



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS SPP.* FRENTE A
MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS DO INTESTINO**

PAULO HENRIQUE SILVA

RECIFE
2022

PAULO HENRIQUE SILVA

**ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS SPP.* FRENTE A
MICRORGANISMOS OPORTUNISTAS DO INTESTINO**

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura em Ciências
Biológicas/UFRPE como requisito
parcial para obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Taciana Cavalcanti
Vieira Soares.

Coorientador: Leandro Paes de Brito

RECIFE
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Paulo Henrique
ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE ENTEROCOCCUS SPP. FRENTE A MICRORGANISMOS
OPORTUNISTAS DO INTESTINO / Paulo Henrique Silva. - 2022.
57 f. : il.
- Orientador: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.
Coorientador: Leandro Paes de Brito.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2022.
1. Probiótico. 2. Enterococcus . 3. Bactéria patogênica. 4. Infecção intestinal . I. Soares, Maria Taciana
Cavalcanti Vieira, orient. II. Brito, Leandro Paes de, coorient. III. Título

PAULO HENRIQUE SILVA

**ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS SPP.* FRENTE A
MICRORGANISMOS OPORTUNISTAS DO INTESTINO**

Comissão Avaliadora:

Profa. Dra Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – UFRPE
Orientador

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra – DMFA/UFRPE
Titular

Prof. Dr. Leandro Fragoso Lins – PPG RENORBIO/UFRPE
Titular

Dra. Juanize Matias – PPG Biociência Animal/UFRPE
Suplente

RECIFE
2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, o qual me proporcionou saúde e força para continuar durante toda esta caminhada. Aos meus familiares, especialmente à minha mãe Severina, a qual sempre esteve ao meu lado. Aos meus colegas e amigos. Gostaria de agradecer aos professores e funcionários da UFRPE que me auxiliaram e me ajudaram durante esses anos. Além disso, gostaria de agradecer a professora Taciana pela oportunidade, paciência, orientação e por todo apoio na minha construção de conhecimento e desenvolvimento acadêmico.

A vocês, meu agradecimento.

“É através dos conflitos entre a realidade da natureza e as limitações das nossas definições que a ciência avança, pois esses conflitos forçam os cientistas a atualizar as definições para incluírem essas novas complicações e exceções.”

João Carlos Setubal

RESUMO

Atualmente, há uma crescente busca por melhorias na qualidade de vida de seres humanos e animais através da utilização de probióticos, sendo estes microrganismos vivos capazes de promover benefícios para a saúde, principalmente intestinal. Segundo órgãos oficiais, infecções intestinais são recorrentes, sendo responsável por milhares de mortes todos os anos. Sendo assim, optou-se pelo desenvolvimento de uma revisão sistemática e experimentos *in vitro* com o intuito de evidenciar uma eventual habilidade de bactérias do gênero *Enterococcus* frente a microrganismos oportunistas do intestino. A proposta de revisão sistemática teve como objetivo principal a verificação de uma possível capacidade antimicrobiana de *Enterococcus* frente a patógenos bacterianos a partir de estudos conduzidos em animais. Já para os experimentos *in vitro*, foi utilizado a bactéria ácido láctica (BAL) *Enterococcus faecium* 133v com o intuito de verificar efeitos antagonista e antimicrobiano, bem como a utilização de Exopolissacarídeo (EPS) produzido por elas para fins de ação antibiofilme e antimicrobiana. Os artigos selecionados para revisão demonstram a capacidade de bactérias do gênero *Enterococcus* em inibir o crescimento de diversos patógenos de infecção intestinal, auxiliando na mitigação de danos no tecido tanto do intestino, como de outros órgãos. Além disso, foi possível observar diminuição ou exclusão de patógenos no trato intestinal e nas fezes dos animais, os quais apresentaram diminuição da perda de peso. Já os experimentos *in vitro* com *E. faecium* 133v frente a bactérias do gênero *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria* e a espécie *Escherichia coli*, obteve resultados satisfatórios quanto à inibição desses patógenos. As análises antagonistas evidenciaram a capacidade da bactéria *E. faecium* 133v em contrapor 5 das 6 espécies patogênicas, com zona de inibição superior a 20mm. Outrossim, tanto o sobrenadante quanto o EPS de *E. faecium* 133v proporcionaram efeito antimicrobiana frente a todas as cepas. Ainda, o EPS foi eficiente em mitigar o desenvolvimento de biofilmes, comumente formados pelas 6 cepas patogênicas. Esses achados evidenciam a capacidade de algumas bactérias do gênero *Enterococcus*, bem como a espécie *E. faecium* 133v em contrapor as principais bactérias acarretadoras de infecção intestinal.

ABSTRACT

Currently, there is a growing search for improvements in the quality of life of humans and animals through the use of probiotics, which are live microorganisms capable of promoting health benefits, mainly intestinal. According to official bodies, intestinal infections are recurrent, accounting for thousands of deaths every year. Therefore, we opted for the development of a systematic review and *in vitro* experiments in order to evidence an eventual ability of bacteria of the *Enterococcus* genus against opportunistic microorganisms in the intestine. The main objective of the systematic review proposal was to verify a possible antimicrobial capacity of *Enterococcus* against bacterial pathogens from studies conducted in animals. For the *in vitro* experiments, the lactic acid bacterium (BAL) *Enterococcus faecium* 133v was used in order to verify antagonist and antimicrobial effects, as well as the use of Exopolysaccharide (EPS) produced by them for the purpose of antibiofilm and antimicrobial action. The articles selected for review demonstrate the ability of bacteria of the *Enterococcus* genus to inhibit the growth of several pathogens of intestinal infection, helping to mitigate tissue damage both in the intestine and in other organs. In addition, it was possible to observe a decrease or exclusion of pathogens in the intestinal tract and in the feces of the animals, which showed a decrease in weight loss. The *in vitro* experiments with *E. faecium* 133v against bacteria of the genus Shigella, Salmonella, Listeria and the species Escherichia coli, obtained satisfactory results regarding the inhibition of these pathogens. The antagonist analyzes showed the ability of the bacterium *E. faecium* 133v to oppose 5 of the 6 pathogenic species, with an inhibition zone greater than 20mm. Furthermore, both the supernatant and the EPS of *E. faecium* 133v provided an antimicrobial effect against all strains. Furthermore, EPS was efficient in mitigating the development of biofilms, commonly formed by the 6 pathogenic strains. These findings show the ability of some bacteria of the *Enterococcus* genus, as well as the *E. faecium* 133v species, to counteract the main bacteria that cause intestinal infection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Microbiota intestinal	13
2.2. Bactérias e infecção intestinal	14
2.3. Probióticos	16
2.4. <i>Enterococcus</i>	17
3. REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I	23
4.1. INTRODUÇÃO	25
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.2.1. Revisão Sistemática	25
4.2.2. Análise qualitativa	26
4.2.3. Questão de pesquisa	26
4.2.4. Busca de artigos	26
4.2.4. Seleção dos estudos	26
4.2.4.1. Critérios de inclusão	26
4.2.4.2. Critérios de exclusão	26
4.2.5. Risco de Viés	27
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.3.1. Risco de viés	30
4.3.2. <i>Enterococcus spp.</i> como fator protetivo da perda peso	31
4.3.3. Aumento da sobrevivência proporcionado pelos probióticos	31
4.3.4. Efeitos em parâmetro histológico propiciado por cepas de <i>Enterococcus</i>	31
4.4. CONCLUSÃO	32
4.5. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II	35
5.1. INTRODUÇÃO	37
5.2. METODOLOGIA	38
5.2.1. Cepas bacterianas e Condições de cultura	38
5.2.2. Atividade antagonista	39
5.2.3. Produção do sobrenadante	40
5.2.4. Extração de Exopolissacarídeo	40
5.2.5. Atividade antimicrobiana do sobrenadante e EPS	41
5.2.6. Atividade antibiofilme	42

5.2.7. Análises estatísticas	42
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.3.1. Efeito antagonista de <i>E. faecium</i> 133v frente a microrganismos oportunistas do intestino.	43
5.3.2. Atividade antimicrobiana do sobrenadante de <i>E. faecium</i> 133v	45
5.3.3. Atividade antimicrobiana do EPS isolado de <i>E. faecium</i> 133v	45
5.3.4. Atividade antibiofilme do EPS	46
5.4. CONCLUSÃO	47
5.5. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Infecção intestinal é ocasionada por diversos microrganismos, especialmente as bactérias oportunistas, as quais tendem a atacar o trato intestinal quando se tem, por exemplo, uma quadro de disbiose nesta região, sendo esta ocasionada principalmente por ingestão de alimentos contaminados (Bäumler e Sperandio, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a diarreia é um dos principais sintomas recorrentes de infecção intestinal no mundo, sendo responsável pela morte de mais de 500.000 mil crianças globalmente, com um total de casos aproximado de 1.7 bilhões todos os anos (OMS, 2017).

Os probióticos, microorganismos vivos que, quando administrado em doses adequadas, conferem benefícios para a saúde de indivíduos, estão sendo cada vez mais utilizados para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, especialmente, as do trato gastrointestinal (FAO/WHO, 2001; KIM, *et al.*, 2019). Um dos exemplos é a utilização da espécie bacteriana *Lactobacillus fermentum*, capaz de mitigar a doença colite em animal (JANG, *et al.*, 2019); ainda, melhorando a diabetes tipo 2 com a utilização da espécie *Lactobacillus acidophilus*, promovendo, também, modulação da microbiota intestinal (YAN, *et al.*, 2019); além disso, atenuando o câncer de cólon retal em ratos (SUGIMURA, *et al.*, 2021).

Bactéria produtoras de ácido láctico, caracterizadas como probióticos em sua maioria, vêm demonstrando, através de experimentos *in vitro* ou *in vivo*, a habilidade antagonista a outros microrganismos oportunistas do intestino como, por exemplo, a utilização de microrganismo do gênero *Bifidobacterium* sendo capaz de prevenir infecção acarretada pelo patógeno *E. coli* (YANG, *et al.*, 2021).

A bactéria *Enterococcus faecium* têm demonstrado grandes benefícios também, sobretudo, com potencial anti-adesão frente a diversos patógenos como *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes* (HE, *et al.*, 2019; NAMI, *et al.*, 2015).

Levando em consideração os benefícios dos probióticos para saúde humana e animal, este trabalho tem como objetivo principal verificar a capacidade antimicrobiana

de bactérias ácido lácticas do gênero *Enterococcus* diante micro-organismos oportunistas do intestino, através de revisão de literatura e experimento *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é composta por diversos microrganismos, sendo em sua maioria bactérias, fungos e vírus (KC, *et al.*, 2020). Estudos sugerem que esses micróbios estão relacionados a inúmeros processos nos diferentes sistemas humano. Na saúde intestinal, por exemplo, esses microrganismos auxiliam nas estruturas da parede desse órgão, especialmente, na defesa imune frente a microrganismos patogênicos, formando assim, uma interação entre microrganismo e hospedeiro (SHI, *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal pode estar relacionada a uma boa formação de estruturas de defesa, como os linfonodos, e folículos linfóides presentes na parede do intestino delgado (AMELIO e SASSI, 2018). Além disso, esses seres microscópicos atuam na diferenciação de células de defesa, estimulando e/ou modulando o sistema imune (MILANI, *et al.*, 2017).

A distribuição desses microrganismos ao longo do intestino propiciam a metabolização de diversos compostos orgânicos provenientes da alimentação, seja no metabolismo de lípidos, proteínas e carboidratos (ADAK, *et al.*, 2018). Uma ingestão maior de fibras resulta no aumento de produção de ácidos graxos de cadeias curtas por bactérias presentes no intestino, auxiliando, por exemplo, na diminuição da pressão arterial (VERHAAR, *et al.*, 2020).

A interligação entre microbioma intestinal e cérebro é cada vez mais estudada. A possível atuação de bactérias em sinalizar, através de comunicação neural, também vem sendo reportada, relacionado-as a diminuição ou intensificação de expressões gênicas (MORAIS, *et al.*, 2021). A comunicação entre esses microrganismos e o cérebro pode se dar através do nervo vago, sendo este responsável por inervar desde o crânio até o abdome (DINAN, *et al.*, 2017). No entanto, alguns microrganismos, especialmente bactérias, são capazes de propiciar desequilíbrio na microbiota do

intestino, processo conhecido como disbiose intestinal, conseqüentemente, a instalação de uma uma infecção nesse órgão.

2.2. Bactérias e infecção intestinal

Seres humanos e animais são suscetíveis a diversas infecções ocasionadas principalmente por bactérias oportunistas, observando-se mecanismos massivos de proliferação quando há uma instabilidade no sistema imune do hospedeiro.

Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* são ligadas, mesmo que intrinsecamente, a depreciação da saúde intestinal tanto humana como animal, isto porque muitas cepas representadas pelo grupo são capazes de provoca a patologia Salmonelose, caracterizada principalmente por provocar diarreia e febre no hospedeiro (CDC, 2019).

Segundo estimativas, mais de 150 mil mortes todos anos são provocadas por cepas não promotoras de febre tifóide e, aproximadamente, 200 mil mortes pelas espécies *Salmonella Typhi* e *S. paratyphi* no mundo, sendo esta última frequente em países em desenvolvimento (CHRISTENSON, 2013). A contaminação por esse patógeno se dá de várias formas, todavia, a frequência é maior por ingestão de alimentos contaminados, podendo ser de origem animal ou vegetal (KRISHNASAMY, *et al.*, 2020; ANTUNES, *et al.*, 2016). Por serem bactérias que crescem em temperatura ambiente (ideal, 37 °C), independente da ausência ou não de oxigênio, faz desses microrganismos potentes causadores de surtos (BAIRD-PARKER, 1990).

Outrossim, bactérias Gram-negativas como cepas da espécie *E. coli* habitam diferentes órgãos de seres humanos sem causar danos, todavia, há cepas que, havendo desequilíbrios em alguns dos sistemas humanos, a mesma pode vir a provocar complicações, tanto em âmbito intestinal como sistêmico (OMS, 2018).

Algumas cepas bacterianas são capazes de produzir estruturas que possibilitam sua fixação em células intestinais e conseqüentemente sua colonização, ademais, as enteropatogênicas (EPEC) desregularizam funções e estruturas celulares dos enterócitos (KAPER, *et al.*, 2004). Outras, produtora de toxinas e enterohemorrágica,

podem provocar vômito e disenteria, podendo até prejudicar outros órgãos como os rins (JESSER e LEVY, 2020). Só na Inglaterra, mais de 40 mil casos foram reportados entre os anos de 2016 e 2017 (JENKINS, *et al.*, 2018).

O gênero *Clostridium*, microrganismos Gram-positivos, formadores de esporos, também podem produzir toxinas capazes de provocar graves quadros de saúde, podendo-se ser observado na espécie *Clostridium difficile* a capacidade de provocar acúmulo de fluido no intestino, uma consequência da produção da enterotoxina TcdA (SAMANTA, BANDYOPADHYAY, *et al.*, 2019). Além disso, a enterotoxina e-toxina produzida por *C. perfringens* são em sua maioria fatais para alguns ruminantes, ademais, no seres humanos, podem afetar diversos órgãos, atingindo até o cérebro, o qual pode apresentar edemas e necroses (ROPOFF e BOUVET, *et al.*, 2009).

Outrossim, outras bactérias podem ocasionar diversas reações no organismo de seres humanos ou de animais. Por exemplo, a listeriose, causada pelo microrganismo Gram-positivo *Listeria monocytogenes*, pode provocar desde uma infecção leve, se restringindo ao trato digestivo, até uma infecção invasiva, como uma infecção na meninge (ALLERBERGER e WAGNER, 2020). Além disso, em mulheres grávidas, o patógeno pode infectar via transplacentária, ou seja, da mãe para feto, acarretando infecções e podendo provocar o aborto, tendo em vista as altas taxas de mortalidade (LAMONT, *et al.*, 2011).

Infecções por bactérias do gênero *Shigella* são outros problemas de saúde pública, uma vez que são responsáveis, segundo estimativa, por mais de 600 mil mortes todos os anos no mundo (WALKER, 2016). Esse patógeno pode desenvolver em pessoas infectadas complicações pós infecção, sendo comum a Síndrome do intestino Irritável (SII), apresentando-se nesse caso com danos do tecido intestinal, bem como infecções urinária (KOSEK, *et al.*, 2010; FORD, *et al.*, 2017).

Por outro lado, a utilização de bactérias não patogênicas, comumente denominadas de probióticos, para seres humanos e animais, estão sendo apresentadas como potentes anti-agentes de infecção tanto em estudos realizados em animais como em seres humanos.

2.3. Probióticos

Os probióticos, microorganismos vivos que, quando administrado em doses adequadas, conferem benefícios para a saúde de indivíduos, estão sendo cada vez mais utilizados para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, especialmente, as do trato gastrointestinal (FAO/WHO, 2001; KIM *et al.*, 2019).

Bactérias probióticas como as do gênero *Lactobacillus* demonstram serem eficientes na mitigação prevenção de vários tipos de doenças. A exemplo, a espécie *L. plantarum* capaz de mitigar perda de peso em pacientes com câncer de cólon retal com alimentação enteral (KAŻMIERCZAK-SIEDLECKA, *et al.*, 2020). A mesma espécie foi eficiente em diminuir complicações em camundongos com câncer de cólon retal, observando-se diminuição de danos no tecido intestinal como diminuição de infiltrações imunitárias, além de minimizar o desenvolvimento do tumor (YUE, *et al.*, 2020).

Estudos têm demonstrado a capacidade desses microorganismos em prevenir e/ou tratar distúrbios metabólicos. Na prevenção da obesidade, espécies como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram eficientes em diminuir o ganho de peso em camundongos alimentados com dieta hipercalórica (HOSSAIN, *et al.*, 2020). Além disso, a cepa *B. animalis subsp. lactis* A6 promoveu o ganho de massa magra (HUO, *et al.*, 2020). Ademais, na diminuição dos níveis de glicose no sangue por *L. paracasei* em modelo animal (ZENG, *et al.* 2019).

Outros resultados promovidos pela administração dos probióticos são satisfatórios. A exemplo, a diminuição do estresse e da ansiedade promovida por *L. plantarum* (LEW, *et al.*, 2019). Para mais, os estudos de Ho *et al.* (2021) desenvolvidos em seres humanos depressivos, evidenciaram a habilidade desta mesma espécie em contrapor o sintomas comuns em quadros depressivos como diminuição de fadiga e estabilidade do sono. Ainda, quando comparado com grupo placebo, os probióticos foram capazes de reduzir a pontuação do Beck Depression Inventory (BDI), sendo este relacionado a indicação de sintomas depressivos, variando de leve, moderada e severa (KAZEMI, *et al.*, 2019).

2.4. *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus*, constituído por bactérias Gram-positivas, representa menos de 1% do total de microrganismos presente no intestino, sendo representado pelas espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (LEBRETON, *et al.*, 2014; NOBLE, 1978). Microrganismos capazes de sobreviver a 60 °C, podendo estar em par, em pequenas cadeias ou em células unitárias, as bactérias *Enterococcus* são vistas, dependendo do isolado, como potenciais promotores de patogenicidade (MURRAY, 1990; GIRAFFA, *et al.*, 1997).

Todavia, estudos recentes têm demonstrado a capacidade de alguns isolados de *Enterococcus* com propriedades probióticas, tanto em trabalhos desenvolvidos em animais como em seres humanos. Benyacoub *et al.* (2005), demonstraram a capacidade da espécie *E. faecium* em combater a *Giardia Intestinalis* em camundongos infectados quando comparado com grupos não tratados. A exclusão de outros parasitas, como o nematóide *Toxocara canis*, também foi verificada com a utilização de *E. faecalis* (BASUALDO, *et al.*, 2013).

Fan *et al.* (2022), analisaram a habilidade da cepa *E. faecalis* EF-2001 morta por calor em animais alimentado com dieta hipercalórica, e obtiveram resultados positivos quanto a diminuição de adipócitos e inflamações no tecido adiposo, bem como ganho de peso. Ainda, a mesma cepa foi eficiente em diminuir os níveis séricos de colesterol total e triglicérides (LEE, *et al.*, 2022). Outros parâmetros como melhora na captação de insulina pelas células, assim como diminuição da glicemia foram observadas em animais tratados com *E. faecalis* AG5 (MISHRA e GHOSH, 2020).

Takahashi *et al.* (2019), apresentaram em seus estudos os benefícios da administração de *E. faecalis* em contornar sintomas como sangramento, diarreia e atrofia do intestino em modelo animal de colite induzido por Sulfato dextrano de sódio (DSS). Ademais, *E. faecium* foi relatada com potencial anticâncer, com diminuição de criptas aberrantes e aumento de citocinas anti-tumoral como IFN- γ e TNF- α (SIVIERI, *et al.*, 2008).

3. REFERÊNCIAS

ADAK, A., & Khan, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(3), 473–493, 2019.

ALLERBERGER, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(1), 16–23, 2010.

ANTUNES, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(2), 110–121, 2016.

BENYACOUB, J., Pérez, P. F., Rochat, F., Saudan, K. Y., Reuteler, G., Antille, N., Humen, M., De Antoni, G. L., Cavadini, C., Blum, S., & Schiffrin, E. J. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1171–1176, 2005.

BAIRD-PARKER, A. C. Foodborne salmonellosis. *Lancet (London, England)*, 336(8725), 1231–1235, 1990.

BASUALDO, J., Sparo, M., Chiodo, P., Ciarmela, M., & Minvielle, M. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 101(6), 559–562, 2007.

CHRISTENSON, J. C. (2013). Salmonella infections. *Pediatrics in review*, 34(9), 375–383, 2013.

CATTANEO, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prella, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., Bellandi, D., ... INDIA-FBP Group. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of aging*, 49, 60–68, 2017.

DINAN, T. G., & Cryan, J. F. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. *Psychosomatic medicine*, 79(8), 920–926, 2017.

D'AMELIO, P., & Sassi, F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified tissue international*, 102(4), 415–425, 2018.

E. coli. WHO, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

FORD, A. C., Lacy, B. E., & Talley, N. J. Irritable Bowel Syndrome. *The New England journal of medicine*, 376(26), 2566–2578, 2017.

FAN, M., Choi, Y. J., Wedamulla, N. E., Tang, Y., Han, K. I., Hwang, J. Y., & Kim, E. K. Heat-Killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 Attenuate Lipid Accumulation in Diet-Induced Obese (DIO) Mice by Activating AMPK Signaling in Liver. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(4), 575, 2022.

GIRAFFA, G., Carminati, D., & Neviani, E. Enterococci Isolated from Dairy Products: A Review of Risks and Potential Technological Use. *Journal of food protection*, 60(6), 732–738, 1997.

HOSSAIN, M., Park, D. S., Rahman, M. S., Ki, S. J., Lee, Y. R., Imran, K. M., Yoon, D., Heo, J., Lee, T. J., & Kim, Y. S. *Bifidobacterium longum* DS0956 and *Lactobacillus rhamnosus* DS0508 culture-supernatant ameliorate obesity by inducing thermogenesis in obese-mice. *Beneficial microbes*, 11(4), 361–373, 2020.

HUO, Y., Lu, X., Wang, X., Wang, X., Chen, L., Guo, H., Zhang, M., & Li, Y. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A6 Alleviates Obesity Associated with Promoting Mitochondrial Biogenesis and Function of Adipose Tissue in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(7), 1490, 2020.

HO, Y. T., Tsai, Y. C., Kuo, T., & Yang, C. Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on Depressive Symptoms and Sleep Quality in Self-Reported Insomniacs: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Trial. *Nutrients*, 13(8), 2820, 2021.

SAMANTA, I e BANDYOPADHYAY S. Chapter 20 - Clostridium, Editor(s): Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay, *Antimicrobial Resistance in Agriculture*, Academic Press, 2020, p. 253-262.

JENKINS D. R. Patterns in the epidemic of Escherichia coli bloodstream infection in Oxfordshire. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(10), 1057–1058, 2018.

JESSER, K. J., & Levy, K. Updates on defining and detecting diarrheagenic Escherichia coli pathotypes. *Current opinion in infectious diseases*, 33(5), 372–380, 2020.

KRISHNASAMY, V. P., Marshall, K., Dewey-Mattia, D., & Wise, M. Outbreak Characteristics and Epidemic Curves for Multistate Outbreaks of Salmonella Infections Associated with Produce: United States, 2009-2015. *Foodborne pathogens and disease*, 17(1), 15–22, 2020.

KAPER, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. Pathogenic Escherichia coli. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140, 2004.

KOSEK, M., Yori, P. P., & Olortegui, M. P. Shigellosis update: advancing antibiotic resistance, investment empowered vaccine development, and green bananas. *Current opinion in infectious diseases*, 23(5), 475–480, 2010.

KAŻMIERCZAK-SIEDLECKA, K., Folwarski, M., Skonieczna-Żydecka, K., Ruszkowski, J., & Makarewicz, W. The use of Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) in cancer patients receiving home enteral nutrition - study protocol for a randomized, double-blind, and placebo-controlled trial. *Nutrition journal*, 19(1), 98, 2020.

KAZEMI, A., Noorbala, A. A., Azam, K., Eskandari, M. H., & Djafarian, K. (2019). Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 38(2), 522–528, 2019.

KC, D., Sumner, R., & Lippmann, S. Gut microbiota and health. *Postgraduate medicine*, 132(3), 274, 2020.

Lamont, R. F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J. P., Vaisbuch, E., Kim, S. K., Uldbjerg, N., & Romero, R.. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of perinatal medicine*, 39(3), 227–236, 2011.

LEBRETON F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, 2014.

LEE, J. H., Woo, K. J., Kim, M. A., Hong, J., Kim, J., Kim, S. H., Han, K. I., Iwasa, M., & Kim, T. J. Heat-Killed *Enterococcus faecalis* Prevents Adipogenesis and High Fat Diet-Induced Obesity by Inhibition of Lipid Accumulation through Inhibiting C/EBP- α and PPAR- γ in the Insulin Signaling Pathway. *Nutrients*, 14(6), 1308, 2022.

LEW, L. C., Hor, Y. Y., Yusoff, N., Choi, S. B., Yusoff, M., Roslan, N. S., Ahmad, A., Mohammad, J., Abdullah, M., Zakaria, N., Wahid, N., Sun, Z., Kwok, L. Y., Zhang, H., & Liong, M. T. Probiotic *Lactobacillus plantarum* P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 38(5), 2053–2064, 2019.

MILANI, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 81(4), e00036-17. 2017.

MURRAY B. E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews*, 3(1), 46–65, 1990.

MISHRA, A. K., & Ghosh, A. R. Probiotic *Enterococcus faecalis* AG5 mitigated high fat diet induced obesity and produced propionic acid stimulated apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocyte. *Life sciences*, 261, 118292, 2020.

MORAIS, L. H., Schreiber, H. L., 4th, & Mazmanian, S. K. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature reviews. Microbiology*, 19(4), 241–255, 2021.

NOBLE C. J. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of clinical pathology*, 31(12), 1182–1186, 1978.

POPOFF, M. R., & Bouvet, P. Clostridial toxins. *Future microbiology*, 4(8), 1021–1064, 2009.

SALMONELLA. CDC, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>

SHI, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4, 14, 2017.

SIVIERI, K., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Barbisan, L.F. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *Eur Food Res Technol* 228, 231–237, 2008

TAKAHASHI, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Odaira, T., Sakuma, W., Onogi, H., Nishijima, H., Furihata, R., Nemoto, Y., Iwasa, H., Tan-No, K., & Tadano, T. Effect of *Enterococcus faecalis* 2001 on colitis and depressive-like behavior in dextran sulfate sodium-treated mice: involvement of the brain-gut axis. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 201, 2019.

VERHAAR, B., Prodan, A., Nieuwdorp, M., & Muller, M. Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. *Nutrients*, 12(10), 2982, 2020.

WALKER B. Shigellosis. *Nursing*, 46(9), 66–67, 2016.

YUE, Y., Ye, K., Lu, J., Wang, X., Zhang, S., Liu, L., Yang, B., Nassar, K., Xu, X., Pang, X., & Lv, J. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 127, 110159, 2020.

ZENG, Z., Yuan, Q., Yu, R., Zhang, J., Ma, H., & Chen, S. Ameliorative Effects of Probiotic *Lactobacillus paracasei* NL41 on Insulin Sensitivity, Oxidative Stress, and Beta-Cell Function in a Type 2 Diabetes Mellitus Rat Model. *Molecular nutrition & food research*, 63(22), e1900457, 2019.

CAPÍTULO I

(Artigo a ser submetido à revista Brazilian Archives of Biology and Technology)

Bactérias do gênero *Enterococcus* frente a microrganismos oportunistas do intestino: uma revisão sistemática

Paulo Henrique Silva ¹
<https://orcid.org/0000-0002-2015-6497>

Lucas de Barros Rodrigues de Freitas ¹
<https://orcid.org/0000-0002-3127-5897>

Ana Lúcia Figueiredo Porto ¹
<https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>

Leandro Paes de Brito ²
<https://orcid.org/0000-0003-3440-6431>

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares ¹
<https://orcid.org/0000-0001-9573-6296>

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA). Recife, Pernambuco, Brasil.

² Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB). Recife, Pernambuco, Brasil.

*Correspondente: eupaulosilvabio@gmail.com

Resumo: Diversos microrganismos habitam a microbiota intestinal de seres humanos e animais. Muitos deles proporcionam benefícios para o hospedeiro, participando de diversos processos metabólicos no organismo, influenciando diversos sistemas. Todavia, há microrganismos, principalmente bactérias, que causam infecção no trato intestinal, prejudicando o funcionamento deste órgão, ocasionando diversas complicações à saúde. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a possível capacidade de bactérias do gênero *Enterococcus* inibir ou mitigar o crescimento de bactérias patogênicas no intestino de camundongos. Para isso, utilizou-se as seguintes plataformas de buscas de artigos científicos: Pubmed e ScienceDirect. Os resultados, a partir das análises dos artigos, demonstraram a habilidade de *Enterococcus* prevenir ou tratar infecções por bactérias, diminuindo danos no tecido intestinal, diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , diminuição de sintomas e danos nos hepatócitos. Esses resultados caracterizam *Enterococcus* como possíveis auxiliares na mitigação da problemática.

Palavras-chave: probiótico; *Enterococcus*; bactérias patogênicas; infecção intestinal.

4.1. INTRODUÇÃO

Infecção intestinal é uma patologia caracterizada por inflamação no trato intestinal ocasionada por diversos microrganismos, podendo atingir qualquer uma das porções do órgão, tendo como principais agentes de infecção bactérias, vírus e fungos, por exemplo [1].

A infecção intestinal está diretamente ligada ao consumo de alimentos e líquidos contaminados, tornando-se estes um meio de entrada, principalmente, para microrganismos oportunistas [2]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada dez pessoas são acometidas por infecção intestinal e mais de 400 mil pessoas todos os anos morrem por complicações dessa patologia, sendo um terço do total crianças menores de cinco anos [3].

Diversos patógenos, principalmente bacterianos, são de interesse clínico, tendo em vista alta patogenicidade e disseminação em ambientes e alimentos. Bactérias como as do gênero *Salmonella*, são capazes de acarretar disbiose intestinal e diarreia, alicerçada a uma ineficiência do sistema imune humoral e uma resistência aos principais antibióticos por parte desses microrganismos [4, 5]. Além disso, bactérias Gram-negativas como *Listeria spp.*, causadora da listeriose tanto em seres humanos como animais, podem desenvolver infecção generalizada, chegando a atingir, em casos graves, o sistema nervoso central [6]. Vale ressaltar que espécies como as do gênero *Shigella spp.*, caracterizado por acarretar infecção aguda no intestino, são responsáveis por acometer mais de 80 milhões de pessoas globalmente todos os anos, segundo estimativas [7].

Nos últimos anos, houve uma intensificação de estudos relacionando os benefícios de microrganismos capazes de beneficiar a saúde humana e animal, principalmente com a utilização de bactérias com potencial probiótico. Estes são microrganismos vivos capazes de proporcionar benefícios à saúde quando administrado em quantidades adequadas [8]. A utilização, por exemplo, de bactérias probióticas frente a patologias são cada vez mais frequentes, podendo-se observar o potencial preventivo de câncer de colo retal [9]; melhorias em distúrbios metabólicos [10]; sendo benéfico para o funcionamento do cérebro, principalmente, para mitigação de distúrbios mentais [11]; outrossim, mitigando processos inflamatórios decorrentes de doenças auto imune, como por exemplo, colite ulcerativa e artrite reumatoide [12].

Bactérias do gênero *Enterococcus*, microrganismos anaeróbios facultativos e produtores de ácido láctico, são bactérias Gram-positivas, sendo em sua maioria patogênicos ou com potencial patogênico [13]. Todavia, algumas espécies do gênero em questão têm se demonstrado com diversos benefícios em estudos realizados em animais e seres humanos, como por exemplo, amenizando colite e surgimento de câncer intestinal em modelo animal [14]; Outrossim, bactérias do gênero *Enterococcus* demonstrou-se com potencial anti-ansiedade, melhorando comportamentos característicos da ansiedade [15]. Ademais, melhorando a imunidade humoral, tendo-se um acréscimo de imunoglobulina IgA-s em crianças suplementadas com *E. faecium* [16].

Diante dos argumentos acima, o objetivo principal deste estudo é verificar os possíveis efeitos antibacteriano promovido por bactérias do gênero *Enterococcus spp.* frente a microrganismos promotores de infecção intestinal, através de uma revisão sistemática.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Revisão Sistemática

As diretrizes que foram relatadas para a Revisão Sistemática e Metanálise seguiram os

protocolos estabelecidos pelos Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses – PRISMA [17, 18]

4.2.2. Análise qualitativa

O protocolo de revisão foi cadastrado na Base de Registros de Protocolos de Revisões Sistemáticas – PROSPERO, conforme o estabelecido pelo Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses – PRISMA [17, 18]

4.2.3. Questão de pesquisa

Foi realizada a seguinte questão de pesquisa: A administração de bactérias do gênero *Enterococcus spp.* possuem efeitos benéficos frente a microrganismos oportunistas do intestino em modelo animal ?

4.2.4. Busca de artigos

A pesquisa foi realizada nas seguintes bases eletrônicas de busca de artigos científicos: Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Sciencedirect (<https://www.sciencedirect.com/>), utilizando os seguintes descritores em inglês: *Enterococcus*; Bacteria; Intestinal infection; Probiotics; *Shigella*; *Listeria*; *Salmonella*; *Escherichia Coli*; *Yersina*; *Staphylococcus*; *Clostridium*; *Campylobacter*. Para detalhamento de buscas foram utilizados conectores, em inglês, AND ou OR.

4.2.4. Seleção dos estudos

4.2.4.1. Critérios de inclusão

O seguintes critérios de inclusão foram aplicados: estudos que conduzem os experimentos em camundongos; utilização de *Enterococcus spp.* como agentes de prevenção ou tratamento; estudos que apresentem controle negativo e positivo para bactéria patogênica; ainda, que comparem pelo menos dois grupos de modelo animal; estudos que incluam pelo menos um agente de infecção intestinal. Estudos publicados nos últimos 10 anos, sendo tanto no idioma português, como inglês ou espanhol.

4.2.4.2. Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram empregados nesta revisão: experimentos *in vitro*; estudos que não sejam conduzidos em camundongos; outro tipo de intervenção que não seja exclusivamente bactérias do gênero *Enterococcus*; estudos sem controle; estudos que não incluem nenhum agente bacteriano de infecção intestinal; trabalhos incompletos; revisões de literatura, capítulos de livros, resumos, anais de congresso, etc; outros critérios que sejam contrários aos de inclusão.

4.2.5. Risco de Viés

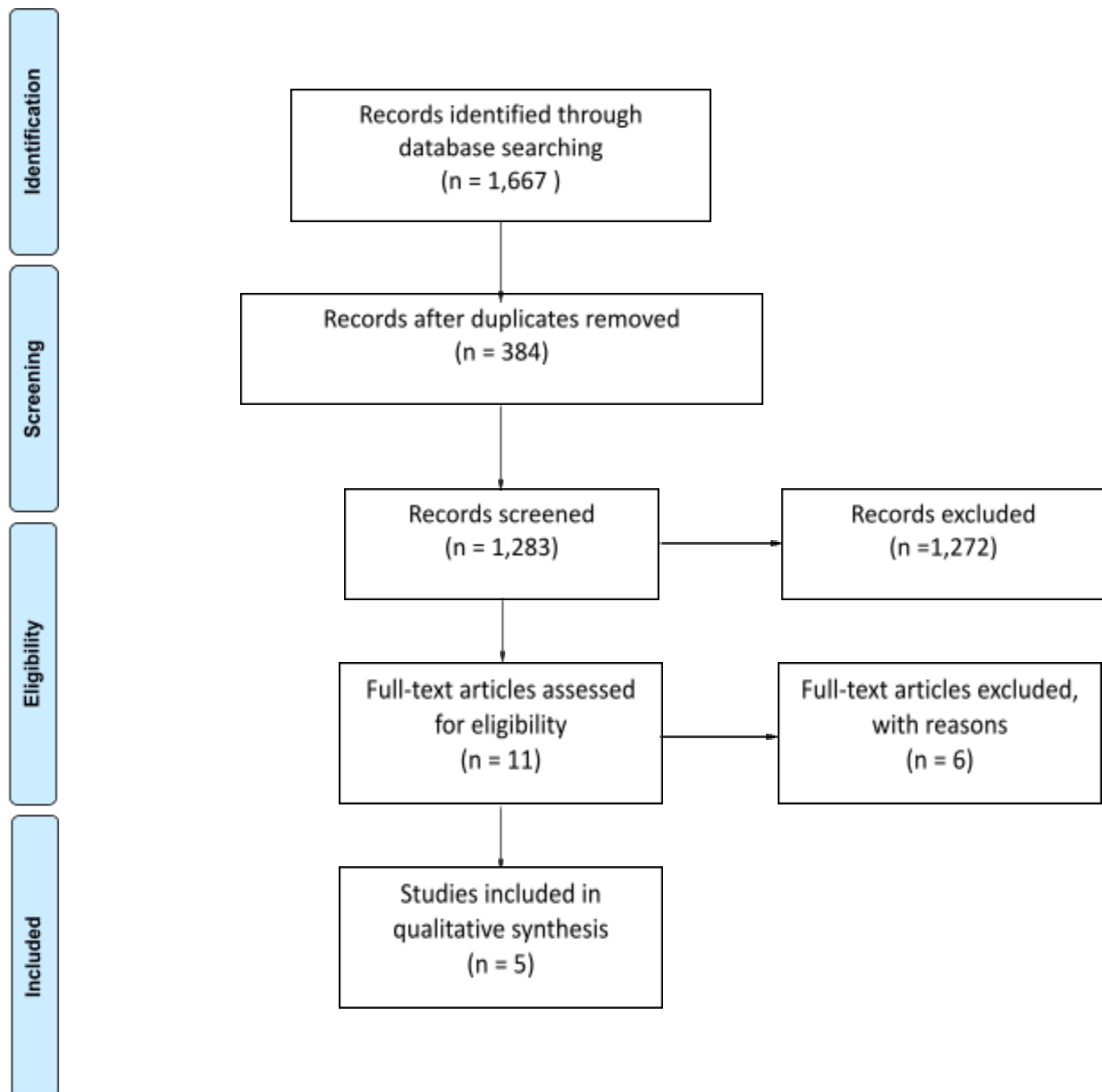
A análise do risco de viés foi realizada com a ferramenta Syrcle, direcionada para estudos em animais. A tabela deste tipo de risco de viés compreende: risco baixo, incerto e alto [19]. Além disso, as análises foram realizadas por três autores independentes, e os contrapontos entre os avaliadores foram discutidos.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a realização de buscas de artigos nas plataformas digitais, encontrou-se 1.667 artigos científicos, destes, 384 duplicatas foram excluídas, totalizando um final de 1.283 artigos. A partir da leitura dos resumos dos estudos, 1.272 trabalhos não estavam relacionados ao tema proposto desta revisão de literatura, conseqüentemente foram excluídos. Desta forma, 11 estudos foram postos para análise de elegibilidade, os quais foram lidos por dois autores independentes. Ao final das análises, conclui-se que 6 artigos não estavam de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos anteriormente, e continham as seguintes características: (1 estudo) correlacionou os efeitos de enterocianas isolada de *Enterococcus* em animais, e não células viáveis ou inviáveis da bactéria ácido láctica; (1 estudo) abordou os efeitos da administração de espécies de *Enterococcus* frente a bactérias enteropatogênicas, porém desenvolvidos em nematóides; (02 estudos) pontuaram a ação de bactérias do gênero *Lactobacillus* como também de *Enterococcus* na inibição de patógenos bacterianos, no entanto, os experimentos foram realizados *in vitro*. (02 estudos) estavam relacionados a caracterização de cepas de *Enterococcus* quanto aos seus potenciais probióticos, sendo assim, não direcionado quanto ao seus efeitos antimicrobiano.

Do total dos trabalhos analisados, apenas 5 artigos foram incluídos nesta revisão, os quais estavam em consonância com os critérios estabelecidos, conforme pode ser observado na **Figura 1**. Todos os cinco artigos foram postos para análise tanto qualitativa como quantitativa, podendo-se verificar as principais características dos estudos desenvolvidos em camundongos na **Tabela 1**. Todos os estudos investigaram os possíveis benefícios de cepas de *Enterococcus spp.*, prevalecendo estudos com a utilização da espécie *Enterococcus faecium*, ademais, todos os experimentos foram empregados células viáveis.

Figura 1. Fluxograma dos estudos selecionados para compor esta revisão de literatura.



Fonte: Os autores.

Tabela 1.Características dos estudos selecionados para compor esta revisão de literatura.

Autor	Indivíduos	Agente de infecção	Agente de intervenção	Concentração de intervenção (UFC)	Tempo de intervenção	Resultados
[20]	20 camundongos	<i>Listeria monocytogenes</i> BA00092	<i>E. faecium</i> JWS 833	1×10 ⁹ UFC/100µl/dia	14 dias	Redução da mortalidade; Aumento de TNF-α e IL-1β.
[21]	24 camundongos	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	<i>E. mundtii</i> ST4SA	4×10 ⁹ UFC/200µl/dia	6 dias	Redução de células patogênicas no intestino; Redução de células patogênicas nas fezes.
[22]	24 camundongos	<i>C. difficile</i> ATCC 43255	<i>E. faecalis</i> NM815; <i>E. faecalis</i> NM915; <i>E. faecium</i> NM1015.	10 ⁹ UFC/200µL/dia	14 dias	Diminuição de degradação da mucina; Diminuição de infiltrações linfocitárias; Redução de células patogênicas nas fezes.
[23]	40 camundongos	<i>Escheriachi coli</i>	<i>E. faecium</i> HDRsEf1	200µl de 5 × 10 ⁹ UFC/ml/dia	10 dias	Mitigação da perda de peso; Diminuições de diarreias; Diminuição de danos histopatológicos; Diminuição de inflamações intestinais.
[24]	48 camundongos	<i>L. monocytogenes</i> CMCC54007	<i>E. faecium</i> WEFA23	2 × 10 ⁹ UFC	7 dias	Aumento de sobrevivência pós infecção; Mitigação da perda de peso; Diminuição de índices do fígado e baço; Redução de IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, e NO Diminuição de células patogênicas no íleo, ceco e cólon.

Fonte: Os autores.

4.3.1. Risco de viés

Baseando-se na tabela de risco de viés para modelo animal Syrcle, proposto por HOOIJMANS, et al. (2014) [19], 3 estudos não esclareceram se houve uma alocação adequada e nem se foram ocultadas; 2 dos estudos não alojaram os animais aleatoriamente; apenas 20% dos experimentos tiveram tanto seus investigadores cegados como também seus avaliadores de resultados nos estudos e mais de 80% sabiam quais grupos foram utilizados o *Enterococcus spp.* Ademais, não houveram dados incompletos nos cinco artigos avaliados (Tabela. 2).

Tabela 2. Risco de viés (Syrcle).

	Sim	Não	Não está claro
A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?	40 %	0%	60%
Os grupos foram semelhantes desde o início ou ajustados para fatores de confusão na análise?	100%	0%	0%
A locação aos diferentes grupos foi adequadamente ocultada?	40%	0%	60%
Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?	60%	0%	40%
Os investigadores foram cegados sobre que intervenção que cada animal recebeu?	20%	80%	0%
Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado?	0%	40%	60%
O avaliador do resultado foi cegado?	20%	40%	40%
Os dados de resultados incompletos foram adequadamente abordados?	100%	0%	0%

Fonte: Os autores.

4.3.2. *Enterococcus spp.* como fator protetivo da perda peso

Os efeitos do *Enterococcus spp.* na prevenção da perda de peso foi visualizado em três estudos [20, 24, 23]. Todos os três estudos envolveram a utilização da espécie *E. faecium* como agente protetor, sendo dois agentes de infecção: *L. monocytogenes* e *E. coli*.

Choi, et al. (2012), mostraram a capacidade da cepa *E. faecium* JWS 833 em contrapor a perda de peso observada no grupo não preventivo, a uma dosagem de 1×10^9 UFC/100µl/dia do probiótico (grupo preventivo: 14.46 ± 0.19 g / grupo não preventivo: 15.31 ± 0.26 g) [20]. Este mesmo benefício foi observado com a administração da cepa *E. faecium* WEFA23, a qual proporcionou uma média de peso aproximado de 18 g, enquanto que o grupo controle positivo não ultrapassou 14g [24]. Vale ressaltar que resultados positivos também foram visualizados em infecções provocadas por *E. coli*, sendo a diferença de peso no grupo probiótico e não probiótico mais significativo no vigésimo dia do experimento [23].

Esses resultados são promissores tendo em vista que infecções intestinais tendem a provocar perda de peso devido ao quadro de disbiose e conseqüentemente o desenvolvimento de diarreia que, neste caso, o organismo humano ou animal não conseguem absorver nutrientes.

4.3.3. Aumento da sobrevivência proporcionado pelos probióticos

Dois estudos demonstraram os efeitos dos probióticos na sobrevivência após infecção por bactérias patogênicas [20, 24]. Um total de 44 camundongos foram utilizados em ambos experimentos, sendo *L. monocytogenes* como agente de infecção.

Nos estudos de Choi, et al. (2012), a administração de *L. monocytogenes* BA00092 a uma dose de $1,2 \times 10^5$ UFC foi suficiente para matar todos os camundongos que não receberam *E. faecium* JWS 833 quase sete dias depois, observando-se um aumento em caráter preventivo do probiótico, uma sobrevivência superior a 10% [20]. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de He, et al. (2021), todavia, os camundongos que não receberam os probióticos morreram três dias depois da infecção, em contraste ao grupo tratado com *E. faecium* WEFA23, aumentando a sobrevivência média entre 14% e 28% após o 8 dias da infecção [24].

4.3.4. Efeitos em parâmetro histológico propiciado por cepas de *Enterococcus*

Dos cinco estudos incluídos nesta revisão, três estudos evidenciaram o potencial de *Enterococcus spp.* com efeitos protetivos a danos no tecido intestinal, sendo um total de 30 indivíduos para o controle e 30 indivíduos para o grupo probiótico [22, 23, 24].

Resultados semelhantes aos encontrados na **Tabela 1** também foram evidenciados com outros gêneros de bactérias ácido lácticas. Wang et al. (2018) demonstraram que o probiótico *L. reuteri* foi capaz de prevenir o aparecimento de infiltrações imunitárias e danos estruturais dos enterócitos em camundongos infectados com *E. coli* [25]. Mais a frente, Wang et al. (2020) também evidenciaram os efeitos de *Lactobacillus*, neste caso *Lactobacillus casei*, em contrapor danos teciduais acarretados por *E. coli*, observando mitigação de infiltrações de células imune,

bem como criptas relativamente normais, apresentando índices de danos histológico do intestino aproximadamente 2 vezes menor do que o grupo controle [26].

4.4. CONCLUSÃO

Infecções intestinais ocasionadas por bactérias patogênicas são recorrentes em diversos países e, em alguns são um problema de saúde pública, tendo em vista os altos índices de mortalidade por complicações desses microrganismos. A utilização de probióticos como fator protetivo e/ou de tratamento frente a esses seres microscópicos oportunistas do intestino é evidenciado em diversos estudos em animais como pode ser confirmado nesta revisão. Benefícios como diminuição da perda de peso e complicações no tecido do intestino propiciado por *Enterococcus*, ressalta a capacidade da mesma em mitigar as principais complicações dessa patologia. Desta forma, há a necessidade de maiores pesquisas que comprovem a seguridade na utilização de bactérias do gênero *Enterococcus*, bem como a caracterização dos efeitos surtidos a partir de sua administração em seres humanos ou animais, para que assim, a mesma possa ser mais um auxiliador na redução da problemática.

4.5. REFERÊNCIAS

1. Healthdirect. Bowel infections; c2022. Disponível em: <https://www.healthdirect.gov.au/bowel-infections#:~:text=Bowel%20infections%20are%20caused%20by,person%20who%20has%20the%20infection.>
2. Centers for Disease Control and Prevention. Foods That Can Cause Food Poisoning; c2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foods-linked-illness.html>
3. Organização das Nações Unidas. Infecção alimentar mata 420 mil pessoas por ano no mundo; 2015. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2015/12/1533841-infeccao-alimentar-mata-420-mil-pessoas-por-ano-no-mundo>
4. Takaya, A., Yamamoto, T., & Tokoyoda, K. Humoral Immunity vs. Salmonella. *Frontiers in immunology*. 2020; 10, 3155.
5. CDC.gov. Salmonella. C2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
6. Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*. 2001; 14(3), 584–640.
7. Watkins L.K.F, Appiah G.D. Shigellosis. In: CDC, editor. *CDC Yellow Book*. EUA; 2019. p. 4-78
8. Saad, Susana. Probiotics and prebiotics: The state of the art. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006; 42. 1-16.

9. Ambalam, P., Raman, M., Purama, R. K., & Doble, M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. 2016; 30(1), 119–131.
10. Silva, P. H. ., Freitas , L. de B. R. de ., Santos, S. M. dos ., Carmo, T. L. do ., Porto, A. L. F. ., Oliveira, V. de M. ., Calaça, P. R. de A. ., & Soares, M. T. C. V. Intestinal bacterial agent with biotechnological potential against metabolic disorders: An integrative review of *Akkermansia muciniphila*. *Research, Society and Development*. 2021; 10(8), e45510817454.
11. Ansari, F., Pourjafar, H., Tabrizi, A., & Homayouni, A. The Effects of Probiotics and Prebiotics on Mental Disorders: A Review on Depression, Anxiety, Alzheimer, and Autism Spectrum Disorders. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2020; 21(7), 555–565.
12. Liu, Y., Alookaran, J. J., & Rhoads, J. M. Probiotics in Autoimmune and Inflammatory Disorders. *Nutrients*. 2018; 10(10), 1537.
13. García-Solache, M., & Rice, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(2), e00058-18.
14. Chung, I. C., OuYang, C. N., Yuan, S. N., Lin, H. C., Huang, K. Y., Wu, P. S., Liu, C. Y., Tsai, K. J., Loi, L. K., Chen, Y. J., Chung, A. K., Ojcius, D. M., Chang, Y. S., & Chen, L. C. Pretreatment with a Heat-Killed Probiotic Modulates the NLRP3 Inflammasome and Attenuates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients*. 2019; 11(3), 516.
15. Kambe J, Watcharin S, Makioka-Itaya Y, Inoue R, Watanabe G, Yamaguchi H, Nagaoka K. Heat-killed *Enterococcus faecalis* (EC-12) supplement alters the expression of neurotransmitter receptor genes in the prefrontal cortex and alleviates anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Lett*. 2020; 720:134753.
16. Surono IS, Koestomo FP, Novitasari N, Zakaria FR, Yulianasari, Koesnandar. Novel probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 supplementation increased total salivary sIgA level and bodyweight of pre-school children: a pilot study. *Anaerobe*. 2011;17(6):496-500.
17. MOHER D., LIBERATI A., TETZLAFF J. & ALTMAN D.G. The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*. 2009; 151:264-269.
18. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Ministério da Saúde, Brasília. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>.
19. Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., & Langendam, M. W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC medical research methodology*. 2014; 14, 43.
20. Choi, H. J., Shin, M. S., Lee, S. M., & Lee, W. K. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiology and immunology*. 2012; 56(9), 613–620.
21. van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 excludes *Listeria monocytogenes* from the GIT, as shown by bioluminescent studies in mice. *Beneficial microbes*. 2016; 7(2), 227–235.
22. Mansour, N. M., Elkhatib, W. F., Aboshanab, K. M., & Bahr, M. Inhibition of *Clostridium difficile* in Mice Using a Mixture of Potential Probiotic Strains *Enterococcus faecalis* NM815, *E. faecalis* NM915, and *E. faecium* NM1015: Novel Candidates to Control *C. difficile* Infection (CDI). *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2018; 10(3), 511–522.

23. Yan, T., Zhang, F., He, Y., Wang, X., Jin, X., Zhang, P., & Bi, D. (2018). Enterococcus faecium HDRsEf1 elevates the intestinal barrier defense against enterotoxigenic Escherichia coli and regulates occludin expression via activation of TLR-2 and PI3K signalling pathways. *Letters in applied microbiology*. 2018; 67(5), 520–527.
24. He, Y., Yang, Q., Tian, L., Zhang, Z., Qiu, L., Tao, X., & Wei, H. Protection of surface layer protein from Enterococcus faecium WEFA23 against Listeria monocytogenes CMCC54007 infection by modulating intestinal permeability and immunity. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021; 105(10), 4269–4284.
25. Wang, T., Teng, K., Liu, G., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, X., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. Lactobacillus reuteri HCM2 protects mice against Enterotoxigenic Escherichia coli through modulation of gut microbiota. *Scientific reports*. 2018; 8(1), 17485.
26. Guangqiang Wang, Hongyu Tang, Ying Zhang, Xiang Xiao, Yongjun Xia, Lianzhong Ai, The intervention effects of Lactobacillus casei LC2W on Escherichia coli O157:H7 -induced mouse colitis, *Food Science and Human Wellness*. 2020; 289-294.

CAPÍTULO II

(Artigo a ser submetido à revista Archives of Biological Science)

Potencial antagônico, antimicrobiano e antibiofilme *in vitro* de *Enterococcus faecium* 133v frente a bactérias oportunistas do intestino

Paulo Henrique Silva*, Lucas de Barros Rodrigues de Freitas, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Leandro Paes de Brito, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Tecnologia em Bioativo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

***Auto correspondente:** eupaulosilvabio@gmail.com

Resumo: Infecções intestinais são recorrentes em diversos países, principalmente, regiões em desenvolvimento. A utilização de antibióticos para minimização da problemática, por exemplo, pode propiciar tanto o desenvolvimento de resistência bacteriana ou até mesmo a eliminação de diversos microrganismos benéficos para organismos humano ou animal. Assim, novos métodos que auxiliam na prevenção ou tratamento de infecções intestinais fazem-se necessários. Neste estudo, visando uma nova perspectiva para prevenir ou tratar infecções no trato intestinal, analisou-se a utilização da bactéria probiótica *Enterococcus faecium* 133v, bem como seus metabólitos ou composição frente as principais bactérias oportunistas do intestino: *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp*. A análise antagonista em difusão de disco demonstraram a capacidade do *E. faecium* 133v em inibir o crescimento da maioria dos microrganismos, obtendo zona de inibição entre 30 mm e 60 mm, sendo a bactéria *Listeria spp* apresentando uma maior sensibilidade. Além disso, o sobrenadante e o Exopolissacarídeo (EPS) de *E. faecium* 133v surtiram efeito antimicrobiana em todas as seis cepas patogênicas. Esses resultados evidenciam a capacidade de *E. faecium* 133v como potente auxiliador, contrapondo às principais bactérias oportunistas do intestino. Assim, fica sugerido estudos *in vivo* para que a utilização do achado possa ser uma possibilidade futura.

Palavras-chave: probiótico; *Enterococcus faecium*; bactérias patogênicas; infecção intestinal.

5.1. INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas, especialmente, provindas de alimentos contaminados, são uma das principais causas de infecção intestinal no mundo, podendo desenvolver, em sua maioria, resistência aos principais antibióticos [1, 2]. Somado a isso, bactérias como as do gênero *Shigella* e *Salmonella* são responsáveis por milhares de casos de todos os anos [3, 4]. Ambas, Gram-negativas podem causar disenteria, quadro clínico caracterizado por evacuação de fezes com muco e sangue; febre, dor de cabeça, náusea e vômito [5, 6].

Além disso, essas e outras patogênicas entéricas são um problema para saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, como é o caso, por exemplo, de algumas regiões presentes no continente Africano e Asiático, sendo responsável por milhares de mortes todos os anos [7]. Ademais, a listeriose, doença ocasionada por algumas cepas do gênero *Listeria*, é caracterizada por penetrar células do intestino, promovendo processos inflamatórios, podendo, em alguns casos, atingir outros órgãos como, por exemplo, o fígado [8]. Além desse patógeno, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, um dos principais agentes promotores de diarreia, fixa-se nos enterócitos e acarreta subversão de processos essenciais das células, desregulando mecanismos de defesa e estrutural [9]. Além disso, infecções por *E. coli* são recorrentes em pessoas acima dos 55 anos, sendo sugerido um aumento de casos ao longo dos próximos anos, devido ao envelhecimento da população mundial [10].

Por outro lado, bactérias benéficas aos seres humanos e animais estão sendo cada vez mais exploradas, isto porque muitas são antagônicas a diversos microrganismos patogênicos dos diversos sistemas, tais como: urinário, digestivo, respiratório, etc [11].

Os probióticos, conhecidos por serem microrganismos vivos capazes de trazer benefícios para a saúde do indivíduo quando administrado em quantidades adequadas, são demonstrados em diversos estudos como potentes agentes anti-infecciosos, principalmente, do trato gastrointestinal [12, 13].

Enterococcus faecium, bactéria Gram-positiva, está sendo, ao longo dos anos, cada vez mais estudada, especialmente em estudos que visam benefícios para saúde humana e animal. É sugerido o potencial de *E. faecium* frente ao câncer de colo retal, diminuindo os principais danos observados neste tipo de patologia [14]. Além disso, isolados protéicos de *E. faecium* também foram eficientes na mitigação no desenvolvimento de câncer colorretal [15]. Além dessa patologia, a bactéria em questão abrandou colite ulcerativa induzida por Sulfato de Dextrano de Sódio (DSS) em camundongos, exibindo uma diminuição de inflamações e danos histopatológicos, característicos dessa doença [16]. Ainda, quando combinado com outros probióticos, culminou na diminuição de índices lipídicos, como triglicerídeos e colesterol total, por exemplo [17].

Sendo assim, em consonância com os benefícios demonstrados acima, bem como a importância de cuidados paliativos frente a microrganismos patogênicos do intestino, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a possível capacidade da bactéria *E. faecium* 133v em oposição as principais bactérias patogênicas intestinal.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. Cepas bacterianas e Condições de cultura

A bactéria ácido láctica *E. faecium* 133V e a bactéria patogênica *Escherichia coli* foram obtidas no Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), presente na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE. As outras quatro bactérias patogênicas (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria sp.*) foram obtidas no Departamento de Tecnologia Rural (UFRPE, Recife). *E. faecium* 133v foi reativada em soro de leite e as bactérias patogênicas foram cultivadas em meio BHI (Brain-Heart-Infusion) caldo por 24 horas a 37 °C.

5.2.2. Atividade antagonista

As bactérias patogênicas foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 18 horas em condições aeróbias, ajustadas para uma concentração de 10^7 UFC/mL. Para o cultivo de *E. faecium* 133v foi utilizado soro de leite, incubando-se a 37°C por 24h. Após o crescimento, 5µL de cultivo foram colocados sob a superfície de discos de papel esterilizados em uma placa de Petri contendo ágar MRS, e incubados a 37°C, durante 24 horas. A seguir, 15 mL de ágar semi sólido contendo as bactérias patogênicas recém cultivadas em caldo BHI, foram adicionados por cima do disco nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, sob observação a cada 24 horas. As zonas de inibição em torno dos discos de papel foram registradas conforme as metodologias de Guedes Neto et al. (2005) e Thirabunyanon e Thong Wittaya (2012) [18, 19].

5.2.3. Produção do sobrenadante

Para produção do sobrenadante, a bactéria ácido láctica *E. faecium 133v* reativada anteriormente, foi adicionada em 500 ml de soro de leite e incubada a 37°C entre 24-48 horas em condições aeróbicas. Após a incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi extraído e estocado a -80°C durante 3 dias. Em seguida, o mesmo foi liofilizado para realização do experimento.

5.2.4. Extração de Exopolissacarídeo

Para a produção de EPS, foi inoculado 1% de pré-inóculo em soro de leite e incubado por 24 - 48 horas a 30°C. Após a centrifugação a 4°C, 9000 rpm por 20 min, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) ao sobrenadante a uma concentração final de 4% (p / v), e as proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação (10000 rpm a 4 ° C durante 30 min). O sobrenadante livre de proteínas, foi coletado e o EPS precipitado pela adição de volumes duplos de etanol absoluto frio e mantido durante a noite a 4°C. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. O precipitado foi dissolvido em água ultrapura e dialisado por 2 dias a 4°C contra a mesma solução (trocada duas vezes ao dia), utilizando membranas de diálise com um ponto de corte de 12–14 kDa. Após a diálise, a solução foi congelada a -80°C e liofilizada a -50°C por até 3 dias para remover completamente o solvente.

5.2.5. Atividade antimicrobiana do sobrenadante e EPS

A atividade antimicrobiana foi performada em placas de 96 poços (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), utilizando-se EPS ou sobrenadante liofilizados. Primeiramente, o EPS/sobrenadante em uma concentração de 100mg/ml foi adicionado na primeira fileira da placa em um volume de 200 microlitros e, nas seguintes, até a de número 8, foram adicionados 100 microlitros de meio BHI. Após isso, fez-se microdiluição, retirando 100 microlitros da primeira fileira e transferindo para a segunda em diante, descartando 100 microlitros no final do processo em cada fileira. Cada patógeno, padronizados a 10^7 UFC, foram adicionados em seguida entre as posições 2-8 da placa. Subsequente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para serem analisadas. O experimento foi realizado em triplicatas na placa, contendo tanto controle negativo, o qual foi composto por apenas meio de cultura, e controle positivo para cada patógeno. Por fim, após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em 600 nm.

As porcentagens da concentração mínima inibitória (CMI) de EPS ou do sobrenadante para cada microrganismo foram calculados como:

$$\% = \left[1 - \left(\frac{A1 - A2}{A0} \right) \right] \times 100\% \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde A1 representa a absorbância dos poços com as diferentes concentrações de EPS/Sobrenadante, A2 é a absorbância do controle negativo (somente BHI estéril) e A0 é a absorbância do controle positivo (somente a cultura patogênica).

5.2.6. Atividade antibiofilme

Para realização da atividade antibiofilme, seguiu-se, com modificações, conforme descrito em Wang et al. (2015) [20]. Sintetizando, utilizou-se EPS diluído em PBS nas seguintes concentrações: 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 e 5.0mg/ml. Após a diluição, 100 microlitros das soluções foram adicionados em placas de microtitulação aderente de 96 poços. Ademais, as bactérias patogênicas foram cultivadas durante 24 horas a 37°C em meio BHI caldo, e por conseguintes, transferiu-se 100 microlitros para a mesma placa. Então, a placa foi agitada em shaker por 90 min a 37°C em 75 rpm e incubada em seguida a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS. Além disso, os poços foram fixados com metanol por um período de 15 minutos e corados por 20 minutos com 125 µL de cristal violeta (0,1%). Por fim, foram lavados novamente com água destilada e colocados para secar em temperatura ambiente. Aplicou-se 200 µL de ácido acético (33%) em cada poço e a absorbância foi medida a 595 nm.

As porcentagens de inibição de adesão microbiana foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Inibição da adesão microbiana} = \left(1 - \left(\frac{Ac}{A0}\right)\right) \times 100\% \quad \text{Eq.(2)}$$

onde Ac é a absorbância do ensaio e A0 é a absorbância dos poços de controle positivo (sem EPS). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

5.2.7. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram geradas a partir do software GraphPad Prism 6.0. Os resultados foram apresentados com média e desvio padrão (\pm) a partir de determinações pelas duplicatas.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Efeito antagonista de *E. faecium* 133v frente a microrganismos oportunistas do intestino.

A capacidade de bactérias produtoras de ácido lático frente a diversos microrganismos é observado em estudos na literatura. Esse potencial inibitório *in vitro* foi verificado com a espécie *E. faecium*, podendo ser observado na **Tabela 1**, na qual a BAL foi eficiente em diminuir, a partir da mensuração do halo em milímetros, o crescimento de *S. typhimurium*, apresentando-se com 30mm de área inibida. Além disso, *E. faecium* 133v apresentou efeitos significativos com outras quatro patogênicas: *S. sonnei*, *Listeria spp.*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. A medição das zonas de inibição demonstraram a eficiência de *E. faecium* 133v em impedir o crescimento das principais bactérias patogênicas, mesmo estando estas em uma concentração de 10^7 UFC/ml. Ademais, *E. faecium* 133v apresentou uma capacidade maior em inibir *S. sonnei* e *Listeria spp.*, 40 mm e 60 mm, respectivamente.

A capacidade de *Enterococcus* em inibir o crescimento de outras baterias pode estar associada tanto a produção de ácido lático, produzido a partir da fermentação de açúcares, como também a produção de bacteriocinas como as enterocinas, já demonstradas anteriormente como potente antimicrobiano sob o crescimento de *S. enterica*, *E. coli*, *S. flexneri* e *L.*

monocytogenes, com as seguinte zona de inibição 15±0.1, 13±0.2, 15±0.2, 13±0.3, respectivamente [21, 22].

Nos estudos dos autores Mohanty et al. (2019) [23], *Lactobacillus plantarum* inibiu o crescimento da bactéria *Salmonella enterica*. Somado a isso, resultados frente a *E. coli* foi demonstrados por outras culturas bacterianas do ácido láctico, como as do *Lactobacillus rhamnosus GG*, apresentando zona de inibição de 3mm, sendo superior a zona de inibição exercida pelo sobrenadante, o qual obteve 2 mm [24].

Os resultados aqui apresentados exibem o potencial antagonista da bactéria probiótica *E. faecium* 133v contra os principais patógenos oportunistas do intestino testados, embora sejam necessários estudos *in vivo* para compreender tais efeitos.

Com intuito de comparar e avaliar a capacidade do meio de cultivo em promover um melhor efeito antagônico foi realizado, através do mesmo método, os efeitos da mesma bactéria, porém cultivada em meio MRS (Man, Rogosa and Sharpe Agar). A cepa também apresentou área de inibição elevada, sendo observado maiores diâmetros frente a *S. typhimurium*, *S. sonnei* e *S. flexneri*, sendo esta última não inibida por *E. faecium* 133v cultivada em soro de leite (**Fig. 1**)

O cultivo de bactérias probióticas em soro de leite para ação antimicrobiana são vistos em outros estudos. Segundo os trabalhos de Medina et al. (2018), os quais cultivaram *Bacillus clausii* em soro de leite, esta espécie foi eficaz frente a vários patógenos, como *S. flexneri* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo [25]. Nas culturas de bactérias do gênero *Lactobacillus*, a produção de proteases é maior em soro de leite, tendo em vistas os diversos compostos que o compõem, além dessa BAL ser facilmente encontrada nesse tipo de cultura [26].

5.3.2. Atividade antimicrobiana do sobrenadante de *E. faecium* 133v

Os resultados demonstraram a eficiência do sobrenadante em inibir o crescimento de todas as bactérias a partir de 50mg/ml, tanto nas cepas Gram-negativas como nas Gram-positivas (**Fig. 2**). Todavia, vale ressaltar a capacidade do composto em inibir o crescimento de *E. coli* na concentração de 12,5 mg/ml, chegando ao valor superior a 90% de inibição - $90,09 \pm 0,004$. Assim, de acordo com os resultados aqui apresentados, o sobrenadante de *E. faecium* 133v pode ser mais um potente aliado em impossibilitar o crescimento de microrganismos capazes de propiciar infecções generalizadas.

Os benefícios para a saúde proporcionados pelo sobrenadante de bactérias ácido lácticas é utilizada em diferentes estudos tanto em *in vitro* ou *in vivo*. Liu et al. (2020), demonstraram a capacidade do sobrenadante de *L. rhamnosus GG* em minimizar os níveis de glicose no sangue, bem como acúmulo de gorduras no fígado [27]. Além disso, o sobrenadante de *Bifidobacterium catenulatum* atenuou inflamações e danos no tecido intestinal de camundongos com colite induzida por DSS [28]. Outrossim, Mirnejad et al. (2013) utilizaram sobrenadante de bactérias ácido lácticas frente a *S.flexneri* e *S. sonnei*, obtendo resultados inibitórios satisfatórios na atividade antimicrobiana [29]. Ainda, segundo os estudos dos autores Wasfi et al. (2018) mostram que sobrenadante de *Lactobacillus sp*, seja tratado ou não, possuíam capacidade antimicrobiana significativa, inibindo o crescimento de *Streptococcus mutans* [30]. Além disso, cepas de *Enterococcus* também tem sido eficiente em posição a *Salmonella* e *E. coli*, apresentando zona de inibição de 8,2mm e 6mm, respectivamente [31].

5.3.3. Atividade antimicrobiana do EPS isolado de *E. faecium* 133v

Os resultados demonstraram que o *E. faecium* 133v foi eficiente em inibir o crescimento de todas as seis cepas, observando-se valores inibitórios significativos em 100 mg/ml do EPS, sendo superiores a 95% de inibição (**Fig. 3**). Ademais, valores inferiores a 12,5 mg/ml foram capazes de inibir o crescimento de *S. flexneri* e, 25 mg/ml, as duas cepas do gênero *Listeria*. Resultados semelhantes foram visualizados nos estudos de Fan et al. (2021), no qual a cepa *Pediococcus pentosaceus* SSC-12 diante de *S. enterica* e *L. monocytogenes*, culminou em 71,9% e 14,9% de exclusão dessas duas patogênicas, respectivamente [32].

O EPS presente em microrganismos, é um composto extracelular caracterizado por proporcionar a formação de biofilmes [33]. Desta forma, a matriz polimérica extracelular (EPS), assim também denominada, auxilia na defesa à diversos agentes potenciais antagônicos [34]. A utilização de EPS frente a microrganismos é referida em alguns estudos. Adebayo-Tayo e Fashogbon (2020), retrataram em estudos conduzidos *in vitro*, a habilidade do EPS de BALs em inibir o crescimento das bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* [35]. Jeong et al. (2017), também demonstraram resultados relevantes, porém, frente a *S. enterica* e *L. monocytogenes* [36].

5.3.4. Atividade antibiofilme do EPS

Biofilmes, comunidade de um determinado microrganismo em interação, formados por diversas bactérias e fungos são responsáveis por infecções principalmente no trato intestinal, sendo frequente, também, no trato urinário de seres humanos [37]. O efeito adesivo de algumas bactérias auxiliado pela secreção, por exemplo, de EPS, resulta na formação de biofilmes,

estando este relacionado a resistência a antibióticos e burlação de mecanismo de defesa do organismo [38]. Sendo assim, optou-se por analisar os possíveis efeitos antibiofilme do EPS.

Os dados da avaliação de atividade do EPS isolado de *E. faecium* 133v, demonstraram a eficiência da BAL em reduzir a formação de biofilmes de todas as seis espécies patogênicas, especialmente, as do gênero *Shigella*, tendo uma forte redução do biofilme, observando-se valores de inibição superiores a 70% (Fig. 4).

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, foi observado nos estudos de Xu et al. (2020), o qual analisou EPS isolado de *Lactobacillus coryniformis* NA-3 frente a *S. typhimurium*, apresentando porcentagem de inibição entre $9,71\% \pm 1,80\%$ a $40,87\% \pm 2,2\%$ [39]. Jia et al. (2018) demonstraram os efeitos anti-aderência de *L. monocytogenes* promovido por EPS de *E. faecium* WEFA23 em células HT-29, obtendo porcentagem de exclusão superior a 80% [40]. Resultados semelhantes foram proporcionados por EPS de *Lactobacillus plantarum* 12, com baixa adesão e invasão às células HT-29 por *S. flexneri* [41].

5.4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais apresentados neste trabalho, observou-se o potencial antagonista, antimicrobiano e antibiofilme de *E. faecium* 133v, bem como seus metabólitos em inibirem o crescimentos de vários microrganismos capazes de promover infecção generalizada. A atividade antimicrobiana exercida pelo sobrenadante e o EPS frente às bactérias do gênero *Shigella*, *Listeria*, *Salmonella* e a espécie *E. coli*, assim como a ação do exopolissacarídeo na diminuição da formação de biofilme, destaca a BAL como promissora frente aos principais agentes de infecções, tanto em seres humanos como animais. Assim, diante desses resultados promitentes, faz-se necessário mais experimentos, especialmente em modelo animal, para que

possamos compreender seus possíveis efeitos benéficos *in vivo*, a fim de que uma utilização futura de *E. faecium* 133v de maneira preventiva ou de tratamento possa ser uma realidade.

5.5. REFERÊNCIAS

- [1] Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., & Cohen, H. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020; 10, 572912. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>
- [2] WHO. Food safety. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- [3] Healy J.M. e Bruce B. B. Salmonellosis (Nontyphoidal), Travel-Related Infectious Diseases. 2019; 4-78.
- [4] Kotloff, K. L., Riddle, M. S., Platts-Mills, J. A., Pavlinac, P., & Zaidi, A. Shigellosis. *Lancet* (London, England). 2018; 391(10122), 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8)
- [5] Lampel, K. A., Formal, S. B., & Maurelli, A. T. A Brief History of Shigella. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2017.
- [6] CDC. Salmonella. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/salmonella-symptoms.html>
- [7] Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., & Angulo, F. J. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS medicine*. 2015; 12(12), e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- [8] Chlebicz, A., & Ślizewska, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International journal of environmental research and public health*. 2018; 15(5), 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

- [9] Kobayashi, T., Ikeda, M., Okada, Y., Higurashi, Y., Okugawa, S., & Moriya, K. Clinical and Microbiological Characteristics of Recurrent *Escherichia coli* Bacteremia. *Microbiology spectrum*. 2021; 9(3), e0139921. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01399-21>
- [10] Marc Bonten, James R Johnson, Anita H J van den Biggelaar, Leonidas Georgalis, Jeroen Geurtsen, Patricia Ibarra de Palacios, Stefan Gravenstein, Thomas Verstraeten, Peter Hermans, Jan T Poolman, Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 72, Issue 7, 1 April 2021, Pages 1211–1219, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>
- [11] Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*. 2018; 26(3), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- [12]FAO/WHO. Probiotics in food Health and nutritional properties guidelines for evaluation. 2001. Disponível em: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- [13] Islam S. U. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*. 2016; 95(5), e2658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>
- [14] Calaça, P. R. de A., Santos, D. da S. ., Silva, J. F. da ., Aragão, A. B. L. ., Melo, I. M. F. de ., Silva, E. C. S. da ., Porto, A. L. F. ., & Soares, M. T. C. V. *Enterococcus faecium* 137v as a protective factor in an animal model for colorectal cancer. *Research, Society and Development*. 2021; 10(6), e9110615354. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15354>
- [15] Lins Aragão, A. B. ., da Silva Ferreira, J., Silva, P. H., da Silva Souza, P. E., da Silva Santos, D., da Silva, E. C., de Andrade Calaça, P. R., Soares da Silva, E. C., Figueiredo Porto, A. L., & Cavalcanti Vieira Soares, M. T. EFICÁCIA DAS ENTEROCINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL: UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*. 2021; 2(5), e25318. <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i5.318>
- [16] He, W., Ni, W., & Zhao, J. *Enterococcus faecium* Alleviates Gut Barrier Injury in C57BL/6 Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis. *Gastroenterology research and practice*. 2021; 2683465. <https://doi.org/10.1155/2021/2683465>
- [17] Huang, J., Huang, J., Yin, T., Lv, H., Zhang, P., & Li, H. *Enterococcus faecium* R0026 Combined with *Bacillus subtilis* R0179 Prevent Obesity-Associated Hyperlipidemia and Modulate Gut Microbiota in C57BL/6 Mice. *Journal of microbiology and biotechnology*; 2021; 31(2), 181–188. <https://doi.org/10.4014/jmb.2009.09005>

- [18] GUEDES NETO, LG.; SOUZA, MR.; NUNES, AC.; NICOLI, JR.; SANTOS, WLM. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microorganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Supl.* 2005; 2:245-250. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000800017>.
- [19] THIRABUNYANON, M.; THONGWITTAYA, N. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. *Research in Veterinary Science.* 2012; 93:74-81. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.008>.
- [20] Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z.: Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32, *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 74, 119e126.
- [21] Sharma, P., Kaur, S., Chadha, B. S., Kaur, R., Kaur, M., & Kaur, S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC microbiology.* 2021; 21(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02086-5>
- [22] Juturu, V., & Wu, J. C. Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical reviews in biotechnology.* 2016; 36(6), 967–977. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1066305>
- [23] 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.* 2019; 126, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.014>
- [24] Moens, F., Duysburgh, C., van den Abbeele, P., Morera, M., & Marzorati, M. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* exert synergistic antipathogenic activity in vitro against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Beneficial microbes.* 2019; 10(8), 923–935. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0064>
- [25] Anna Rzepkowska, Dorota Zielińska, Aleksandra Ołdak, Danuta Kołożyn-Krajewska. Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Food Science & Technology.* 2017; 9; 1983-1994
- [26] Rochín-Medina JJ, Ramírez-Medina HK, Rangel-Peraza JG, Pineda-Hidalgo KV, Iribe-Arellano P. Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Sci Technol Int.* 2018 Jan; 24(1):35-42. doi: 10.1177/1082013217724705.

- [27] Liu, Q., Liu, Y., Li, F., Gu, Z., Liu, M., Shao, T., Zhang, L., Zhou, G., Pan, C., He, L., Cai, J., Zhang, X., Barve, S., McClain, C. J., Chen, Y., & Feng, W. Probiotic culture supernatant improves metabolic function through FGF21-adiponectin pathway in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2020; 75, 108256. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108256>
- [28] Kim, H., Jeong, Y., Kang, S., You, H. J., & Ji, G. E. . Co-Culture with *Bifidobacterium catenulatum* Improves the Growth, Gut Colonization, and Butyrate Production of *Faecalibacterium prausnitzii*: In Vitro and In Vivo Studies. *Microorganisms*. 2020; 8(5), 788. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050788>
- [29] Mirnejad, Reza; Vahdati, Ali Reza; Rashidiani, Jamal; Erfani, Mohammad; Piranfar, Vahab. The Antimicrobial Effect of *Lactobacillus Casei* Culture Supernatant Against Multiple Drug Resistant Clinical Isolates of *Shigella Sonnei* and *Shigella Flexneri* in Vitro. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013; 15(2), -. doi:10.5812/ircmj.7454
- [30] Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M., & Ashour, H. M. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2018; 22(3), 1972–1983. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13496>
- [31] Rasta Hajikhani; Derya Onal Darilmaz; Zehra Nur Yuksekdog; Yavuz Beyatli. Assessment of some metabolic activities and potential probiotic properties of eight *Enterococcus* bacteria isolated from white cheese microbiota . *Antonie van Leeuwenhoek*. 2021; doi:10.1007/s10482-021-01599-3
- [32] Fan, Y., Li, X., Tian, R., Tang, R., & Zhang, J. Characterization and Biological Activity of a Novel Exopolysaccharide Produced by *Pediococcus pentosaceus* SSC-12 from Silage. *Microorganisms*. 2021; 10(1), 18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010018>
- [33] Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*. 2009; 5(3), e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>
- [34] Filloux, Alain; Ramos, Juan-Luis (2014). [Methods in Molecular Biology] *Pseudomonas* Methods and Protocols, Exopolysaccharide Quantification. 2014; 347–357. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_29
- [35] Adebayo-Tayo, B., & Fashogbon, R. In vitro antioxidant, antibacterial, in vivo immunomodulatory, antitumor and hematological potential of exopolysaccharide produced by

wild type and mutant *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus*. *Heliyon*. 2020; 6(2), e03268. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03268>

[36] Jeong D., Kim D.-H., Kang I.-B., Kim H., Song K.-Y., Kim H.-S., et al. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*. 2017; 78 436–442. [10.1016/j.foodcont.2017.02.033](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033)

[37] Del Pozo J. L. Biofilm-related disease. Expert review of anti-infective therapy. 2018; 16(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

[38] Ishikawa, T., Omori, T., & Kikuchi, K. Bacterial biomechanics-From individual behaviors to biofilm and the gut flora. *APL bioengineering*. 2020; 4(4), 041504. <https://doi.org/10.1063/5.0026953>

[39] Xu, X., Peng, Q., Zhang, Y., Tian, D., Zhang, P., Huang, Y., Ma, L., Qiao, Y., & Shi, B. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. *Food & nutrition research*. 2020; 64, 10.29219/fnr.v64.3744. <https://doi.org/10.29219/fnr.v64.3744>

[40] Jia, Kaiying; Tao, Xueying; Liu, Zhengqi; Zhan, Hui; He, Weijun; Zhang, Zhihong; Zeng, Zheling; Wei, Hua (2018). Characterization of novel exopolysaccharide of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infant and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; S0141813018347731. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.245

[41] Song, Y., Sun, M., Feng, L., Liang, X., Song, X., Mu, G., Tuo, Y., Jiang, S., & Qian, F. Antibiofilm Activity of *Lactobacillus plantarum* 12 Exopolysaccharides against *Shigella flexneri*. *Applied and environmental microbiology*. 2020; 86(15), e00694-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00694-20>

TABELAS

Tabela 1. Zona de inibição exercida pela cepa 133v frente a bactérias Gram-negativas (A) e Gram-positivas (B).

A

Bactéria	Zona de Inibição (mm)			
Bactérias patogênicas (Gram-negativa)				
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Enterococcus faecium</i> 133v	30	30	40	-

B

Bactéria	Zona de Inibição (mm)	
Bactérias patogênicas (Gram-positiva)		
	<i>Listeria spp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i> 133v	60	30

Fonte: Os autores.

LEGENDAS DAS FIGURA

Figura 1. Comparativo entre a cepa *E. faecium* 133v cultivada em soro de leite e em MRS (Man Rogosa & Sharpe).

Figura 2. Inibição de crescimento microbiano promovido pelo sobrenadante- A e B.

Figura 3. Concentração inibitória mínima do exopolissacarídeo frente a microrganismos gram-negativos (A) e gram-positivos (B).

Figura 4. Atividade do exopolissacarídeo na inibição da formação de biofilmes de bactérias gram-negativas (A) e gram-positivas (B).

FIGURAS

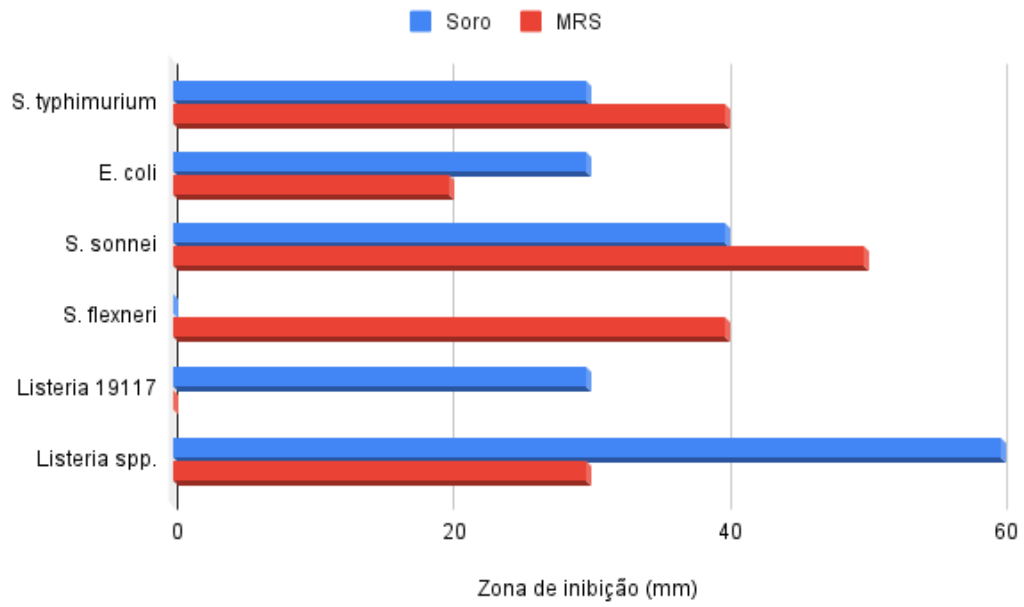
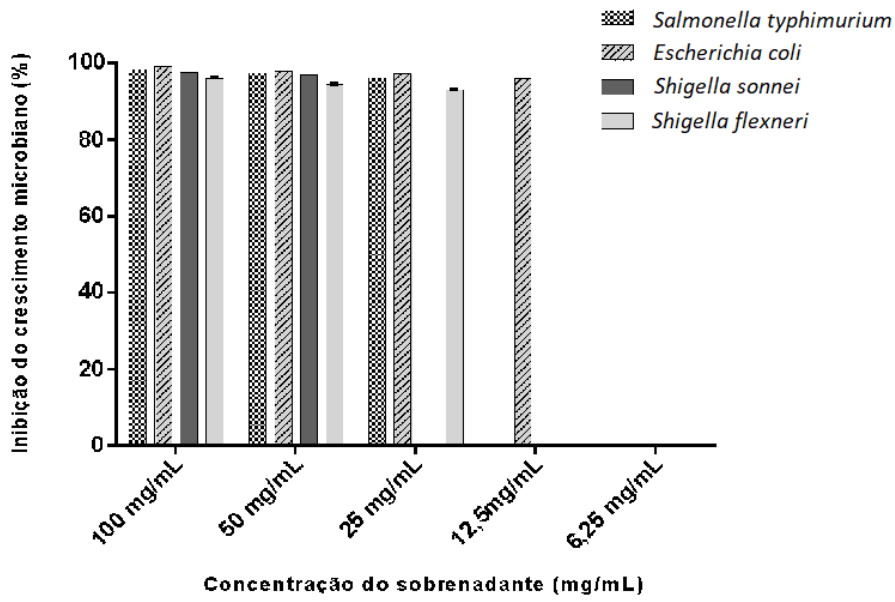


Fig. 1

A



B

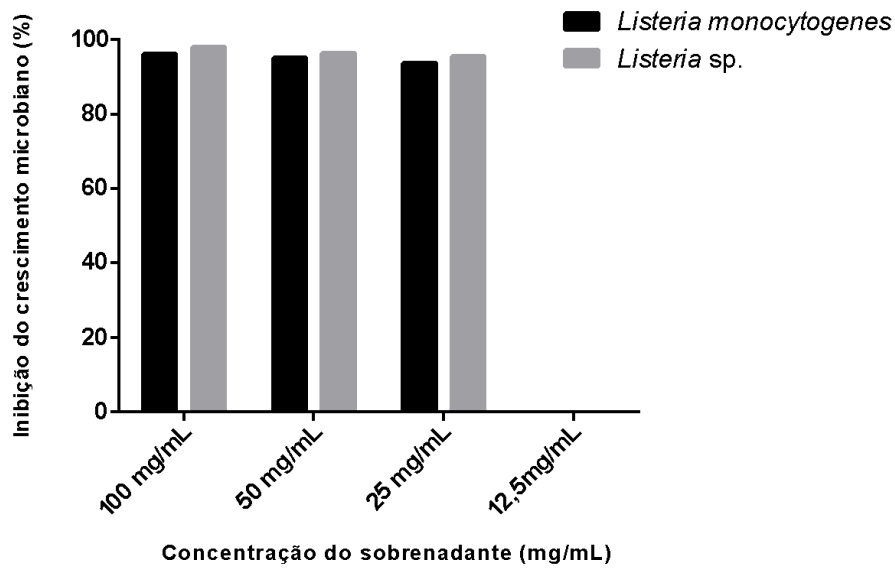


Fig. 2

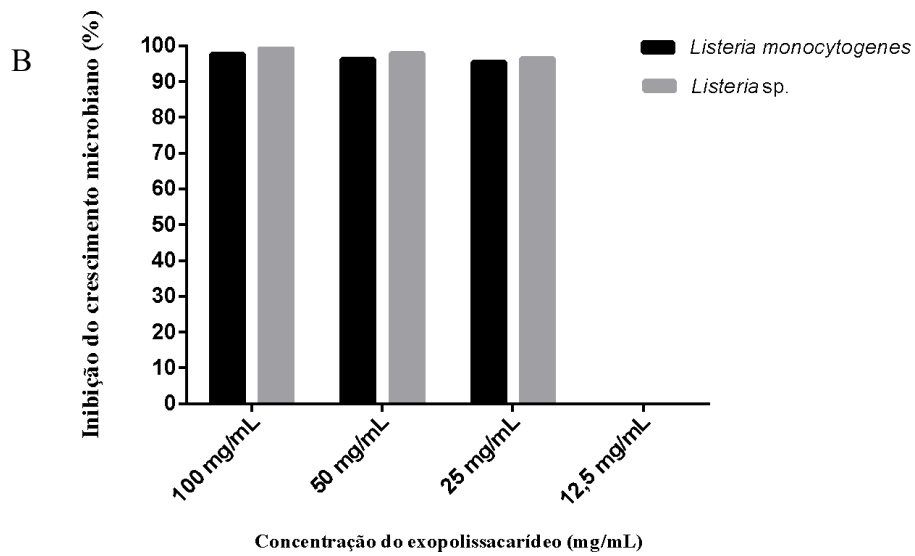
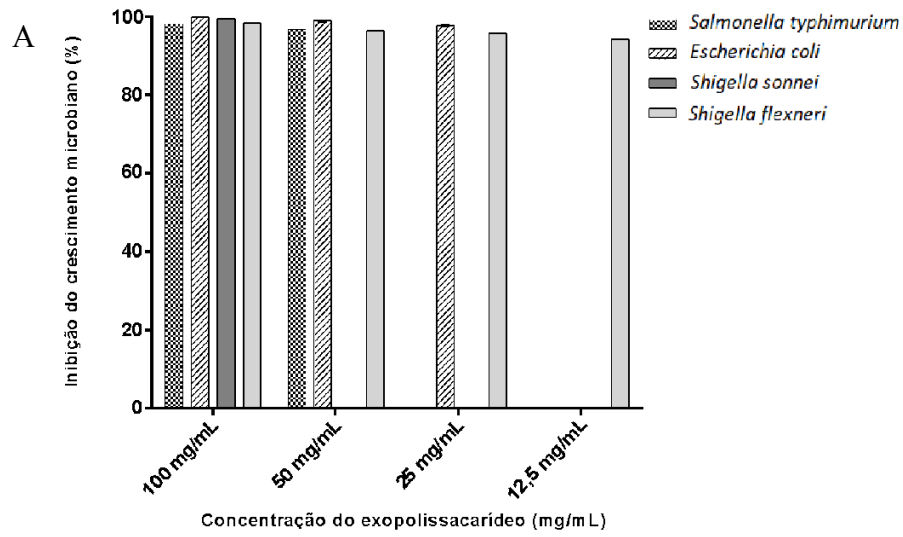


Fig.3

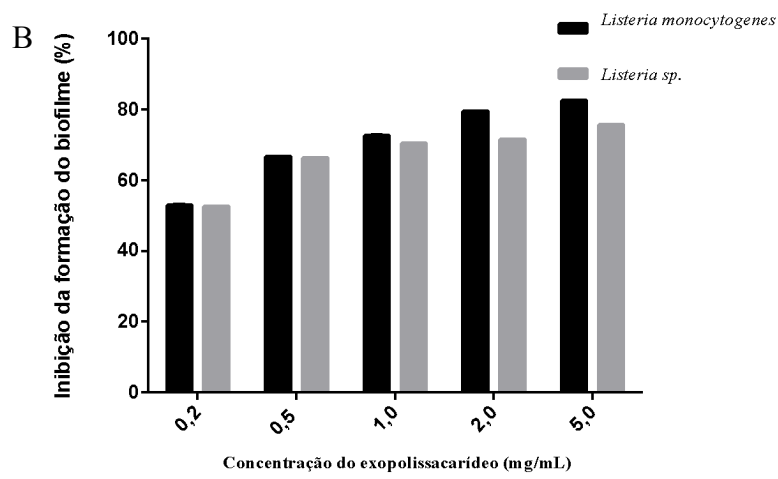
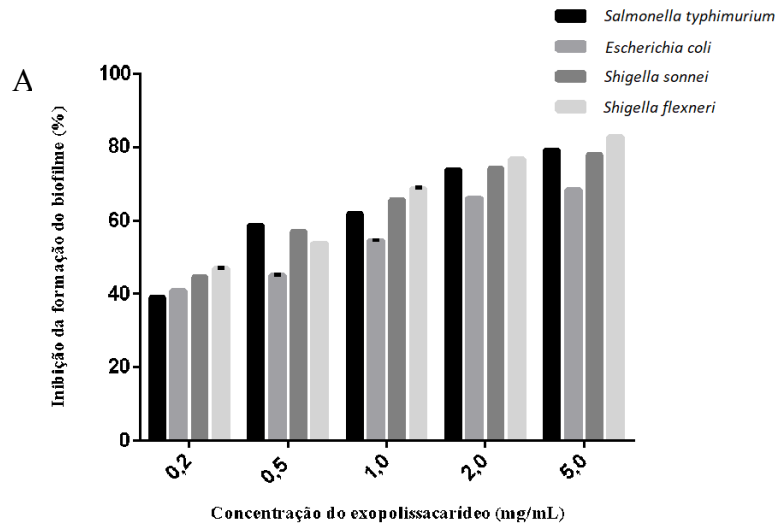


Fig. 4