

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE LACTOBACILOS ISOLADOS DE**  
**ORIGEM HUMANA: CAPACIDADE DE ADESÃO E INIBIÇÃO DE**  
**PATÓGENO**

**MATHEUS RODRIGUES SILVA DO CARMO**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE LACTOBACILOS ISOLADOS DE**  
**ORIGEM HUMANA: CAPACIDADE DE ADESÃO E INIBIÇÃO DE**  
**PATÓGENO**

**MATHEUS RODRIGUES SILVA DO CARMO**

*Sob a orientação da Professora Dra.*  
**Rosa Helena Luchese**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica,  
Junho de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C287p

Carmo, Matheus Rodrigues Silva do, 1994-  
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE LACTOBACILOS ISOLADOS  
DE ORIGEM HUMANA: CAPACIDADE DE ADESÃO E INIBIÇÃO DE  
PATÓGENO / Matheus Rodrigues Silva do Carmo. -  
Seropédica, 2020.  
61 f.

Orientadora: Rosa Helena Luchese.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
2020.

1. lactobacilos. 2. probiótico. 3. microbiota. 4.  
adesão. 5. caco-2. I. Luchese, Rosa Helena, 1957-,  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Ciência e Tecnologia de Alimentos III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



**ATA Nº 1599 / 2020 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)**

**Nº do Protocolo: 23083.033237/2020-51**

**Seropédica-RJ, 28 de julho de 2020.**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**MATHEUS RODRIGUES SILVA DO CARMO**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/06/2020

---

ROSA HELENA LUCHESE (Dr<sup>a</sup>) UFRRJ

(orientadora)

---

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA (Dr<sup>a</sup>) UFRRJ

---

ANDRE FIORAVANTE GUERRA (Dr) CEFET/RJ

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

*(Assinado digitalmente em 29/07/2020 15:27 )*

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 1806986

*(Assinado digitalmente em 29/07/2020 11:07 )*

ROSA HELENA LUCHESE  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 359403

*(Assinado digitalmente em 29/07/2020 15:40 )*

ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 064.179.236-06

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1599**, ano:  
**2020**, tipo: **ATA**, data de emissão: **28/07/2020** e o código de verificação: **a92854bc69**

Dedico este trabalho à minha mãe,  
Ronilda Rodrigues Silva do Carmo  
Amor que transborda e ilumina.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todo o equilíbrio emocional e espiritual que me foi proporcionado ao longo dos 2 anos de mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosa Helena Luchese por toda a contribuição, paciência e profissionalismo ao longo da orientação.

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ pelo suporte que foi dado no início do presente trabalho. Um agradecimento especial à assistente de laboratório Dina Rodrigues e aos técnicos Edlene e Roberto.

Ao Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular da UEZO pelas portas que foram abertas para que o trabalho pudesse ser realizado. Um agradecimento especial à Mestre Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho que auxiliou em todos os experimentos e que, sobretudo, tornou-se uma grande amiga ao longo do mestrado.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, pelos 24 meses de bolsa de mestrado a qual pude ser contemplado; CNPq e FAPERJ, pelo subsídio de materiais e equipamentos para realização dos experimentos do presente trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas que, de alguma forma, puderam me auxiliar em minha jornada acadêmica. Foi difícil atravessar esses 24 longos meses, porém concluo com sentimento de vitória e dever cumprido.

Um agradecimento especial à minha prima, Mestre Karina Girardi do Carmo de Vasconcelos, por ser a pessoa a qual me espelho em muitos aspectos. Me sinto privilegiado por ser primo de alguém que, sobretudo, é minha amiga. Também agradeço em especial à minha avó que, mesmo em outro estado, mantém suas orações à Deus, pedindo proteção aos seus queridos filhos, netos e bisnetos. Tenho orgulho de fazer parte da árvore genealógica de Maria de Oliveira da Silva. Que Jesus Cristo te abençoe, vó!

Por fim, agradeço ao Alexandre Magno Abrão, o “Chorão”. Ao longo dos anos eu aprendi que:

*“A vida me ensinou a nunca desistir*

*Nem ganhar, nem perder, mas procurar evoluir.”*

Dias de luta, dias de glória

**Charlie Brown Jr.**

## RESUMO

DO CARMO, Matheus Rodrigues Silva. **Propriedades probióticas de lactobacilos isolados de origem humana: capacidade de adesão e inibição de patógeno.** 2020. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Uma microbiota intestinal equilibrada está associada a um estilo de vida saudável. O consumo de alimentos prebióticos e / ou que contenham microrganismos probióticos pode assegurar o equilíbrio dessa microbiota. Probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A capacidade de aderir e colonizar o intestino e de inibição de patógenos representam requisitos essenciais para microrganismos serem considerados probióticos. Os lactobacilos fazem parte do grupo de bactérias ácido-lácticas (LAB), possuindo importantes propriedades tecnológicas e probióticas. O objetivo do estudo foi avaliar as propriedades probióticas de cepas de lactobacilos de origem humana por sua capacidade de adesão, colonização e inibição de patógeno. Foram utilizadas 4 cepas de *Lacticaseibacillus paracasei*, 3 cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* e 2 cepas de *Limosilactobacillus fermentum*. Avaliou-se a hidrofobicidade da superfície celular das cepas, sua capacidade de aderir às células epiteliais intestinais (Caco-2) e sua capacidade de inibir o patógeno de origem alimentar *Salmonella* Typhimurium DTA 41 através dos mecanismos de competição, exclusão e desacoplamento. Apesar de apresentar baixo percentual de hidrofobicidade da superfície celular, todas as cepas apresentaram alta capacidade de adesão nas células Caco-2, não havendo diferença significativa entre as cepas isoladas e a cepa probiótica comercial da Christian Hansen *L. casei*. Tanto as cepas isoladas quanto a comercial foram capazes de inibir os biofilmes de *Salmonella*, além de reduzir a adesão do patógeno nas células Caco-2. No entanto, a redução da adesão de *Salmonella* nas células Caco-2 pelos isolados humanos, especialmente *L. rhamnosus* DTA 73 foi superior em comparação à cepa comercial, que não foi eficaz em excluir ou desacoplar o patógeno.

Em superfície plástica a inibição através dos mecanismos de competição e exclusão foi significativamente mais eficaz quando comparada à inibição por desacoplamento para todas as cepas. Os resultados do estudo sugerem que as cepas isoladas possuem alta capacidade de adesão e inibição de patógeno, podendo ser usada não apenas para prevenir, mas também para tratar diarreia já que também apresentam capacidade de desacoplar *Salmonella* em células Caco-2. Outros testes *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para estabelecer as propriedades probióticas das cepas de lactobacilos, além de compreender os mecanismos que as tornam capazes de aderir às células epiteliais intestinais e de inibir patógenos.

**Palavras-chave:** Lactobacilos, probióticos, adesão, mucosa, microbiota, Caco-2.

## ABSTRACT

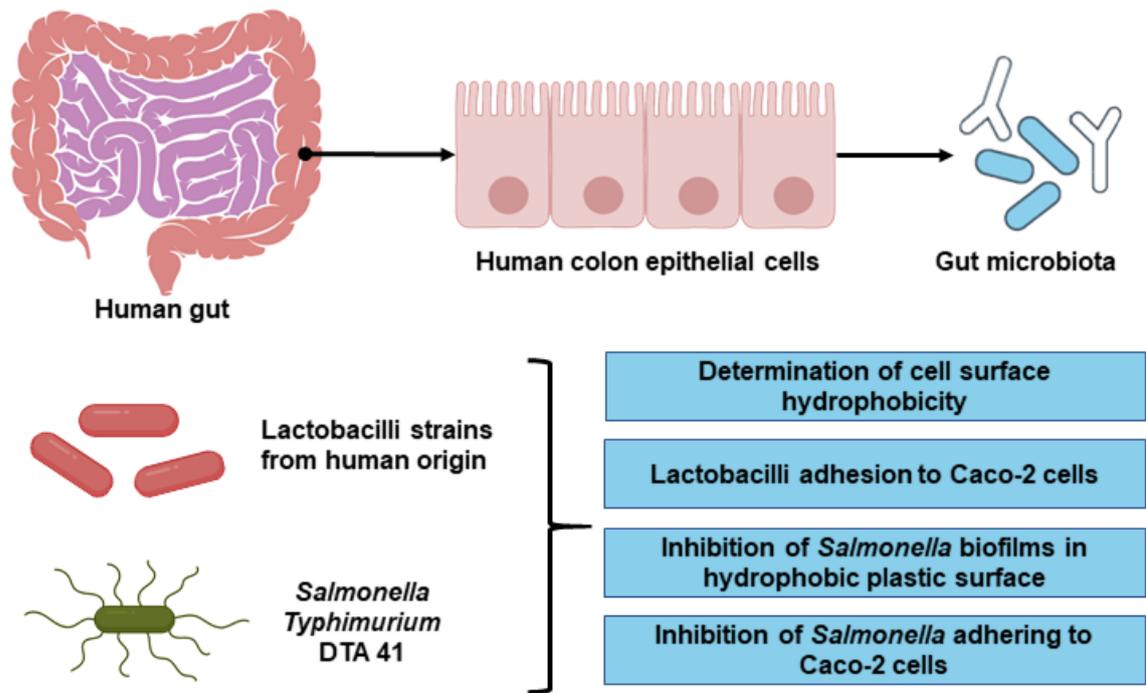
DO CARMO, Matheus Rodrigues Silva. **Probiotic properties of lactobacilli strains from human origin: adhesion capacity and pathogen inhibition.** 2020. 57 p. Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Balanced intestinal microbiota is associated with a healthy lifestyle and the consumption of prebiotic foods and /or foods that are sources of probiotic microorganisms are important to achieve this goal. Probiotics are live microorganisms that, when ingested in adequate amounts, confer benefits to the host health. Essential requirements to be considered probiotic are the ability to adhere and colonize the intestine and pathogens inhibition. Lactobacilli are part of the group of lactic acid bacteria (LAB), having important technological and probiotic properties. The objective of the study is to evaluate the probiotic properties of lactobacilli strains from human origin by their capacity for adhesion, colonization and pathogen inhibition. The following strains of lactobacilli were used: 4 strains of *Lacticaseibacillus paracasei*, 3 strains of *Lacticaseibacillus rhamnosus* and 2 strains of *Limosilactobacillus fermentum*. The hydrophobicity of the cell surface of the strains was evaluated, their ability to adhere to intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) and their capacity to inhibit the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium DTA 41 through the mechanisms of competition, exclusion and displacement. Despite presenting low percentage of cell surface hydrophobicity, all strains showed a high adhesion to Caco-2 cells, with no significant difference between isolated strains and Christian Hansen's commercial probiotic *L. casei*. Both the isolated strains and the commercial strain were able to inhibit *Salmonella* biofilms, in addition to reducing the pathogen's adhesion to Caco-2 cells. However, the reduction in *Salmonella* adhesion to Caco-2 cells by human isolates, especially *L. rhamnosus* DTA 73, was superior compared to the commercial strain, which was not effective in excluding or displace the pathogen. In the plastic surface, inhibition through competition and exclusion mechanisms was significantly more effective when compared to inhibition by displacement for all strains. The results of the study suggest that the isolated strains

have a high capacity for adhesion and pathogen inhibition and should be used not only to prevent, but also to treat diarrhea since they also have the ability to displace *Salmonella* in Caco-2 cells. Further *in vitro* and *in vivo* tests must be carried out to establish the probiotic properties of lactobacilli strains, in addition to understanding the mechanisms which make them capable of adhering to intestinal epithelial cells and inhibiting pathogens.

**Keywords:** Lactobacilli, probiotics, adhesion, mucous, microbiota, Caco-2.

## RESUMO GRÁFICO



**Figura 1.** Resumo gráfico submetido junto ao artigo referente ao presente estudo para a revista Food Research International.

**Fonte:** O Autor, 2020.

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAL – Bactérias ácido-lácticas

TGI – Trânsito gastrointestinal

PAM – Peptídeo antimicrobiano

EPS - Exopolissacarídeos

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

FAO – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultura enriquecido com sais, aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular)

SFB – Soro Fetal Bovino

CMF – Cálcio/Magnésio Free

BPLS - Brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar (meio de cultura seletivo para enterobactéria)

MRS – De Man, Rogosa and Sharpe (meio de cultura seletivo para lactobacilos)

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Resumo gráfico submetido junto ao artigo referente ao presente estudo para a revista Food Research International.

**Figura 2:** Representação da interação química e molecular entre lactobacilos e a mucosa e epitélio do intestino.

**Figura 3:** Mecanismos de inibição de patógeno desempenhados pelos probióticos.

**Figura 4:** Imagens de microscopia retiradas da ficha de dados da linhagem Caco-2 utilizada no estudo.

**Figura 5.** Esquema de tripsinização e replicação de linhagem celular realizada no cultivo das células epiteliais intestinais Caco-2.

**Figura 6.** Percentual de hidrofobicidade da superfície celular de diferentes cepas de lactobacilos.

**Figura 7.** Capacidade de adesão de diferentes cepas de lactobacilos em linhagem celular Caco-2.

**Figura 8:** Adesão das cepas de lactobacilos em células Caco-2 observada através de microscopia de contraste de fase (400x).

**Figura 9.** Inibição de biofilme de *Salmonella* Typhimurium por diferentes cepas de lactobacilos através dos mecanismos de competição, exclusão e desacoplamento.

**Figura 10:** Atividade inibitória de *Salmonella* Typhimurium por cepas de lactobacilos em células epiteliais intestinais (Caco-2).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Lista de cepas de lactobacilos utilizadas no estudo

**Tabela 2.** Contagem de *S. Typhimurium* (UFC/mL) após inibição por competição, exclusão e desacoplamento de biofilmes do patógeno na presença das diferentes cepas de lactobacilos. O controle é representado pela contagem do patógeno na ausência de lactobacilos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVO:.....	3
Objetivos específicos: .....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
4.1. Microbiota intestinal .....	4
4.2. O epitélio e a mucosa do intestino .....	5
4.3. Probióticos.....	6
4.5. O gênero <i>Lactobacillus</i> .....	9
4.6. Adesão de lactobacilos no intestino.....	10
4.7. Atividade antimicrobiana .....	11
4.8. Inibição de patógenos .....	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
5.1. Cepas de bactérias e condições de cultivo.....	17
5.2. Cultivo celular: célula epitelial de cólon humano (Caco-2).....	18
5.3. Teste de hidrofobicidade da superfície celular .....	20
5.4. Capacidade de adesão das cepas de lactobacilos em linhagem celular Caco-2 .....	21
5.5. Capacidade de redução da produção de biofilme de <i>Salmonella</i> Typhimurium em superfície plástica hidrofóbica.....	22
5.6. Inibição de <i>Salmonella</i> Typhimurium em células Caco-2.....	22
5.7. Análise estatística .....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## 1. INTRODUÇÃO

O intestino humano é colonizado por uma imensa gama de micro-organismos que juntos formam a microbiota. Estima-se que esta microbiota consista em 500 a 1000 espécies diferentes de bactérias, sendo a maioria de característica anaeróbica. A microbiota é considerada por muitos autores como um “órgão” metabólico, participando de vários processos fisiológicos (BÄCKHED; DING; WANG; HOOPER *et al.*, 2004). Entre suas funções incluem a capacidade de processar componentes alimentares não digeríveis, função antimicrobiana - impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas e função imunomoduladora - a microbiota interage com as células do epitélio intestinal do hospedeiro e causa uma resposta contínua do sistema imunológico (ROUND; MAZMANIAN, 2010). O equilíbrio da microbiota está associado a um estilo de vida saudável e ao consumo de alimentos que são fontes de micro-organismos probióticos (SÁNCHEZ-TAPIA; TOVAR; TORRES, 2019; WOLTERS; AHRENS; ROMANÍ-PÉREZ; WATKINS *et al.*, 2019).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006). Os requisitos essenciais para a seleção de microrganismos probióticos são representados pela estabilidade durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), adesão às células epiteliais intestinais e muco e capacidade de inibir patógenos (TARRAH; DA SILVA DUARTE; DE CASTILHOS; PAKROO *et al.*, 2019). A adesão bacteriana no intestino geralmente ocorre no muco e no epitélio intestinal. A adesão celular consiste em um sistema complexo que envolve a interação entre o envelope celular da bactéria e a membrana das células epiteliais. Essa interação pode ocorrer através de afinidade química ou interações específicas envolvendo constituintes celulares (MOHANTY; PANDA; KUMAR; RAY, 2019). Após a adesão ao epitélio intestinal, os micro-organismos probióticos podem ser capazes de inibir patógenos, induzindo uma resposta imune e promovendo uma barreira protetora (TUO; SONG; SONG; LIU *et al.*, 2018). Outra função importante dos probióticos é a exclusão competitiva contra patógenos (TASNIM; ABULIZI; PITHER; HART *et al.*, 2017). Um fator de exclusão

competitiva desempenhada por algumas bactérias comensais é a formação de biofilme através da produção de exopolissacarídeos e subsequente inibição da adesão de patógenos na mucosa intestinal (DENG; CHEN; WU; XIN *et al.*, 2015).

O grupo de bactérias ácido-lácticas (BAL) representa os microrganismos mais utilizados como probióticos. Conforme a sua ampla aplicação na indústria de alimentos ao longo dos anos, o grupo BAL recebeu o status de “Geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos EUA e recebeu o status “Suposição de Segurança Qualificada” (QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) (HOSSAIN; MIZAN; ASHRAFUDOULLA; NAHAR *et al.*, 2020). O BAL é comumente encontrado em produtos fermentados, como carnes, sucos, vegetais, frutas, laticínios e outros alimentos, além de hospedar naturalmente plantas e animais (LIU; HAN; ZHOU, 2011; LY; MAYRHOFER; DOMIG, 2018; NURAIIDA, 2015). As bactérias ácido-lácticas são importantes na microbiota intestinal de seres humanos e animais, promovendo muitas funções positivas para o organismo (XU; ZHOU; TANG; LI *et al.*, 2020). Os lactobacilos representam o maior gênero do grupo LAB. Contém grande número de espécies, isoladas principalmente de seres humanos, animais, plantas e alimentos (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004). Os lactobacilos são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos e utilizam lactose na fermentação. Esse gênero é amplamente utilizado como culturas iniciadoras (produção de ácido) e probióticos na indústria (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016).

O objetivo deste trabalho foi realizar testes *in vitro* para avaliar as propriedades probióticas de diferentes cepas de lactobacilos isoladas de fezes de crianças de 7 a 21 dias, com base em sua capacidade de aderir às células epiteliais (Caco-2) e na inibição de patógeno de origem alimentar *Salmonella* Typhimurium. O teste *in vitro* de estabilidade na passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) foi realizado anteriormente por nosso grupo e os dados já foram publicados (TARRAH; DA SILVA DUARTE; DE CASTILHOS; PAKROO *et al.*, 2019).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os microrganismos probióticos possuem propriedades funcionais desejáveis e que podem conferir benefícios à saúde humana. Com a crescente demanda por alimentos funcionais por parte dos consumidores, salienta-se a importância de se estudar os probióticos de origem humana avaliando suas características de adesão em mucosa intestinal, suas capacidades antimicrobianas e de proteção contra patógeno.

Desta maneira espera-se que esses microrganismos possam ser aplicados em produtos alimentícios, agregando valor nutricional, funcional, sensorial e comercial aos mesmos.

## **3. OBJETIVO:**

Avaliar as propriedades de adesão dos lactobacilos isolados de origem humana quanto à capacidade de adesão ao epitélio intestinal e inibição de patógeno de origem alimentar.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a hidrofobicidade da superfície celular das cepas de lactobacilos;
- Verificar a capacidade de adesão das cepas em linhagem celular Caco-2;
- Avaliar a redução da formação de biofilmes do patógeno de origem alimentar *S. Typhimurium* DTA 41;
- Analisar a capacidade de inibição da adesão do patógeno em linhagem celular Caco-2;
- Estudar a diferença entre cepas de origem humana e cepa probiótica comercial.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Microbiota intestinal

O intestino humano é colonizado por uma imensa gama de microrganismos que em conjunto formam a microbiota. Estima-se que essa microbiota seja constituída por 500 a 1000 espécies diferentes de bactérias, as quais em sua maioria são anaeróbias. A microbiota é considerada por muitos autores como um “órgão” metabólico, participando de diversos processos fisiológicos (BÄCKHED; DING; WANG; HOOPER *et al.*, 2004). Entre suas funções incluem a habilidade de processar componentes dietéticos indigeríveis, função antibacteriana, impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas, função imunomoduladora – a microbiota interage com as células do epitélio intestinal do hospedeiro e provoca uma resposta contínua do sistema imune (ROUND; MAZMANIAN, 2010), entre outras funções amplamente estudadas.

O equilíbrio da microbiota intestinal é um importante fator de saúde. Bäckhed *et al.* (2004) verificaram que a introdução de uma microbiota no intestino de camundongos promoveu um ganho de gordura corporal significativamente maior quando comparado aos camundongos que não receberam a microbiota. Esse resultado pode ser explicado pela capacidade da microbiota intestinal em digerir componentes dietéticos não digeríveis, permitindo um maior aproveitamento energético e nutricional da dieta (BÄCKHED; DING; WANG; HOOPER *et al.*, 2004).

Outra função importante da microbiota do intestino é a capacidade de exclusão competitiva contra patógenos (TASNIM; ABULIZI; PITHER; HART *et al.*, 2017). Nichos ecológicos semelhantes são exigidos tanto pelos patógenos quanto pelas bactérias comensais para a colonização e proliferação no intestino, e mecanismos para competir uns com os outros evoluíram nessas bactérias ao longo do tempo. Fatores como mudanças de pH, produção de bacteriocinas, consumo preferencial de nutrientes e estímulo de mecanismos de defesa do hospedeiro promovem a competição entre patógenos e bactérias comensais, estabelecendo um ambiente microbiano específico (KAMADA; CHEN; INOHARA; NÚÑEZ, 2013). Um fator importante de exclusão competitiva desempenhada por algumas bactérias comensais é através da formação de

biofilme pela produção de exopolissacarídeos e posterior inibição da adesão de patógenos em mucosa intestinal (DENG; CHEN; WU; XIN *et al.*, 2015).

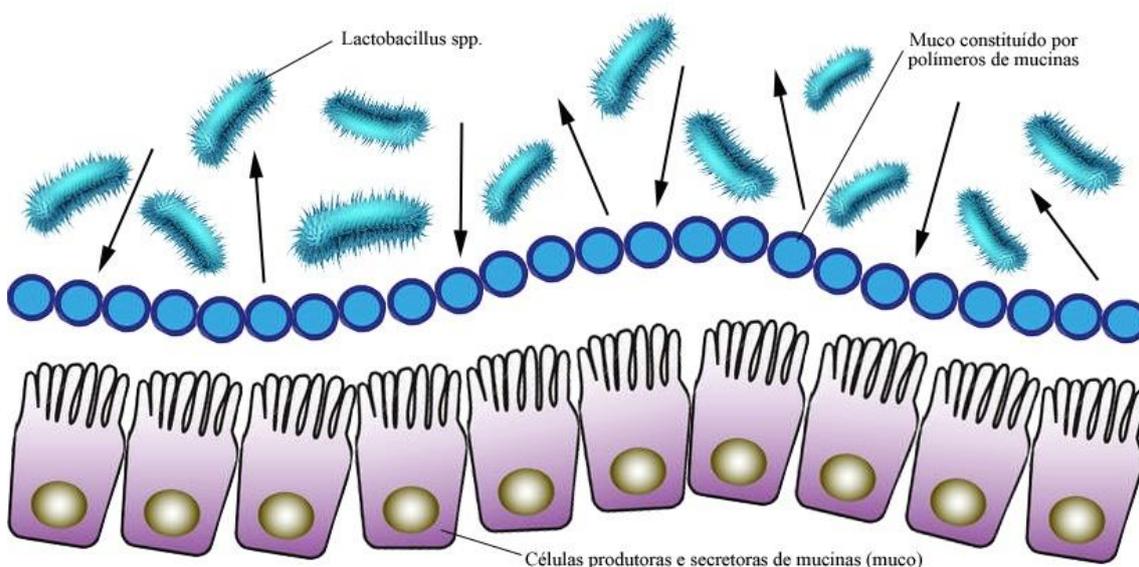
#### **4.2. O epitélio e a mucosa do intestino**

O epitélio gastrointestinal é coberto por uma camada de muco que, por sua vez, é formada a partir de uma matriz de gel composta principalmente por glicoproteínas complexas que estabelecem uma barreira de proteção contra antígenos, além de promover motilidade ao lúmen. No intestino humano, a camada de muco pode variar de 30 a 300 micrômetros, aumentando consideravelmente do intestino delgado até o reto (MATSUO; OTA; AKAMATSU; SUGIYAMA *et al.*, 1997).

O epitélio do intestino é constituído por diversos tipos de células colunares, espalhadas por toda extensão intestinal. Um tipo de célula colunar presente são as células caliciformes. Essas células são capazes de produzir glicoproteínas denominadas mucinas, que proporcionam ao muco suas características físicas de viscosidade e elasticidade. As mucinas secretadas formam polímeros que estabelecem a estrutura do muco, promovendo proteção contra patógenos, enzimas, toxinas, desidratação e abrasão (LABOISSE; JARRY; BRANKA; MERLIN *et al.*, 1996). Ao todo são conhecidos por volta de 21 genes MUC envolvidos na síntese de mucinas em humanos. As mucinas são transportadas para a superfície da membrana ou secretadas no muco (BYRD; BRESALIER, 2004). Os genes MUC1, MUC3A/B, MUC4 e MUC12 são os envolvidos na expressão de mucinas ligadas à membrana de células caliciformes do cólon humano. As mucinas ligadas à membrana poderiam desempenhar um papel nos efeitos imunomoduladores das interações bacterianas com o epitélio, entretanto as bactérias entram em contato mais frequentemente com as mucinas do muco. O MUC2 é o principal gene da mucina secretada no cólon, sendo esta a maior constituinte do gel mucoso que protege o tecido (LIÉVIN-LE MOAL; SERVIN; COCONNIER-POLTER, 2005).

Os polímeros de mucina são considerados glicanos nutritivos para bactérias, mais especificamente dos probióticos. Os padrões de glicosilação no intestino podem ter evoluído com a microbiota intestinal para acomodar os nichos com características benéficas para o hospedeiro. Ao promover

oligossacarídeos de mucina específicos para enzimas bacterianas, a expressão diferencial de mucinas poderia regular as interações microbianas com o hospedeiro, além de estabelecer populações bacterianas desejadas para compor a microbiota intestinal. Se isso desempenha um papel crucial na adesão de lactobacilos ou se é principalmente um mecanismo de promoção e manutenção de uma microbiota específica, atualmente não está claro (PATSON; CORFIELD, 2009). As enzimas de hidrólise de glicosídeos de lactobacilos têm sido bem caracterizadas em termos de degradação e metabolismo de oligossacarídeos, mas o conhecimento da adesão permanece pouco descrito. A **figura 2** apresenta um modelo de interação química e molecular que desempenham papel importante nas interações entre bactérias e o hospedeiro. A elucidação desses mecanismos de ligação pode ser a chave para entender a adesão de lactobacilos no intestino.



**Figura 2:** Representação da interação química e molecular entre lactobacilos e a mucosa e epitélio do intestino.

**Fonte:** O Autor, 2018.

### 4.3. Probióticos

Atualmente, há um aumento significativo no interesse e na demanda por probióticos, após uma longa história de uso em produtos lácteos fermentados e de estudo sobre a homeostase da microbiota intestinal e os benefícios para a saúde humana. Por sua vez, os probióticos são definidos pela FAO/WHO (2006) como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades

adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os probióticos devem apresentar as seguintes características: resistência ao ácido gástrico, bile e suco pancreático; capacidade de adesão à mucosa e epitélio do intestino; atividade antimicrobiana contra patógenos; capacidade de reduzir a adesão de patógenos na superfície do trato gastrointestinal (KOLACEK; HOJSK; BERNI CANANI; GUARINO *et al.*, 2017).

As cepas que pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, microrganismos predominantes da microbiota gastrointestinal, são as bactérias probióticas mais utilizadas e estão incluídas em muitos alimentos funcionais e suplementos dietéticos. Os resultados de muitos estudos em humanos e modelos animais mostraram a potencial eficácia clínica dos probióticos em muitas doenças. De fato, os probióticos apresentaram capacidade de suprimir a diarreia, mitigar a intolerância à lactose e complicações pós-operatórias, apresentar atividade antimicrobiana e reduzir a carcinogênese colorretal, além de prevenir as doenças inflamatórias intestinais. No entanto, as generalizações relativas aos potenciais benefícios para a saúde dos probióticos não devem ser feitas, pois cada bactéria possui especificidades e mecanismos diferentes (FONTANA; BERMUDEZ-BRITO; PLAZA-DIAZ; MUÑOZ-QUEZADA *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de alimentos funcionais utilizando probióticos tem recebido uma grande atenção nos últimos anos. Os produtos lácteos como leite fermentado, iogurte e sorvete (BATISTA; SILVA; CAPPATO; FERREIRA *et al.*, 2017; DI CRISCIO; FRATIANNI; MIGNOGNA; CINQUANTA *et al.*, 2010; PINTO; FRITZEN-FREIRE; DIAS; AMBONI, 2019) com probióticos são os mais encontrados na literatura. Entretanto, produtos não lácteos fermentados e não fermentados também tem sido desenvolvidos como fonte alternativa de alimentos funcionais com potencial probiótico (DIAS; DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA; PINTO; DE OLIVEIRA SANTANA *et al.*, 2018; XU; BAO; WU; LAO *et al.*, 2019). Além disso, muitos estudos tem investigado a relação simbiótica do alimento fonte de probiótico e os benefícios à saúde humana, como o consumo de queijo probiótico na atenuação dos efeitos deletérios causados pelo tabaco e a prevenção e tratamento da urolitíase (MARTINS; SANTOS-JUNIOR; FILHO; SILVA *et al.*, 2018; VASCONCELOS; SILVA; POSO; BARROSO *et al.*, 2019).

#### 4.4. Bactérias ácido-lácticas

As bactérias ácido-lácticas (BAL) recebem esse nome por serem responsáveis pela formação de mais de 50% de ácido láctico como produto final do metabolismo de carboidratos. São bactérias gram-positivas, não apresentam motilidade, não esporulam e apresentam morfologia de cocos ou bastões (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). As BALs são microrganismos largamente utilizados na produção de alimentos em função de suas características tecnológicas desejáveis. Na indústria de alimentos, a bactéria ácido-láctica é usada como cultura iniciadora que promove uma rápida acidificação do meio, ou como cultura não iniciadora que promove a formação de compostos aromáticos, contribuindo para o desenvolvimento do sabor, textura, valor nutricional, segurança e qualidade dos produtos alimentícios (RAMA; KUHN; BEUX; MACIEL *et al.*, 2019).

Muitos estudos recentes continuam investigando o potencial probiótico de bactérias ácido-lácticas (RUIZ-MOYANO; GONÇALVES DOS SANTOS; GALVÁN; MERCHÁN *et al.*, 2019; XU; ZHOU; TANG; LI *et al.*, 2020) e seus benefícios à saúde humana como na resposta imunológica, inflamação e no câncer (DEL CARMEN; DE MORENO DE LEBLANC; LEVIT; AZEVEDO *et al.*, 2017; LÓPEZ; GUEIMONDE; MARGOLLES; SUÁREZ, 2010). Um dos critérios para que um microrganismo tenha propriedades probióticas é a estabilidade ao longo da passagem no trato digestivo. As BAL normalmente apresentam estabilidade em ambiente ácido como o do estômago e resistência aos sais biliares (FAYE; TAMBURELLO; VEGARUD; SKEIE, 2012). As bactérias ácido-lácticas apresentam atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar, até mesmo contra bactérias esporuladas. Além de serem capazes de produzir bacteriocinas (peptídeos com atividade antimicrobiana), as BAL apresentam atividade antagonista contra patógenos por exclusão competitiva – elas competem pelo sítio de adesão e inibem biofilmes (MESSAOUDI; MANAI; KERGOURLAY; PRÉVOST *et al.*, 2013).

#### 4.5. O gênero *Lactobacillus*

Algumas alterações taxonômicas no gênero lactobacilos foram propostas em 2020. Por se tratar de um gênero que apresenta uma série de espécies com características fenotípicas, ecológicas e genotípicas diversas, foi sugerida a sua reclassificação em 25 gêneros, sendo 23 novos gêneros, a partir da avaliação da taxonomia de *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* com base em seqüências genômicas inteiras. Com esta reclassificação, as espécies do grupo *Lactobacillus casei* foram reclassificadas no novo gênero *Lacticaseibacillus*, enquanto aquelas pertencentes ao grupo *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus fermentum* foram alocadas em um novo gênero, *Limosilactobacillus* (ZHENG; WITTOUCK; SALVETTI; FRANZ et al., 2020).

Os lactobacilos são bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos e apresentam morfologia em forma de bastonete. Esse gênero de bactérias representa importante parte da microbiota comumente encontrada na boca, no trato gastrointestinal e no trato genital-urinário feminino. Ao microscópio, os lactobacilos não exibem motilidade e apresentam morfologia em bastão variando em tamanho, sendo umas mais longas e outras mais curtas (SLOVER; DANZIGER, 2008). Muitas espécies de lactobacilos são anaeróbias facultativas, podendo crescer na presença ou ausência de oxigênio. Apenas 20% de espécies isoladas de humanos são anaeróbias obrigatórias. O ácido láctico representa o produto final da fermentação da glicose no metabolismo dessas bactérias. O ácido acético e o succinato também são produtos desse metabolismo, porém em pequenas quantidades (MADIGAN; MARTINKO, 2006). Os lactobacilos representam um gênero muito diverso que consiste em mais de 50 espécies reconhecidas. Tradicionalmente, baseado em vias metabólicas, o gênero foi dividido em três grupos. Investigações anteriores usaram muitos sistemas de tipagem baseados em genótipos para caracterizar e agrupar lactobacilos. No entanto, a caracterização fenotípica clássica continua sendo importante para grupos criteriosos de linhagens baseadas em suas propriedades comuns (ANNUK; HYNES; HIRMO; MIKELSAAR et al., 2001).

O trato gastrointestinal de muitos animais é colonizado por diferentes espécies de lactobacilos. As espécies mais comuns que podem ser encontradas e isoladas do TGI desses animais são *Lactobacillus brevis*, *L.*

*casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentarum* e *L. salivarius*. Os lactobacilos têm sido isolados de conteúdo fecal de animais, principalmente de humanos, além de secreções vaginais, mamas e da saliva (SLOVER; DANZIGER, 2008).

Algumas espécies de lactobacilos são utilizadas como bactérias probióticas, sendo comercializadas liofilizadas ou através de produtos alimentícios como queijos e iogurtes. Muitos estudos têm evidenciado os efeitos dessas bactérias no tratamento da diarreia em crianças e adultos, candidíase, doenças inflamatórias intestinais e em outras enfermidades (CANNON; LEE; BOLANOS; DANZIGER, 2005).

#### **4.6. Adesão de lactobacilos no intestino**

Como mencionado anteriormente, as células globulares caliciformes produzem e secretam glicoproteínas chamadas mucinas que, por sua vez, constituem a camada de muco que envolve o epitélio intestinal. Por outro lado, as bactérias ácido-lácticas produzem proteínas de superfície que interagem com as mucinas presentes na mucosa intestinal, permitindo a aderência e posterior colonização desses microrganismos. Além disso, a hidrofobicidade da superfície celular pode auxiliar na interação química inespecífica entre bactéria e mucosa (NISHIYAMA; SUGIYAMA; MUKAI, 2016).

Alguns métodos *in vitro* são realizados para avaliar a adesão de microrganismos no intestino. As linhagens Caco-2 e HT-29 são linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon muito utilizadas nos estudos de adesão. A linhagem HT-29, diferente da Caco-2, possui a característica de produzir muco. Muitos estudos *in vitro* que tem como objetivo avaliar a adesão de bactérias em muco utilizam esta linhagem celular como célula hospedeira. A grande maioria dos testes realizados com lactobacilos mostrou resultados positivos para o índice de aderência nas células epiteliais intestinais (ZHANG; ZHANG; TUO; GUO *et al.*, 2010) e (DENG; CHEN; WU; XIN *et al.*, 2015).

Vários membros do gênero lactobacilos são capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS), que podem desempenhar um papel essencial na determinação das características da superfície celular. Os EPS também estão envolvidos na formação de biofilmes, o que pode melhorar a colonização e ajudar na sobrevivência desses microrganismos. A capacidade de formar

agregados multicelulares também pode ser importante na colonização de cepas probióticas e tem sido sugerido que os EPS podem contribuir para as propriedades de agregação de bactérias lácticas. Da mesma forma, os EPS também podem influenciar as características físico-químicas da superfície celular, como a hidrofobicidade, que também pode ter impacto na adesão bacteriana e na colonização. Um estudo demonstrou que as mudanças na camada de EPS afetaram as propriedades fisiológicas de *L. johnsonii* e tiveram impacto nas interações adesivas ao tecido hospedeiro (DERTLI, E., MAYER, M., & NARBAD, A., 2015).

#### **4.7. Atividade antimicrobiana**

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são usualmente capazes de produzir proteínas, peptídeos, ácidos orgânicos e outras substâncias químicas que permitem a inibição de outros microrganismos como os patógenos e os deteriorantes. As bacteriocinas, por exemplo, são substâncias de origem proteica que possuem a capacidade de inibir determinados microrganismos. Estes compostos antimicrobianos podem representar uma alternativa ao tratamento com antibióticos e também são capazes de inibir patógenos de origem alimentar, possuindo valor para a indústria farmacêutica e de alimentos (PIDUTTI; FEDERICI; BRANDI; MANNA *et al.*, 2018).

Alguns estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de lactobacilos probióticos contra *E. coli* causadora de diarreia, como ETEC, EPEC, EHEC, EIEC e EAEC. Em um estudo que teve como objetivo avaliar a proteção de lactobacilos contra diarreia de origem infecciosa, foi possível observar que quatro espécies (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* e *L. paracasei*), isolados de conteúdo fecal de lactentes saudáveis, apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* diarreiogênica. Essa atividade antimicrobiana parece ter relação com a produção de ácidos orgânicos e/ou peróxido de hidrogênio pelas cepas de lactobacilos, sugerindo propriedade inibitória contra *E. coli* e tornando-as possíveis candidatas à prevenção promovida pelo uso de probióticos (DAVOODABADI; DALLAL; LASHANI; EBRAHIMI, 2015).

Por outro lado, a segurança microbiológica de alimentos tem se mostrado uma grande preocupação de saúde pública no mundo,

principalmente nos países em processo de desenvolvimento. Durante a elaboração de produtos fermentados, muitos patógenos são inibidos pela atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas (BAL), promovida pela produção de bacteriocinas e ácidos orgânicos. Essa inibição já foi estudada e identificada contra muitos patógenos de origem alimentar como *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (MASHAK, 2016).

#### **4.8. Inibição de patógenos**

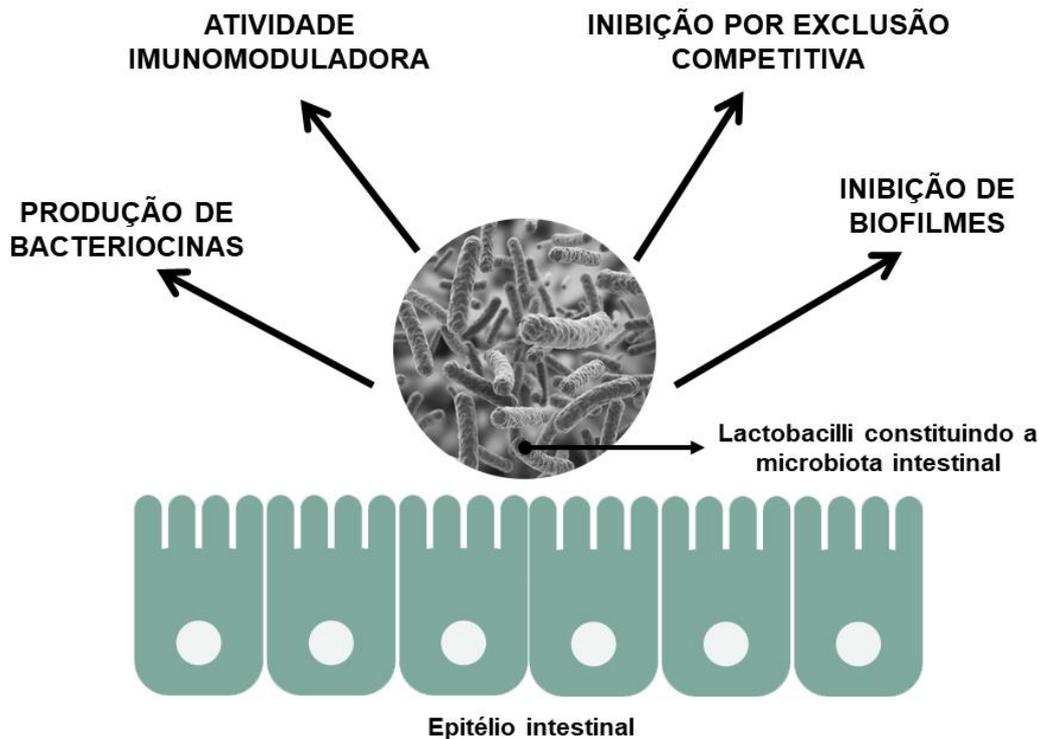
Uma das funções fisiológicas básicas da microbiota intestinal é a capacidade de inibição de patógenos, estabelecendo uma espécie de barreira microbiana. Os lactobacilos são componentes naturais da colônia microbiana do intestino, e são considerados agentes probióticos, proporcionando uma defesa contra microrganismos que possam causar infecções gastrointestinais. Os mecanismos de inibição de patógenos os quais as diferentes espécies de lactobacilos promovem ainda não são estritamente definidos (SERVIN, 2004). Entretanto, muitos estudos já mostram alguns possíveis mecanismos de inibição. Os lactobacilos podem proteger as células hospedeiras da colonização de patógenos através do efeito de barreira, além de modular a resposta imunológica do hospedeiro (RESTA-LENERT; BARRETT, 2003).

O *Lactobacillus acidophilus* e *L. plantarum* mostraram-se eficazes na inibição da adesão de *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium às células epiteliais intestinais. Essas propriedades justificam o uso de lactobacilos como método de prevenção contra infecções, ao passo em que possuem a capacidade de inibir a adesão de patógenos (ZHANG; ZHANG; TUO; GUO *et al.*, 2010).

No estudo de GAGNON; KHEADR; LE BLAY; FLISS *et al.* (2004) foi possível observar que na presença de números crescentes de *Bifidobacterium* spp. houve uma redução progressiva no número de *Escherichia coli*. Ao mesmo passo, também observaram que ocorreu uma redução da adesão da *E. coli* em células Caco-2 (epitélio intestinal) quando as bifidobactérias foram adicionadas aos poços contendo as células hospedeiras, independente da cepa testada.

No experimento de exclusão realizado no estudo de ZHANG; ZHANG; TUO; GUO *et al.* (2010), 3 espécies diferentes de lactobacilos apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) na inibição da adesão de células de *Shigella sonni* em células hospedeiras produtoras de muco (HT-29). Entretanto, o experimento de competição mostrou que a cepa L. M5-L foi a única que apresentou atividade competitiva contra *S. sonnei*, impedindo a aderência de 33% das células. Todas as outras cepas apresentaram um nível pouco significativo na competição contra o patógeno na aderência as células HT-29.

Por outro lado, a cepa *Lactobacillus paracasei* FJ861111.1 se mostrou eficiente em inibir a adesão às células hospedeiras HT-29 de vários patógenos como *Sh. dysenteriae* 301 (49,5%), *Sh. dysenteriae* 2457 (60,5%), *S. aureus* Cowan1 (32,3%), *Cr. sakazakii* 45401 (21%), *Cr. sakazakii* 45402 (24,7%), *E. coli* 44102 (19,3%) e *C. albicans* SC5314 (14,6%). Além disso, para verificar a capacidade do *L. paracasei* FJ861111.1 de anticolonização de patógenos em modelo in vivo, utilizaram *Candida albicans* para infectar camundongos. Como resultado, observaram que a administração da cepa de *L. paracasei* antes da infecção foi capaz de reduzir significativamente as contagens de *C. albicans* nas fezes dos camundongos após infecção. A adesão de patógenos promove a liberação de proteínas e toxinas que iniciam processos necróticos nas células hospedeiras, facilitando assim a invasão e posterior infecção. Um mecanismo de probióticos para excluir patógenos do intestino é através da competição por locais de adesão na superfície do intestino e a produção de componentes antimicrobianos. Logo, os lactobacilos podem ser fortes candidatos como probióticos para promover a inibição de patógenos (DENG; CHEN; WU; XIN *et al.*, 2015).



**Figura 3:** Mecanismos de inibição de patógeno desempenhados pelos probióticos.

**Fonte:** O Autor, 2020.

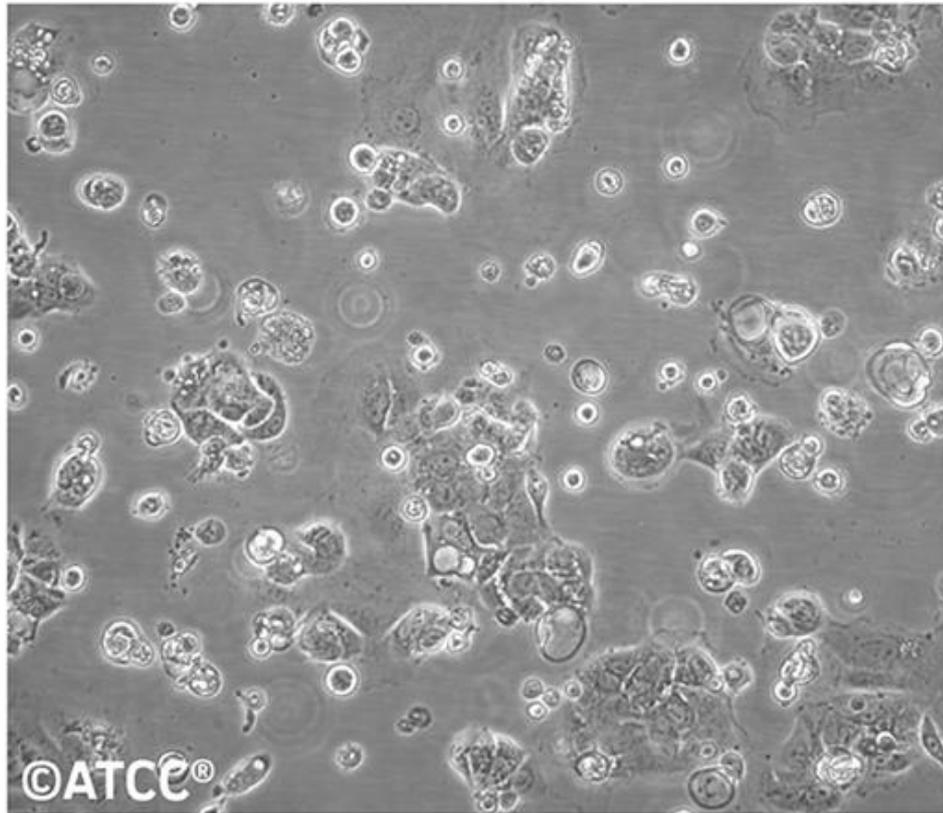
#### 4.9. A linhagem celular Caco-2 nos testes *in vitro* de adesão e inibição de patógenos

A linhagem celular Caco-2 constitui-se de células epiteliais de adenocarcinoma de cólon humano, possuem propriedades aderentes e quando cultivadas, diferenciam-se em uma monocamada contínua com morfologia e funcionalidade típica dos enterócitos normais (HIDALGO; RAUB; BORCHARDT, 1989). As células Caco-2 são amplamente utilizadas como modelo nas investigações da digestão e absorção intestinal de nutrientes e compostos bioativos (CHEN; ZHANG; MARCONE; PAULS *et al.*, 2017). Entretanto, com o aumento dos estudos relacionados aos microrganismos com propriedades probióticas e seus mecanismos de adesão, inibição de patógeno e resposta imunológica, a linhagem celular Caco-2 tem sido frequentemente utilizadas como modelo nesses estudos (TUO; SONG; SONG; LIU *et al.*, 2018; WANG; LI; CHEN; HUANG *et al.*, 2010; ZHANG; TAO; SHAH; WEI, 2016).

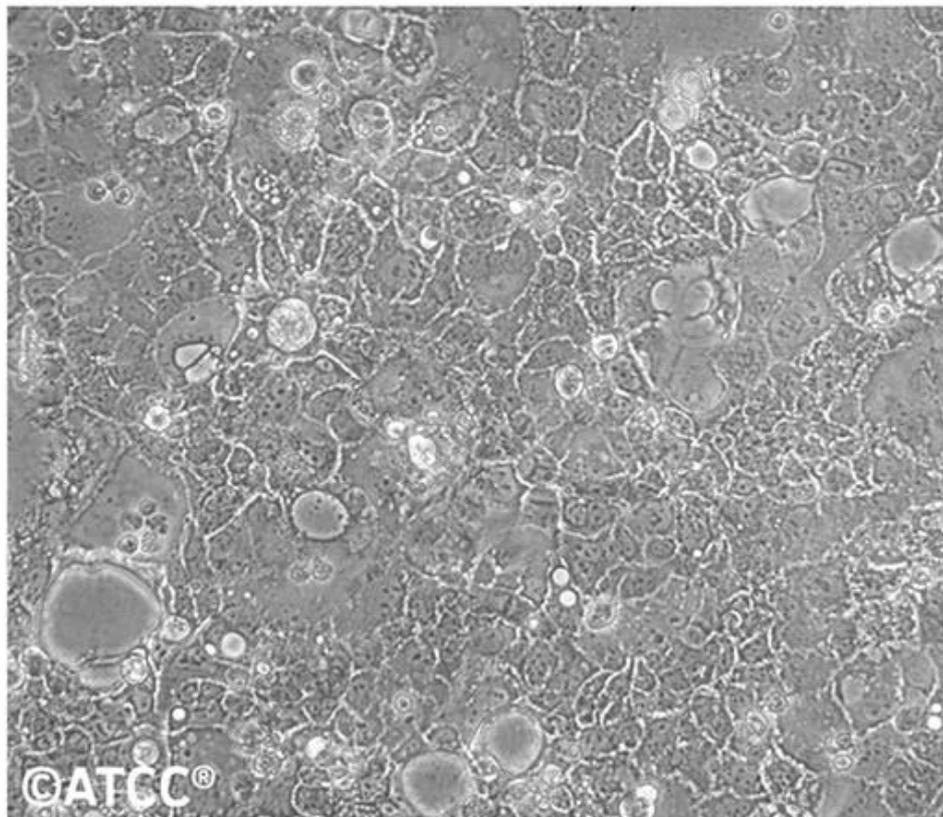
A adesão dos microrganismos investigados como probióticos potenciais tem sido analisada utilizando modelos *in vitro* com linhagens celulares epiteliais do intestino. Alguns métodos utilizam a inoculação das bactérias nas linhagens celulares em monocamada, tendo a adesão da bactéria investigada através de contagem de bactérias aderidas às células em diferentes campos da imagem de microscopia (DEVI; KURREY; HALAMI, 2018). Por outro lado, muitos estudos utilizam o método de inoculação da bactéria na linhagem celular em monocamada, lavagens sucessivas com solução tampão após incubação para retirada das bactérias não aderentes e plaqueamento em ágar para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (TUO; SONG; SONG; LIU *et al.*, 2018; WANG; ZHANG; DU; WANG *et al.*, 2019).

A inibição de patógenos por microrganismos probióticos tem sido largamente estudada em modelos *in vitro* utilizando a linhagem celular Caco-2. As investigações vão desde a capacidade dos probióticos de reduzir a adesão de patógenos nas células Caco-2 (FALAH; VASIEE; BEHBAHANI; YAZDI *et al.*, 2019; VASIEE; MORTAZAVI; SANKIAN; YAZDI *et al.*, 2019) até o estudo de atividade imunomoduladora representada pelas bactérias comensais nas células hospedeiras (BELGUESMIA; ALARD; MENDIL; RAVALLEC *et al.*, 2019). As microscopias também são utilizadas para investigar o potencial probiótico de inibição de patógeno em células Caco-2. A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para obter imagens de alta resolução da superfície de uma amostra e a imunofluorescência é uma técnica que permite a marcação de antígenos com um anticorpo ligado a um fluoróforo que emite luz fluorescente, permitindo uma imagem com marcações desejáveis (MENEZES; MELO; RAMOS; MOREIRA *et al.*, 2020).

No estudo de KONINKX; TOOTEN e MALAGO (2010) foi possível observar uma melhora na integridade da barreira de muco das células Caco-2 induzida por uma cepa probiótica após exposição ao patógeno de origem alimentar *Salmonella enteritidis* 857. As bactérias patogênicas promovem uma forte indução apoptótica em células Caco-2, ao passo em que cepas probióticas atenuaram esse efeito, sugerindo a atividade anti-câncer como uma possível propriedade probiótica (ALTONSY; ANDREWS; TUOHY, 2010).



Low Density



High Density

**Figura 4:** Imagens de microscopia retiradas da ficha de dados da linhagem Caco-2 utilizada no presente estudo.

**Fonte:** ATCC, 2020.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFRRJ) e no Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular Prof. Antônio Carlos Campos de Carvalho da Fundação Centro Universitário da Zona Oeste do Rio de Janeiro (UEZO).

### 5.1. Cepas de bactérias e condições de cultivo

Foram utilizadas as seguintes cepas isoladas de origem humana: 3 cepas de *Lactocaseibacillus paracasei* (DTA 73, DTA 76 e DTA 79), 4 cepas de *Lactocaseibacillus rhamnosus* (DTA 81, DTA 83, DTA 92 e DTA 97) e 2 cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (DTA 104 e DTA 106). Além disso, também foi utilizada a cepa probiótica comercial *Lactocaseibacillus casei* 01 (Christian Hansen) como controle do estudo. Como patógeno, foi utilizada a cepa *Salmonella* Typhimurium DTA 41 isolada de amostra de kani pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ. A lista com as cepas utilizadas no presente estudo pode ser observada na Tabela 1.

As cepas de lactobacilos foram previamente isoladas através de amostras fecais de lactentes com até 20 dias de idade, posteriormente foram identificadas por sequenciamento do 16S rDNA e agrupadas por similaridade genética usando RAPD-PCR, conforme descrito por GUERRA; JUNIOR; SANTOS; ANDRIGHETTO *et al.* (2018). As cepas de lactobacilos foram cultivadas em caldo MRS e incubadas a 36°C por 24 horas sob atmosfera aeróbia. A bactéria patogênica *Salmonella* Typhimurium DTA 41 foi cultivada em caldo triptona de soja e incubada também a 36°C por 24 horas sob atmosfera aeróbia.

**Tabela 2.** Cepas de lactobacilos utilizadas no estudo

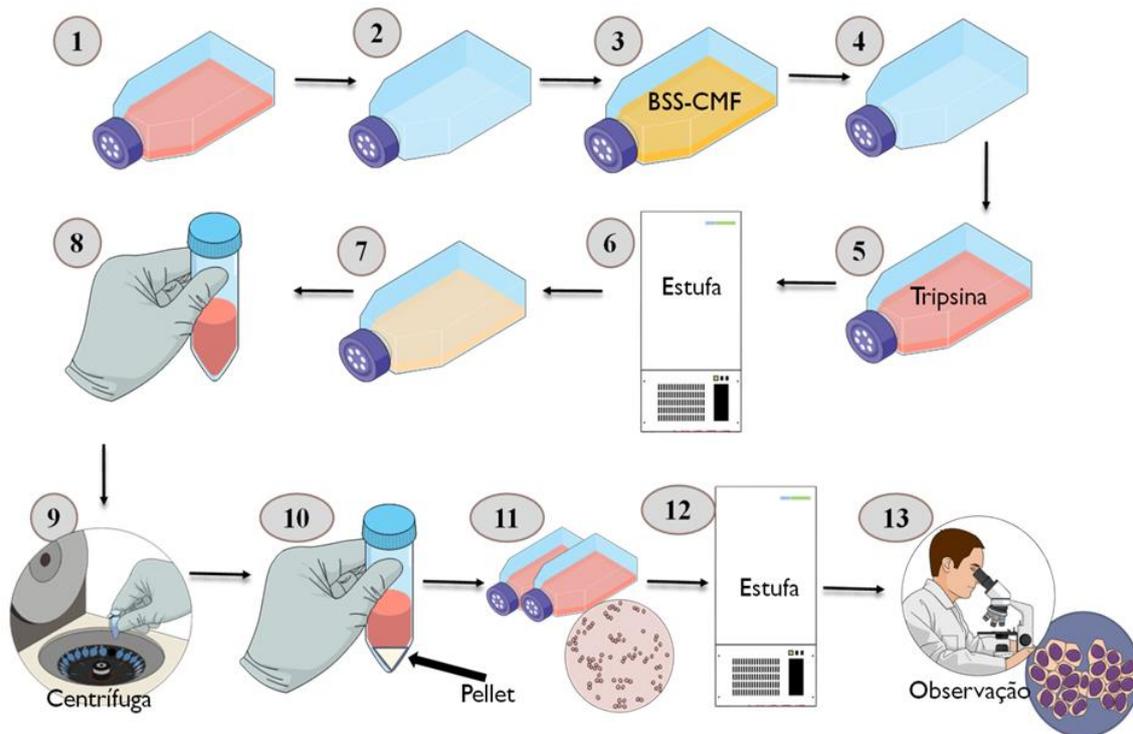
<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>
<i>L. rhamnosus</i>	DTA 73
<i>L. rhamnosus</i>	DTA 76
<i>L. rhamnosus</i>	DTA 79
<i>L. paracasei</i>	DTA 81
<i>L. paracasei</i>	DTA 83
<i>L. paracasei</i>	DTA 92
<i>L. paracasei</i>	DTA 97
<i>L. fermentum</i>	DTA 104
<i>L. fermentum</i>	DTA 106
<i>L. casei</i>	Christian Hansen 01

## **5.2. Cultivo celular: célula epitelial de cólon humano (Caco-2)**

A linhagem celular Caco-2 foi adquirida através do Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, RJ). O cultivo celular da linhagem seguiu a metodologia adaptada proposta por LÓPEZ; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ; SÁNCHEZ; RUAS-MADIEDO *et al.* (2012). A linhagem celular foi mantida em meio RPMI suplementado com 10% (vol/vol) de soro fetal bovino e 1% (vol/vol) de estreptomicina/penicilina em garrafas de 25cm<sup>3</sup>. Todos os meios e suplementos foram obtidos da SIGMA. As incubações ocorreram a 37°C em CO<sub>2</sub> a 5% numa incubadora de CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura foram substituídos a cada 2 dias. A replicação da linhagem em outras garrafas seguiu conforme o esquema representado na **Figura 5**, quando a mesma apresentasse uma confluência de até 90%. O procedimento de replicação seguiu conforme protocolo interno do laboratório da seguinte forma:

- 1) Linhagem celular apresentando confluência de até 90% em meio de cultura RPMI;
- 2) O descarte do meio de cultura RPMI foi realizado;

- 3) Uma solução salina balanceada e cálcio-magnésio livres (BSS-CMF) foi introduzida para lavagem da linhagem;
- 4) Foi feito o descarte da solução BSS-CMF;
- 5) Solução de tripsina foi usada para desacoplamento das células na superfície interna da garrafa;
- 6) A garrafa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos para ação da tripsina;
- 7) A solução de tripsina contendo a massa de células foi transferida para tubo FALCON de 15 mL;
- 8) Tubo FALCON de 15mL contendo a solução de tripsina com a massa de células;
- 9) Foi feita a centrifugação da solução a 1500rpm por 10 minutos;
- 10) Foi realizada a observação do pellet formado após centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o meio de cultura novo foi introduzido para ressuspender as células depositadas no interior do tubo;
- 11) O meio de cultura com as células foi transferido para garrafas novas e estéreis;
- 12) As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
- 13) Foi realizada a observação da linhagem replicada em microscopia de contraste de fase nos aumentos de 100 e 400x.



**Figura 5.** Esquema de tripsinização e replicação de linhagem celular realizada no cultivo das células epiteliais intestinais Caco-2. **Fonte:** Arquivo LTFCM, 2018.

### 5.3. Teste de hidrofobicidade da superfície celular

A metodologia para o ensaio seguiu a metodologia proposta por ALIZADEH BEHBAHANI; NOSHAD e FALAH (2019) com algumas modificações. A hidrofobicidade da superfície celular foi determinada de acordo com a capacidade das bactérias ácido-lácticas de aderirem-se ao solvente não polar. Sua capacidade de adesão às células epiteliais do intestino pode ser estimada pela aderência aos hidrocarbonetos. As dez culturas de lactobacilos foram cultivadas por duas transferências sucessivas. As culturas em fase estacionária foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS estéril e ressuspenso no mesmo tampão para ajustar a densidade em  $OD_{600} = 0,5$  (A1). Em seguida, 3 mL de suspensão de lactobacilos e 1 mL de acetato de etila (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foram misturados e agitados em vórtex por 1 minuto e incubados a 36°C por 1 hora para separação de fases. Após este período, a fase aquosa foi cuidadosamente removida e o seu valor de absorvância foi lido a 600 nm (A2).

O percentual de hidrofobicidade foi então calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = (A1 - A2) / A1 \times 100$$

#### **5.4. Capacidade de adesão das cepas de lactobacilos em linhagem celular Caco-2**

O método para avaliar a adesão das cepas de lactobacilos em células Caco-2 seguiu a metodologia proposta por VASIEE; MORTAZAVI; SANKIAN; YAZDI *et al.* (2019) e ALIZADEH BEHBAHANI; NOSHAD e FALAH (2019) com modificações. As células Caco-2 apresentando por volta de 90% de confluência foram transferidas para uma placa para cultura de células de 24 poços contendo lamínulas redondas em cada poço. O experimento seguiu com a linhagem em monocamada nos poços. As culturas de lactobacilos foram centrifugadas, lavadas com PBS estéril e ressuspendidas em meio RPMI com soro fetal bovino (10%) e sem antibióticos. Posteriormente, as culturas foram ajustadas para uma  $OD_{600} = 0.5$ , representando aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. As diferentes culturas de bactérias foram introduzidas nos poços contendo a Caco-2 em monocamada, incubando por 1 hora em 37°C, sob atmosfera aeróbia e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram lavados quatro vezes com PBS estéril e visualizados em microscopia de contraste fase através do aumento de 400x. Foram obtidas cinco imagens de campos distintos por poço através do programa AxioVision 40x64, Carl Zeiss Microscopy. Após visualização em microscópio e obtenção das imagens, os poços foram lavados com PBS estéril e tratados com solução de Triton X-100 (0,05%) por 10 minutos. As células desaderidas foram transferidas para água peptonada (10% m/v) e diluições seriadas foram realizadas. Seguiu-se o plaqueamento através da técnica da microgota em ágar MRS (Merck, Germany). As placas foram incubadas a 36°C por 72h e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas. O resultado seguiu através da seguinte equação:

$$\text{Adesão (\%)} = \frac{\text{Concentração final (UFC/mL)} \times 100}{\text{Concentração inicial (UFC/mL)}}$$

## 5.5. Capacidade de redução da produção de biofilme de *Salmonella* Typhimurium em superfície plástica hidrofóbica

A capacidade de microrganismos probióticos reduzirem a formação de biofilmes de patógenos foi estudada através da metodologia realizada por VIEIRA; GUERRA e LUCHESE (2015). Foi utilizada superfície plástica com características hidrofóbicas, constituída de placas de microtítulo estéreis com base plana e em forma de “U”, ambas com capacidade para 300 µL.

Foram avaliados os diferentes mecanismos de redução da formação de biofilmes de patógeno da seguinte forma:

**Competição:** Cepas de lactobacilos foram cultivadas concomitantemente com *Salmonella* Typhimurium a uma concentração de  $10^7$  UFC/mL cada, e incubados por 24 horas a 36°C sob anaerobiose.

**Exclusão:** As bactérias patógenas em uma concentração de  $10^7$  UFC/mL foram semeadas sobre as placas já contendo biofilmes de lactobacilos seguido de incubação sob anaerobiose a 36°C por 24 horas.

**Desacoplamento:** Cepas de lactobacilos em uma concentração de  $10^7$  UFC/mL foram semeadas sobre as placas já contendo biofilmes de *Salmonella*, seguido de incubação sob anaerobiose a 36°C por 24 horas.

Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato e os biofilmes removidos com auxílio de “swab”. As contagens foram realizadas pela técnica da microgota com diluições sucessivas em Ágar verde-brilhante vermelho fenol (BPLS) (Difco Laboratories, Detroit, Mich) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. Typhimurium*. Foram preparados controles do patógeno sem inoculação de Lactobacilos.

## 5.6. Inibição de *Salmonella* Typhimurium em células Caco-2

Os mecanismos de competição, exclusão e desacoplamento utilizados no experimento de inibição de biofilme foram aplicados para avaliar a atividade anti-adesão das cepas de lactobacilos contra a cepa patogênica *Salmonella* Typhimurium. Para o ensaio de competição, volumes iguais de cada cepa com a mesma concentração foram adicionados aos poços. A placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1 h, as bactérias não

ligadas (cepas de lactobacilos e *S. Typhimurium*) foram lavadas e as bactérias e células Caco-2 restantes foram retiradas com Triton X-100 a 0,05%. O índice de competição foi calculado como a porcentagem de ligação de *S. Typhimurium* em Caco-2 inoculada com as diferentes cepas de lactobacilos dividida pela adesão do patógeno na ausência de lactobacilos.

Para o ensaio de exclusão, primeiro as cepas de lactobacilos foram adicionadas aos poços e incubadas por 1 h. As bactérias não aderidas foram lavadas suavemente com PBS estéril. Posteriormente, a cepa do patógeno foi adicionada aos poços e a placa de 24 poços foi incubada por mais 1 hora. As bactérias não aderidas foram lavadas e as bactérias e células foram retiradas com Triton X-100 a 0,05%. O índice de exclusão foi calculado como: Inibição da adesão do patógeno, em que A2 e A1 representam a porcentagem de adesão da *S. Typhimurium* na presença e na ausência das cepas de lactobacilos, respectivamente.

Para o ensaio de desacoplamento, a cepa patogênica foi primeiramente adicionada aos poços e a placa foi incubada a 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> por 1 h. As bactérias não aderidas foram lavadas e as cepas de lactobacilos foram adicionadas aos poços. Após 1 h de incubação a 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, as bactérias não aderidas foram lavadas suavemente com PBS estéril e as bactérias e as células Caco-2 foram retiradas com Triton 0,05% X-100.

As células desaderidas foram transferidas para um tubo contendo PBS estéril e, em seguida, foi feita diluição seriada e posterior plaqueamento em ágar BPLS (Difco Laboratories, Detroit, Mich) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC / mL) de *Salmonella Typhimurium*.

### **5.7. Análise estatística**

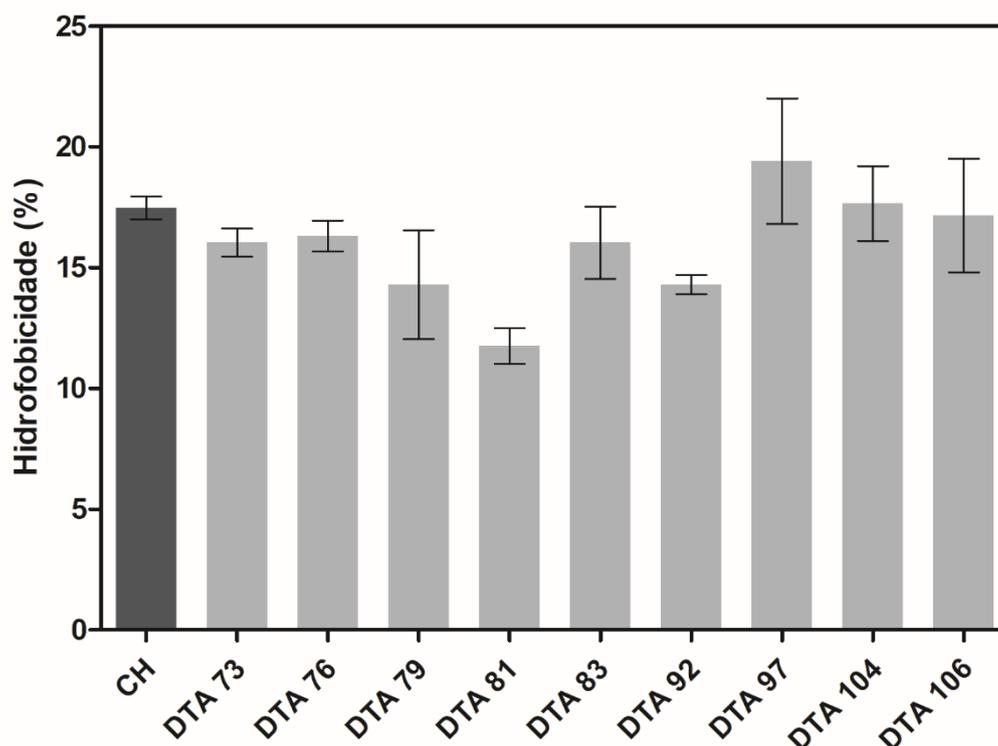
Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltiplas comparações pelo método de Dunnett com 95% de confiança para hidrofobicidade e adesão em células Caco-2 e pelo método de Tukey com 95% de confiança para os dados de redução de biofilmes e inibição de patógeno em células Caco-2. Todas as análises foram realizadas com o uso dos programas estatísticos GraphPad Prism 5 e STATISTICA v8.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Hidrofobicidade da superfície celular

A capacidade de adesão celular envolve um complexo processo que depende da interação entre a superfície da bactéria e a membrana da célula hospedeira. Essa interação costuma estar relacionada com as propriedades da superfície celular da bactéria, como a presença de proteínas e a hidrofobicidade. Bactérias que apresentam alta hidrofobicidade da superfície celular geralmente apresentam forte interação com o muco intestinal (MOHANTY; PANDA; KUMAR; RAY, 2019). Na **Figura 6** é apresentado o resultado do teste de hidrofobicidade da superfície celular das diferentes cepas de lactobacilos utilizadas no presente estudo. O percentual de hidrofobicidade variou de 12% para a cepa DTA 81 até 20% da cepa DTA 97. Todas as cepas apresentaram baixo percentual de hidrofobicidade. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as cepas isoladas e a cepa probiótica comercial Christian Hansen.

A hidrofobicidade da superfície celular representa um potencial de interação inespecífica entre a bactéria e a célula hospedeira. Essa interação pode ser fraca inicialmente e, muitas vezes, reversível. Por outro lado, as células bacterianas e as células hospedeiras possuem interações mais específicas e que podem ser mais determinantes para a adesão da bactéria (TODOROV; BOTES; GUIGAS; SCHILLINGER *et al.*, 2008). O resultado do estudo sugere que as cepas possuem pouca afinidade química inespecífica com o muco do hospedeiro. Em contrapartida, as cepas apresentaram alta capacidade de adesão em células Caco-2. No estudo que avaliou a diferença de expressão de mRNA de Muc2 (glicoproteína que constitui o muco) em 4 linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon, foi possível observar uma expressão mais significativa na linhagem HT-29 e LS174T comparada a Caco-2 (BU; LI; TIAN; HUANG, 2011), sugerindo que as interações específicas entre as bactérias e as células Caco-2 são mais determinantes na capacidade de adesão.



**Figura 6.** Percentual de hidrofobicidade da superfície celular de diferentes cepas de lactobacilos. Não há diferença significativa entre as cepas isoladas de origem humana e a cepa probiótica comercial. Não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as cepas isoladas e a cepa comercial de acordo com o teste de Dunnett.

## 6.2. Capacidade de adesão das diferentes cepas de lactobacilos em linhagem celular Caco-2

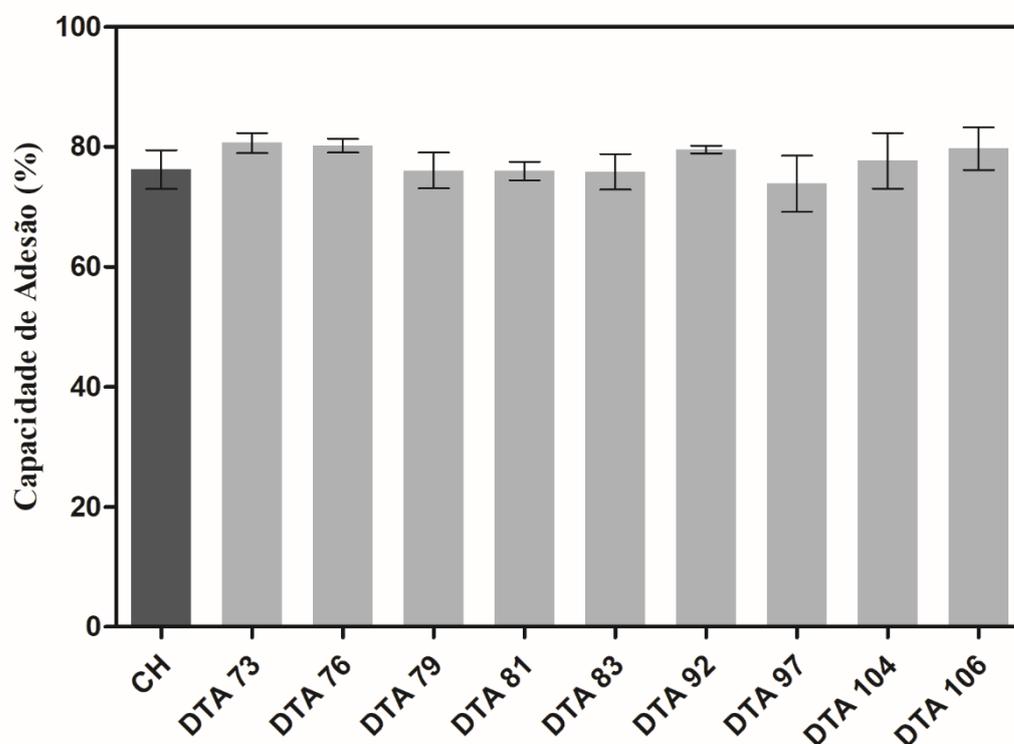
Um dos critérios importantes para seleção de probióticos é sua capacidade de adesão às células intestinais, tornando este fator um pré-requisito para a colonização bacteriana, bem como para as interações bactéria-hospedeiro que possam conferir benefícios à saúde. Essa capacidade de adesão depende das propriedades da superfície bacteriana e das proteínas que mediam a ligação das bactérias à camada de muco gastrointestinal. Contudo, alguns fatores podem alterar a adesão dessas bactérias às células intestinais, como por exemplo, o estresse ambiental ou alterações na superfície da membrana bacteriana. Dessa forma, também é importante avaliar as respostas ao estresse em meios complexos e com fatores interferentes limitados (GANDHI; SHAH, 2016). A linhagem celular Caco-2 tem sido muito utilizada nos ensaios *in vitro* para análise da capacidade de adesão e colonização de microrganismos com potencial probiótico no epitélio do

hospedeiro (DEVI; KURREY; HALAMI, 2018; SHINDE; VEMURI; SHASTRI; PERERA *et al.*, 2019). O resultado da capacidade de adesão das diferentes cepas de lactobacilos utilizadas no estudo nas células Caco-2 é apresentado na **Figura 7** e imagens de microscopia de contraste de fase (400x) mostrando a adesão está presente na **Figura 8a e 8b**. Todas as cepas apresentaram percentual de adesão nas células epiteliais intestinais entre 75 e 80%, sugerindo uma alta capacidade de adesão das cepas em epitélio intestinal. Não houve diferença significativa no percentual de adesão das cepas isoladas de origem humana e a cepa probiótica comercial *L. casei* 01 (Christian Hansen). No estudo publicado por nosso grupo em 2019, foi realizado o ensaio *in vitro* de adesão de algumas cepas isoladas de origem humana em células HT-29 pelo método de contagem de diferentes campos. As cepas DTA 79 e DTA 81 foram consideradas muito adesivas pelo estudo, ao passo que a cepa DTA 83 apresentou pouca adesão, sendo considerada como não adesiva (TARRAH; DA SILVA DUARTE; DE CASTILHOS; PAKROO *et al.*, 2019). Em contrapartida, nosso estudo mostrou grande capacidade de adesão da cepa DTA 83 em células Caco-2. Esse resultado sugere que as cepas apresentam mecanismos de adesão diferentes de acordo com a linhagem celular utilizada no ensaio *in vitro*, uma vez que os probióticos possuem interações específicas com as células hospedeiras (RINKINEN; WESTERMARCK; SALMINEN; OUWEHAND, 2003).

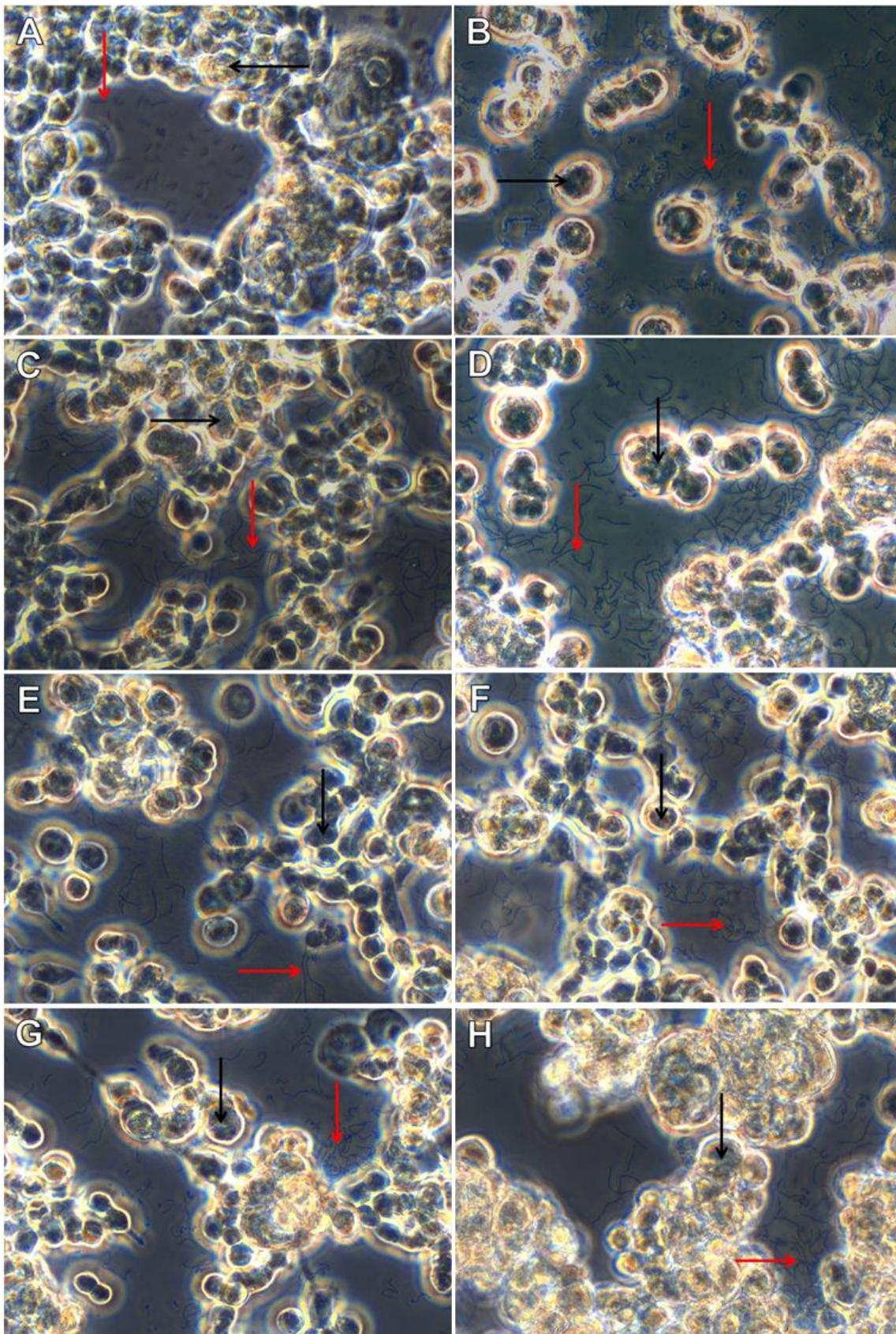
As proteínas ligadas à superfície dos lactobacilos promovem adesão desses microrganismos na mucosa do epitélio intestinal através da interação com as células epiteliais. Por não apresentarem membrana externa e disporem de múltiplas camadas de peptidoglicano, os lactobacilos possuem diferentes estratégias de ancoragem de proteínas na superfície celular (RAMIAH; VAN REENEN; DICKS, 2008). Outro mecanismo envolvido na adesão de bactérias probióticas é através da produção de exopolissacarídeos (EPS). Além de fornecer proteção durante a passagem pelo trato gastrointestinal, o EPS também promove a formação de biofilme que facilita a colonização do epitélio intestinal. Os exopolissacarídeos aumentam a hidrofobicidade da superfície celular bacteriana, intensificando a interação química entre bactérias e células epiteliais (Konieczna, SŁodziński, & Schmidt, 2018). No entanto, as cepas isoladas mostraram uma baixa hidrofobicidade da superfície celular, sugerindo

menor produção de EPS e, portanto, uma interação específica mais determinante na adesão em células epiteliais intestinais.

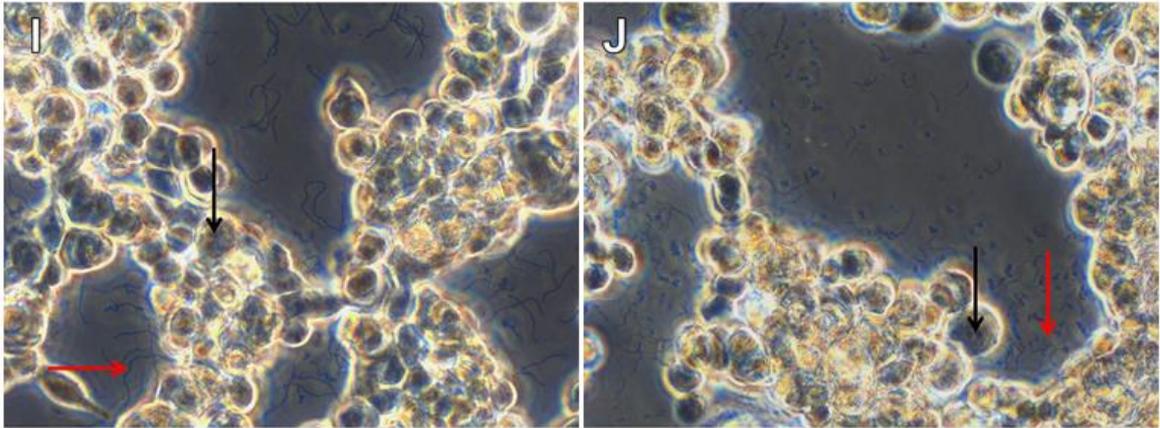
As imagens de microscopia de contraste de fase apresentadas na **Figura 6** condizem com os resultados apresentados no gráfico de adesão das cepas em células Caco-2. Nas imagens, pode-se observar uma grande concentração das cepas na superfície das células epiteliais, sugerindo uma forte interação entre a bactéria e a célula hospedeira. Além disso, também é possível notar uma grande auto-agregação das cepas isoladas, o que não ocorre da mesma maneira na cepa probiótica comercial. A auto-agregação das bactérias também pode estar envolvida na capacidade de adesão em células epiteliais (TUO; SONG; SONG; LIU *et al.*, 2018), reforçando o resultado.



**Figura 7.** Capacidade de adesão de diferentes cepas de lactobacilos em linhagem celular Caco-2. Não há diferença significativa entre as cepas isoladas de origem humana e a cepa probiótica comercial Christian Hansen. Não há diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as cepas isoladas e a cepa comercial de acordo com o teste de Dunnet.



**Figura 8a:** Adesão das cepas de lactobacilos em células Caco-2 observada através de microscopia de contraste de fase (400x). Setas pretas indicam as células Caco-2 e setas vermelhas indicam as células de lactobacilos. Cepas: (A) CH, (B) DTA 73, (C) DTA 76, (D) DTA 79, (E) DTA 81, (F) DTA 83, (G) DTA 97.



**Figura 8b:** Adesão das cepas de lactobacilos em células Caco-2 observada através de microscopia de contraste de fase (400x). Setas pretas indicam as células Caco-2 e setas vermelhas indicam as células de lactobacilos. Cepas: (I) DTA 104 e (J) DTA 106.

### 6.3. Capacidade de redução da produção de biofilme de *Salmonella* Typhimurium em superfície plástica hidrofóbica

A adesão de bactérias patogênicas e a subsequente colonização na mucosa intestinal são etapas importantes no processo de infecção. Os microrganismos probióticos são capazes de aderir e colonizar o trato gastrointestinal e, assim, inibir a adesão de patógenos e fornecer proteção ao hospedeiro (FAGHFOORI; POURGHASSEM GARGARI; SABER GHARAMALEKI; BAGHERPOUR *et al.*, 2015). A capacidade de inibir o biofilme patogênico é uma das importantes propriedades probióticas. A formação de biofilme por patógenos bacterianos promove resistência ao meio ambiente e sua capacidade de escapar do sistema imunológico do hospedeiro (SARIKAYA; ASLIM; YUKSEKDAG, 2017). A **Figura 4** mostra os resultados da inibição do biofilme de *S. Typhimurium* DTA 41 pelas diferentes cepas isoladas de lactobacilos e pela cepa probiótica comercial. Todas as cepas reduziram a adesão e a formação de biofilme do patógeno de origem alimentar *S. Typhimurium* pelos mecanismos de competição, exclusão e desacoplamento. A redução logarítmica de *Salmonella* por competição foi a mais significativa (aproximadamente 4 ciclos log), enquanto o mecanismo de desacoplamento apresentou a menor redução (aproximadamente 2 log). Este resultado sugere que os lactobacilos competem e excluem a *Salmonella*, mas não desacopla com a mesma eficácia. Através do mecanismo de desacoplamento, os lactobacilos são menos capazes de remover os biofilmes de *Salmonella* já aderidos à superfície, sugerindo que os probióticos devem ser ingeridos regularmente antes que o patógeno seja estabelecido no ambiente do trato gastrointestinal.

A produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos lactobacilos também pode estar fortemente envolvida na inibição de *S. Typhimurium* na superfície plástica hidrofóbica, uma vez que os EPS possuem capacidade anti-biofilme, impedindo a adesão patogênica (OLEKSY; KLEWICKA, 2018). No estudo de WU; PAN; WU; CHANG *et al.* (2010), os exopolissacarídeos extraídos de uma cepa probiótica de *Bifidobacterium* foram capazes de inibir sete patógenos de origem alimentar diferentes e na concentração de 80 ppm, incluindo uma cepa de *Salmonella* Typhimurium. No entanto, o mesmo não é observado para uma cepa não produtora de EPS, enfatizando a relação entre exopolissacarídeos e

inibição de biofilme de patógeno (NAMPOOTHIRI; BEENA; VASANTHAKUMARI; ISMAIL, 2017).

**Tabela 3** – Contagem de *S. Typhimurium* (UFC/mL) após inibição por competição, exclusão e desacoplamento de biofilmes do patógeno na presença das diferentes cepas de lactobacilos. O controle é representado pela contagem do patógeno na ausência de lactobacilos.

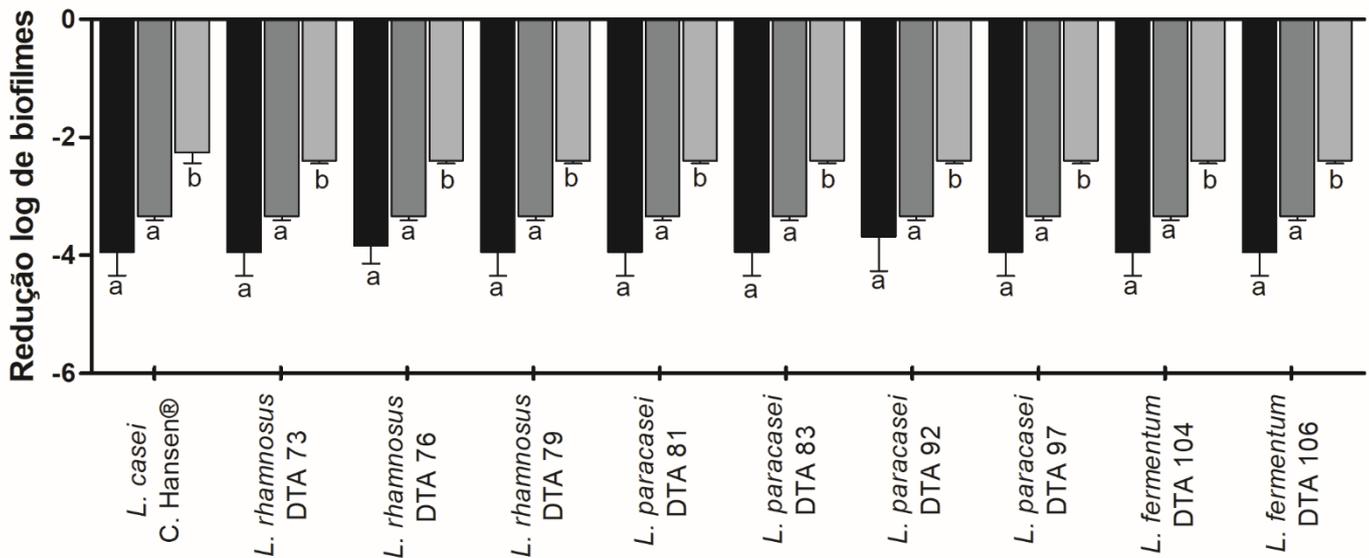
<b>Competição</b>	Log. UFC de <i>S. Typhimurium</i>
<i>L. rhamnosus</i> DTA 73	2.5 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 76	2.6 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 79	2.5 a
<i>L. paracasei</i> DTA 81	2.5 a
<i>L. paracasei</i> DTA 83	2.5 a
<i>L. paracasei</i> DTA 92	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 97	2.5 a
<i>L. fermentum</i> DTA 104	2.5 a
<i>L. fermentum</i> DTA 106	2.5 a
<i>L. casei</i> 01 (Christian Hansen)	2.5 a
Controle	6.4 b

<b>Exclusão</b>	Log. UFC de <i>S. Typhimurium</i>
<i>L. rhamnosus</i> DTA 73	2.7 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 76	2.7 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 79	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 81	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 83	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 92	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 97	2.7 a
<i>L. fermentum</i> DTA 104	2.7 a
<i>L. fermentum</i> DTA 106	2.7 a
<i>L. casei</i> 01 (Christian Hansen)	2.7 a
Controle	6.04 b

<b>Desacoplamento</b>	<b>Log. UFC de <i>S. Typhimurium</i></b>
<i>L. rhamnosus</i> DTA 73	2.7 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 76	2.7 a
<i>L. rhamnosus</i> DTA 79	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 81	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 83	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 92	2.7 a
<i>L. paracasei</i> DTA 97	2.7 a
<i>L. fermentum</i> DTA 104	2.7 a
<i>L. fermentum</i> DTA 106	2.7 a
<i>L. casei</i> 01 (Christian Hansen)	2.8 a
Controle	5.1 b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 0,95 de significância pelo teste de Dunnett.*



**Figura 9.** Inibição de biofilme de *Salmonella* Typhimurium por diferentes cepas de lactobacilos através dos mecanismos de competição (barras pretas), exclusão (barras cinza-escuros) e desacoplamento (barras cinza-claros). Letras diferentes expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

#### 6.4. Inibição da adesão de *Salmonella* Typhimurium em linhagem celular Caco-2

Como não houve diferença significativa entre as cepas nos experimentos anteriores, selecionamos uma cepa representativa de cada espécie de lactobacilos para o teste de inibição de *S. Typhimurium* em células Caco-2: *L. casei* da Christian Hansen, *L. rhamnosus* DTA 73, *L. paracasei* DTA 92 e *L. fermentum* DTA 106. Os resultados da inibição de *S. Typhimurium* DTA 41 pela cepa probiótica comercial e pela cepa isolada *L. paracasei* DTA 92 mostram que houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no mecanismo de competição em comparação com exclusão e desacoplamento. A cepa que apresentou maior inibição do patógeno nas células epiteliais foi o isolado *L. rhamnosus* DTA 73, com percentual de inibição por competição, exclusão e desacoplamento de 88,7, 86,3 e 84,3, respectivamente, sem diferença significativa entre os mecanismos. Todas as cepas isoladas apresentaram inibição significativamente maior por desacoplamento em comparação ao *L. casei* 01 da Christian Hansen. Somente o isolado *L. rhamnosus* DTA 73

apresentou inibição significativamente maior do patógeno nos três mecanismos em comparação ao probiótico comercial.

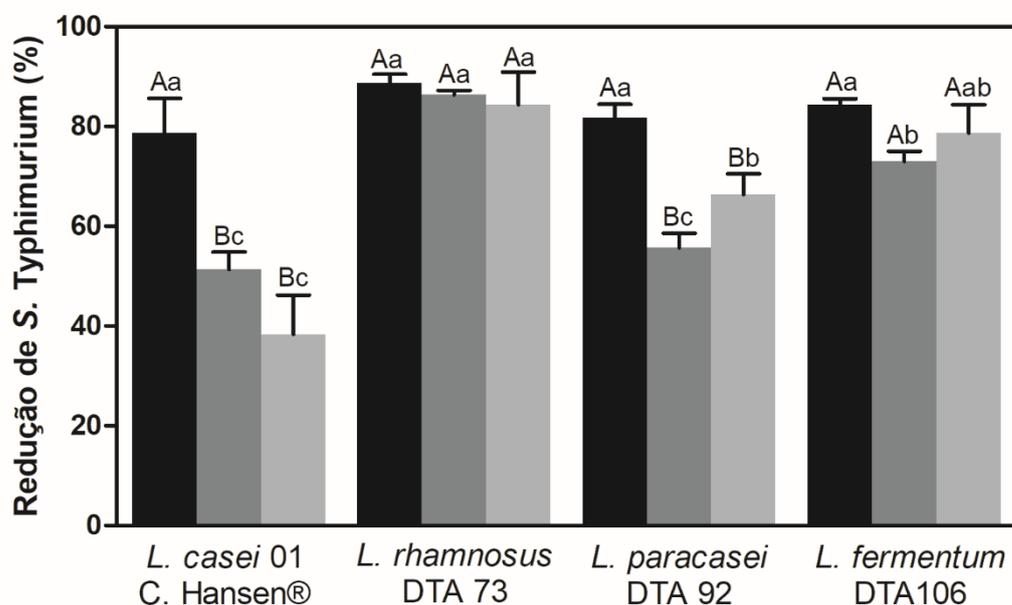
Um mecanismo pelo qual os probióticos são capazes de promover uma barreira contra micro-organismos patogênicos é a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos (PAMs). Acredita-se que esses peptídeos produzidos promovam propriedades probióticas, pois auxiliam na colonização de microrganismos comensais, inibem diretamente patógenos e sinalizam e modulam o sistema imunológico do hospedeiro (HARDY; HARRIS; LYON; BEAL *et al.*, 2013). No estudo *in vivo* realizado em 2007, houve uma redução significativa de *S. Typhimurium* nos grupos de porcos infectados com o patógeno e tratados com diferentes cepas de lactobacilos. O grupo controle não tratado exibiu uma contagem média de *S. Typhimurium* nas amostras de fezes 200 vezes maior em comparação aos grupos tratados com probióticos (CASEY; GARDINER; CASEY; BRADSHAW *et al.*, 2007).

Vários fatores importantes estão ligados à adesão de lactobacilos às células epiteliais do hospedeiro, como a presença do ácido lipoteicóico na superfície celular da bactéria, proteína S da camada superficial, peptidoglicano e capacidade de auto-agregação celular. A capacidade das proteínas da camada S de lactobacilos aderirem às células do trânsito intestinal está associada à capacidade de inibição de patógenos; embora nem todos os lactobacilos tenham uma camada de proteína S (ZHANG; WANG; LIU; ZHAO *et al.*, 2013). Essas proteínas foram identificadas como capazes de inibir a adesão de *S. Typhimurium* e *Escherichia coli* O157 e após sua remoção ou interrupção, a capacidade de adesão e inibição contra patógenos foi reduzida (CHEN; XU; SHUAI; CHEN *et al.*, 2007).

Outro mecanismo que pode estar envolvido na inibição do patógeno é a resposta imunomoduladora que alguns micro-organismos probióticos são capazes de promover nas células epiteliais intestinais, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por patógenos e promovendo a secreção de citocinas anti-inflamatórias (TUO; SONG; SONG; LIU *et al.*, 2018). As células epiteliais intestinais desempenham um papel regulador essencial na homeostase da microbiota, permitindo uma resposta inata contra bactérias patogênicas. Além da barreira física, as CEIs estão envolvidas na

discriminação de bactérias patogênicas e subsequentes respostas imunes no ambiente intestinal (WANG; LI; CHEN; HUANG *et al.*, 2010). No estudo de ABRAMOV; KOSAREV; PRIPUTNEVICH; MACHULIN *et al.* (2020) foi possível observar que as cepas de *Lactobacillus crispatus* expressam a proteína da camada superficial (Slp), exibem atividade antagônica contra patógenos de origem alimentar e promovem atividade imunomoduladora nas células Caco-2 e HT-29. A cepa isolada de *L. plantarum* usada no estudo de ZHANG; TAO; SHAH e WEI (2016) mostrou um efeito antagônico contra *B. cereus* ATCC14579 produtora de enterotoxina e *B. cereus* HN001 patogênico *in vitro*. A cepa afetou o nível de expressão gênica das células Caco-2 induzida por *B. cereus*, sugerindo atividade imunomoduladora da cepa de lactobacilos.

Mais estudos *in vitro* são necessários para entender os mecanismos relacionados à capacidade de inibição de patógenos por nossas cepas isoladas, mais precisamente no que se diz respeito aos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta imune induzida pelas cepas.



**Figura 10:** Atividade inibitória de *Salmonella* Typhimurium por cepas de lactobacilos em células epiteliais intestinais (Caco-2) através dos mecanismos de competição (barras pretas), exclusão (barras cinza-escuros) e desacoplamento (barras cinza-claros). Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados *in vitro* do presente estudo indicam que todas as cepas de lactobacilos isoladas de origem humana têm capacidade de aderir às células hospedeiras e inibir patógeno. As cepas isoladas apresentaram desempenho semelhante à cepa probiótica comercial *L. casei* 01 da Christian Hansen. Embora as cepas apresentem baixa hidrofobicidade da superfície celular, as mesmas mostraram alta capacidade de adesão nas células Caco-2, sugerindo uma forte interação específica com a célula hospedeira para adesão e colonização. Quanto à inibição de biofilmes de patógenos, todas as cepas foram muito eficazes na inibição por exclusão e competição do biofilme de *S. Typhimurium*, mas não apresentaram a mesma eficácia através do mecanismo de desacoplamento. No entanto, a cepa *L. rhamnosus* DTA 73 mostrou uma inibição do patógeno semelhante nos 3 mecanismos em células Caco-2. Além disso, a inibição através dos 3 mecanismos apresentada pela cepa DTA 73 foi maior comparada à cepa probiótica comercial, sugerindo uma diferente resposta imunomoduladora induzida pela nossa cepa isolada na linhagem celular Caco-2.

São necessários mais testes *in vitro* e pesquisas em sistemas *in vivo* para avaliar os potenciais benefícios à saúde dessas cepas. Em geral, este estudo confirma o que é demonstrado em muitos outros estudos sobre o potencial do gênero lactobacilos como uma fonte importante para a descoberta de novos microrganismos benéficos à saúde humana.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOV, V. M.; KOSAREV, I. V.; PRIPUTNEVICH, T. V.; MACHULIN, A. V. *et al.* S-layer protein 2 of *Lactobacillus crispatus* 2029, its structural and immunomodulatory characteristics and roles in protective potential of the whole bacteria against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, 150, p. 400-412, 2020/05/01/ 2020.

ALIZADEH BEHBAHANI, B.; NOSHAD, M.; FALAH, F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. **Microbial Pathogenesis**, 136, p. 103677, 2019/11/01/ 2019.

ALTONSY, M. O.; ANDREWS, S. C.; TUOHY, K. M. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium*, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: Mediation by the mitochondrial pathway. **International Journal of Food Microbiology**, 137, n. 2, p. 190-203, 2010/02/28/ 2010.

ANNUK, H.; HYNES, S. O.; HIRMO, S.; MIKELSAAR, M. *et al.* Characterisation and differentiation of lactobacilli by lectin typing. **Journal of Medical Microbiology**, 50, n. 12, p. 1069-1074, 2001. Article.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BATISTA, A. L. D.; SILVA, R.; CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S. *et al.* Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, 38, p. 242-250, 2017/11/01/ 2017.

BELGUESMIA, Y.; ALARD, J.; MENDIL, R.; RAVALLEC, R. *et al.* In vitro probiotic properties of selected lactobacilli and multi-strain consortium on immune function, gut barrier strengthening and gut hormone secretion. **Journal of Functional Foods**, 57, p. 382-391, 2019/06/01/ 2019.

BU, X.-D.; LI, N.; TIAN, X.-Q.; HUANG, P.-L. Caco-2 and LS174T cell lines provide different models for studying mucin expression in colon cancer. **Tissue and Cell**, 43, n. 3, p. 201-206, 2011/06/01/ 2011.

BYRD, J. C.; BRESALIER, R. S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, 23, n. 1-2, p. 77-99, 2004. Review.

CANNON, J. P.; LEE, T. A.; BOLANOS, J. T.; DANZIGER, L. H. Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 24, n. 1, p. 31-40, Jan 2005.

CASEY, P. G.; GARDINER, G. E.; CASEY, G.; BRADSHAW, B. *et al.* A Five-Strain Probiotic Combination Reduces Pathogen Shedding and Alleviates Disease Signs in Pigs Challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, n. 6, p. 1858, 2007.

CHEN, P. X.; ZHANG, H.; MARCONE, M. F.; PAULS, K. P. *et al.* Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, 38, p. 675-685, 2017/11/01/ 2017.

CHEN, X.; XU, J.; SHUAI, J.; CHEN, J. *et al.* The S-layer proteins of Lactobacillus crispatus strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, 115, n. 3, p. 307-312, 2007/04/20/ 2007.

DAVOODABADI, A.; DALLAL, M. M. S.; LASHANI, E.; EBRAHIMI, M. T. Antimicrobial activity of Lactobacillus spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic Escherichia coli. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 8, n. 12, 2015. Article.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in Lactobacillus: A review. 4, n. 1, p. 106-122, 2004.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Lactobacillus SPP.: General Characteristics☆. *In: Reference Module in Food Science*: Elsevier, 2016.

DEL CARMEN, S.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; LEVIT, R.; AZEVEDO, V. *et al.* Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, 42, p. 122-129, 2017/01/01/ 2017.

DENG, K.; CHEN, T.; WU, Q.; XIN, H. *et al.* In vitro and in vivo examination of anticolonization of pathogens by Lactobacillus paracasei FJ861111.1. **Journal Of Dairy Science**, 98, n. 10, p. 6759-6766, 2015.

DEVI, S. M.; KURREY, N. K.; HALAMI, P. M. In vitro anti-inflammatory activity among probiotic *Lactobacillus* species isolated from fermented foods. **Journal of Functional Foods**, 47, p. 19-27, 2018/08/01/ 2018.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L. *et al.* Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, 93, n. 10, p. 4555-4564, 2010/10/01/ 2010.

DIAS, C. O.; DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, J.; PINTO, S. S.; DE OLIVEIRA SANTANA, F. C. *et al.* Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, 24, p. 26-36, 2018/08/01/ 2018.

FAGHFOORI, Z.; POURGHASSEM GARGARI, B.; SABER GHARAMALEKI, A.; BAGHERPOUR, H. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of probiotics effects on colorectal cancer. **Journal of Functional Foods**, 18, p. 463-472, 2015/10/01/ 2015.

FALAH, F.; VASIEE, A.; BEHBAHANI, B. A.; YAZDI, F. T. *et al.* Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. **Microbial Pathogenesis**, 131, p. 246-253, 2019/06/01/ 2019.

FAO/WHO. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO food and nutrition paper, 0254-4725 ; 85.**, n. Accessed from <https://nla.gov.au/nla.cat-vn3788914>, 2006.

FAYE, T.; TAMBURELLO, A.; VEGARUD, G. E.; SKEIE, S. Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. **Journal of Dairy Science**, 95, n. 2, p. 558-566, 2012/02/01/ 2012.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S. *et al.* Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, 109, n. S2, p. S35-S50, 2013.

GAGNON, M.; KHEADR, E. E.; LE BLAY, G.; FLISS, I. *et al.* In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, 92, n. 1, p. 69-78, 2004/04/01/ 2004.

GANDHI, A.; SHAH, N. P. Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like

Caco-2 cells. **Journal of Dairy Science**, 99, n. 4, p. 2594-2605, 2016/04/01/ 2016.

GUERRA, A.; JUNIOR, W.; SANTOS, G.; ANDRIGHETTO, C. *et al.* Lactobacillus paracasei probiotic properties and survivability under stress-induced by processing and storage of ice cream bar or ice-lolly. **Ciência Rural**, 08/15 2018.

HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J. *et al.* Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. **Nutrients**, 5, n. 6, 2013.

HIDALGO, I.; RAUB, T.; BORCHARDT, R. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. **Gastroenterology**, 96, p. 736-749, 04/01 1989.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. Introduction to the LAB. *In*: **Lactic Acid Bacteria**, 2014. p. 1-12.

HOSSAIN, M. I.; MIZAN, M. F. R.; ASHRAFUDOULLA, M.; NAHAR, S. *et al.* Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against Listeria monocytogenes biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. **LWT**, 118, p. 108864, 2020/01/01/ 2020.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nature Immunology**, 14, p. 685, 06/18/online 2013. Review Article.

KOLACEK, S.; HOJSAK, I.; BERNI CANANI, R.; GUARINO, A. *et al.* Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, 65, n. 1, p. 117-124, 2017.

KONINKX, J. F. J. G.; TOOTEN, P. C. J.; MALAGO, J. J. Probiotic bacteria induced improvement of the mucosal integrity of enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to Salmonella enteritidis 857. **Journal of Functional Foods**, 2, n. 3, p. 225-234, 2010/07/01/ 2010.

LABOISSE, C.; JARRY, A.; BRANKA, J. E.; MERLIN, D. *et al.* Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. **Proceedings of the Nutrition Society**, 55, n. 1, p. 259-264, 1996. Article.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L.; COCONNIER-POLTER, M.-H. The increase in mucin exocytosis and the upregulation of MUC genes encoding for

membrane-bound mucins induced by the thiol-activated exotoxin listeriolysin O is a host cell defence response that inhibits the cell-entry of *Listeria monocytogenes*. **Cellular Microbiology**, 7, n. 7, p. 1035-1048, 2005.

LIU, S.-n.; HAN, Y.; ZHOU, Z.-j. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. **Food Research International**, 44, n. 3, p. 643-651, 2011/04/01/ 2011.

LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, I.; SÁNCHEZ, B.; RUAS-MADIEDO, P. *et al.* Interaction of *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 with HT29 Cells

Influences Regulatory-T-Cell-Associated Chemokine Receptor

Expression. 78, n. 8, p. 2850-2857, 2012.

LÓPEZ, P.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A.; SUÁREZ, A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, 138, n. 1, p. 157-165, 2010/03/31/ 2010.

LY, D.; MAYRHOFER, S.; DOMIG, K. J. Significance of traditional fermented foods in the lower Mekong subregion: A focus on lactic acid bacteria. **Food Bioscience**, 26, p. 113-125, 2018/12/01/ 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Prokaryotic diversity: the bacteria**. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.: 2006. (Brock: biology of microorganisms).

MARTINS, A. A.; SANTOS-JUNIOR, V. A.; FILHO, E. R. T.; SILVA, H. L. A. *et al.* Probiotic Prato cheese consumption attenuates development of renal calculi in animal model of urolithiasis. **Journal of Functional Foods**, 49, p. 378-383, 2018/10/01/ 2018.

MASHAK, Z. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Isolated From Kashk-e Zard and Tarkhineh, Two Iranian Traditional Fermented Foods. 4, n. 2, p. 7-34692, 2016/5/1 %J Int J Enteric Pathog 2016.

MATSUO, K.; OTA, H.; AKAMATSU, T.; SUGIYAMA, A. *et al.* Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. **Gut**, 40, n. 6, p. 782-789, 1997. Article.

MENEZES, A. G. T.; MELO, D. d. S.; RAMOS, C. L.; MOREIRA, S. I. *et al.* Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. **Microbial Pathogenesis**, 140, p. 103969, 2020/03/01/ 2020.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H. *et al.* Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, 36, n. 2, p. 296-304, 2013/12/01/ 2013.

MOHANTY, D.; PANDA, S.; KUMAR, S.; RAY, P. In vitro evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic Lactobacillus plantarum DM 69 against Salmonella enterica. **Microbial Pathogenesis**, 126, p. 212-217, 2019/01/01/ 2019.

NAMPOOTHIRI, K. M.; BEENA, D. J.; VASANTHAKUMARI, D. S.; ISMAIL, B. Chapter 3 - Health Benefits of Exopolysaccharides in Fermented Foods. *In*: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C., *et al* (Ed.). **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. Boston: Academic Press, 2017. p. 49-62.

NISHIYAMA, K.; SUGIYAMA, M.; MUKAI, T. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. **Microorganisms**, 4, n. 3, p. 34, 2016.

NURAIIDA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. **Food Science and Human Wellness**, 4, n. 2, p. 47-55, 2015/06/01/ 2015.

OLEKSY, M.; KLEWICKA, E. Exopolysaccharides produced by Lactobacillus sp.: Biosynthesis and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 58, n. 3, p. 450-462, 2018/02/11 2018.

PATSOS, G.; CORFIELD, A. Management of the human mucosal defensive barrier: Evidence for glycan legislation. **Biological Chemistry**, 390, n. 7, p. 581-590, 2009. Review.

PIDUTTI, P.; FEDERICI, F.; BRANDI, J.; MANNA, L. *et al.* Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the Lactobacillus salivarius SGL 03. **124**, n. 2, p. 398-407, 2018.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; DIAS, C. O.; AMBONI, R. D. M. C. A potential technological application of probiotic microcapsules in lactose-free Greek-style yoghurt. **International Dairy Journal**, 97, p. 131-138, 2019/10/01/ 2019.

RAMA, G. R.; KUHN, D.; BEUX, S.; MACIEL, M. J. *et al.* Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. **International Dairy Journal**, 98, p. 25-37, 2019/11/01/ 2019.

RAMIAH, K.; VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. T. Surface-bound proteins of Lactobacillus plantarum 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and

their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. **Research in Microbiology**, 159, n. 6, p. 470-475, 2008/07/01/ 2008.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). 52, n. 7, p. 988-997, 2003.

RINKINEN, M.; WESTERMARCK, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. **Veterinary Microbiology**, 97, n. 1, p. 55-61, 2003/12/02/ 2003.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, n. 27, p. 12204-12209, 2010.

RUIZ-MOYANO, S.; GONÇALVES DOS SANTOS, M. T. P.; GALVÁN, A. I.; MERCHÁN, A. V. *et al.* Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. **LWT**, 114, p. 108388, 2019/11/01/ 2019.

SÁNCHEZ-TAPIA, M.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. Diet as Regulator of Gut Microbiota and its Role in Health and Disease. **Archives of Medical Research**, 50, n. 5, p. 259-268, 2019/07/01/ 2019.

SARIKAYA, H.; ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z. Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (I-EPSs) from *Lactobacilli* strains. **International Journal of Food Properties**, 20, n. 2, p. 362-371, 2017/02/01 2017.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. 28, n. 4, p. 405-440, 2004.

SHINDE, T.; VEMURI, R.; SHASTRI, M. D.; PERERA, A. P. *et al.* Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. **Journal of Functional Foods**, 52, p. 100-108, 2019/01/01/ 2019.

SLOVER, C. M.; DANZIGER, L. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, 30, n. 4, p. 23-27, 2008/02/15/ 2008.

TARRAH, A.; DA SILVA DUARTE, V.; DE CASTILHOS, J.; PAKROO, S. *et al.* Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of *Lactobacillus casei* group strains isolated from infant feces. **Journal of Functional Foods**, 54, p. 489-497, 2019/03/01/ 2019.

TASNIM, N.; ABULIZI, N.; PITHER, J.; HART, M. M. *et al.* Linking the Gut Microbial Ecosystem with the Environment: Does Gut Health Depend on Where We Live? **Frontiers in Microbiology**, 8, n. 1935, 2017-October-06 2017. Perspective.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U. *et al.* Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 104, n. 2, p. 465-477, 2008/02/01 2008.

TUO, Y.; SONG, X.; SONG, Y.; LIU, W. *et al.* Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. **Journal of Dairy Science**, 101, n. 6, p. 4822-4829, 2018/06/01/ 2018.

VASCONCELOS, F. M.; SILVA, H. L. A.; POSO, S. M. V.; BARROSO, M. V. *et al.* Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. **Food Research International**, 123, p. 697-703, 2019/09/01/ 2019.

VASIEE, A.; MORTAZAVI, S. A.; SANKIAN, M.; YAZDI, F. T. *et al.* Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**, 133, p. 103547, 2019/08/01/ 2019.

VIEIRA, M. A.; GUERRA, A. F.; LUCHESE, R. H. Mechanisms Of Pathogens Biofilm Reduction By Probiotic Bacteria. **Revista Higiene Alimentar**, Edição Especial, 2015.

WANG, B.; LI, J.; CHEN, J.; HUANG, Q. *et al.* Effect of live *Lactobacillus plantarum* L2 on TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 production in Caco-2 cells. **International Journal of Food Microbiology**, 142, n. 1, p. 237-241, 2010/08/15/ 2010.

WANG, J.; ZHANG, H.; DU, H.; WANG, F. *et al.* Identification and characterization of *Diutina rugosa* SD-17 for potential use as a probiotic. **LWT**, 109, p. 283-288, 2019/07/01/ 2019.

WOLTERS, M.; AHRENS, J.; ROMANÍ-PÉREZ, M.; WATKINS, C. *et al.* Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health – A systematic review conducted within the MyNewGut project. **Clinical Nutrition**, 38, n. 6, p. 2504-2520, 2019/12/01/ 2019.

WU, M.-H.; PAN, T.-M.; WU, Y.-J.; CHANG, S.-J. *et al.* Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. **International Journal of Food Microbiology**, 144, n. 1, p. 104-110, 2010/11/15/ 2010.

XU, X.; BAO, Y.; WU, B.; LAO, F. *et al.* Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics. **Food Chemistry**, 289, p. 250-258, 2019/08/15/ 2019.

XU, Y.; ZHOU, T.; TANG, H.; LI, X. *et al.* Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. **Food Control**, 111, p. 107057, 2020/05/01/ 2020.

ZHANG, W.; WANG, H.; LIU, J.; ZHAO, Y. *et al.* Adhesive ability means inhibition activities for lactobacillus against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. **Anaerobe**, 22, p. 97-103, 2013/08/01/ 2013.

ZHANG, Y.-C.; ZHANG, L.-W.; TUO, Y.-F.; GUO, C.-F. *et al.* Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. **Research in Microbiology**, 161, n. 8, p. 667-672, 2010/10/01/ 2010.

ZHANG, Z.; TAO, X.; SHAH, N. P.; WEI, H. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. **Journal of Dairy Science**, 99, n. 4, p. 2666-2674, 2016/04/01/ 2016.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70, 04/15 2020.