



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação histopatológica da ação probiótica do *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em modelo experimental de salmonelose induzida.

Victor Augusto Guedes de Carvalho

Orientador: Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia

João pessoa - PB

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação histopatológica da ação probiótica do *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em modelo experimental de salmonelose induzida.

Victor Augusto Guedes de Carvalho

Orientador: Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

João Pessoa - PB

2017

Catálogo na publicação
Universidade Federal da Paraíba
Seção de Catalogação da Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB

C331a Carvalho, Victor Augusto Guedes de.
Avaliação histopatológica da ação probiótica do lactobacillus rhamnosus EM1107 em modelo experimental de salmonelose induzida / Victor Augusto Guedes de Carvalho. – João Pessoa, 2017.
33 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba.
Orientador(a): Prof.º Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia.

1. Histopatologia. 2. Probiótico. 3. Salmonella. 4. Lactobacillus. I.
Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 616-091.8(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Victor Augusto Guedes de Carvalho

Avaliação histopatológica da ação probiótica do *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em modelo experimental de salmonelose induzida.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Hugo Enrique Méndez Garcia

Orientador

Claudence Rodrigues do Nascimento

Membro

Bruno Mendes Tenório

Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a EMBRAPA por fornecer o organismo objeto de estudo desse trabalho, assim como financiar o mesmo, sou também grato à UFPB e seu corpo docente e administrativo por me guiarem e darem o suporte necessário durante minha graduação.

Agradeço ao apoio dos professores e demais pesquisadores que auxiliaram na execução desse projeto, em especial Prof. Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia, Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia R. E. Queiroga, a patologista Prof^ª Dr^ª Cláudia Roberta Vieira de Figueiredo e a M^ª. Fernanda Rodrigues Leite Rolim, por me transmitirem conhecimento que sem dúvida será fundamental nos próximos anos.

Agradeço aos meus familiares por sempre me incentivarem e apoiarem na decisão de me tornar um biólogo, em especial à minha mãe Selma Verônica por ser o melhor exemplo de dedicação, esforço e responsabilidade para mim. Eu me espelho em você.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores que tive a oportunidade de ser aluno, pois todos de alguma forma acrescentaram algo na formação acadêmica que eu adquiri durante o curso.

Agradeço aos meus colegas de curso, por me darem ânimo e motivação em todos os momentos durante esses quatro anos. Em especial agradeço aos meus colegas de turma Matheus, Montenegro, Lívia, Pedro, Isabela, Ariosvaldo, Camila, Joevertton, Ighor, Suelton e Isabella. Vocês são minha inspiração de o quão capazes nós somos.

RESUMO

A salmonelose continua apresentando altas taxas de incidência em pessoas, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. O tratamento convencional da salmonelose é feito por meio de antibióticos, entretanto, este pode causar alguns efeitos prejudiciais ao organismo tratado, tais como disfunção imune, digestiva e hepática, além de tornar a população de bactérias remanescente mais resistente. Nesse contexto estão sendo estudadas alternativas ao uso de antibióticos no tratamento de doenças. Uma das opções é o uso de organismos probióticos, que podem agir de forma preventiva ao fortalecer o sistema imune, além de ajudar o organismo a se defender de infecções já estabelecidas. Este estudo visou avaliar a ação probiótica de uma nova cepa de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 em animais infectados por *Salmonella enterica*, analisando-se parâmetros histopatológicos para determinar a eficácia do tratamento à base do probiótico.

Palavras-chave: Probiótico, Histopatologia, *Salmonella*, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

Salmonellosis continues to have high incidence rates in humans and is considered one of the major public health problems, especially in underdeveloped and developing countries. Conventional treatment of salmonellosis is the use of antibiotics, however, it can cause some detrimental effects on the treated organism, such as immune, digestive and hepatic dysfunction, in addition to making the remaining bacterial population more resistant. In this context, alternatives to the use of antibiotics in the treatment of diseases are being studied. One of the options is the use of probiotic organisms, which can act in a preventive way by strengthening the immune system, as well as helping the body to defend itself against established infections. This study aimed to evaluate the probiotic action of a new strain of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in animals infected with *Salmonella enterica*, histopathological parameters were used to determine the efficacy of probiotic treatment.

Keywords: Probiotic, Histopathology, *Salmonella*, *Lactobacillus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características histológicas do intestino.....	12
Figura 2 - Células caliciformes e criptas intestinais do cólon.....	12
Figura 3 - Características histológicas do Fígado.....	13
Figura 4 - Parênquima do baço.....	14
Figura 5 - GCP-1 Íleo.....	15
Figura 6 - GCP-2 Baço.....	16
Figura 7 - GCP-1 Fígado.....	16
Figura 8 - GPL-2 Cólon.....	18
Figura 9 - GPL-1 Baço.....	18
Figura 10 - GPL-4 Fígado.....	19

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Título: Esquema experimental.....Anexos

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	02
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	02
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	02
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
3.1 - SALMONELOSE.....	03
3.2 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PROBIÓTICOS.....	04
3.3 - PROBIÓTICOS: UMA ALTERNATIVA AO USO DOS ANTIBIÓTICOS NO TRATAMENTO À SALMONELOSE.....	05
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	07
4.1 - DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	07
4.2 - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS.....	07
4.3 - ENSAIO <i>IN VIVO</i>.....	08
4.4 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	10
5. RESULTADOS.....	11
5.1 - DESCRIÇÃO ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS ANALISADOS.....	11
5.2 - DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DOS TECIDOS ANALISADOS.....	11
5.3 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	14
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÕES.....	20
8. REFERÊNCIAS.....	21
ANEXOS.....	24

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas através da ingestão de alimentos hoje são tidas como um dos maiores problemas de Saúde Pública, entre elas está a salmonelose, doença causada por bactérias do gênero *Salmonella*. Após a ingestão, as bactérias se passam pelo estômago, local onde algumas morrem devido principalmente à acidez do meio. Em seguida aderem-se e adentram nas células do tecido epitelial de revestimento na região íleo-cecal causando a morte dessas células, desencadeando assim o processo inflamatório nesse órgão. Alguns dos sintomas causados pela proliferação de *Salmonella* são diarreia, dores abdominais, febre e náuseas.

O Tratamento convencional da salmonelose focado na administração de antibióticos além de eliminar a população de *Salmonella*, diminuem a sobrevivência de outras bactérias importantes para nosso organismo, comprometendo principalmente os sistemas imunológico e digestivo humano, sabendo disso, buscam-se alternativas na terapêutica da salmonelose.

Pesquisas desenvolvidas a respeito dos probióticos vem crescendo de forma exponencial nos últimos anos (GUARNER et al, 2011) e os resultados obtidos vêm chamando a atenção da comunidade científica e profissionais da área da saúde devido aos seus benefícios para a saúde (FAO/WHO, 2002). O consumo de probióticos pode resultar numa melhora em funções imunológicas, digestivas e respiratórias, além de aliviar sintomas de doenças infecciosas como a salmonelose (FLESCHE et al., 2014), sabendo disso, a utilização de probióticos mostra-se como potencial de medicina preventiva, protegendo o indivíduo de possíveis futuras infecções. Micro-organismos do gênero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces* são conhecidos por sua ação probiótica. Já foi registrada a ação probiótica de algumas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* na prevenção e tratamento da diarreia infecciosa aguda, assim como a diarreia associada ao uso de antibióticos e síndrome do intestino irritável (GUARNER et al, 2011).

O objeto de estudo desse trabalho é a cepa EM1107 de *Lactobacillus rhamnosus* isolada de queijo de coalho de leite de vaca, na "Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical", EMBRAPA/Fortaleza-CE. Diversos estudos *in vitro* buscando investigar o potencial probiótico dessa cepa já foram realizados, entretanto, mais estudos são necessários antes de aprovar a comprovação desse organismo como um probiótico e sua disponibilização no mercado, análises da ação do *L. rhamnosus* EM1107 em modelo animal se fazem importantes nessas circunstâncias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos probióticos da cepa EM1107 de *Lactobacillus rhamnosus* no intestino, fígado e baço de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) desafiados com *Salmonella enterica* do sorovar Enteritidis P125109.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as possíveis alterações nos tecidos epiteliais e conjuntivos dos órgãos estudados;
- Verificar a ocorrência de inflamação de tecido nos diferentes grupos testados;
- Identificar a abundância de muco ou glicoproteínas no intestino.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. SALMONELOSE

A salmonelose é uma doença relacionada a bactérias gram negativas do gênero *Salmonella* que compreende duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Existem seis subdivisões da *Salmonella enterica*: *salamae*, *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; enquanto a *Salmonella bongori* não possui subespécies (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2011). São reconhecidos mais de 2.400 sorotipos de *Salmonella enterica*, dos quais cerca de 1.400 pertencem à subespécie *enterica*. Os sorotipos mais encontrados em humanos são *Enteritidis* e *Typhimurium* (CHEN et al, 2013).

Pesquisas relacionadas a surtos de doenças causadas pela alimentação vêm mostrando que a ocorrência dessas enfermidades tem aumentado principalmente as causadas por bactérias do gênero *Salmonella* do sorotipo Enteritidis (CARDOSO et al, 2006). A cada ano cerca de 1,4 milhões casos de salmonelose são registrados na América do Norte, sendo necessário tratamento hospitalar em aproximadamente 22% desses casos (CHEN et al, 2013).

A salmonelose é principalmente adquirida por meio da ingestão de alimentos de origem de animais contaminados com *Salmonella spp*, tanto com infecções subclínicas, quanto portadores assintomáticos. Pode também ser adquirida através de equipamentos contaminados que manuseiem determinado alimento (CARDOSO et al, 2006), é possível ainda se infectar através da ingestão de líquidos, tais como a água, por meio do solo, ou com contato direto com um indivíduo infectado (SILVA JUNIOR et al, 2005). Os principais alimentos relacionados à infecção por *Salmonella* são os produtos lácteos, ovos, carnes e derivados, por apresentarem níveis de umidade alta e teor protéico adequados para o crescimento das bactérias (GERMANO et al, 2015).

Após serem ingeridas e sobreviverem ao suco gástrico, às bactérias *Salmonella spp*. atravessam a mucosa intestinal e aderem-se às células do tecido epitelial de revestimento do intestino delgado, local onde se proliferam (OLIVEIRA et al, 2013). As bactérias podem induzir as células epiteliais do intestino a permitir com que estas penetrem no meio intracelular através de uma complexa cascata de reações bioquímicas que leva ao rearranjo de proteínas do citoesqueleto das células, num processo semelhante à fagocitose (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2011). Estes processos eventualmente causam a morte das células do intestino desencadeando processo inflamatório e estabelecendo o quadro de enterocolite.

Lipopolissacarídeos presentes na parede celular da *Salmonella spp.* podem ativar macrófagos e desencadear o processo de degranulação, liberando entre outras moléculas a prostaglandina E2, que ao interagir com seus receptores nas células do intestino, sinalizam para que as células ativem AMP cíclico, impedindo a absorção de água e estimulando a liberação de água para a luz do intestino, resultando em diarreia (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2011; LIANG et al, 2005).

A *Salmonella spp.* pode ultrapassar as células da mucosa intestinal e interagir com fagócitos, caso sejam fagocitadas e sobreviverem nessas células, a bactéria adquire capacidade de atingir outros órgãos (geralmente baço e fígado) por meio do deslocamento dos fagócitos pelo organismo e se proliferar nesses locais, quando isso ocorre, se diz que a infecção se tornou sistêmica e, nesses casos a infecção pode mais facilmente levar à morte(OLIVEIRA et al, 2013).

3.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PROBIÓTICOS

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que quando administrado em quantidades ideais a determinado indivíduo, irá atribuir benefícios à sua saúde (GUARNER et al, 2011), sendo as espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* mais comumente utilizadas para essa finalidade (FAO/WHO, 2002). Entre os benefícios comprovados devido à utilização de probióticos, têm-se a prevenção e tratamento da diarreia de diversas patogenias em adultos e crianças, auxílio na digestão, redução da intolerância à lactose, redução da constipação, prevenção da enterocolite, alívio dos sintomas da síndrome do intestino irritado, aumento da imunidade (FLESCH et al., 2014), tratamento de infecções vaginais, aumento da sobrevivência de recém-nascidos pré-termo e efeito anti carcinogênico (GUARNER et al, 2011).

A exclusão competitiva (EC) é conhecida por ser um dos principais mecanismos que geram os benefícios causados pela presença dos probióticos num hospedeiro, diz-se que está ocorrendo exclusão competitiva quando determinada população é incapaz de se estabelecer em um ambiente devido à presença de outra população (OKAMOTO et al, 2005), se a população a ser reduzida for de um micro-organismo nocivo a determinado hospedeiro, espera-se que ocorram benefícios à sua saúde. No caso do trato gastrointestinal humano, a EC pode ocorrer entre as populações de organismos da microbiota, o que inclui os probióticos. Espécies de *Lactobacillus* podem inibir a colonização de bactérias patogênicas por liberar substâncias como ácidos que reduzem o pH intestinal, competir por locais de adesão na

mucosa, assim como por nutrientes e por favorecer o crescimento de outras populações de organismos probióticos (FLESCH et al., 2014).

É importante esclarecer que os resultados encontrados em estudos com determinadas cepas de probióticos não podem ser generalizados para outras cepas, ainda que sejam da mesma espécie devido a diversos fatores evolutivos derivados das variações genéticas presentes em diferentes populações desses organismos, essas diferenças podem influenciar na dosagem que deve ser administrada, nos efeitos à saúde do hospedeiro, mudanças na interação com o veículo em que o probiótico é inserido (GUARNER et al, 2011).

3.3 PROBIÓTICOS: UMA ALTERNATIVA AO USO DOS ANTIBIÓTICOS NO TRATAMENTO À SALMONELOSE

Torna-se cada vez mais frequente encontrar populações bacterianas resistentes a múltiplas substâncias antibióticas, incluindo bactérias do gênero *Salmonella* (KAY et al, 2013). Para a comunidade acadêmica é evidente que o motivo dessa resistência é o processo de seleção desses micro-organismos em consequência ao uso em larga escala dos antibióticos (LI et al, 2015). Bactérias podem adquirir essa resistência pela transferência horizontal de genes que afere capacidade à bactéria de sobreviver ao uso dos antibióticos, essa característica pode inicialmente surgir devido a alguma mutação e ser passada para vários indivíduos, criando a partir daí uma população resistente (BLAIR et al, 2014). Devido ao seu ciclo de vida que inclui hábito parasitário intracelular, as bactérias do gênero *Salmonella* conseguem manter mais indivíduos vivos durante algum tratamento a base de antibióticos (MOAL et al, 2014), o que reduz a eficácia dos antibióticos no tratamento da salmonelose.

Além da problemática da resistência microbiana, o uso dos antibióticos está correlacionado com alguns problemas de saúde como a obesidade (FIOL et al, 2015), diabetes tipo 1 e 2, asma, alergias e doenças inflamatórias do intestino (BLASER et al, 2016). Muitas dessas consequências estão relacionadas com o fato de que os antibióticos muitas vezes não são tão específicos quanto ao seu alvo e reduzem além da população de bactérias patogênicas, populações probióticas e benéficas ao organismo, o que afeta o metabolismo, imunidade e outros aspectos fisiológicos (KORPELA et al, 2016).

A ação dos probióticos é bem documentada no trato gastrointestinal, local onde a infecção da *Salmonella* é iniciada e estabelecida, sabe-se que cepas de *Lactobacillus* atuam influenciando o funcionamento imunológico, fisiológico, químico, físico e modulando o microbioma nos locais em que estão presentes (KUISMA et al, 2003; WENFENG et al,

2015). Os principais mecanismos de ação realizados pelos probióticos no combate à salmonelose são: (1) A modulação do microbioma intestinal por alterar a concentração de oxigênio, tornando inviável a colonização de outras populações de bactérias muitas vezes patogênicas (KUISMA et al, 2003); (2) Interferir em mecanismos moleculares dos organismos patogênicos, tais como a interação com sítios de ligação, ação de toxinas, entre outros fatores de virulência (MOAL et al, 2014); (3) Ativação do sistema imunológico, correlacionada com a presença de *Lactobacillus* por promover a produção de IgA (OKAMOTO et al, 2005); (4) Produção de moléculas com ação antimicrobiana, tais como ácidos láticos e outros metabólitos (MOAL et al, 2014); (5) Produção de enzimas digestivas como a amilase e lactase por exemplo (WENFENG et al, 2015).

Em um estudo in vitro foi demonstrado que o *Lactobacillus acidophilus* LB é capaz de conter a infecção intracelular de *Salmonella enterica* de Sorotipo Typhimurium SL1344 em enterócitos humanos de linhagem Caco-2/TC-7 (COCONNIER et al, 2000), um dos principais obstáculos do tratamento da salmonelose baseado em antibióticos. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (CIMPERMAN et al, 2011) e *Lactobacillus casei* DN-114 001 (TERAN et al, 2009) mostraram-se bastante eficientes em reduzir a duração e severidade da diarreia aguda infecciosa em crianças, *L. casei* DN-114 001 ainda atuou positivamente na prevenção da diarreia em crianças e adultos. Existem evidências de que o uso de probióticos é eficiente no tratamento de doenças associadas ao uso de antibióticos, entretanto, o mecanismo de ação ainda é incerto (NAMI et al, 2014). Estudos com a utilização de probióticos no tratamento e prevenção de doenças vêm crescendo e ganhando atenção, entretanto, ainda são necessários muitos experimentos para comprovar os benefícios de diversas cepas, assim como entender os mecanismos de ação destas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Os ensaios com animais foram realizados no Laboratório de Experimentação Animal CCS/UFPB; a preparação dos inóculos de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis P125109 foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos DN/CCS/UFPB; O processamento do material para análise histopatológica foi realizado no Laboratório de Processamento de Amostras Biológicas e Histotecnologia – LAPBH ETS/CCS/UFPB.

4.2 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

A cultura de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 utilizada no experimento foi obtida na Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical da Embrapa Caprinos e Ovinos/Sobral, Ceará, Brasil. Foram feitos repiques da cultura em ágar MRS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), incubada em estufa durante 24 horas, temperatura de 37° Celsius, após esse tempo a cepa foi inoculada em caldo MRS (Sigma-Aldrich) e novamente foi deixado na estufa durante 18 horas a 37° Celsius. Em seguida os caldos com probióticos foram centrifugados (4500 g, 15min, 4 °C), passaram por lavagem em solução salina estéril (NaCl, 0,85%) duas vezes e suspensas em solução salina estéril. As concentrações ideais dos inóculos foram de 10⁸ UFC/mL, para aferir se as concentrações estavam corretas foi utilizado um espectrofotômetro (SF200DM- UV-Vís, Bel Engineering, Monza, Italy) para realizar leituras de densidade óptica para um comprimento de onda de 625 nm (DO₆₂₅), correspondente à concentração ideal das bactérias.

O preparo do inóculo de *Salmonella* diferente, mudando apenas a composição do ágar e caldo utilizado, sendo o ágar BHI (Sigma-Aldrich) e o caldo BHI (Sigma-Aldrich). A cultura usada foi a *Salmonella enterica* de sorovar Enteritidis P125109, fornecida pelo Dr. Paul Andrew Barrow da “School of Veterinary Medicine and Science”, da “University of Nottingham” na Inglaterra.

4.3 ENSAIO *IN VIVO*

O experimento foi realizado com um total de 36 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar albinos, sendo divididos em três grupos: (1) grupo controle negativo (GCN) (n= 4). O GCN corresponde a animais cuja dieta não foi adicionada de probióticos e sem desafio com *Salmonella spp.*; (2) grupo controle positivo (GCP) (n= 16) com quatro caixas (GCP-1, GCP-2, GCP-3 e GCP-4) com quatro indivíduos cada. GCP corresponde a animais sem dieta adicional de probióticos, mas, desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis; (3) grupo positivo e com *Lactobacillus* (GPL) (n= 16) também com quatro caixas (GPL-1, GPL-2, GPL-3 e GPL-4) com quatro indivíduos em cada grupo. No grupo GPL todos os animais foram infectados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e foram nutridos com caldo probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107. Todos os indivíduos eram machos, no início do experimento tinham cinco semanas de idade.

Todos os grupos tiveram cuidados padronizados, os quatro animais de cada caixa eram identificados por meio de marcas feitas em suas caudas com caneta permanente de tinta não tóxica. Os animais foram identificados como: sem marca (SM), indivíduos que não apresentavam marcas na cauda; uma marca (1M), representando indivíduos que apresentavam apenas uma marca na cauda; duas marcas (2M), correspondente a animais que possuíam duas marcas na cauda; três marcas (3M), ratos com três marcas na cauda.

A quantidade de ração (Rhostrer) disponibilizada era de 30g por indivíduo para dois dias, após esses dias, as sobras eram pesadas e o peso anotado, em seguida eram novamente colocadas 30g por indivíduo. O peso de cada animal também era aferido e anotado a cada dois dias, caso algum comportamento diferente ou algum sintoma de doença em algum animal fosse notado durante a pesagem, eram realizadas anotações sobre isso e nos dias seguintes aquele indivíduo era observado com mais atenção. Os ratos tinham acesso livre à água *ad libitum*, todo dia a quantidade de água consumida era repostada. A maravalha de cada gaiola era trocada a cada três dias, havia um timer no circuito das lâmpadas para propiciar um ciclo de luz para os animais, sendo 12 horas com luz e 12 horas sem luz, esses períodos coincidiam com o ciclo diário local, a temperatura no ambiente era mantida em 25°.

Um dos procedimentos que variou entre os grupos foi a gavagem intragástrica, procedimento ao qual se insere uma sonda flexível ligada a uma seringa na boca do animal, objetivando chegar próximo ao estômago para ser adicionada alguma substância ao conteúdo estomacal do animal, a substância variava de acordo com o grupo ao qual estava sendo administrada, sendo gavagem intragástrica com solução fisiológica salina nos animais dos

grupos GCN e GCP e inoculo de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 nos animais do grupo GCP, a indução à salmonelose por meio do inoculo de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis também foi feita por gavagem intragástrica. Independentemente da substância administrada, a quantidade era de 2 mL por animal todo dia durante 25 dias dado o início do experimento.

O experimento do grupo controle negativo ocorreu durante o mês de junho de 2016, enquanto os ensaios dos grupos controle positivo e o grupo positivo e com *Lactobacillus* aconteceram no mês de agosto desse mesmo ano. Os animais foram obtidos do Biotério Thomas George - UFPB, ao chegarem ao laboratório foram marcados e separados em seus respectivos grupos, no dia seguinte o experimento era iniciado. 14 dias após o início do experimento foi administrado streptomina aos animais do grupo GCP e GPL (0,2 mg por animal via gavagem intragástrica), mas antes foram retiradas a água e ração desses animais. No 15º dia por meio da gavagem foi adicionado 100µL de bicarbonato de sódio a 10% dissolvido em solução salina no conteúdo estomacal dos animais dos grupos GCP e GPL para tornar mais susceptível a infecção da *Salmonella* sp., 30 minutos depois foi realizado o desafio com 1 mL de 1×10^8 UFC/mL de *S. Enteritidis* uma vez em cada animal desse grupo, a gavagem nos dias seguintes foram realizadas da mesma forma que vinham sendo feitas anteriormente.

As eutanásias foram realizadas nos dias 16º, 18º, 22º e 25º do período experimental para a coleta de órgãos para análise histopatológica (Quadro 1). Todos os quatro animais de uma caixa dos grupos GCP e GPL eram eutanasiados em cada um desses dias, enquanto o grupo GCN tinha apenas um animal eutanasiado. No dia da eutanásia de determinado indivíduo, este não recebia gavagem intragástrica, entretanto, para os demais animais o procedimento era seguido normalmente.

Os ratos a serem eutanasiados foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (0,4 mL/100 g de peso) e Cloridrato de Xilazina (0,1 mL/100 g de peso) administrados em via intramuscular na região interna da coxa do animal, o tempo necessário era aguardado até o anestésico fazer o efeito completamente, em seguida o animal era colocado em uma mesa cirúrgica com o ventre virado pra cima, seus membros eram fixados na mesa e passado álcool a 70% na região abdominal onde um corte longitudinal no plano mediano seguindo o sentido do eixo craniocaudal, esse corte iniciava na parte inferior do abdômen do animal e ia até o meio da caixa torácica, inicialmente apenas a pele era cortada, após o corte da pele era colocado álcool a 70% na região do corte, o material cirúrgico utilizado era substituído por outro esterilizado e em seguida a camada muscular era cortada de forma a tornar possível a visualização dos órgãos internos, o esterno do animal era cortado a fim de se ter acesso ao

coração e sem seguida era realizada a técnica de punção cardíaca, que consiste na retirada do sangue do animal pelo coração, para isso era utilizada uma seringa de 5mL. Com o animal devidamente eutanasiado. Em seguida, eram coletados fragmentos do fígado, baço, íleo e cólon. O material foi imediatamente imerso em solução fixadora (Líquido de Bouin) e armazenado numa geladeira para ser posteriormente processado.

Durante todo o tempo no laboratório foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI) descartáveis, tanto os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) quanto os ratos, maravalha, e qualquer outro objeto que teve contato com os animais ao fim da eutanásia era colocado em sacos para autoclavagem e descontaminados em autoclave antes de ser descartados. O material cirúrgico era autoclavado antes e após os procedimentos. A bancada, mesa cirúrgica, gaiolas e equipamentos de laboratório eram descontaminados após a eutanásia ou quando necessário.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a fixação do material coletado, estes foram novamente seccionados para o tamanho aproximado de 1cm³ utilizando uma lâmina de barbear (Gillette) e colocados em cassetes histológicos, em seguida lavados em água corrente por 24 horas. Após a lavagem iniciou-se a desidratação dos fragmentos, sendo os cassetes submersos em concentrações crescentes de álcool a 70%, 80%, 90% e absoluto, durante 30 minutos em cada uma dessas soluções, sendo a última etapa repetida uma vez, em seguida foi realizado o processo de diafanização, durante uma hora com uma repetição. Para infiltração e confecção do bloco foi utilizada parafina histológica com ponto de fusão de 56 – 60°C.

A microtomia foi realizada utilizando um micrótomo rotativo manual, os cortes histológicos foram feitos com 4 µm de espessura, submetidos à coloração de Hematoxilina de Harris e Eosina (H&E) para a observação da morfologia e aspectos gerais dos tecidos. Foi utilizado Entelan e lamínulas de vidro para a montagem das lâminas.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS ANALISADOS

O intestino dos ratos apresenta morfologia semelhante ao intestino humano, ou seja, é um órgão tubular cujo diâmetro e aspectos variam de acordo com a região do órgão. O fígado e baço são órgãos glandulares ricamente vascularizados localizados no abdome dos ratos. O fígado tem quatro lobos, é localizado logo abaixo do diafragma e ocupa grande espaço na cavidade abdominal, sendo predominante no lado direito do corpo, já o baço não apresenta divisões de lobos e é localizado na região superior esquerda da cavidade abdominal. O fígado apresenta regiões basais (conectadas a vasos de grande porte) e periféricas (distantes dos vasos de grande porte e nas extremidades do órgão). Foram coletados fragmentos do íleo e cólon proximal de cada animal e foram clivados em sentido transversal ou ao longo do maior eixo quando necessário.

5.2 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DOS TECIDOS ANALISADOS

A principal característica do tecido epitelial de revestimento do intestino delgado é a presença de projeções digitiformes (vilosidades) [Figura 1] e de microvilosidades, representando um tipo de especialização da membrana celular na região apical das células, formando projeções que aumentam a superfície de contato dessas células com o meio extracelular. Ao longo do intestino são encontradas formações glandulares que se assemelham a invaginações do tecido epitelial chamadas de criptas intestinais ou criptas de Lieberkühn [Figura 2]. No epitélio de revestimento intestinal observam-se as células caliciformes, responsáveis pela produção de mucina que ao entrar em contato com a água forma o muco, o qual é liberado por via apócrina e merócrina. Na coloração H&E as células caliciformes são identificadas por apresentarem coloração mais clara que as demais células do epitélio devido à presença de muco em seu meio intracelular [Figura 2].

As vilosidades intestinais no íleo são menores se comparadas com as do jejuno, mas, maiores que as do duodeno. No íleo é encontrada grande quantidade de células caliciformes e algumas criptas intestinais. No cólon não são encontradas vilosidades intestinais, entretanto, podem se observar muitas criptas intestinais e também são encontradas muitas células caliciformes.

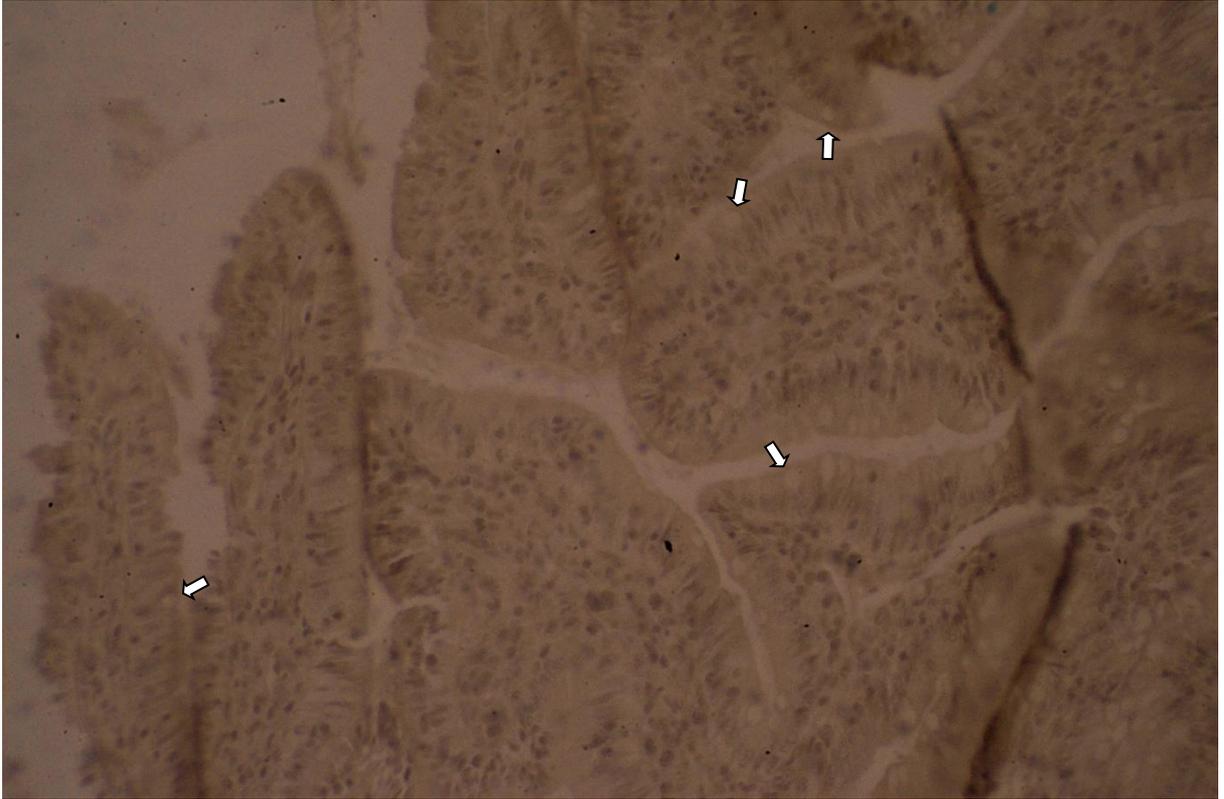


Figura 1 - Características histológicas do intestino.

Vilosidades intestinais do íleo. As setas apontam para as células caliciformes.

Aumento de 100x

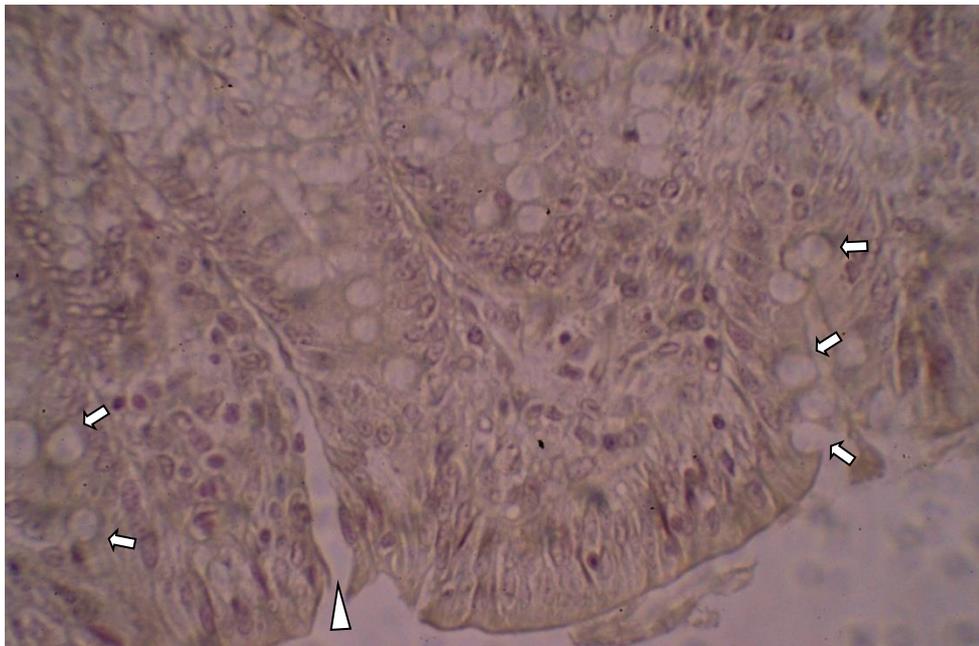


Figura 2 - Células caliciformes e criptas intestinais do cólon.

Fotomicrografia epitélio do cólon. As setas apontam para as células caliciformes. Cabeça de seta aponta para uma cripta intestinal. Aumento de 400x.

O componente estrutural básico do fígado são as células chamadas de hepatócitos, células epiteliais com formato poliédrico com núcleo arredondado e cromatina descondensada [Figura 3]. O aglomerado de hepatócitos delimitado por tecido conjuntivo do tipo adiposo é denominado lóbulo. No centro de um lóbulo é encontrada uma veia centro-lobular onde convergem os sinusóides hepáticos, que são canais formados entre os hepatócitos em um lóbulo conduzindo sangue até a veia centro-lobular.

No baço são encontrados nódulos linfóides dispostos ao longo do tecido, em geral esses nódulos apresentam um ramo arterial, que nem sempre é centralizado [Figura 4]. Normalmente são encontrados linfócitos próximos às artérias existentes no baço, esses linfócitos em conjunto com as artérias formam estruturas conhecidas por bainha periarteriolar. Os nódulos linfóides e a bainha periarteriolar compõem o que é chamado de polpa branca do baço. A polpa vermelha do baço é constituída de sinusóides e de linfócitos e outros tipos celulares presentes nessa matriz. Uma cápsula formada por tecido conjuntivo propriamente dito denso modelado reveste o órgão como um todo, em algumas regiões existe o prolongamento desse tecido em direção à região interna do baço, formando estruturas chamadas de trabéculas de tecido conjuntivo, a cápsula do baço é revestida externamente por tecido epitelial de revestimento simples pavimentoso.

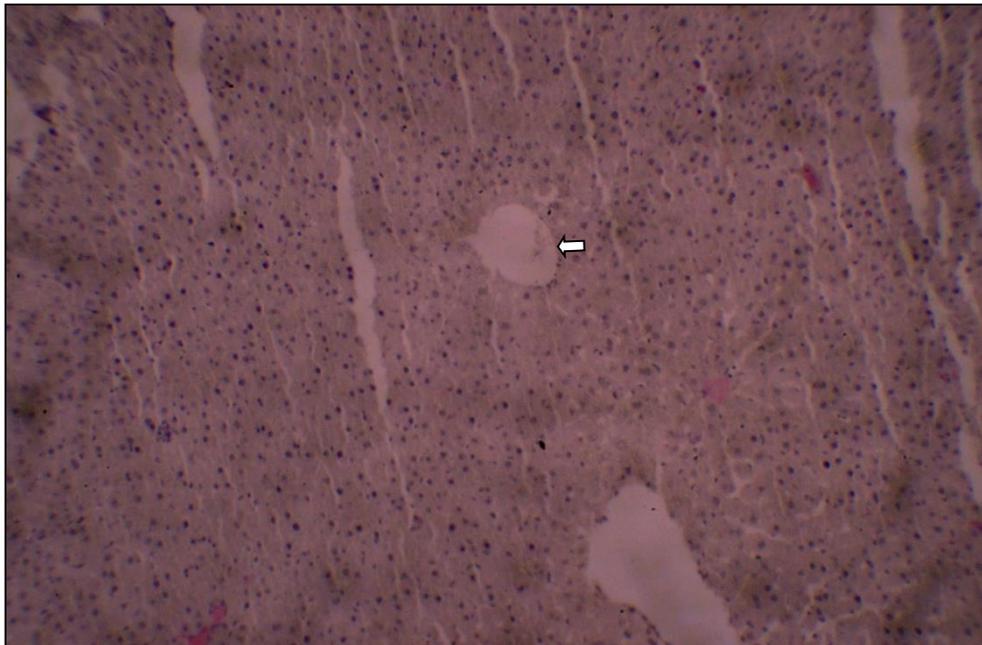


Figura 3 - Características histológicas do Fígado.

Tecido hepático saudável. A seta aponta um vaso sanguíneo.

Aumento de 100x.

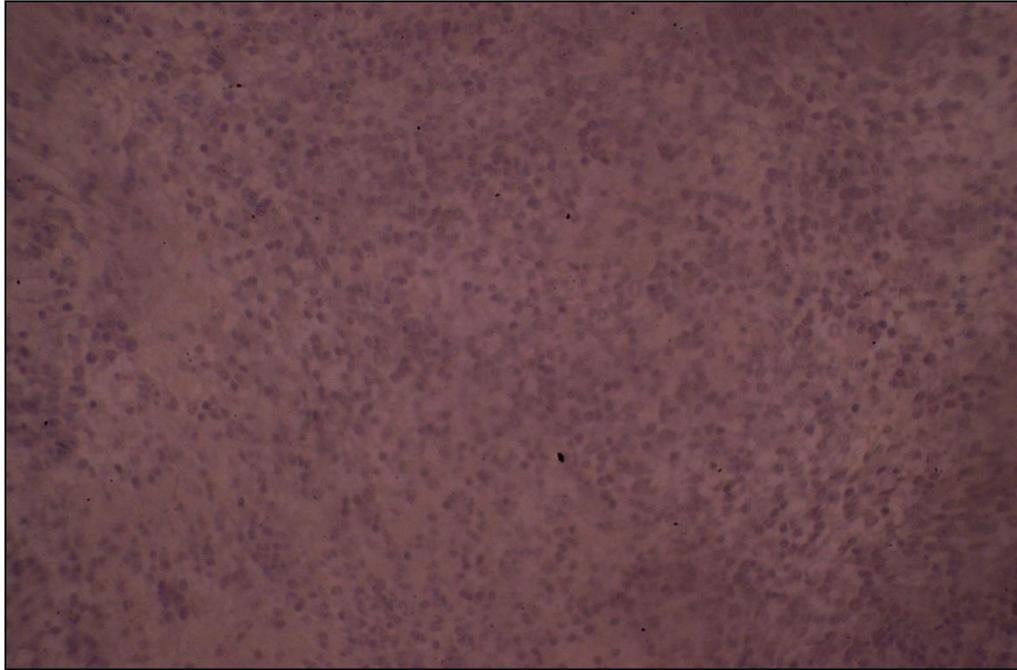


Figura 4 - Parênquima do baço

Polpa vermelha do tecido do baço. Aumento de 400x.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram observadas várias lesões e alterações teciduais nas amostras dos animais do Grupo Controle Positivo (GCP), indivíduos foram desafiados à *Salmonella enterica* do sorovar Enteritidis P125109 e foram realizadas gavagens intragástricas com solução salina.

No indivíduo da caixa 1 do GPC foi detectado aumento da produção de muco, hiperplasia mucóide e superatividade das células das criptas intestinais no Íleo [Figura 5]; no Baço foi observada intensa inflamação no folículos linfóides, desorganização do parênquima esplênico com áreas focais de necrose e presença de hemossiderina; no fígado foi encontrada degeneração hidrópica, e necrose nos hepatócitos, também se observou hiperemia e material fracamente eosinofílico disperso no parênquima, compatível com edema, além disso foram encontrados hepatócitos com degeneração balonizante compatível com necrose [Figura 7].

No animal da caixa 2, a análise do Baço evidenciou uma desorganização do parênquima esplênico com inflamação crônica [Figura 6]; no cólon foi observado inflamação de impermeio entre as glândulas, assim como infiltrado leucocitário; o tecido do fígado apresentou hiperemia e inflamação no parênquima hepático.

No animal da caixa 3, foi observado no íleo pouca inflamação nas criptas intestinais; no cólon foi observado processo inflamatório discreto também apenas nas criptas intestinais.

As amostras do indivíduo da caixa 4 apresentaram algumas alterações, no fígado foi possível observar degeneração hidrópica dos hepatócitos e inflamação discreta do parênquima hepático; a análise das lâminas do revelou apenas a presença de uma discreta inflamação nas criptas intestinais; no baço foi encontrada hiperemia, um pouco de hemossiderina e processo inflamatório discreto.



Figura 5 - GCP-1 Íleo.

Fotomicrografia do íleo do animal da caixa 1 do Grupo Controle Positivo (GCP). Hiperplasia de células caliciformes com conteúdo a ser secretado. As setas indicam as células caliciformes. Aumento de 400x.



Figura 6 - GCP-2 Baço.

Fotomicrografia do Baço do animal da caixa 1 do GCP. Observa-se inflamação crônica(setas) e a desorganização estrutural do parênquima esplênico. Aumento de 100x.

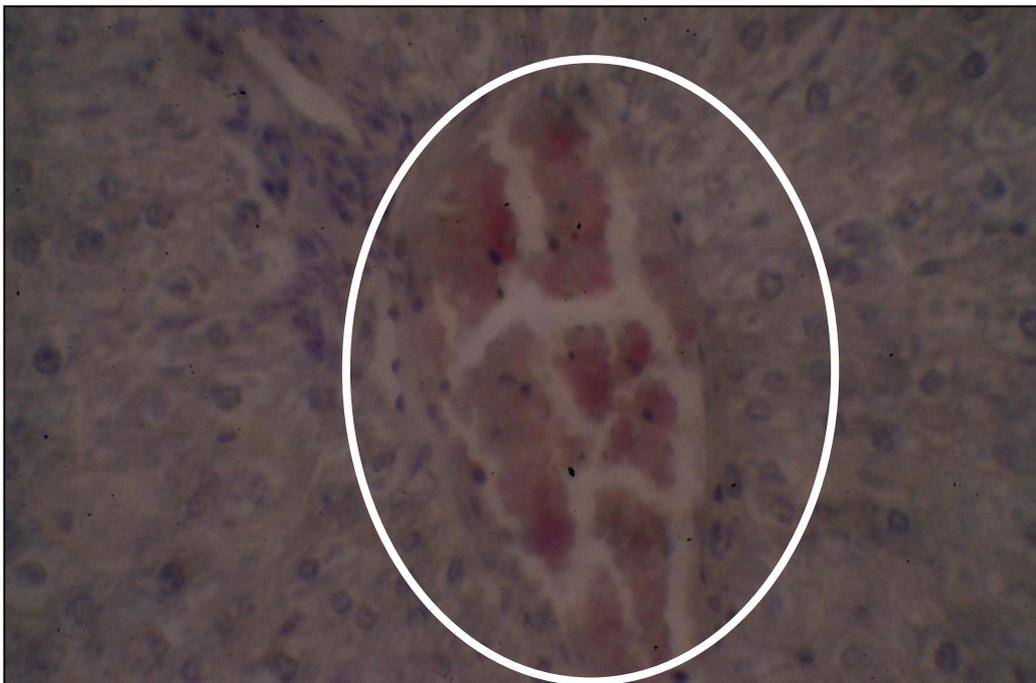


Figura 7 GCP-1 Fígado

Observa-se no centro a hiperemia de um vaso hepático e material com fracamento eosinofílico no parênquima do tecido compatível com edema destacados com um círculo. Aumento de 400x.

Foram encontradas poucas alterações nas amostras dos indivíduos do Grupo Positivo e com *Lactobacillus*, cujos animais foram desafiados à *Salmonella enterica* do sorovar Enteritidis P125109 e as gavagens intragástricas realizadas eram feitas com solução com *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 e alterações quando encontradas foram menos severas do que as observadas no Grupo Controle Positivo.

Na análise do baço do animal da caixa 1 foi possível observar inflamação discreta e um pouco de hemossiderina [Figura 9]; nas lâminas histológicas do íleo, foi observada inflamação discreta com permeio às criptas.

No indivíduo da caixa 2 também foi encontrada apenas uma alteração: hiperplasia mucosa discreta no cólon [Figura 8].

No animal da caixa 3 foram encontradas alterações teciduais em alguns órgãos. No baço apesar da arquitetura histológica estar preservada, foram encontradas áreas focais de hiperemia; No fígado foi observada hiperemia, inflamação discreta no parênquima e alguns hepatócitos com degeneração hidrópica; a análise do íleo revelou início de processo inflamatório nas criptas intestinais, quase imperceptível; no cólon foi encontrada inflamação estromal moderada a intensa, desorganizando a arquitetura tecidual.

Nas amostras do animal da caixa 4, foram encontradas algumas lesões. No baço foi observada desorganização da estrutura esplênica e hiperemia discreta; no íleo foi vista inflamação discreta nos estromas; a análise do fígado mostrou uma inflamação muito discreta e hiperemia focal [Figura 10]; no cólon foi observada inflamação discreta e hiperplasia mucosa.

As amostras que não foram citadas não apresentaram alterações teciduais, assim como também não foram encontradas alterações teciduais nos indivíduos do Grupo Controle Negativo.

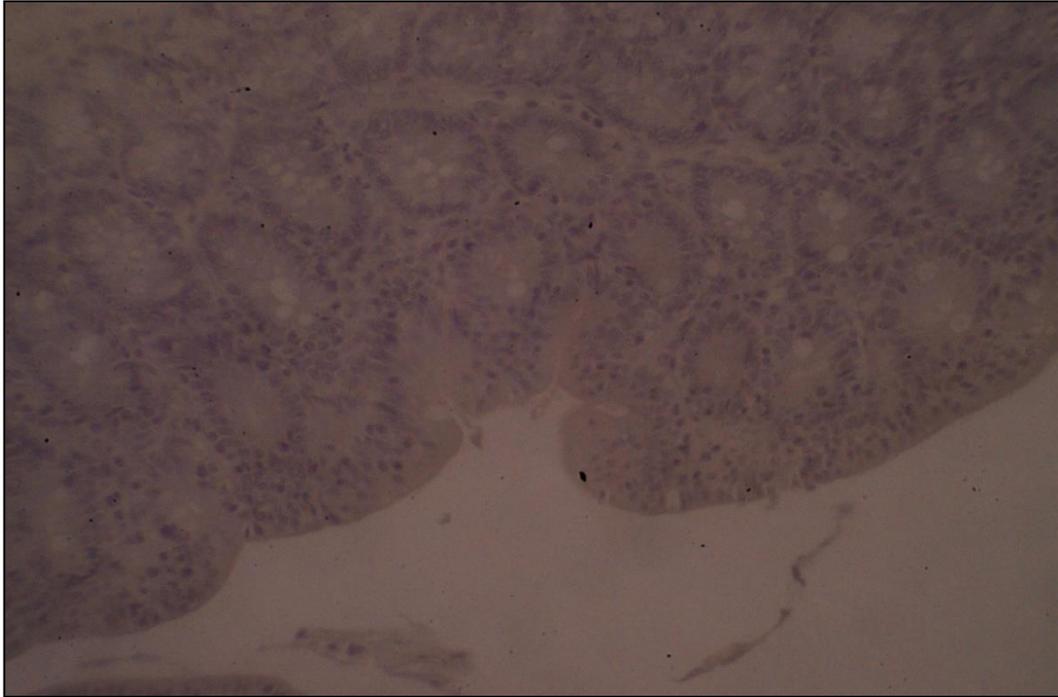


Figura 8 - GPL-2 Cólon

Tecido do cólon do animal com tratamento de *Lactobacillus r.* a apresenta um discreto aumento na quantidade de células caliciformes. Aumento de 100x

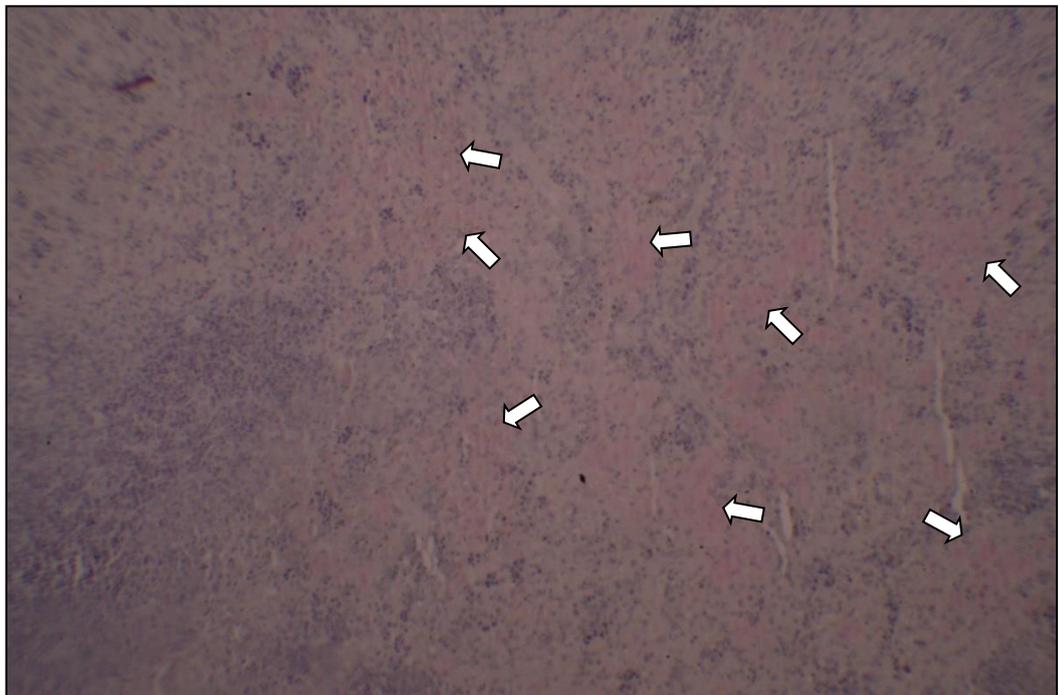


Figura 9 - GPL-1 Baço

Fotomicrografia do tecido do baço do animal da caixa 1 do GPL. Indicados por setas, nota-se processo inflamatório discreto no parênquima esplênico, menos severo do que os observados nos animais do GCP. Aumento de 100x

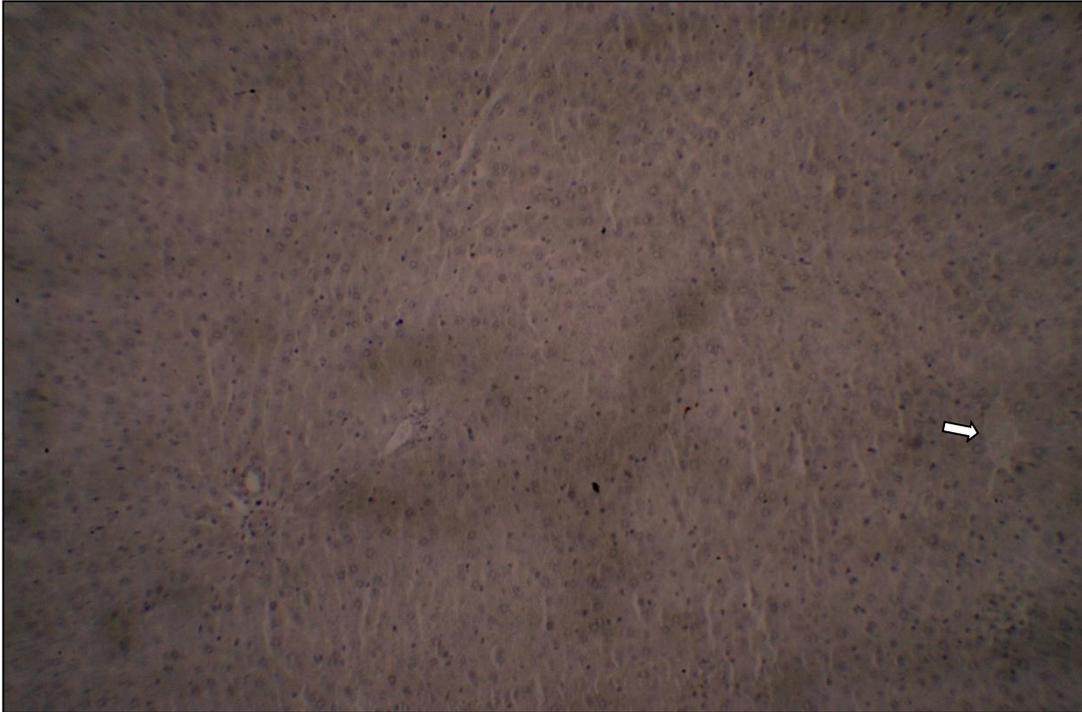


Figura 10 - GPL-4 Fígado

Tecido hepático com algumas células inflamatórias no parênquima e leve hiperemia apontada pela seta. Aumento de 100x.

6. DISCUSSÃO

A utilização de antibióticos e anti-inflamatórios não esteroidais podem incidir em diversos efeitos adversos como náusea, formações de úlceras, hemorragia, problemas renais, asma e febre (ARCHER; MUTHUKUMAR; HALAMI, 2015; BLASER et al, 2016), além de muitas vezes tornar mais resistente a população de micro-organismos patógenos (BLAIR et al, 2014). Por muitos anos buscaram-se meios de melhorar esses medicamentos, produzir fármacos mais eficientes ou alternativas de tratamento para evitar esses problemas. Nesse âmbito as pesquisas com probióticos cresceram (GUARNER et al, 2011) e seus resultados mostram que muitas vezes o tratamento com probióticos são mais eficientes do que os a base de fármacos (ARCHER; MUTHUKUMAR; HALAMI, 2015).

Os resultados encontrados mostram que em animais induzidos à salmonelose por *Salmonella enterica* do sorovar Enteritidis P125109, a administração de solução probiótica com *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 leva à resistência aos danos que seriam causados pela

salmonelose, visto que as alterações teciduais encontradas no Grupo Positivo e com *Lactobacillus* são bem menos severas do que as observadas no Grupo Controle Positivo. Esses dados convergem com os resultados encontrados por Acurcio et al. (2017), que testou a eficiência da ação probiótica do *Lactobacillus plantanarum* B7 em ratos desafiados com *Salmonella enterica* Typhimurium. Consolidando ainda mais a tese do uso de produtos probióticos como meio de prevenção e tratamento a infecções gastrointestinais.

O padrão da evolução das lesões teciduais encontradas no Grupo Controle Positivo, que no decorrer do período experimental os indivíduos sem tratamento também não apresentaram lesões nos tecidos analisados, foi semelhante ao encontrado em uma avaliação histopatológica em ratos infectados por *Salmonella enterica* Enteritidis com dieta probiótica baseada em *Lactobacillus* de diferentes espécies realizada por Okamoto et al. (2005). Dessa forma, pode-se entender que o uso dos probióticos tem bastante influência na fase inicial da infecção de patógenos gastrointestinais, visto que no presente estudo os animais com poucos dias após a infecção do controle positivo apresentaram lesões teciduais graves, enquanto os indivíduos recém infectados e tratados com *Lactobacillus* apresentaram alterações discretas.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se inferir que o uso do *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 tem ação probiótica em modelo de salmonelose induzida *in vivo*. Estudos imunológicos, ultraestruturais e metagenômicos se fazem necessários para explicar melhor os mecanismos utilizados pelo *Lactobacillus rhamnosus* que levam aos resultados encontrados. Além disso, sugere-se que sejam feitos futuros estudos com abordagem comparativa da eficiência do uso dessa cepa probiótica e produtos sintéticos no tratamento de doenças infectocontagiosas, pois, traria a população para mais próximo da realidade da uso dos probióticos na terapêutica.

8. REFERÊNCIAS

ARCHER, Ann Catherine; MUTHUKUMAR, S.p.; HALAMI, Prakash M.. Anti-inflammatory potential of probiotic *Lactobacillus* spp. on carrageenan induced paw edema in Wistar rats. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 81, p.530-537, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.044>.

ACURCIO, Leonardo Borges et al. Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 33, p.436-445, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.010>.

BLAIR, Jessica M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s.i.], v. 13, n. 1, p.42-51, 1 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

BLASER, M. J.. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. **Science**, [s.l.], v. 352, n. 6285, p.544-545, 28 abr. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad9358>.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, M. V. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006

CHEN, Hung-ming et al. Nontyphoid *Salmonella* Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. **Pediatrics & Neonatology**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.147-152, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>.

CIMPERMAN, Lisa et al. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Pilot Study of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 for the Prevention of Antibiotic-associated Diarrhea in Hospitalized Adults. **Journal Of Clinical Gastroenterology**, [s.l.], v. 45, n. 9, p.785-789, out. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mcg.0b013e3182166a42>.

COCONNIER, Marie-hélène; LIÉVIN, Vanessa; LORROT, Mathie. Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against Intracellular *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infecting Human Enterocyte-Like Caco-2/TC-7 Cells. **Applied And Environmental Microbiology**, Châtenay-malabry, v. 66, n. 3, p.1152-1157, mar. 2000.

FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, London Ontario, Canada.

FIOL, Fernando de Sá del et al. Obesity and the Use of Antibiotics and Probiotics in Rats. **Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.162-167, 18 mar. 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000371737>.

FLESCH, Aline Gamarra Taborda; POZIOMYCK, Aline Kirjner; DAMIN, Daniel de Carvalho. The therapeutic use of symbiotics. **Arq Bras Cir Dig**, v. 27, n. 3, p.206-209, 2014.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, Maria Izabel Simoes. **Higiene E Vigilância Sanitária De Alimentos**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2015. 1112 p.

GUARNER, Francisco et al. Probióticos e Prebióticos. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos y prebióticos. World Gastroenterology Organization/WGO, p. 1-29, 2011

KAY, Greeson et al. Frequency of antibiotic resistant Salmonella, Escherichia coli, Enterococcus, and Staphylococcus aureus in meat in Saudi Arabia. **African Journal Of Microbiology Research**, [s.i.], v. 7, n. 4, p.309-316, 31 jan. 2013. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr12.930>.

KORPELA, Katri et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. **Nature Communications**, [s.i.], v. 7, p.1-8, 26 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10410>.

KUISMA, J.; MENTULA, S.; JARVINEN, H..Effect of Lactobacillus rhamnosus GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. **Aliment Pharmacol Ther**, Helsinki, v. 17, p.509-515, 2003.

LI, Xian-zhi; PLÉSIAT, Patrick; NIKAIDO, Hiroshi. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.i.], v. 28, n. 2, p.337-418, 18 mar. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00117-14>.

LIANG, Yu-Chih et al. Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E2. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 3, p. 357-361, 2005.

MOAL, V. Lievin-le; SERVIN, A. L.. Anti-Infective Activities of Lactobacillus Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.i.], v. 27, n. 2, p.167-199, 1 abr. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00080-13>.

NAMI, Y. et al. Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.137-146, 18 dez. 2014. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.078923-0>.

OKAMOTO, Adriano Sakai. **Avaliação histopatológica e imunológica da mucosa intestinal de aves tratadas com Lactobacillus spp. e desafiadas com Salmonella Enteritidis**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

OLIVEIRA, Aline Pedrosa de; SOLA, Marília Cristina; FEISTEL, Janaína Costa. **SALMONELLA ENTERICA: GENES DE VIRULÊNCIA E ILHAS DE**

PATOGENICIDADE. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 16, p.1947-1972, 2013.

SÁNCHEZ-VARGAS, Flor M.; ABU-EL-HAIJA, Maisam A.; GÓMEZ-DUARTE, Oscar G.. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine And Infectious Disease**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.263-277, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>.

SHARMA, Jagriti; CHAUHAN, D. S.. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa by antibiotics and probiotics combinations- In vitro study. **European Journal Of Experimental Biology**, Agra, v. 6, n. 4, p.10-14, 2014.

SILVA JUNIOR, Eneo Alves da. **Livro - Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2005. 623 p.

TERAN, Carlos G.; TERAN-ESCALERA, Carlos N.; VILLARROEL, Patricia. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. **International Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.518-523, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.09.014>.

TSUJI, Hirokazu; CHONAN, Osamu; SUYAMA, Yumi. MAINTENANCE OF HEALTHY INTESTINAL MICROBIOTA IN WOMEN WHO REGULARLY CONSUME PROBIOTICS. **International Journal Of Probiotics And Prebiotics**, Tokyo, v. 9, n. 1/2, p.31-38, 10 mar. 2014.

WENFENG, Sha et al. Application of Probiotics in Pig Industry as a Substitute of Antibiotics. **Animal Husbandry and Feed Science**, Rugao, v. 7, n. 1, p. 15, 2015.

ANEXOS

Grupo Controle Negativo (GCN)	Grupo Controle Positivo (GCP)	Grupo Positivo e com <i>Lactobacillus</i> (GPL)	
Apenas uma Caixa	Caixas: 1, 2, 3 e 4	Caixa: 1, 2, 3 e 4	
Início do Experimento			
Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com <i>Lactobacillus</i>	13 dias
	Streptomicina		14
Desafio com <i>Salmonella Enteritidis</i>			15
Eutanásia animal SM	Eutanásia Caixa 1	Eutanásia Caixa 1	16
Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com <i>Lactobacillus</i>	17
Eutanásia animal 1M	Eutanásia Caixa 2	Eutanásia Caixa 2	18
Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com <i>Lactobacillus</i>	19
			20
Eutanásia animal 2M	Eutanásia Caixa 3	Eutanásia Caixa 3	21
Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com Solução Salina	Gavagem Intragástrica com <i>Lactobacillus</i>	22
			23
Eutanásia animal 3M	Eutanásia Caixa 4	Eutanásia Caixa 4	24
			25

Tempo (dia) ↓

Quadro 1 – Esquema experimental.

(Nos dias de Eutanásia, apenas os animais a serem eutanasiados não recebiam gavagem intragástrica, para os demais indivíduos o procedimento era realizado normalmente.)