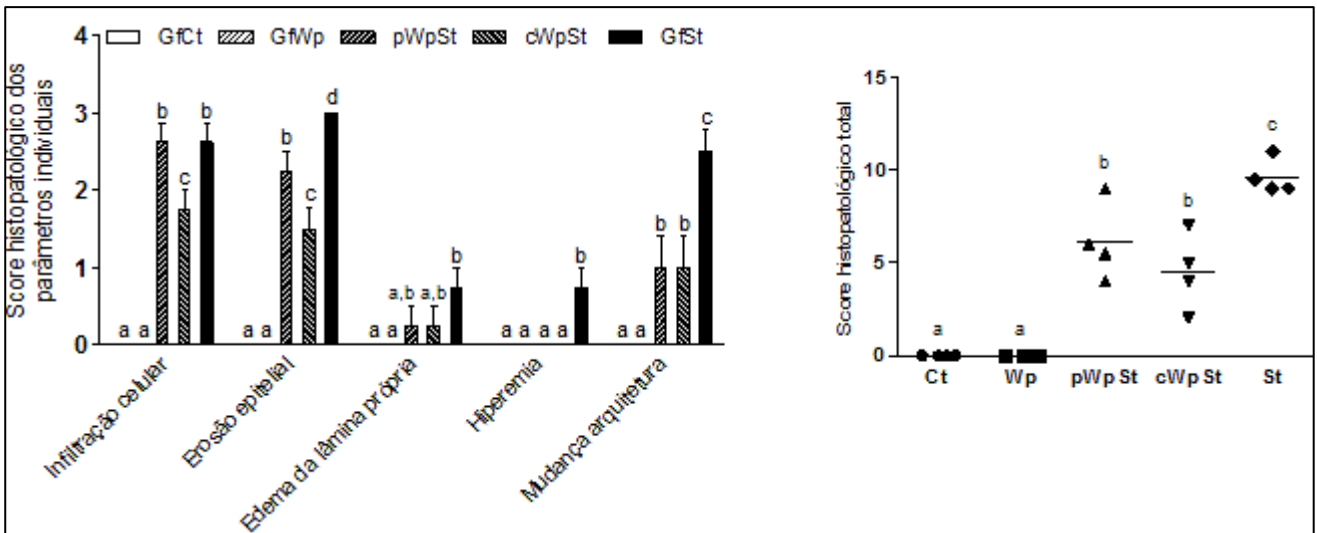
Nestes órgãos, os camundongos dos grupos tratados com WpK4 (CvWp) não apresentaram alterações importantes da arquitetura ou celularidade, mantendo a continuidade e preservação da mucosa ao longo de todo o comprimento dos segmentos examinados, não demonstrando diferença estatística em relação aos animais controle em quaisquer dos parâmetros avaliados.

Os animais desafiados (CvSt) demonstraram alterações mais proeminentes e difusas no íleo, apresentando mudanças vasculares como infiltração celular, erosão epitelial, edema da lâmina própria e hiperemia. Na mucosa do íleo, observaram-se variações importantes e segmentares da altura, apresentando áreas focais de perda de arquitetura e necrose de algumas vilosidades (**Figura 17D**). Já nos camundongos infectados que foram tratados com WpK4 (CvWS) a infiltração celular e a hiperemia mostraram-se menores (**Figura 17C**), promovendo uma proteção significativa, refletida pelo *score* histopatológico total (**Figura 15**).

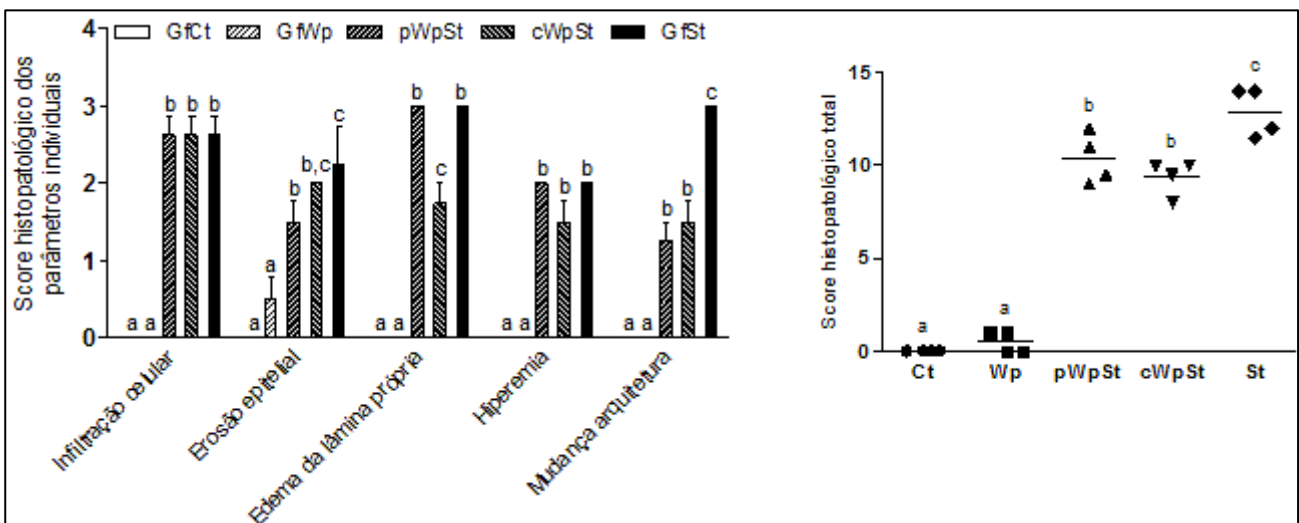
No cólon, as alterações derivadas do desafio com salmonela (CvSt) foram mais discretas e focais, apresentando infiltração celular, erosão epitelial e alterações arquiteturais com discreta atrofia glandular colônica (**Figura 17H**). Os animais do grupo desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com WpK4 (CvWS) demonstraram ampla recuperação da arquitetura do cólon, sendo o aspecto da mucosa muito próximo do normal em quase toda extensão dos segmentos onde haviam alterações induzidas pelo enteropatógeno. Além disso, observa-se ainda uma menor erosão epitelial e infiltrados inflamatórios mais discretos (**Figura 17G**). Estes resultados revelam uma proteção geral no cólon dos camundongos convencionais (**Figura 16**).

As mesmas análises histopatológicas realizadas no íleo e cólon dos camundongos convencionais foram realizadas para animais isentos de germe. Os gráficos dos *scores* por parâmetro individual e total dos diferentes órgãos são apresentados nas **Figuras 18 e 19**. Os resultados obtidos foram semelhantes aos visualizados nos animais CV, sendo que a administração de WpK4 mostrou-se segura, além de proporcionar proteção frente ao desafio experimental com *S. Typhimurium*. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de tratamento profilático (pWpSt) e terapêutico (tWpSt).





**Figura 18.** Score histopatológico total e por parâmetros no íleo de camundongos isentos de germes tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infectados ou não com *Salmonella* Typhimurium. GfCt: grupo controle; pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As análises foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento. Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



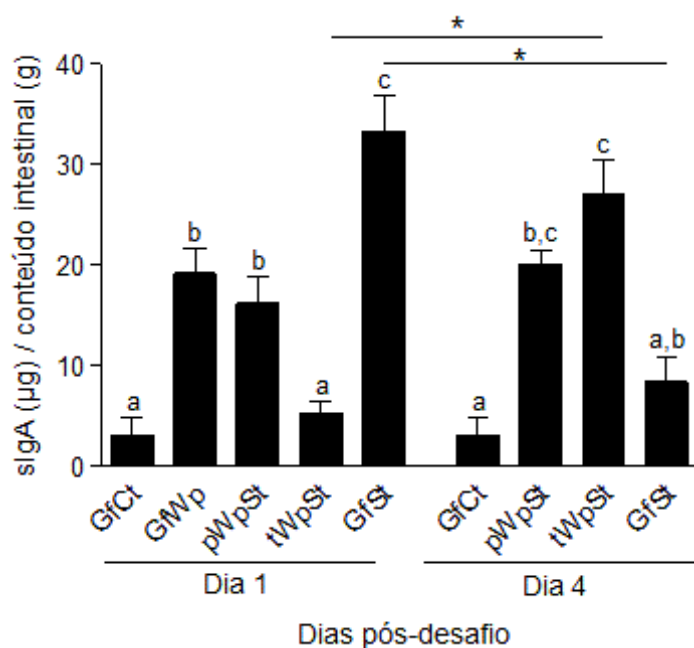
**Figura 19.** Score histopatológico total e por parâmetros no cólon de camundongos isentos de germes tratados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e infectados ou não com *Salmonella* Typhimurium. GfCt: grupo controle; pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As análises foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento. Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

### 5.3.5 Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) total

As imunoglobulinas A secretadas (sIgA), juntamente com as defesas inatas da mucosa, fornecem a primeira linha de defesa imunológica contra infecções por agentes patogênicos presentes no lúmen intestinal, sendo consideradas as principais moléculas efetoras associadas às superfícies mucosas (Martins et al., 2010). Assim, os títulos de sIgA total no conteúdo

intestinal foram determinados nos diferentes grupos experimentais de camundongos isentos de germe e convencionais.

A monoassociação de camundongos com WpK4 (GfWp) promoveu um aumento nos títulos de sIgA em relação ao grupo controle (GfCt). Após quatro dias de infecção, ambos os modelos, preventivo (pWpSt) e terapêutico (tWpSt), elevaram a produção desta imunoglobulina que apresentou-se significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) no grupo tWpSt, quando comparado ao controle da infecção (GfSt) (**Figura 20**).



**Figura 20.** Títulos de imunoglobulina secretória do tipo A (sIgA) total no conteúdo intestinal de camundongos monoassociados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 infectados com *Salmonella* Typhimurium.

GfCt: grupo controle; pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; GfSt: controle da infecção com *S. Typhimurium*. As análises foram realizadas em quatro animais por grupo de tratamento por dia. Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si em cada dia analisado ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. “\*” indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ) no grupo, entre os dias, pelo teste Tukey.

Pesquisas conduzidas com *L. casei* CRL 431, *L. acidophilus* CRL 730, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 423 e *Streptococcus thermophilus* CRL 412 demonstraram que as administrações orais destas linhagens em camundongos promovem o aumento de sIgA total no fluido intestinal e que este mecanismo poderia explicar a proteção observada nos animais infectados, uma vez que a imunoglobulina A neutralizaria o enteropatógeno e previniria a internalização (Castillo et al., 2012). Estes trabalhos corroboram os resultados encontrados para WpK4, pois os camundongos alimentados com a linhagem e desafiados com *S. Typhimurium* apresentaram taxa de translocação e índices hepático e esplênico estatisticamente menores que aquelas obtidas para os grupos não tratados.

Os níveis de sIgA em camundongos CV permaneceram iguais em todos os grupos estudados, não havendo diferença estatística ( $P>0,05$ ) para esta imunoglobulina (dados não mostrados).

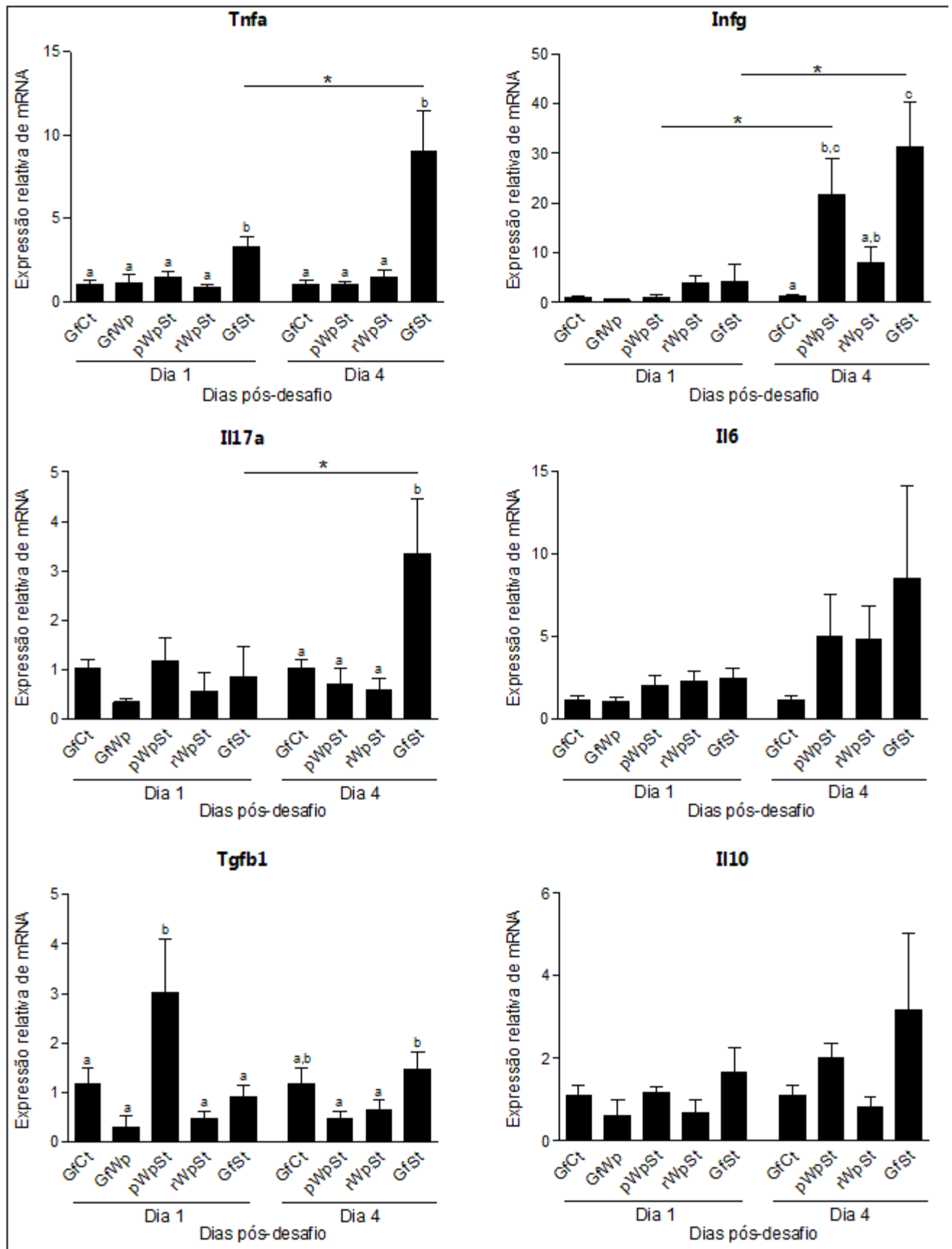
### 5.3.6 Expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas

Durante a infecção de camundongos com *S. Typhimurium*, as primeiras células encontradas pelo enteropatógeno são as células epiteliais intestinais, células dendríticas (DCs) e macrófagos (Coburn, Grassl e Finlay, 2007). A interação com essas células induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como Tnfa e Ifng, levando a um influxo massivo de neutrófilos, macrófagos e DC imaturas, os quais são necessários para a supressão do crescimento bacteriano em infecções sub-letais por salmonela (Mastroeni e Grant, 2011).

Neste estudo, o modelo do desafio experimental de camundongos isentos de germe com *S. Typhimurium* desenvolveu-se conforme o esperado, produzindo um aumento estatisticamente significativo ( $P<0,05$ ) dos mediadores pró-inflamatórios Tnfa, Ifng e Il17a do primeiro para o quarto dia de infecção (**Figura 21**). Tnfa e Ifng são importantes para o processo inflamatório, tendo papel central como mediadores na ativação e recrutamento de neutrófilos para a região afetada, enquanto a indução moderada de Il17a é crítica para o controle da invasão local pela salmonela (Dougan et al., 2011). Embora essenciais, uma resposta exarcebada destas citocinas acaba produzindo uma disfunção da barreira epitelial do hospedeiro, contribuindo para a entrada e colonização da bactéria patogênica (Castillo et al., 2012).

A administração de WpK4 nos camundongos desafiados (pWpSt e tWpSt) foi capaz de manter a secreção das citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal em níveis similares aqueles observados no grupo controle (GfCt) no quarto dia de infecção. Além disso, o tratamento com WpK4 induziu a produção de Tgfb1, uma citocina que estimula a diferenciação de DCs imaturas em DCs regulatórias, as quais estão envolvidas no processo de tolerância oral requerido para a manutenção da estabilidade gastrointestinal (Delcenserie et al., 2008; Viasu-Bolocan, Popescu e Bică, 2013).

Esta modulação da resposta imune exibida pela alimentação dos animais com WpK4 provavelmente está relacionada às lesões menos graves e ao menor grau de inflamação observados na análise histopatológica do colon e íleo dos camundongos infectados e tratados. Para as citocinas Il6 e Il10 não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais.



**Figura 21.** Expressão relativa das citocinas Tnfa, Infg, Il17a, Il6, Tgfb1 e Il10 no intestino delgado de camundongos monoassociados com *Weissella paramesenteroides* WpK4 infectados com *Salmonella* Typhimurium.

GfCt: grupo controle; pWpSt: pré-tratamento com WpK4 e infecção com *S. Typhimurium*; tWpSt: inóculo simultâneo de WpK4 e *S. Typhimurium*; Gfst: controle da infecção com *S. Typhimurium*. Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si em cada dia analisado ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

## 6 CONCLUSÃO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, juntamente com a Organização Mundial da Saúde, preconizam que um pré-requisito para que uma linhagem bacteriana seja chamada de “probiótico” é que sua segurança e funcionalidade sejam avaliadas de acordo com o “Guia para Avaliação de Probiótico em Alimentos” (*Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, FAO/WHO, 2002). Resumidamente, este documento descreve que é necessário: (1) conhecer o gênero e a espécie do microrganismo; (2) realizar testes *in vitro* para triar o potencial probiótico da linhagem; (3) que a linhagem não seja patogênica; (4) utilizar testes *in vivo* para fornecer evidências e provar os efeitos *in vitro*, assim como determinar os mecanismos de ação.

*Weissella paramesenteroides* WpK4 demonstrou, por meio dos testes *in vitro* e *in vivo*, que é capaz de colonizar animais monoassociados, reduzir a translocação e atenuar as lesões causadas pela infecção com *Salmonella* Typhimurium durante um desafio experimental, além de suprimir uma resposta inflamatória excessiva, levando a uma recuperação e manutenção da homeostase da mucosa intestinal. Ainda, não apresenta resistência contra antimicrobianos que não sejam intrínsecos de bactérias do ácido lático e produziu substâncias desejáveis para um candidato probiótico como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e EPS. Portanto, a linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 pode ser considerada um probiótico e, posteriormente, pode ser testada em suínos como uma alternativa profilática ou terapêutica para o controle de infecções por enteropatógenos.

## 7 REFERÊNCIAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtiva e Exportadora de Carne Suína. **Estatística**. Disponível em: <[www.abipecs.com.br](http://www.abipecs.com.br)>. Acesso em: 12 de jan. de 2015.

ALVIM, L. B. **Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

AMARI, M.; LAGUERRE, S.; VUILLEMIN, M.; ROBERT, H.; LOUX, V.; KLOPP, C.; MOREL, S.; GABRIEL, B.; REMAUD-SIMÉON, M.; GABRIEL, V.; MOULIS, C.; FONTAGNÉ-FAUCHERET, C. Genome sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, isolated from a wheat sourdough. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 1608-1609, 2012.

AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food microbiology**, v. 24, p. 559-570, 2007.

ANGULO, F. JOHNSON, K. R.; TAUXE, R. V.; COHEN, M. L. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications of the use of fluoroquinolones in food animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, p. 77-83, 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos**: alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude>>. Acesso em: 20 de jan. de 2015.

AGHEYISI, R. **The probiotics market: Ingredients, supplements, foods**: Report code FOD035B, BCC Research. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/probiotics-market-ingredients-foods-fod035c.html>>. Acesso em: 20 de jan. de 2015.

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

ASHIDA, H.; OGAWA M.; KIM, M.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 36–45, 2011.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A., 2007. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 56-66, 2011.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L.; BAMBIRRA, L. H. S.; ABURJAILE, F. F. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, p. 1-10, 2011.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 279-299, 2000.

BAUER, E.; WILLIAMS, B. A.; SMIDT, H.; MOSENTHIN, R.; VERSTEGEN, M. W. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, p. 1-17, 2006.

BELLETTI, N.; GATTI, M.; BOTTARI, B.; NEVIANI, E.; TABANELLI, G.; GARDINI, F. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two italian hard cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2162-2169, 2009.

BERENDSEN, B.; STOLKER, L.; DE JONG, J.; NIELEN, M.; TSERENDORJ, E.; SODNOMDARJAA, R.; CANNAVAN, A.; ELLIOTT, C. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1955-1963, 2010.

BERGER, B.; PRIDMORE, R.D.; BARRETTO, C.; DELMAS-JULIEN, F.; SCHREIBER, K.; ARIGONI, F.; BRÜSSOW, H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 1311-21, 2007.

BESSA, M. C.; COSTA, M. CARDOSO. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80-84, 2004.

BJORKROTH, K. J.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 141-148, 2002.

BRANCO, K. M.; NARDI, R. M.; MOREIRA, J. L.; NUNES, A. C.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R.; CARVALHO, M. A. Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, p. 338-344, 2010.

BYWATER, R. J. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. **Poultry Science**, v. 84, p. 644-648, 2005.

CALL, D. R.; DAVIS, M. A.; SAWANT, A. A. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, p. 159-167, 2008.

CANIBE, N.; JENSEN, B. B. Influence of maternal faecal microflora on colonization of the newborn piglets. In: PROCEEDINGS OF XI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY OF PIGS, 11, 2009, Costa Daurada. **Book of Abstracts...** Montbrió del Camp: Engelsk, 2009, p. 59-60.

CARDOZO, E. C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, p. 2466 - 2471, 2007.

CASTILLO, N. A.; LEBLANC, A. M.; GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis Immune mechanisms involved. **Food Research International**, v. 45, p. 831–841, 2012.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C.; CORNET, M.; CRUTZ-LE, A. M.; DUDEZ, A. M.; MARTIN, V.; BEAUFILS, S.; DARBON-RONGÈRE, E.; BOSSY, R.; LOUX, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1527-1533, 2005.

CHARTERIS, A.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1636-1643, 1998.

CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology, Reading**, v. 156, p. 420-430, 2010.

CHIQUIERI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L.; CARVALHO, E. C. Q.; COSTA, A. P. D. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 97-104, 2007.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de Laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 11-23, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo**. v. 25, p. 1-117, 2005.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Princípios Éticos**. Disponível em: <[http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)>. Acesso em 12 de fev. 2015.

COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.112-118, 2007.

COLLINS, M. D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 595-603, 1993.

COSTA, L. B.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 589-595, 2007.

COSTA, G. N.; MIGLIORANZA, L. H. Probiotics: the effects on human and current prospects. In: RIGOBELLO, E. C. (Ed). **Probiotics**. 3 Ed. Croácia: InTech, 2012. p. 367-384.



COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SALZANO, G.; SORRENTINO, E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait**, v.85, p. 193-204, 2005.

CRISSIUMA, A. L.; ALMEIDA, E. C. P. Experimentação e Bem Estar Animal-Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 1, p. 1-10, 2006.

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

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 1-11, 2003.

DANIELSEN, M.; HORNSHØJ, H.; SIGGERS, R. H.; JENSEN, B. B.; VAN KESSEL, A. G.; BENDIXEN E. Effects of bacterial colonization on the porcine intestinal proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 2596-2604, 2007.

DE KEERSMAECKER, S. C. J.; VERHOEVEN, T. L.; DESAIR, J.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; NAGY, I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 89 - 96, 2006.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current issues in molecular biology**, v. 10, p. 37-54, 2008.

DESLAND, F.; CHRISTIANSEN, L.; RAHMAN, M.; KHAN, K.; POTTS, A.; CLAUDIO, F. Commonly asked question about probiotics and the potential benefits for your health. **Institute of food and agricultural sciences (IFAS extension)**, p. 1-7, 2012.

DINIS, J. V. B. M. F. **Estratégias nutricionais na prevenção de doenças digestivas dos suínos**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

DOUGAN, G.; JOHN, V.; PALMER, S.; MASTROENI, P. Immunity to salmonellosis. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 196-210, 2011.

EMBRAPA-CNPSA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves. **Publicações**: sistema de Produção de Suínos. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/suinos/index.html>>. Acesso em: 12 de jan. de 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. **The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007**. EFSA Journal, v. 8, p. 1-1309, 2010.

ESPECHE, M. C.; OTERO, M. C.; SESMA, F.; NADER-MACIAS, M. E. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 346-357, 2009.

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

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Animal Feed Impact on Food Safety**, v. 1, p. 1-54, 2007.

FAMULARO, G.; DE SIMONE, C.; MATTEUZZI, D.; PIROVANO, F.; Tradicional and high potency probiotic preparations for oral bacteriotherapy. **BioDrugs**, v. 12, p. 455-470, 1999.

FERREIRA, A. B. Estudo da Resistência a Antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 Submetido a Condições de Estresse. 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FIGUEIREDO, F. V. **Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de dois estuários do estado do ceará-Brasil**. 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

FLORESTA, F. A. **Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20: filogenia e presença de sequência de inserção putativa**. 2003. 54 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

FUKAO, M.; YAJIMA, N. Assessment of antibiotic resistance in probiotic lactobacilli. In: PANA, M. (Ed). **Antibiotic Resistant Bacteria: a Continuous Challenge in the New Millennium**. 6 Ed. Croácia: InTech, 2012. p. 503-512.

FUSCO, V.; QUERO, G. M.; STEA, G.; MOREA, M.; VISCONTI, A. Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker. **Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 1-7, 2011.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; SERPE, L.; FIORI, M.; CIVITAREALE, C.; STACCHINI, P. Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1017-1024, 2010.

GARCIA, G. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MEDEIROS, A. A.; POIATTI, M. L.; VALIN, A. R.; FERREIRA H.; CHIODA, M. C.; COAN, T. P.; PIGATTO, R. M.; PIGATTO, C. P.; TROVÓ, K. V. P. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 263 - 268, 2006.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 503-514, 2010.

GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, p. 741-757, 2007.

GILL, S. H.; LIN, H.; RUTHERFURD, K. J. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immune-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, p. 97-104, 2001.

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

GOLDIN, B. R. Probiotics and Health: From History to Future. In: KNEIFEL, W., SALMINEN, S. **Probiotics and Health Claims**. Ames: Wiley-Blackwell, 2011, v. 1, p. 1-16.

GORTON, S.J.; KLIEBENSTEIN, J.B.; BERAN, G.W. **Economic Analysis of Salmonella Impacts on Swine Herds**. Iowa State University. Disponível em: <<http://www.ipic.iastate.edu/reports/99swinereports/asl-1702.pdf>>. Acesso em: 10 de fev. 2015.

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

GRIFFITH, R. W.; SCHWARTZ, K. J.; MEYERHOLZ, D. K. *Salmonella*. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D; J. **Diseases of Swine**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006, v. 9, p. 739-751.

GUEDES NETO, L.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

GUIBOURDENCHE, M. ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. D.; WEILL, F-X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

GUO, X-H.; KIM, J-M; NAM, H-M.; PARK, S-Y.; KIM, J-M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, v. 16, p. 321 - 326, 2010.

HALD, T.; WEGENER, H. C. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, v. 3, 1999, Washington. **Proceedings...** Washington, 1999, p. 200 – 205.

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

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109 - 116, 2002.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**. v. 45, p. 819-830, 2012.

INOUE, R.; TSUKAHARA, T.; NAKANISHI, N.; USHIDA, K. Development of the intestinal microbiota in the piglet. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, p. 257-265, 2005.

JAMUNA, M.; BABUSHA, S. T.; JEEVARATNAM, K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. **Food Microbiology**, v. 22, p. 449-454, 2005.

JANG, J.; KIM, B.; LEE, J.; KIM, J.; JEONG, G.; HAN, H. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 29 - 34, 2002.

JIN, L.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 619 - 624, 2000.

JUNIOR, A. M. P.; BRUNO, D. G.; TIBA, S.; FUJJI, R. Uso de aditivos antimicrobianos na alimentação animal: controle, restrições e tendências In: CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE AVICULTURA, SUINOCULTURA E LATICÍNIOS, 1, 2008, São Bento. **Palestra...** São Bento: Nutron, 2010, p. 1-7.

KANG, M-S.; KIM, Y-S.; LEE, H-C.; LIM, H-S.; OH, J-S. Comparison of temperature and additives affecting the stability the probiotic *Weissella cibaria*. **Chonnam Medical Journal**. v. 48, p. 159-163, 2012.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1 - 9, 2002.

KENNY, M.; SMIDT, H.; MENGHERI, E.; MILLER, B. Probiotics - do they have a role in the pig industry? **Animal**, v. 5, p. 462 – 470, 2011.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; MÜLLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 900-912, 2007.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Food Microbiology**, v. 41, p.103 - 125, 1998.

KLOSE, V.; BAYER, K.; BRUCKBECK, R.; SCHATZMAYR, G.; LOIBNER, A-P. *In vitro* antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 515-521, 2010.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 329 - 347, 2008.

KOS, B.; SUSKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 981 - 987, 2003.

KONSTANTINOV, S. R.; FAVIER, C. F.; ZHU, W. Y.; WILLIAMS, B. A.; KLUSS, J.; SOUFFRANT, W. B.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L.; SMIDT, H. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. **Animal Research**, v. 53, p. 317-324, 2004.

KUWANO, K.; TANAKA, N.; SHIMIZU, T.; NAGATOSHI, K.; NOU, S.; SONOMOTO, K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 396-402, 2005.

LEBLANC, A. M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 223-231, 2010.

LEE, C. M.; SIEO, C. C.; ABDULLAH, N.; HO, Y. W. Estimation of 16S rRNA gene copy number in several probiotic *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 136-141, 2008.

LEE, C. M.; SIEO, C. C.; CHEAH, Y-K.; ABDULLAH, N.; HO, Y. W. Discrimination of probiotic *Lactobacillus* strains for poultry by repetitive sequenced-based PCR fingerprinting. **Journal of the Science of food and Agricultural**, v. 10, p 1-7, 2011.

LEE, Y. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p.157 - 162, 2005.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, p. 728-764, 2008.

LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171-184, 2010.

LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M.; MØLLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 673-690, 2002.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIN, W-H.; YU, B.; JANG, S-H.; TSEN, H-Y. Antimicrobial susceptibility different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe**, v. 13, p. 107-113, 2007.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 23, p. 1-8, 2001.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação:** sislegis. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 15 de jan. de 2015a.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Divisão de epidemiologia: Informes Semestrais e Anuais OIE - Brasil 2005 a 2011.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal/informacoes-epidemiologicas>>. Acesso em: 15 de jan. de 2015b.

MARTÍN, R.; SUÁREZ, J. E. Biosynthesis and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by vaginal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 400-405, 2010.

MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, N. J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5, p. 53-59, 2006.

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*. **Archive Microbiology**, p. 1-9, 2010.

MARTINS, F. S.; RODRIGUES, A. C. P.; TIAGO, F. C. P.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; ARANTES, R. M. E.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 352-359, 2007.

MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. H.; ARANTES, R. M.; 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.

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.

MASTROENI, P; GRANT, A.J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. 1-15, 2011.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 281-295, 2005.

MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, p. 231-241, 2012.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1687-1693, 2008.

METCHNIKOFF, E. **Prolongation of Life: Optimistic Studies**. New York: Putnam's Sons, 1908.

MIRLOHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; DOKHANI, S.; SHEIKH, M.; ABGHARY, A. INVESTIGATION of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 233-240, 2009.

MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F.; 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 Microbiology**, v. 5, p. 1-9, 2005.

MOREIRA, J. L. S. **Isolamento, Identificação Molecular e Seleção de Linhagens Probióticas de Lactobacilos Aviários para uso como Veículo de uma Vacina Oral Contra Eimeriose**. 2005. 69 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MORELLI, L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 1, p. 59-67, 2000.

MOTA, R. M.; MOREIRA, J. L. S.; SOUZA, M. R.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 1-11, 2006.

MOURA, L. N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 66-69, 2001.

MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

NAM, H.; HA, M.; BAE, O.; LEE, Y. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4642-4645, 2002.

O'BRIEN, A. D. Innate resistance of mice to *Salmonella typhi* infection. **Infection and Immunity**, v. 38, p. 948–952, 1982.

OECD-FAO. Organization for Economic Co-Operation and Development. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2009-2018**. p. 1 - 274, 2009.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 57 - 62, 2010.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE ALIMENTOS FUNCIONAIS contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2670 – 2679, 2008.

OUOBA, L. I. I; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 217-224, 2008.

PAL, A.; RAMANA, K. Isolation and preliminary characterization of a non bacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 499-503, 2009.

PANCHENIAK, E. F. R. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PEREIRA, V. G; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 229-240, 2007.

PETRI, D.; HILL, J. E.; VAN KESSEL, A. G. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. **Livestock Science**, v. 133, p. 107-109, 2010.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C.; MIGLINO, L. B.; CARON, L. F.; BEIRÃO, B. C. B.; SILVA, A.V. F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p. 27-36. 2012.

PRIDMORE, R. D.; PITTET, A-C.; PRAPLAN, F.; CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, p. 210-215, 2008.



RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3260-3264, 2003.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1261-1269, 2001.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 255-278, 1998.

RIPAMONTI, B.; REBUCCI, R.; STELLA, S.; BALDI, A.; SAVOINI, G.; BERSANI, C.; BERTASI, B.; PANTEGHINI, C.; CANTONI, C.; ROMAGNA, E. Screening and selection of lactic acid bacteria from calves for designing a species-specific probiotic supplement. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 350 - 352, 2007.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J. A.; GARABAL, J. I. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria *and Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 284-293, 2009.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396-402, 2000.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; NEVADO, F. P.; CÓRDOBA, M. G. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p. 715-721, 2008.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. PROBIOTIC bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

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

SANDES, S. H. C. **Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa na pecuária bovina.** 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

SANDERS, M. E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures - significance to fluid milk-products containing cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1819-1828, 1993.

SANTOS, B. F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002, p.139-42.

SANTOS, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; GOMES, P. C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1395-1400, 2003.

SANTOS, R. L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R. M.; KINGSLEY, R. A.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infection**, v. 3, p.1335–1344, 2001.

SCHLEY, P.D.; FIELD C.J. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.87, p.221-230, 2002.

SERNA-COCK, L.; ENRÍQUEZ-VALENCIA, C. E.; JIMÉNEZ-OBANDO, E. M.; CAMPOS-GAONA, R. Effects of fermentation substrates and conservation methods on the viability and antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p 1-8, 2012a.

SERNA-COCK, L.; RUBIANO-DUQUE, L. F.; LOAIZA-CASTILLO, N. B. *Weissella confusa* como un agente bioprotector en la inocuidad alimentaria contra patógenos Gram-negativo. **Alimentos Hoy**. v. 21, p. 1-13, 2012b.

SERNA-COCK, L.; VALENCIA-HERNANDEZ, L. J.; CAMPOS-GAONA, R. Kinetics of fermentation and antimicrobial action of *Weissella confusa* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Revista Facultad de Ingeniería**, v. 55, p. 55-65, 2010.

SHI, H. N.; WALKER, A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 493-500, 2004.

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, A. M.; BARBOSA, F. H.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M.; NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 29-37, 2004.

SILVA, C. A.; BRIDI, A. M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H.; SILVA, C. R. B.; MENEGUCCI, C. G.; CARVALHO, B. B. Uso de probiótico e de antibióticos na alimentação de leitões em fase de creche. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 739 - 746, 2007.

SINGHA, T. K. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. **Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 276-281, 2012.

SIRIRAT, R.; THOSAPORN, R.; SOMKIAT, P. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. **Acquaculture Research**, v. 39, p. 134-143, 2008.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORAES, N. **Clínica e Patologia Suína**, Goiânia: Pfizer, 1999.

SOTO, F. R. M.; VUADEN, E. R.; BENITES, N. R.; AZEVDO, S. R.; PINHEIRO, S. R. BEMARDI, F.; COELHO, C. P.; VASCONCELLOS, S. A. Implantação da homeopatia e avaliação dos índices de produtividade de uma granja comercial de suínos comparado com a alopatia na fase de recria e terminação. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 14, p. 107-114, 2007.

SPENCER, R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 7, p. 215 - 220, 1994.

SRIONNUAL, S.; YANAGIDA, F.; LIN, L. H.; HSIAO, K. N.; CHEN, Y. S. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaa-som, a fermented fish product from Thailand. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2247-2250, 2007.

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

SUTHERLAND, I. W. A sticky business. Microbial exopolysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, v. 29, p. 70-71, 2002.

TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4264 - 4267, 1999.

TAJABADI, N.; MARDAN, M.; MUSTAFA, S.; FEIZABADI, F.; NATEGHI, L.; RASTI, B.; MANAP, M. Y. A. *Weissella* sp. Taj-Apis, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. **Journal of Food, Agriculture and Environment**. v. 10, p.263-267, 2012.

TEIXEIRA, G. S.; SOARES-BRANDÃO, K. L.; BRANCO, K. M., SAMPAIO, J. L.; NARDI, R. M.; MENDONÇA, M.; ALMEIDA, R. B.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; NICOLI, J. R. Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 891-897, 2010.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 1-10, 2002.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek Journal**, v.76, p.115-137, 1999.

THALLINGER, B.; PRASETYO, E. N.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, v. 8, p. 97-109, 2013.

TIMMERMAN, H. M.; KONING, C. J. M.; MULDER, L. ROMBOOTS, F. M.; BEYNEN, A. C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics – a comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 219-233, 2004.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 209-221, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 166-172, 2007.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Londres, v. 8, p. 692-700, 2003.

TURNER, J. L.; DRITZ, P. S. S.; MINTON, J. E. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine Diets. **The Professional Animal Scientist**, v. 17, p. 21 -226, 2001.

USDA, United States Department of Agriculture, **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. p. 1 – 15, 2015.

VALERIO, F.; FAVILLA, M.; DE BELLIS, P.; SISTO, A.; DE CANDIA, S.; LAVERMICOCCA, P. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 438-448, 2009.

VALLOR, A. C.; ANTONIO, M. A.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1431-1436, 2001.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, M. R. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos, **Ciência Rural**, v. 39, p.2233-2242, 2009.

VASCONCELOS, A. L. S.; NICOLI, J. R.; NARDI, R. M. D. Antagonistic and protective effects against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by *Lactobacillus murinus* in the digestive tract of gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 21-24, 2003.

VIASU-BOLOCAN, L.; POPESCU, F.; BICĂ, C. Probiotics and their Immunomodulatory Potential. **Current Health Sciences Journal**, v. 39, p. 204-209, 2013.

VIEGAS, R. P. **Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, p. 2535-2554, 2009.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, p. 672-678, 2010.

WALL, S. K.; ZHANG, J.; ROSTAGNO, M. H.; EBNER, P. D. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 48-53, 2010.

WEI, C.; LIU, J. K.; HOU, X. L.; YU, L. Y.; LEE, J. S.; KIM, C. J. Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99. **Vaccine**, v. 28, p. 4113-4118, 2010.

WEISS, L. H. N.; NONIG, R. B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 104-108, 2002.

WELMAN, A. D.; MADDOX, L. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 269-274, 2003.

WILLING, B. P.; VAN KESSEL, A. G. Enterocyte proliferation and apoptosis in the distal small intestine is influenced by the composition of colonising commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 3256-66, 2007.

WRIGHT, G. D. Mechanism of resistance to antibiotics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 563-569, 2003.

ZARDO, A. O.; LIMA, G. J. M. M. Alimentos para suínos. **BIPERS**, v. 8, p. 1-61, 1999.

ZHOU, J. S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 87-96, 2000.

## APÊNDICES

Apêndice A. Síntese da caracterização probiótica *in vitro* das linhagens de BAL isoladas de suínos

Linhagem de BAL	Características Fisiológicas <sup>1</sup>					Antagonismo <sup>2a</sup>						Antibiograma <sup>3b</sup>							
	SGA <sup>a</sup>	SB <sup>a</sup>	MATS <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	EPS <sup>b</sup>	Ef	Lm	Sa	Pa	Ec	Se	Ac	Ap	Er	Ct	Ch	Ox	Pe	Va
<i>W. paramesenteroides</i> WpK4	0%	27.5%	72.9%	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	S	M	S	R	M	R
<i>L. plantarum</i> LpG1	0%	28.3%	44.6%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> LaH4	7.4%	29.3%	75.3%	+	-	+	-	+	+	+	+	R	S	R	S	S	R	M	R
<i>L. paraplantarum</i> LprG	30%	57.1%	48.7%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	M	R
<i>W. cibaria</i> WcL	27.8%	100%	43%	+	+	+	+	+	+	+	+	M	S	S	M	S	R	R	R
<i>W. cibaria</i> WcM	56.8%	33.6%	43.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	R	S	S	M	S	R	R	R
<i>L. brevis</i> LbS	72.8%	36.7%	72.6%	+	-	+	+	+	+	+	+	M	S	S	S	S	R	M	R
<i>L. reuteri</i> LreZ	86.1%	59.1%	54.4%	+	-	+	+	+	+	+	+	S	S	S	S	S	R	R	R
<i>L. brevis</i> LbW	92.4%	47.8%	98.6%	+	-	+	+	+	+	+	+	S	S	S	S	S	R	S	R
<i>W. cibaria</i> WcN	92.8%	94.4%	57.9%	+	+	+	-	+	+	+	+	R	S	S	M	S	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> LaL4	93.7%	66.4%	85.4%	-	+	+	+	+	+	+	+	R	S	S	M	S	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpI	96.5%	93%	63.2%	+	-	+	-	+	+	+	+								ND
<i>W. paramesenteroides</i> WpJ4	99.1%	33.4%	51.8%	+	-	+	+	+	-	+	+	R	S	R	M	S	R	R	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpD	99.4%	65.4%	62.5%	-	+	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	R	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpC	99.6%	63.3%	45.6%	-	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	S	R
<i>L. rossiae</i> LrA1	100%	15.6%	71.2%	-	-	-	+	+	+	+	+								ND
<i>L. plantarum</i> LpG4	100%	45.9%	47.4%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	S	R
<i>L. plantarum</i> LpR	100%	50%	45.9%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	M	S	M	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpF	100%	54.9%	45.6%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpH1	100%	64.7%	49.6%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	R	M	S	R	R	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpA	100%	68.2%	46.3%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpB	100%	71.8%	45.5%	-	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpE	100%	73%	47.3%	+	-	+	+	+	+	+	+	R	S	S	S	S	R	M	R
<i>W. paramesenteroides</i> WpX	100%	77.2%	44.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	M	R	M	R	R	R	R	R

1. SGA = Percentagem de inibição por Suco Gástrico Artificial; SB = Percentagem de inibição por Sais Biliares; MATS = Adesão microbiana a solventes (hidrofobicidade celular); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Produção de peróxido de hidrogênio; EPS = Síntese de exopolissacarídeo. “+” = linhagem produtora; “-” = linhagem não produtora.

2. Antagonismo. Ef = *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; Lm = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853; Ec = *Escherichia coli* ATCC 25723; Se = *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. “+” = halo de inibição ≥ 15 mm; “-” = halo de inibição < 15 mm.

3. Antibiograma. Ac = ampicilina (30 µg); Ap = ampicilina (45 µg); Er = eritromicina (15 µg); Ct = ceftriaxona (30 µg); Ch = cloranfenicol (30 µL); Ox = oxacilina (1 µg); Pe = penicilina G (10 U); Va = vancomicina (30 µg). R = resistente; M = moderadamente sensível; S = sensível.

a. Testes realizados por Alvim et al., 2011; b. Testes *in vitro* realizados neste trabalho.

**Apêndice B.** Níveis de susceptibilidade das linhagens de bactérias do ácido lático isoladas de suínos a agentes antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (milímetros) em teste de disco-difusão em ágar MRS

ISOLADO*	ANTIBIÓTICO			
	CFN	CIP	CLT	CEX
<i>W. paramesenteroides</i> WpA	10,85	0	24,30	14,85
<i>W. paramesenteroides</i> WpB	10,98	0	25,41	13,95
<i>W. paramesenteroides</i> WpC	9,92	0	24,69	11,99
<i>W. paramesenteroides</i> WpD	8,39	0	8,64	0
<i>W. paramesenteroides</i> WpE	10,56	0	25,09	13,03
<i>W. paramesenteroides</i> WpF	10,07	0	24,75	13,34
<i>W. paramesenteroides</i> WpH1	12,69	0	15,67	9,47
<i>W. paramesenteroides</i> WpJ4	10,83	0	18,21	9,35
<i>W. paramesenteroides</i> WpK4	16,03	9,53	20,75	0
<i>W. paramesenteroides</i> WpX	14,77	8,02	0	0
<i>W. cibaria</i> WcL	9,78	8,51	15,23	0
<i>W. cibaria</i> WcM	11,84	0	16,84	0
<i>W. cibaria</i> WcN	11,97	0	15,45	0
<i>L. acidophilus</i> LaH4	0	0	22,26	8,76
<i>L. acidophilus</i> LaL4	16,81	8,43	19,82	0
<i>L. brevis</i> LbS	15,50	0	15,60	13,09
<i>L. brevis</i> LbW	16,27	0	29,46	21,46
<i>L. plantarum</i> LpG1	8,99	0	22,44	8,45
<i>L. plantarum</i> LpG4	10,32	0	25,09	22,61
<i>L. plantarum</i> LpR	11,36	0	9,21	0
<i>L. paraplantarum</i> LprG	8,99	0	22,44	8,45
<i>L. reuteri</i> LreZ	14,45	0	10,77	10,55

CFN: cefalexina (30µg.); CIP: ciprofloxacina (1µg); CLT: cefalotina (30µg); CEX: cefoxitina (10µg). \*Os isolados *W. paramesenteroides* WpI e *L. rossiae* LrA1 não apresentaram crescimento suficiente para realização do teste.

## ANEXOS

**Anexo A.** Níveis de susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. aos agentes antimicrobianos de acordo com o diâmetro do halo de inibição (milímetros) em teste de disco-difusão em ágar MRS de acordo com Charteris et al., 1998.

ANTIMICROBIANO		NÍVEL DE SUSCEPTIBILIDADE		
Nome	Concentração	Resistente (R)	Moderadamente Sensível (MS)	Sensível (S)
Amicacina	30 µg	< 15	16 - 17	≥ 18
Ceftriaxane	30 µg	< 13	14 - 20	≥ 21
Cloranfenicol	30 µg	< 13	14 - 17	≥ 18
Oxacilina	1 µg	< 18	19 - 20	≥ 21
Penicilina	10 U	< 19	20 - 27	≥ 28
Vancomicina	30 µg	< 14	15 - 16	≥ 17



**Anexo B.** Certificado de aprovação do projeto, expedido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.



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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 203/2009**, relativo ao projeto intitulado "***Determinação do potencial imunomodulatório de lactobacilos, frações da parede bacteriana e proteína S recombinante de novos isolados com potencial probiótico***", que tem como responsável(is) **Álvaro Cantini Nunes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 12/2009**.

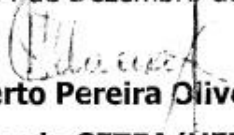
Este certificado expira-se em **9/ 12/ 2014**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 203/2009**, related to the project entitled "***Determination of modulation of the immune responses induced in mice by new strains of lactobacillus, cell wall fraction and recombinant S-layer proteins***", under the supervisors of **Álvaro Cantini Nunes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 9, 2009**.

This certificate expires in **December 9, 2014**.

Belo Horizonte, 14 de Dezembro de 2009.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

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