



Universidade Estadual Paulista

“Júlio De Mesquita Filho”

Faculdade De Ciências Farmacêuticas

Efeito de um produto probiótico à base de soja na fase aguda da colite ulcerativa

Olivia Pizetta Zordão

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos
Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso
Umbelino Cavallini

Araraquara

2016

**Efeito de um produto probiótico à base de soja na fase aguda
da colite ulcerativa**

Olivia Pizetta Zordão

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciências dos
Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela
Cardoso Umbelino Cavallini

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Z88e
Olivia

Zordão, Olivia Pizetta
Efeito de um produto probiótico à base de soja na fase aguda da colite ulcerativa /

Pizetta Zordão. – Araraquara, 2016.
73 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Pesquisa em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

1.Colite ulcerativa. 2.Doença inflamatória intestinal. 3. Microbiota. 4. Produto fermentado de soja. 5. *Enterococcus faecium*. 6. *Bifidobacterium longum*. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

OLIVIA PIZETTA ZORDÃO

**EFEITO DE UM PRODUTO PROBIÓTICO À BASE DE
SOJA NA FASE AGUDA DA COLITE ULCERATIVA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Mestre(a) em Alimentos e
Nutrição

Araraquara, 08 de Julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA


DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI


PATRICIA DE OLIVEIRA PRADA


MARLA SIMONE JOVENASSO MANZONI

Dedicatória

Aos meus pais, Arquelau e Luzia, por
sempre me apoiarem e darem o suporte
necessário em todas as situações, por mais
difíceis que fossem.

Ao meu irmão Luis Henrique, que sempre
esteve ao meu lado não me deixando
desanimar nunca.

Ao Marcelo, por todo amor, dedicação e
pelo companheirismo de toda essa
trajetória.

A república Hellmann's que me acolheu e
esteve ao meu lado nos piores e melhores
momentos desses 2 anos de Unesp
Araraquara

A Deus, pela esperança nos momentos
mais turbulentos e por não me deixar de ter
fé em mim mesma

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pela orientação, ensinamentos e dedicação durante todas as etapas. Obrigada pela paciência e confiança dedicada a mim.

A Larissa, que dedicou muito tempo e saliva em infinitas explicações, agradeço à amizade, ao companheirismo e a paciência. Sentirei muita saudade do convívio diário e de todos os acontecimentos esperados e inesperados que o projeto nos proporcionou.

Às minhas colegas do Laboratório de Pesquisa em Probióticos: Isabela, Juliana Jabur e Juliana Marchesin pelo companheirismo.

A Josiane, Juliana, Raissa, Beatriz, Camila e Roseli, pela contribuição no período experimental.

A Roseli e a Josiane, pelas contribuições durante as análises.
Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr-UNESP, pelo aprendizado concedido durante o curso de mestrado.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr-UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa.

A Pró-Reitoria de Pós Graduação (PROPG) da UNESP pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio e ao José Antonio do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP, pelo auxílio nas técnicas histológicas.

A todos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação e da Biblioteca da FCFAr-UNESP.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste sonho.

RESUMO

Objetivos: A utilização de microrganismos probióticos na redução do risco de doenças inflamatórias intestinais (DIIs), incluindo a colite ulcerativa (CU), tem se mostrado promissora, sendo que o efeito benéfico depende da cepa utilizada e da fase da patologia. O objetivo do presente estudo foi averiguar o efeito de um produto probiótico à base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, na fase aguda da colite quimicamente induzida em camundongos. **Métodos:** O protocolo experimental teve duração total de 14 dias e os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=10): Grupo C - Animais saudáveis que não receberam os produtos em estudo; Grupo CL - Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo; Grupo CLF - Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado probiótico; Grupo CLP - Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo). A indução da colite foi feita pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS) a 3% dissolvido na água fornecida diariamente aos animais, por um período de sete dias, e os produtos foram administrados ao longo dos 14 dias de estudo. Durante o período experimental foram monitorados os seguintes parâmetros: peso corpóreo dos animais, ingestão hídrica e de ração, consistência e presença de sangue oculto ou aparente nas fezes e composição da microbiota fecal. Ao final do protocolo, os animais foram eutanasiados e o intestino grosso foi removido para realização das análises macroscópica e histológica. **Resultados:** De acordo com os resultados do índice de atividade da doença (IAD), os animais que consumiram o produto probiótico (CLF) apresentaram redução dos sintomas associados à colite durante o período de indução em comparação aos animais do grupo CL. As análises histológicas evidenciaram que o cólon dos camundongos dos grupos CL e CLP apresentou áreas com infiltrados de células, além de alterações nas criptas, representadas por degeneração ou desaparecimento de tais estruturas. O cólon dos animais pertencentes ao grupo CLF exibiu infiltrado de células inflamatórias, sem alteração nas criptas. Os resultados da análise da composição da microbiota fecal mostraram que a ingestão do produto fermentado probiótico resultou no maior aumento na população de *Lactobacillus* spp. ($1,5 \log_{10}$ UFC/g) e menor aumento de enterobactérias ($1,34 \log_{10}$ UFC/g) ao longo do protocolo. **Conclusão:** Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a ingestão regular do produto fermentado probiótico avaliado pode auxiliar na redução dos sintomas e na preservação da integridade do cólon durante a fase aguda da colite induzida em camundongos.

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal; colite ulcerativa; probióticos; microbiota; produto fermentado de soja; *Enterococcus faecium*; *Bifidobacterium longum*.

ABSTRACT

Objectives: The use of probiotic microorganisms in the reduction of inflammatory bowel diseases (IBD) risks, including ulcerative colitis (UC), has been shown promising, and the beneficial effect depends on the strain used and the stage of disease. The objective of this study was to investigate the effect of a probiotic soy product fermented with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* 416 with addition of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in the acute phase of colitis chemically induced in mice.

Methods: The experimental protocol had total duration of 14 days and the animals were randomized into four groups (n = 10): Group C - healthy animals that have not received the products under study; CL Group - Animals with chemically induced colitis and who have not received the products under study; CLF Group - Animals with chemically induced colitis and receiving the probiotic fermented product; Group CLP - animals with chemically induced colitis and receiving the unfermented product (placebo). The induction of colitis was made by the administration of dextran sodium sulfate (DSS) 3% dissolved in the drinking water for a period of seven days, and the products were administered over the 14 days of the study. During the trial period the following parameters were monitored: body weight, water and food intake, consistency and presence of hidden or apparent blood in stool and composition of the fecal microbiota. At the end of the protocol, the animals were euthanized and the large intestine was removed to perform the macroscopic and histological analysis. **Results:** According to the results of disease activity index (DAI), the animals that consumed the probiotic product (CLF) showed a reduction of symptoms associated with colitis during the induction period, compared to the CL group. Histological analysis showed that the colon of mice of CL and CLP groups showed areas with cell infiltrates, as well as changes in the crypts, represented by degeneration or disappearance of such structures. The colon of animals belonging to the CLF group exhibited infiltration of inflammatory cells, without changing in the crypts. The results of the analysis of fecal microbiota composition revealed that the ingestion of the probiotic fermented product resulted in the greatest increase in the population of *Lactobacillus* spp. ($1.5 \log_{10}$ CFU / g) and less increase of enterobacteria ($1.34 \log_{10}$ CFU / g) over the protocol. **Conclusion:** The results obtained in this study indicate that regular intake of probiotic fermented product evaluated can help in the reduction of the symptoms and preservation of colon health during the acute colitis induced in mice.

Key-words: inflammatory bowel disease; ulcerative colitis; probiotics; microbiota; fermented soy product; *Enterococcus faecium*; *Bifidobacterium longum*.

Sumário

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
<i>Doenças inflamatórias intestinais</i>	4
<i>Probióticos</i>	6
<i>Probióticos e doenças inflamatórias intestinais</i>	8
PROPOSIÇÃO	13
<i>Objetivo geral:</i>	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
<i>Material</i>	14
<i>Métodos</i>	14
<i>Obtenção dos Produtos</i>	14
<i>Produto Fermentado</i>	14
<i>Produto não fermentado (placebo)</i>	15
<i>Controle da viabilidade celular do produto fermentado</i>	16
<i>Estudo em Modelo Animal</i>	16
<i>Administração dos produtos</i>	17
<i>Indução e medida da colite</i>	18
<i>Avaliação do cólon</i>	19
<i>Avaliação Macroscópica</i>	19
<i>Avaliação Histológica</i>	20
<i>Avaliação microbiológica</i>	21
<i>Análise Estatística dos Resultados</i>	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	23

<i>Controle da viabilidade celular do produto fermentado</i>	<i>23</i>
<i>Estudo em modelo animal</i>	<i>24</i>
Indução e medida da colite.....	25
Avaliação Macroscópica	30
Avaliação Histológica	32
Avaliação microbiológica	37
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo genérico usado para indicar o grupo de patologias onde estão inseridas a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) (1). A CU é uma doença inflamatória reincidente restrita ao cólon, afetando principalmente as últimas porções do órgão, e sendo por isso, também designada de retocolite ulcerativa (1).

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) apresentam como característica comum a inflamação da mucosa intestinal, entretanto a sua patogênese ainda não é completamente conhecida. Evidências indicam a possível associação das DIIs com uma variedade de fatores, que podem ser genéticos, imunológicos e de composição da microbiota (2).

Além da suscetibilidade genética, a patogênese das DIIs está relacionada a alterações na resposta imune da mucosa entérica em relação aos microrganismos presentes no intestino, podendo levar a uma inflamação crônica (1).

O envolvimento da microbiota intestinal na patogênese da DII fundamenta-se no fato de que indivíduos portadores dessa patologia apresentam disbiose (desequilíbrio da microbiota bacteriana intestinal), expressa pela redução na diversidade de microrganismos presentes no intestino e onde o número de bactérias patogênicas está aumentado e o de benéficas (entre elas as pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.) encontra-se diminuído (3-5).

O controle da homeostase dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal pode auxiliar na redução do risco e dos sintomas e na prevenção das recidivas das DIIs (3, 6). Nesse contexto, surge a

necessidade de procurar alternativas para o controle desta patologia, que apresentem eficácia similar à terapia farmacológica e com menos efeitos adversos à saúde do paciente.

Probióticos - microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro - auxiliam na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal e reduzem o risco de doenças associadas a alterações nesse ecossistema (7-9).

Diferentes cepas de microrganismos probióticos estão, cada vez mais, sendo estudadas como possíveis agentes terapêuticos para as DIIs, principalmente CU. Apesar de seu mecanismo não ser completamente conhecido, há indícios de que algumas cepas bacterianas modulam positivamente a microbiota intestinal e o sistema imune, além de possuírem uma ação anti-inflamatória associada à produção de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e aminas bioativas (10-12). Os efeitos benéficos atribuídos aos microrganismos probióticos são cepa específicos e relacionados à viabilidade, estabilidade durante o processamento e armazenamento e capacidade de sobreviver ao trânsito intestinal (7, 9).

Um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa observou que a ingestão regular de um produto probiótico à base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, foi capaz de reduzir o risco de desenvolvimento da colite crônica em ratos, uma vez que constatou-se diminuição do IAD durante o período de indução, menor alteração do cólon ao final do protocolo, em comparação com os demais

grupos induzidos à colite, e modulação positiva da microbiota fecal (10,13). Contudo, um estudo mais aprofundado, que seja capaz de contemplar diferentes fases da doença, se faz necessário para um melhor entendimento do efeito benéfico do produto probiótico. Nesse sentido, o presente trabalho propõe a investigação do efeito do produto probiótico à base de soja na fase aguda da CU induzida em camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doenças inflamatórias intestinais

As DIIs compreendem um grupo de doenças intestinais idiopáticas, que são caracterizadas pela inflamação crônica do intestino. Suas formas mais comuns são a DC e a CU, que podem apresentar freqüentes recidivas e manifestações clínicas graves (1,14,15).

A incidência e a prevalência das DIIs variam de acordo com a região do mundo, sendo constatado um aumento no número de pacientes acometidos por tais patologias nos últimos anos. As DIIs afetam indivíduos de ambos os sexos, sendo prevalente em populações de áreas urbanas e classes sociais elevadas (16).

A incidência mundial de CU varia de 1,5 a 24,5 casos por 100.000 habitantes/ano e a de DC de 0,7 a 14,6 casos por 100.000 habitantes/ano (16). Os estudos epidemiológicos relacionados à incidência e prevalência de DIIs no Brasil ainda são escassos. Estudo realizado no estado de São Paulo evidenciou uma incidência de 4,48 casos para CU 3,50 casos para DC por 100.000 habitantes, entre os anos de 2001 e 2005 (17).

O aumento na prevalência de DIIs está relacionado aos fatores que modificam a composição da microbiota intestinal e, conseqüentemente a resposta imune do hospedeiro. Entre esses fatores estão hábitos dietéticos, presença de agentes infecciosos e hábito de fumar. A “hipótese da higiene”, segundo a qual hábitos higiênicos excessivos impediriam o contato do homem com microrganismos importantes para o controle da resposta imune, também é utilizada para explicar o aumento das DIIs (16).

A etiologia da DII permanece desconhecida, porém evidências indicam que a composição da microbiota intestinal, associada a fatores genéticos, ambientais e imunológicos, pode ter um papel importante na iniciação da inflamação e perpetuação da patologia (18-20).

A microbiota humana é um sistema complexo composto por 1000 a 1150 espécies bacterianas, sendo a maior densidade e diversidade de bactérias encontradas no intestino delgado e cólon. A sinergia entre hospedeiro e espécies colonizadoras está associada a um estado de homeostasia, que quando perdida leva à disbiose (alteração na composição das populações de bactérias comensais), podendo resultar em alteração da resposta imunológica aos antígenos bacterianos, induzindo assim a determinadas patologias (21-28).

Hipóteses de que as bactérias intestinais desempenham um papel importante na patogênese das DIIs são baseadas na observação de que a inflamação e as lesões típicas da doença ocorrem geralmente no íleo e cólon, em função das concentrações mais elevadas de bactérias (29).

Pacientes acometidos por CU apresentam uma inflamação superficial da mucosa do intestino grosso, enquanto nos portadores de DC a inflamação não é apenas superficial, mas sim transmural. Dependendo da região do cólon afetada os pacientes podem ser diagnosticados como sendo portadores de proctite (reto), colite de lado esquerdo (cólon sigmóide, com ou sem envolvimento do cólon descendente) e pancolite (cólon transversal). Alguns pacientes também desenvolvem inflamação ileal, podendo interferir na diferenciação entre CU e DC (30-31).

As DIIs são freqüentemente associadas a pacientes portadores de neoplasias intestinais. O câncer colorretal é uma causa importante de mortalidade em sociedades ocidentais. No Brasil, o câncer de cólon ocupa o terceiro lugar entre as causas de morte por câncer (32). Experimentos e estudos epidemiológicos indicam que a dieta e a nutrição são fatores chave na modulação do surgimento e progressão do câncer de cólon. Portanto, o risco de desenvolvimento dessas neoplasias pode ser reduzido com a identificação de componentes alimentares com atividade antitumoral e investigação dos seus mecanismos de ação (33). A ocorrência de displasia ou carcinoma é uma complicação de estados severos de DIIs, em que a inflamação é elevada e constante, e que ao longo do tempo resultará em alteração da estrutura epitelial (31).

Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (7, 9)

A maioria dos alimentos contendo cepas probióticas é obtido através da fermentação láctica de matéria-prima de origem animal (leite de vaca), porém também há a possibilidade de se utilizar alimentos não lácteos como veículo de tais microrganismos (34-37)

As cepas utilizadas para a produção industrial de alimentos probióticos devem suportar as condições à que são submetidas durante o

processo de obtenção e período de estocagem do produto, serem capazes de resistir às secreções gástricas, biliares e pancreáticas para chegarem na forma ativa no intestino, além de serem seguras para o consumo humano (38-41).

O mecanismo de ação dos probióticos ainda é desconhecido em sua totalidade, pois existe uma grande variedade de cepas probióticas que sofrem a influencia de alguns fatores, como: presença de outras bactérias no ambiente e estado de saúde do paciente (42-43).

As cepas probióticas usadas habitualmente para consumo humano são bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), membros usuais da microbiota, não patogênicas, Gram-positivas, catalase-negativa, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. As LAB, através da produção de ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico, levam a uma diminuição no pH intestinal, inibindo a multiplicação de diferentes patógenos e auxiliando no restabelecimento do equilíbrio da microbiota (41-47).

Entre os inúmeros modos de ação dos probióticos, pode-se citar ainda a aderência à superfície da mucosa intestinal, dificultando a colonização de bactérias patogênicas (48) e a modulação do sistema imunológico, com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$) e estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias (incluindo IL-10) (42).

Existem diversas evidências da aplicação benéfica de probióticos no trato gastrointestinal, sistema urogenital e doenças respiratórias, além de estudos que comprovaram a eficácia de algumas cepas na redução de

níveis de colesterol sérico e obesidade (49-54). Microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., e *Saccharomyces* spp. têm demonstrado efeitos benéficos à saúde, como por exemplo, a prevenção e/ou tratamento de diarreia, redução de alergias e de DIIs (55-56). Todos os efeitos na saúde, anteriormente citados, estão relacionados à modulação da microbiota intestinal (57-58).

Probióticos e doenças inflamatórias intestinais

O progresso no entendimento dos mecanismos de ação tem possibilitado a investigação da eficácia dos probióticos, prebióticos e simbióticos no tratamento ou redução dos sintomas das DIIs, além de outras doenças como diarreia infecciosa, diarreia do viajante, síndrome do cólon irritável e síndrome metabólica (43,47,59,60). A intolerância à terapêutica farmacológica é uma das razões que justificam o investimento em pesquisas que avaliam os efeitos dos probióticos nas DIIs (59).

Schiffrin et al. (61) observaram que a ingestão regular de produtos fermentados de leite, contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium bifidum*, resultou em colonização do intestino por esses gêneros de microrganismos e aumento da atividade fagocítica de leucócitos circulantes durante semanas, indicando que bactérias entéricas provocam respostas imunológicas em nível sistêmico e local.

Vários estudos avaliaram os efeitos da administração oral da mistura VSL#3, que é uma cultura mista composta por oito cepas

probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* e *Streptococcus thermophilus* (62). Em 2004, Tursi et al. (63) observaram que a mistura VSL#3 associada a baixas doses de balsalazida (fármaco utilizado no tratamento da CU aguda) melhorou os índices de remissão da doença em pacientes portadores de CU, quando comparados aos pacientes que recebiam somente tratamento medicamentoso (mesalazina ou balsalazida). Resultados semelhantes foram encontrados por Sood et al. (64) que avaliaram o efeito da administração de VSL#3 duas vezes por dia, durante 12 semanas, em 147 pacientes portadores de colite e que recebiam concomitantemente terapia medicamentosa. O grupo probiótico apresentou redução no IAD superior ao grupo placebo, após seis e 12 semanas de estudos ($p < 0,001$). No final do protocolo a porcentagem de pacientes que entraram na fase de remissão da doença foi superior no grupo probiótico (42,9%) em comparação com o grupo placebo (15,7%) ($p < 0,001$). O grupo de terapia combinada também mostrou melhora nos sintomas, demonstrando que VSL#3 pode potencializar as propriedades anti-inflamatórias da mesalamina. Outro estudo, conduzido por Miele et al. (65) avaliou 29 crianças com diagnóstico de CU (leve a moderada), que se encontravam sob terapêutica previamente instituída (prednisolona e mesalazina) e que no decorrer do estudo associaram a administração de VSL#3. Os resultados evidenciaram que a taxa de remissão e a de recidiva e os resultados das análises endoscópicas e histológicas foram

melhores nos pacientes tratados com VSL#3, quando comparados ao placebo ($p < 0,05$).

A administração da cepa *L. casei Shirota* (LcS) reduziu o desenvolvimento da CU em camundongos Balb/c, induzida por DSS. Análises de parâmetros imunológicos também mostraram que houve diminuição em citocinas pró-inflamatórias nos animais alimentados com LcS, em comparação com os alimentados com dieta padrão (66).

Outro estudo, realizado por Hegazy e El-Bedewy (67), demonstrou que o uso de probióticos combinados com terapia medicamentosa (sulfassalazina) é benéfico à saúde, pois diminui significativamente a concentração de IL-6 na mucosa do cólon, a expressão de TNF-alfa e de NF-kapa B p65, o recrutamento de leucócitos e o nível de calprotectina fecal em pacientes com CU, em comparação com o grupo tratado apenas com o fármaco.

Estudos realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp de Araraquara indicaram que o microrganismo *Enterococcus faecium* CRL 183, na forma pura ou associada a um produto à base de soja, tem a capacidade de sobreviver e colonizar o intestino de ratos (68), um pré-requisito para ser considerado probiótico, pois algumas bactérias podem não resistir a certas substâncias do trato gastrointestinal (69-70).

Sivieri et al. (71) constataram que a cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 reduz o número de tumores e a formação de criptas aberrantes. Os resultados do trabalho sugerem que a administração de *E. faecium* CRL 183 durante o estágio inicial de carcinogênese inibiu

significativamente o câncer de cólon, embora a indução química tenha sido agressiva e por um período longo de tempo.

Rossi et al. (72) elaboraram um produto fermentado à base de soja, em 1999, utilizando as cepas *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 como culturas iniciadoras. O produto proveniente da utilização das cepas citadas apresentou propriedades funcionais, tais como diminuição no desenvolvimento de câncer de mama, além da modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal e do sistema imune, que foram comprovados em modelos *in vivo* e *in vitro* (54,73-77).

Em um estudo recente, foi avaliado o efeito da ingestão do mesmo produto fermentado, suplementado com *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, no desenvolvimento de colite induzida por DSS, em ratos wistar *specific pathogen free* (SPF). Os animais receberam diariamente por gavagem 2,0 mL dos produtos em estudo (10^8 UFC), sendo que a administração foi iniciada sete dias antes da indução da colite e se estendeu por 16 dias após o período de indução (sete dias), totalizando 30 dias de tratamento (10,13). Os resultados mostraram que a bebida fermentada de soja alterou positivamente a microbiota dos ratos, pois aumentou a população de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp, que são gêneros de microrganismos importantes na manutenção da integridade das células epiteliais no cólon. Além disso, o grupo de animais que consumiu a bebida probiótica também apresentou redução nos sintomas da colite em relação ao grupo controle, exibindo um menor IAD. Os intestinos dos animais que receberam a bebida fermentada apresentaram um infiltrado de células referentes à inflamação do tecido,

contudo, não foram evidenciadas alterações nas criptas e no epitélio, e regiões de ulceração, sugerindo que o probiótico pode ter amenizado a gravidade da inflamação (10,13). No referido estudo optou-se pela indução da forma crônica da colite, não sendo possível avaliar o efeito do produto na fase aguda da doença.

PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

Estudar o efeito da ingestão diária de um produto à base de extrato aquoso de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, na fase aguda da colite quimicamente induzida em camundongos.

Objetivos específicos:

- Determinar o grau da colite desenvolvida no intestino dos diferentes grupos de animais durante a fase de indução;
- Realizar análise histológica do cólon dos animais;
- Avaliar a composição da microbiota fecal através da determinação da população de *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. e enterobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas amostras de extrato hidrossolúvel de soja fermentado com inóculo misto de *Enterococcus faecium* CRL 183 (CERELA - Centro de Referência para Lactobacilos, Argentina) e *Lactobacillus helveticus* 416 (ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, Brasil), com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (American Type Culture Collection, EUA; importado por Banco de Células do Rio de Janeiro).

Métodos

Obtenção dos Produtos

Produto Fermentado

O produto fermentado foi processado nas dependências da Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados de Soja (UniverSoja), do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, de acordo com a metodologia descrita por Rossi et al. (72,78). O inóculo bacteriano convencional foi substituído por 1,5% (v/v) de cultivo de *Enterococcus faecium* CRL 183 e 1,5% (v/v) de cultivo de *Lactobacillus helveticus* 416 (adjuvante tecnológico). A fermentação foi realizada a 37°C até o produto atingir pH 4,5. A cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro - UFC/ml) foi adicionada

após o término do processo fermentativo. As células foram propagadas em meio leite (10% leite em pó, 1% de glicose, 0,5% extrato de levedura), sendo a incubação feita a 37°C (*overnight*), antes de serem adicionadas ao produto.

Os inóculos foram submetidos à contagem de células viáveis de *Enterococcus* spp (M17 - Difco, França), *Lactobacillus* spp. (MRS - Difco, França) e *Bifidobacterium* spp. (BIM-25 - Reinforced *Clostridium* Ágar - Difco, França - com adição de ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B, sulfato de canamicina, ácido iodo acético e cloreto de trifeniltetrazolio-TTC), para garantir um número mínimo de células viáveis de 10⁸ UFC/ml no produto final.

Produto não fermentado (placebo)

O produto considerado placebo apresentou constituição idêntica ao produto fermentado, apenas sem conter os cultivos bacterianos (*E. faecium* CRL 183, *L. helveticus* 416 e *B. longum* ATCC 15707), portanto sem passar pelo processo fermentativo. O produto foi acidificado pela adição direta de ácido láctico (grau alimentício – Purac Sínteses, Brasil) em quantidade suficiente para alcançar o pH de 4,5, semelhante ao do produto fermentado.

Os produtos foram produzidos semanalmente e armazenados a 5°C até a utilização.

Controle da viabilidade celular do produto fermentado

A análise da viabilidade dos microrganismos utilizados foi realizada no produto final (lote I: preparado no T0; lote II – preparado no T7), imediatamente após o preparo e com sete dias de armazenamento à temperatura de refrigeração.

Amostras de 25g de produto fermentado foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada estéril e, então, as demais diluições seriais foram preparadas. Para a contagem de *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram utilizados os meios ágar Lactobacilli Man Rogosa Sharpe (MRS - Difco, França), ágar KF *Streptococcus* (Difco, França), e BIM-25 (Reinforced Clostridium Ágar - Difco, França - com adição de ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B, sulfato de canamicina, ácido iodo acético e cloreto de trifeniltetrazolio - TTC), respectivamente. As placas de MRS e KF foram incubadas em aerobiose, por 24 - 48 horas a 37 °C. As placas de BIM-25 foram incubadas em anaerobiose, por 72 horas a 37 °C (79).

Estudo em Modelo Animal

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas C57bl/6, SPF, procedentes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB) e pesando em média 20g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno dentro de uma estante com controle de temperatura e umidade relativa do ar (23 ± 2°C; 60-70% umidade – Alesco E-520, Brasil) e ciclos de 12 horas com e sem luz. Todos os animais do protocolo receberam água e ração básica

para camundongos (Presence, Brasil) *ad libitum* (esterilizadas em autoclave - 121°C/ 15 min.). A ingesta hídrica e de ração e foi monitorada diariamente.

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (CEUA – FCFAR) – protocolo número 04/2015.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=10):

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo.

Grupo CL: Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo.

Grupo CLF: Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado probiótico.

Grupo CLP: Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

Administração dos produtos

Os produtos (fermentado probiótico e placebo) foram administrados diariamente, por gavagem, no período da manhã, em quantidade suficiente para garantir a ingestão de 10^8 UFC (máximo de 0,5 ml por animal). A administração dos produtos foi iniciada sete dias antes da indução da colite (T0). Os animais dos grupos Controle (C) e Colite (CL) receberam diariamente (gavagem) a mesma quantidade de água esterilizada. Os produtos em estudo foram administrados durante todo

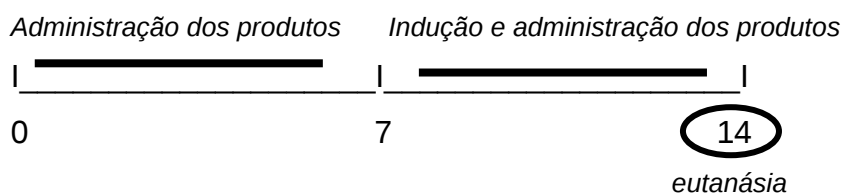
período experimental, ou seja, antes e durante a indução da patologia (T0 a T14 - Figura 1).

Indução e medida da colite

A indução da colite foi realizada através da administração DSS (PM= 36.000 – 50.000; MP Biomedical, Estados Unidos), segundo metodologia de Cooper et al. (80). O DSS (3%) foi dissolvido na água fornecida diariamente aos animais.

O protocolo experimental teve duração de 14 dias (T0 a T14), sendo que antes do início do experimento os animais permaneceram 10 dias no biotério, recebendo somente água e ração *ad libitum*, para adaptação. O DSS foi administrado durante um período de sete dias (7º ao 14º dia do protocolo). No 14º dia do protocolo experimental os animais foram eutanasiados para avaliação dos efeitos dos produtos administrados na fase aguda da doença (imediatamente após o término da indução) (Figura 1).

Figura 1. Esquema do protocolo da colite aguda.



O grau da colite foi medido diariamente, sendo considerados os seguintes parâmetros: perda de peso corpóreo, consistência das fezes e

presença de sangramento retal oculto ou aparente (81) (Tabela 1). A determinação da presença de sangue oculto nas fezes foi realizada utilizando-se o kit Hemoplus (Newprov, Pinhais, Brasil). Amostras de fezes, correspondentes a um período de 48h, foram coletadas no início e a cada sete dias do protocolo, para verificação da presença de sangue oculto ou aparente e análise da microbiota fecal.

Tabela 1 - Índice de atividade da doença

Pontuação do índice de atividade da doença (IAD)			
Pontuação	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangue oculto/aparente
0	Nenhuma	Normal	Negativo
1	1 a 5	Fezes pastosas	Positivo
2	5 a 10		
3	10 a 20		
4	> 20	Diarreia	Sangue aparente

Adaptado de MURTHY et al. (81)

Avaliação do cólon

No final do experimento os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Foi realizada laparotomia e o cólon e o reto foram removidos e abertos longitudinalmente para posterior análise macroscópica e histológica.

Avaliação Macroscópica

As amostras do intestino grosso dos diferentes grupos experimentais foram fotografadas para posterior análise macroscópica segundo metodologia proposta por Bell et al. (82) e Camuesco et al. (83), que leva em consideração a extensão e a severidade do dano no tecido. Essa metodologia prevê a atribuição de pontuação de zero a 10, de acordo com o dano macroscópico visível (Tabela 2).

Tabela 2 - Critério para avaliação macroscópica de dano no cólon (continua)

Pontuação	Critério
0	Sem dano
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um local
4	≥ 2 locais de inflamação/ulceração
5	≥ 2 locais de inflamação e ulceração ou um local de inflamação/ulceração com mais de 0,1cm ao longo do cólon
6 a 10	Se o dano for maior que 2cm ao longo do cólon, considerar 1 ponto a mais para cada cm em questão.

Adaptado de Bell et al. (82); Camuesco et al. (83)

Avaliação Histológica

As amostras do cólon e reto foram fixadas por imersão em folmaldeído 10%. Após a fixação, as amostras foram rotineiramente processadas e embebidas em parafina. Cortes de aproximadamente 5µm foram montados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina/eosina e analisados em microscópio óptico. Os diferentes segmentos do cólon e do reto foram avaliados e classificados segundo metodologia proposta por Nanda-Kumar et al. (84). As análises histológicas foram realizadas no

Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara.

Avaliação microbiológica

A composição da microbiota fecal foi analisada no início do experimento (T0 - antes da administração dos produtos); uma semana após a ingestão dos produtos (T7) e após a indução da colite e administração dos produtos (T14 – final do protocolo). As fezes foram coletadas das caixas de contenção dos animais, correspondendo a um período de 24 horas, armazenadas em sacos de polipropileno estéreis e congeladas a -80°C (Indrel, Brasil - Modelo IULT 335D) para análise posterior.

A análise da composição da microbiota fecal por microbiologia convencional foi baseada na determinação da população de bactérias pertencentes aos gêneros: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e *Enterococcus* spp. e do grupo enterobactérias. As amostras de fezes foram diluídas e inoculadas em meios de cultura seletivos: *Lactobacillus* spp. - ágar Man Rogosa Sharpe (Acumedia – Neogen, Estados Unidos), 37°C/48h, anaerobiose (85); *Bifidobacterium* spp. - BIM-25 (Acumedia – Neogen, EUA); 37°C/72h, anaerobiose (86); enterobactérias - ágar MacConkey (Acumedia – Neogen, Estados Unidos); 37°C/48h (87); *Bacteroides* spp. - ágar Bacteróides Bile Esculina (Acumedia – Neogen, Estados Unidos); 37°C/72h, anaerobiose (88); *Clostridium* spp. - Reinforced Clostridium Ágar (Acumedia – Neogen, Estados Unidos), 37°C/48h, anaerobiose (89);

Enterococcus spp. - ágar KF *Streptococcus* (Acumedia – Neogen, Estados Unidos); 37°C/48h (90).

Análise Estatística dos Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey (dados paramétricos). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa para análise estatística Biostat, sendo adotado o nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle da viabilidade celular do produto fermentado

O produto fermentado foi submetido à contagem de células viáveis de *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., para garantir um número mínimo de células viáveis de 10^8 UFC/g no produto final, ao longo do protocolo.

Os resultados da viabilidade dos microrganismos (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp.) nos produtos fermentados de soja produzidos semanalmente, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Controle semanal da viabilidade dos microrganismos presentes no produto fermentado probiótico.

Microrganismo	População ($\log_{10}$ UFC/g) /tempo			
	Lote I		Lote II	
	T0	T7	T7	T14
<i>Enterococcus</i> spp.	10,45±0,04 ^c	12,33±0,01 ^a	11,86±0,04 ^b	12,39±0,02 ^a
<i>Lactobacillus</i> spp.	10,00±0,06 ^c	12,33±0,05 ^a	11,74±0,02 ^b	11,64±0,17 ^b
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,46±0,00 ^d	12,21±0,05 ^a	11,68±0,05 ^b	11,29±0,04 ^c

Resultado corresponde à média ± desvio padrão da viabilidade de microrganismos imediatamente após o preparo do produto (lote I – preparado no T0; lote II – preparado no T7) e após sete dias de armazenamento sob refrigeração. Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Apesar das médias de viabilidade terem diferido significativamente entre si, observou-se que ao longo de todo o experimento (14 dias) o produto apresentou contagens superiores a 10^{10} UFC/g ($10 \log_{10}$ UFC/g) dos três microrganismos analisados, número considerado adequado para que os mesmos exerçam seus efeitos probióticos (91-92). Salienta-se que apesar do produto fermentado ser composto por um inoculo misto de

Lactobacillus helveticus 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183, somente houve comprovação, em estudos feitos por nosso grupo de pesquisa *in vivo* e *in vitro*, das propriedades funcionais da cepa *Enterococcus faecium*. O uso da cepa *Lactobacillus helveticus* 416 é justificado por razões tecnológicas.

Estudo em modelo animal

A colite aguda é normalmente induzida pela administração de DSS (2 a 5%), durante um curto período de tempo (quatro a nove dias). Os sintomas da fase aguda da patologia induzida por DSS incluem: perda de peso, diarreia, presença de sangue nas fezes, piloereção, anemia e, em alguns casos, morte do animal (93). Dessa forma, a avaliação das manifestações clínicas da patologia é de extrema importância para o entendimento dos efeitos dos diferentes tratamentos.

Consumo hídrico e de ração

O consumo de água e de ração durante os 14 dias do protocolo experimental é apresentado nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão por grupo, no início do protocolo (T0), sete dias após a ingestão dos produtos (T7) e sete dias após a indução + ingestão dos produtos (T14). Nesse período, apesar das variações em termos numéricos absolutos, não houve alteração significativa ($p < 0,05$) na ingestão hídrica e de ração dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 4 - Consumo médio de água (ml/semana).

Grupos	Consumo médio de água (ml)		
	T0	T7	T14
C	23,50±5,80 ^a	22,75±2,22 ^a	19,25±1,50 ^a
CL	18,50±4,76 ^a	24,50±5,26 ^a	21,75±2,36 ^a
CLF	16,25±5,56 ^a	23,25±4,72 ^a	20,00±5,23 ^a
CLP	16,50±4,93 ^a	24,00±4,73 ^a	21,25±5,77 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha e coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Tabela 5 - Consumo médio de ração (g/semana).

Grupos	Consumo médio de ração (g)		
	T0	T7	T14
C	10,43±2,22 ^a	9,95±2,09 ^a	9,50±1,51 ^a
CL	10,67±1,48 ^a	10,63±2,10 ^a	10,32±1,27 ^a
CLF	10,99±1,95 ^a	9,53±2,28 ^a	9,45±2,03 ^a
CLP	10,96±2,90 ^a	9,46±1,32 ^a	9,43±1,89 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha e coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Indução e medida da colite

O desenvolvimento da colite nos animais dos diferentes grupos de estudo foi acompanhado durante o período de indução (T7 ao T14 – sete dias), pela determinação do índice de atividade da doença (IAD).

O IAD (81) considera como fatores indicativos da doença: alterações no peso corporal, presença de sangue oculto ou aparente nas fezes e consistência das mesmas durante o período de indução. O aumento do IAD (Tabela 6) nos grupos de animais com colite quimicamente induzida por DSS (CL, CLP e CLF) indica a presença da patologia durante o período de indução. Os resultados encontrados se assemelham aos de outros autores que utilizaram o mesmo método de indução (94-97). Nesses estudos os sintomas começaram a aparecer entre o segundo e o terceiro dias de indução, atingindo intensidade máxima no sexto e sétimo dias.

Os resultados evidenciam que não houve alteração nas fezes e no peso dos animais do grupo controle. Os grupos induzidos e que não receberam o produto probiótico (CL e CLP) apresentaram alteração na consistência das fezes (pastosa ou diarreia) e/ou presença de sangue aparente nas fezes a partir do terceiro dia da indução. A menor variação nos parâmetros analisados durante o período de indução (fezes com consistência normal até o sexto dia e presença de sangue aparente apenas no quarto dia) ocorreu no grupo de animais que consumiu o produto fermentado (CLF), indicando um possível efeito protetor da bebida probiótica estudada.

Chen et al. (98) analisaram o efeito de quatro cepas probióticas separadamente - *L. acidophilus*, *C. butyricum*, *B. adolescentis* e *E. faecalis* - em camundongos com colite quimicamente induzida (DSS) e observaram que o IAD foi maior em todos os grupos que não receberam

os microrganismos probióticos, quando comparados aos quatro grupos que receberam as cepas.

Um estudo realizado em ratos portadores de colite quimicamente induzida (DSS) constatou que a administração diária de 15mg de VSL#3 melhora significativamente o IAD a partir do quarto dia de indução, quando comparado ao grupo placebo (99).

Celiberto (100) observou resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo quando avaliou o efeito da mesma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) no desenvolvimento da fase crônica da colite quimicamente induzida em ratos. O grupo de animais que consumiu o produto probiótico apresentou menor IAD quando comparado aos grupos placebo e sem tratamento, exibindo menor perda de peso, consistência normal das fezes até o quarto dia de indução e presença de sangue oculto ou aparente nas fezes somente nos dois últimos dias da indução (dias 13 e 14).

Estudo conduzido por Pan et al. (101) investigou o efeito da administração de *Lactobacillus paracasei* (LC-01) em 50 camundongos Balb/c com colite quimicamente induzida por DSS 2,5%. O IAD dos grupos tratados com doses médias (1.10^8 UFC/ml) e altas (1.10^{10} UFC/ml) de LC-01 foram significativamente menores em relação aos grupos tratados com baixa dose do probiótico (1.10^6 UFC/ml) ou sem tratamento ($p<0,05$).

Tamaki et al. (102) investigaram os possíveis efeitos da ingestão de probióticos em pacientes com CU provenientes de nove hospitais no Japão. Foi observado que os pacientes que receberam a formulação

probiótica (*Bifidobacterium longum* 536) apresentaram redução significativa no IAD a partir da oitava semana de tratamento ($3,8 \pm 0,4$ para $2,6 \pm 0,4$; $p < 0,01$) quando comparados aos pacientes que receberam placebo ($4,5 \pm 0,5$ para $3,2 \pm 0,6$; $p = 0,88$). Os resultados das avaliações endoscópicas e as taxas de remissão também foram melhores no grupo que recebeu o probiótico

Tabela 6 - Índice de atividade da doença (IAD) por grupo durante o período de indução (T7 a T14).

Período de indução (dias)	C				CL				CLF				CLP			
	Perda de peso (%)*	Cons. das fezes	SO/SA	IAD	Perda de peso (%)*	Cons. das fezes	SO/SA	IAD	Perda de peso (%)*	Cons. das fezes	SO/AS	IAD	Perda de peso (%)*	Cons. das fezes	SO/SA	IAD
0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0
1	0	N	-	0	0	N	SO	2	2,24	N	SO	3	0	N	SO	2
2	0	N	-	0	0	N	SO	2	1,40	N	SO	3	0	N	SO	2
3	0	N	-	0	0	P	SA	6	0	N	SO	2	0	N	SA	4
4	0	N	-	0	0	P	SA	6	0	N	SA	4	0	P	SA	6
5	0	N	-	0	3,19	P	SA	7	0	N	SA	4	13,09	P	SA	9
6	0	N	-	0	3,69	D	SA	9	1,42	N	SA	5	8,68	P	SA	8
7	0	N	-	0	5,25	D	SA	10	8,96	P	SA	8	5,56	P	SA	8
Total				0				42				29				39
Média				0				5,25				3,63				4,88

*Percentual de perda de peso medido em relação ao dia anterior.

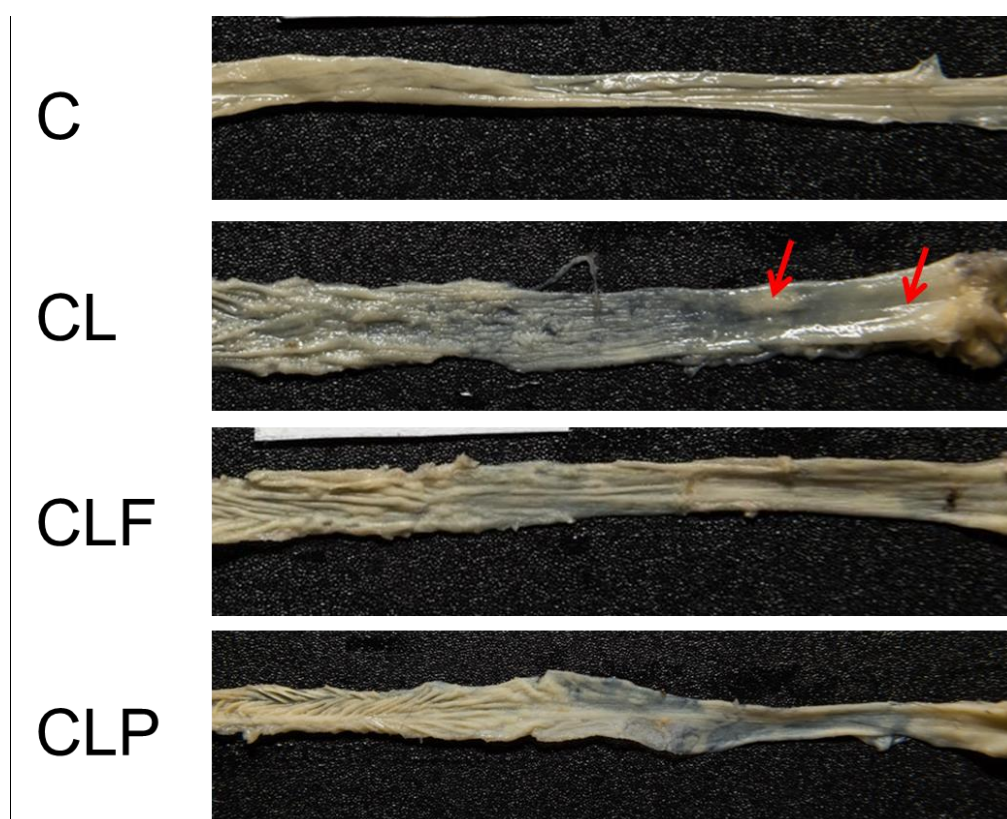
Consistência das fezes: **N**=normal, **P**=pastosa, **D**=diarreia. **SA**: sangue aparente, **SO**: sangue oculto.

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

Avaliação Macroscópica

Apesar de terem sido observadas algumas áreas edemaciadas em regiões correspondentes ao cólon e reto dos animais do grupo CL, os resultados obtidos na análise macroscópica não foram conclusivos, impedindo a realização da avaliação macroscópica proposta por Bell et al. (82).

Figura 2 – Imagens representativas da análise macroscópica do cólon e reto dos diferentes grupos experimentais.



Grupo C: Animais saudáveis que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

Melgar et al. (103) analisaram macroscopicamente o cólon de camundongos C57BL/6 e BALB/c com colite aguda e crônica quimicamente

induzidas por DSS 3% e observaram que à medida que a inflamação progrediu o cólon enrijeceu e sua porção média se aderiu ao mesentério. Na fase crônica da patologia foi observada formação epitelial irregular, distorção das criptas e depleção de células caliciformes, sugerindo alterações mais evidentes em estágios crônicos da patologia.

O encurtamento do cólon mede morfometricamente o grau da inflamação, correlacionando-se com alterações patológicas e histológicas e sendo, por isso, considerado um marcador da colite (104). Apesar da importância desse parâmetro na caracterização da patologia, a relação peso/comprimento médio do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença significativa entre si ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da relação peso/comprimento (mg/cm) do cólon

Grupo	Cólon (mg/cm)
C	36,12±3,19 ^a
CL	39,26±6,13 ^a
CLF	35,94±3,71 ^a
CLP	43,89±8,54 ^a

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$). **Grupo C:** Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

Celiberto (100) avaliou os efeitos da mesma bebida probiótica na fase crônica da colite quimicamente induzida (DSS) em ratos Wistar. O grupo de animais que consumiu a bebida probiótica apresentou menor grau de inflamações e/ou ulcerações em relação aos demais grupos induzidos, diferindo significativamente do grupo com colite e sem tratamento (CL) ($p < 0,01$) e do grupo

com colite e que recebeu como tratamento o fármaco sufassalazina (CLS) ($p < 0,01$). A divergência nos resultados obtidos pode ser explicada pelo fato do estudo da fase crônica ter sido realizado com um modelo animal diferente (rato macho Wistar) do presente estudo (camundongo fêmea C57bl/6). Melgar et al. (103) avaliaram o efeito da administração de DSS durante quatro semanas, e acompanharam o período subsequente de supressão da indução, em dois modelos animais: camundongos BALB/c e C57BL/6. Os resultados evidenciaram que as duas linhagens de camundongos desenvolvem colite aguda, sendo que após a interrupção da administração de DSS a colite evolui para a fase crônica em camundongos C57BL/6 e para a remissão em camundongos BALB/c. Além dos fatores genéticos (linhagem, idade), a fase da doença, a composição da microbiota e a exposição a situações estressantes podem interferir na evolução da patologia (93)

Avaliação Histológica

Os resultados da análise histológica (Figura 3) indicam que o cólon dos animais do grupo controle (sem indução por DSS) se apresentou sem alterações estruturais e sem focos de inflamação. Esse resultado era esperado, pois o grupo controle não foi exposto ao indutor (DSS). O grupo CL, por sua vez, exibiu grandes alterações estruturais caracterizada por destruição das criptas, formação de abscessos, presença de células inflamatórias e uma região de edema entre a lâmina própria e a camada muscular. O intestino dos animais que consumiram o produto placebo (CLP) mostrou grande quantidade de infiltrado de células, tanto no epitélio quanto na camada muscular, caracterizando assim a inflamação. Os

resultados evidenciaram ainda uma aparente destruição das criptas, sugerindo que o produto de soja sem adição das cepas probióticas não exerce ação benéfica na fase aguda da colite quimicamente induzida. Nas amostras de tecidos dos animais que receberam o produto fermentado (CLF) foi constatado um infiltrado de células, características de processos inflamatórios. Entretanto, não foram verificadas regiões edemaciadas e as criptas se mantiveram íntegras, indicando que o produto probiótico em estudo exerceu um efeito positivo na fase aguda da colite, nas condições desse estudo.

Estudo que avaliou a fase crônica da colite constatou um efeito protetor do mesmo produto fermentado probiótico à base de soja (CLF), e em menor grau, do produto sem a adição de probióticos (CLP) nas alterações histológicas típicas da patologia (100). Os resultados do produto placebo foram explicados, parcialmente, pela presença de compostos bioativos na soja (isoflavonas), que apresentam ação anti-inflamatória cientificamente comprovada (105).

Ha'kansson et al. (106) avaliaram o efeito da ingestão diária de cascas de mirtilo associada ou não a cepas probióticas (*Bifidobacterium infantis* DSM 15159, *Lactobacillus gasseri*, DSM 16737 e *Lactobacillus plantarum* DSM 15313) na carcinogênese coloretal e dano no fígado de 48 camundongos fêmeas, submetidos a tratamento cíclico com DSS 4%. Os autores observaram uma redução no IAD, no número de ulcerações e de alterações displásicas nos grupos que receberam cascas de mirtilo, com ou sem adição de probióticos. A ingestão de probióticos reduziu os danos hepáticos, nas condições do estudo.

Persborn et al. (107) avaliaram o efeito da suplementação de uma mistura de nove cepas probióticas [*Bifidobacterium bifidum* (W23), *B. lactis* (W51), *B. lactis* (W52), *Lactobacillus acidophilus* (W22), *L. casei* (W56), *L. paracasei* (W20),

L. plantarum (W62), *L. salivarius* (W24) e *Lactococcus lactis* (W19)] em indivíduos com pouchite (inflamação na bolsa ileal, comum em pacientes portadores de CU e que foram submetidos a intervenção cirúrgica para remoção do cólon e reto). Os resultados demonstraram que a suplementação com probióticos foi capaz de restaurar a função de barreira da mucosa intestinal em relação à cepa *Escherichia coli* K12, auxiliando na manutenção da integridade do intestino.

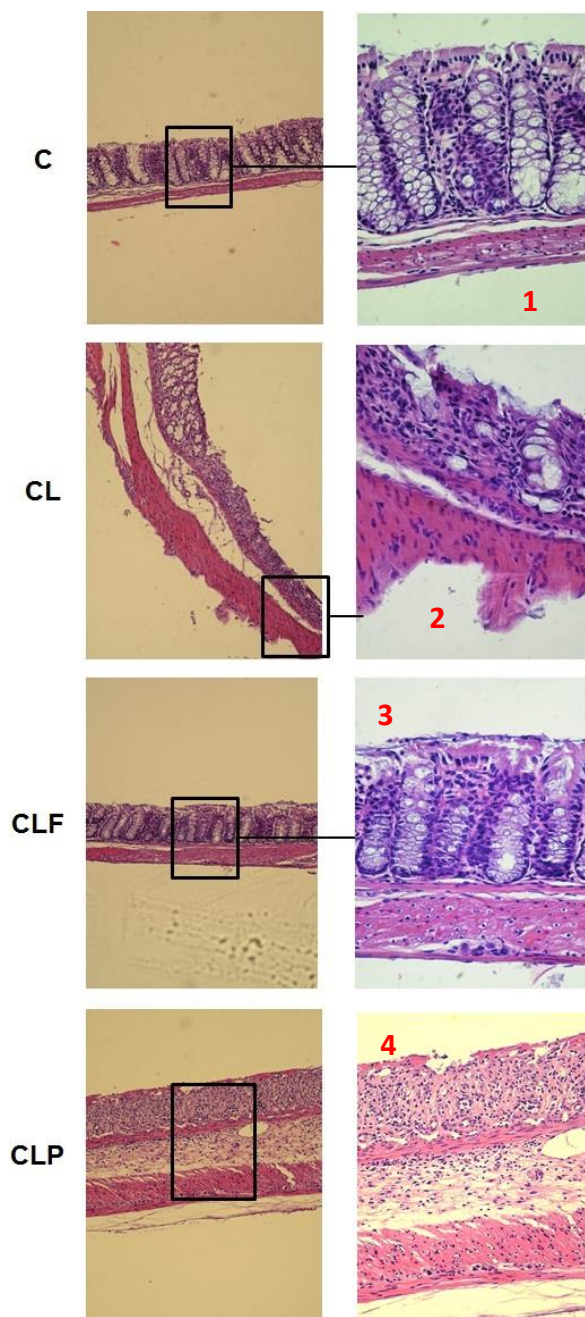
Testes realizados *in vitro* mostraram que determinadas espécies de *Lactobacillus* spp. possuem capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na codificação da proteína de junção de aderência E-Caderina, afetando positivamente a integridade da barreira epitelial e reforçando a função de barreira da mucosa intestinal (108).

Estudo conduzido por Hegazy et al. (67) avaliou 30 pacientes portadores de CU (leve a moderada) que foram divididos em dois grupos de tratamento: G1 - sulfassalazina (2400 mg/d) e G2 - sulfassalazina (2400 mg/d) mais as cepas probióticas *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus fermentum* (1.10^{10} UFC/ml). Após oito semanas de estudo, constatou-se que o tratamento que associou sulfassalazina e cepas probióticas reduziu a extensão da inflamação, impediu a lesão da mucosa e aliviou os sintomas da colite, auxiliando na manutenção da remissão e prevenindo a recidiva da doença.

Chen et al. (109) conduziram um estudo que avaliou a eficiência de uma bebida fermentada com a cepa *Lactobacillus paracasei* 01 sobre a barreira intestinal, utilizando testes *in vitro*. Os resultados mostraram que a bebida é capaz de proteger o intestino, promovendo a multiplicação das células epiteliais intestinais, aumentando a integridade do epitélio e modulando a produção de citocinas inflamatórias na presença de DSS.

Um estudo conduzido por Srutkova et al. (110) analisou o efeito de duas cepas de *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 e CCDM 372 no desenvolvimento de colite aguda em camundongos, induzida por DSS. A administração de *B. longum* CCM 7952 reduziu a produção de TNF- α nas células dos nódulos linfáticos mesentéricos (estudo *in vitro*) e preveniu alterações nas proteínas de junções de oclusão (*tight junctions*), associadas à fisiopatologia da colite. A cepa *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 não exerceu efeito protetor em relação ao desenvolvimento da colite, evidenciando o caráter cepa-específico do gênero *Bifidobacterium* spp.

Figura 3 - Fotomicrografias representativas do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina/ eosina



Grupo C: Animais saudáveis que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo). **1:** Epitélio sem alterações; **2:** regiões com infiltrado de células inflamatórias, alteração nas criptas e edema; **3:** regiões com um infiltrado de células inflamatórias, porém sem alteração na cripta; **4:** regiões com infiltrado de células inflamatórias e alteração nas criptas. Aumento de 10x e 40x

Avaliação microbiológica

Embora a etiologia exata da DII permaneça obscura, acredita-se que esta esteja relacionada a alterações na composição da microbiota intestinal, a respostas imunológicas anormais e a fatores ambientais ainda indeterminados. É de extrema importância que a etiologia da CU seja elucidada e para que haja um melhor entendimento da patologia é necessário, entre outros, a realização de estudos que investiguem a composição da microbiota intestinal (111-112).

Apesar dessa lacuna na patogênese da doença, pesquisas indicam que pacientes portadores de DII apresentam uma intolerância a determinadas bactérias comensais da microbiota, levando a um desequilíbrio na resposta imunológica que desencadeia a doença (113-115).

Apesar das muitas evidências de que microrganismos intestinais são necessários para que haja o desencadeamento e perpetuação da inflamação nas DIIs, ainda permanece a dúvida se é realmente a resposta imune anormal à disbiose da microbiota intestinal que desempenha o papel mais importante ou então, um microrganismo específico ou um grupo de agentes microbianos que seriam os responsáveis por tal patogênese (114).

Nos diferentes grupos de animais a composição da microbiota mostrou-se significativamente diferente ($p < 0,05$) no início do estudo (T0) para a maioria dos gêneros estudados. Logo, considerou-se mais relevante comparar a composição da microbiota entre os tempos no decorrer do experimento, para averiguar possíveis alterações. Os dados obtidos na avaliação da composição da microbiota fecal foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). Porém, no presente estudo, considerou-se que alterações menores que meio ciclo logarítmico (0,5

$\log_{10}$ UFC/g) não apresentam significado do ponto de vista microbiológico, pois podem ser consequências de variações da própria análise (116).

Os resultados da população de *Enterococcus* spp. das amostras de fezes dos diferentes grupos ao longo do protocolo encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - População de *Enterococcus* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T7	T14
C	5,84±0,02 ^b	6,74±0,05 ^a	7,29±0,39 ^a
CL	6,32±0,02 ^b	6,41±0,02 ^b	9,08±0,29 ^a
CLF	6,05±0,01 ^c	8,67±0,10 ^b	9,27±0,06 ^a
CLP	6,30±0,02 ^b	6,44±0,05 ^b	8,36±0,00 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey(p<0,05).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Os resultados mostraram que em todos os grupos houve variação na ordem de grandeza das populações de *Enterococcus* spp. durante o período experimental. Contudo, no grupo CLF a população de *Enterococcus* spp. apresentou o maior aumento (2,62 $\log_{10}$ UFC/g, p<0,05) após a ingestão do produto fermentado probiótico (T7), mantendo-se elevada até ao final do experimento (T14).

O aumento da população de *Enterococcus* spp. nos demais grupos não era esperado. O gênero *Enterococcus* spp. é constituído por diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as mais comumente encontradas nas fezes humanas. Apesar do gênero conter espécies com atividade probiótica comprovada, várias outras estão relacionadas a patologias

gastrintestinais, podendo causar, inclusive, infecções oportunistas (117). Logo, as alterações observadas não significam, necessariamente, aumento da espécie probiótica em estudo.

Estudo realizado por Bedani et al. (118) verificou que houve um aumento na população do gênero *Enterococcus* spp. em ratos que ingeriram um produto probiótico à base de soja, semelhante ao avaliado nesse experimento. Entretanto o grupo alimentado com o produto fermentado de soja esterilizado também demonstrou aumento do gênero em questão, sugerindo que a fermentação pode induzir o aparecimento de metabólitos que influenciam a população de *Enterococcus* spp.

A variação na população de *Enterococcus faecium* foi verificada também em um estudo conduzido por Cavallini et al. (76), que utilizou o mesmo produto fermentado de soja (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416) para avaliar a relação entre a microbiota fecal de coelhos e fatores de risco de doenças cardiovasculares. Após 60 dias de estudo os autores constataram que os animais que recebiam o produto probiótico exibiam aumento na população fecal de *Enterococcus faecium*.

Há gêneros bacterianos potencialmente patogênicos, enquanto outros são considerados benéficos para o hospedeiro, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., por apresentarem propriedades imunomoduladoras, anticarcinogênicas e com potencial de proteção contra DIIs (76,119-122).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da população de *Lactobacillus* spp. presente nas fezes dos diferentes grupos experimentais ao longo do protocolo.

Tabela 9 - População de *Lactobacillus* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T7	T14
C	7,83±0,01 ^a	6,89±0,04 ^b	8,12±0,25 ^a
CL	7,80±0,14 ^b	7,41±0,02 ^c	8,45±0,03 ^a
CLF	7,55±0,07 ^c	8,49±0,09 ^b	9,05±0,01 ^a
CLP	7,70±0,02 ^b	7,56±0,02 ^b	8,76±0,12 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey(p<0,05).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Os resultados indicam uma variação na população de *Lactobacillus* spp. em todos os grupos, ao longo do protocolo experimental. No T7 (uma semana após a administração dos tratamentos), somente o grupo que consumiu o produto probiótico apresentou aumento na população de *Lactobacillus* spp. (0,94 $\log_{10}$ UFC/g). No final do experimento (T14) observou-se aumento na população de *Lactobacillus* spp. em relação ao período anterior (T7) nos grupos CL, CLF e CLP (1,04; 0,56 e 1,2 $\log_{10}$ UFC/g, respectivamente), sugerindo que o indutor DSS não afetou negativamente a viabilidade desse gênero de microrganismo. Observou-se que no T14 (fim do protocolo) o grupo CLF apresentou o maior aumento na população de *Lactobacillus* spp. (1,50 $\log_{10}$ UFC/g) em relação ao início do protocolo (T0). A utilização da cepa *Lactobacillus helveticus* 416 na fermentação do produto à base de soja, explica parcialmente tal resultado. A elevação na população de *Lactobacillus* spp. do grupo CLP (não fermentado – 1,06 $\log_{10}$ UFC/g) no final do protocolo sugere um possível efeito modulador da mistura base utilizada na produção do produto, uma vez que o placebo não continha os

microrganismos probióticos. O grupo C não apresentou alteração na população de *Lactobacillus* spp. ($0,29 \log_{10}$ UFC/g) e o grupo CL apresentou aumento inferior a um ciclo logarítmico ($0,65 \log_{10}$ UFC/g) ($p < 0,05$) após os 14 dias de tratamento.

Bullock et al. (123) concluíram que houve redução na população de *Lactobacillus* spp. em pacientes com colite ulcerativa ativa ou em remissão.

Peran et al. (124) verificaram o efeito da administração de *Lactobacillus fermentum* 5716 (cepa isolada do leite materno) na microbiota intestinal de ratos com colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Como resultado do trabalho pôde-se observar que os animais com colite induzida e que receberam o probiótico apresentaram população de *Lactobacillus* spp. superior a do grupo de animais com colite e sem tratamento. As populações de *Bifidobacterium* spp. e de bactérias potencialmente patogênicas, como as pertencentes aos grupos coliformes e enterobactérias, não sofreram alterações significativas.

Estudo conduzido por Cavallini et al. (76) mostrou que a ingestão regular do produto probiótico a base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416, sem adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, também provocou aumento na população fecal de *Lactobacillus* spp. ($1,27 \log_{10}$ UFC/g) em coelhos com hipercolesterolemia induzida.

Celiberto (100) observou resultados semelhantes em estudo com ratos Wistar, onde a ingestão da bebida probiótica a base de soja, fermentada com *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, elevou a população de *Lactobacillus* spp. ($0,86 \log_{10}$ UFC/g).

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da população de *Bifidobacterium* spp. presente nas fezes dos diferentes grupos experimentais ao longo do protocolo.

Tabela 10 - População de *Bifidobacterium* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T7	T14
C	6,19±0,00 ^c	6,82±0,05 ^b	7,45±0,13 ^a
CL	6,81±0,05 ^b	6,45±0,01 ^c	8,41±0,01 ^a
CLF	6,71±0,03 ^c	8,60±0,02 ^b	8,82±0,04 ^a
CLP	6,25±0,01 ^b	6,42±0,01 ^b	8,60±0,15 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey($p<0,05$).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Dados da literatura indicam que a elevação da população de algumas espécies de *Bifidobacterium* no cólon são benéficas ao seu hospedeiro, levando a um aumento na produção de AGCC, modulação do sistema imune, redução do pH intestinal e diminuição de microrganismos patogênicos (125-126).

De acordo com os resultados da Tabela 10, é possível observar que todos os grupos apresentaram aumento na população de *Bifidobacterium* spp. após o período de indução (T14), sugerindo que o indutor DSS não influenciou negativamente a viabilidade desse gênero de microrganismo. Os grupos CLF e CLP apresentaram as maiores elevações na população de *Bifidobacterium* spp. (2,11 e 2,35 $\log_{10}$ UFC/g, respectivamente), em relação ao início do experimento (T0). Esse resultado evidencia, novamente, o possível efeito benéfico dos

produtos placebo e fermentado na modulação da microbiota dos animais em estudo. Cabe destacar que no T7 somente o grupo CLF exibiu aumento na população de *Bifidobacterium* spp. superior a um ciclo logarítmico ($1,89\log_{10}\text{UFC/g}$). Esse resultado era esperado, pois o produto probiótico contém a cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 em sua composição.

Estudo realizado por Celiberto (100) observou um aumento significativo na população de *Bifidobacterium* spp. ($1,35 \log_{10}\text{UFC/g}$) no grupo de animais que consumiu o mesmo produto fermentado à base de soja. Entretanto, o consumo do produto placebo não alterou a população desse gênero de microrganismos na fase crônica da colite.

Outros estudos, conduzidos em diferentes modelos animais, também reportaram um aumento da população de *Bifidobacterium* spp. após a ingestão regular do mesmo produto fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416, sem adição de *Bifidobacterium longum*, sugerindo que o produto é capaz de modular benéficamente a microbiota fecal (76,118).

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da população de *Clostridium* spp. presente nas fezes dos diferentes grupos experimentais ao longo do protocolo.

Tabela 11 - População de *Clostridium* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T7	T14
C	8,59±0,02 ^a	6,83±0,04 ^c	8,22±0,16 ^b
CL	8,70±0,02 ^a	6,87±0,08 ^c	8,14±0,03 ^b
CLF	6,85±0,03 ^c	8,10±0,04 ^b	8,96±0,04 ^a
CLP	6,60±0,03 ^c	6,80±0,06 ^b	8,73±0,10 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey(p<0,05).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7**= uma semana após a ingestão dos produtos, **T14**= período de indução da colite/fim do experimento.

Dados da literatura indicam que bactérias do gênero *Clostridium* spp. podem apresentar um caráter patogênico e atividades metabólicas indesejáveis, sendo relacionadas, juntamente com cepas do gênero *Bacteroides* spp., a processos inflamatórios intestinais (119, 127-128).

No presente estudo não foi possível explicar a redução na população de *Clostridium* spp. dos grupos, C e CL no final do T7, uma vez que tais animais receberam somente água e ração até esse momento do protocolo. Se considerarmos a população inicial desse gênero de microrganismos (T0), observou-se aumento de *Clostridium* spp. nos grupos CLF e CLP no final do experimento (T14) e os demais grupos (C e CL) mantiveram-se praticamente inalterados. Destacamos ainda o aumento na população do gênero *Clostridium* spp. no grupo CLF após a ingestão do produto probiótico (T7).

Esses dados são discordantes dos observados anteriormente em diferentes modelos animais. Estudo conduzido por Celiberto (100) concluiu que a administração do mesmo produto probiótico não influenciou a população desse

gênero de bactéria. Cavallini et al. (76) também analisaram a variação na população de *Clostridium* spp. após a administração de um produto fermentado (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416) a base de soja em coelhos com hipercolesterolemia induzida. Os resultados mostraram que não houve variação superior a meio ciclo logarítmico na população do gênero *Clostridium* spp. no grupo de animais que recebeu a bebida probiótica, sugerindo que esta não interfere no gênero citado.

Por outro lado, Bedani et al. (118) verificaram que ratos alimentados com uma dieta à base de carne e suplementados com uma suspensão da cepa pura de *E. faecium* CRL 183 exibiam um pequeno aumento na população de *Clostridium* spp. ($0,55 \log_{10}\text{UFC/g}$), após 30 dias de tratamento. O resultado sugere um possível efeito negativo da cepa probiótica na população de *Clostridium* spp. presente na microbiota intestinal dos camundongos.

A família *Enterobacteriaceae* é o maior grupo de bacilos Gram-negativos, além de ser o mais heterogêneo, apresentando importância clínica e estando relacionada a uma gama de patologias que afetam o ser humano. Do ponto de vista clínico, as enterobactérias patogênicas são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp., (129). Estudos anteriores (130-132) constataram maior prevalência de enterobactérias em fezes de pacientes com DII, em comparação com pacientes saudáveis (controle).

De acordo com o resultado da Tabela 12, constatou-se que todos os grupos apresentaram aumento significativo da população de enterobactérias durante o período experimental, sendo o menor aumento verificado para o grupo CLF ($1,34 \log_{10}\text{UFC/g}$). Quando se observa o final do período de indução (T14)

em relação ao período anterior (T7), esse aumento não tem relevância do ponto de vista microbiológico no grupo CLF, pois foi menor que meio ciclo logarítmico ($0,17 \log_{10}\text{UFC/g}$). Tal resultado sugere um possível efeito protetor do produto probiótico em estudo, já que nos grupos CL e CLP o aumento da população de enterobactérias foi superior a um ciclo logarítmico ($1,47$ e $1,48 \log_{10}\text{UFC/g}$ respectivamente) no mesmo período (entre T7 e T14).

Tabela 12 - População de enterobactérias ($\log_{10}\text{UFC/g}$)

Grupos	T0	T7	T14
C	$3,86 \pm 0,05^c$	$4,82 \pm 0,09^b$	$6,58 \pm 0,09^a$
CL	$4,24 \pm 0,14^c$	$4,97 \pm 0,13^b$	$6,44 \pm 0,01^a$
CLF	$4,12 \pm 0,07^c$	$5,29 \pm 0,02^b$	$5,46 \pm 0,06^a$
CLP	$4,24 \pm 0,03^c$	$5,06 \pm 0,18^b$	$6,54 \pm 0,17^a$

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si (pelo teste de Tukey($p < 0,05$)).

Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo). **T0=** antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

Um estudo anterior, utilizando coelhos como modelo animal, constatou redução de mais de três ciclos logarítmicos com a administração do mesmo produto probiótico, sem adição de *B. longum* (76).

Os resultados relativos à população de *Bacteroides* spp. estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - População de *Bacteroides* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T7	T14
C	3,65±0,03 ^a	3,65±0,03 ^a	3,73±0,10 ^a
CL	3,72±0,07 ^a	3,79±0,10 ^a	3,86±0,11 ^a
CLF	2,77±0,01 ^a	2,53±0,08 ^a	2,65±0,08 ^a
CLP	3,57±0,03 ^c	3,77±0,06 ^b	4,26±0,05 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey($p<0,05$).

Grupo C: Animais saudáveis que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL:** Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CLF:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto fermentado. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T7=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T14=** período de indução da colite/fim do experimento.

A população de *Bacteroides* spp. manteve-se baixa (média de 2,53 a 4,26 $\log_{10}$ UFC/g) e sem grandes alterações durante todo o experimento. Apesar do grupo CLP apresentar aumento significativo na população de *Bacteroides* spp. durante o período de indução (entre T7 e T14), essa variação, sendo menor do que meio ciclo logarítmico (0,49 $\log_{10}$ UFC/g) não tem relevância do ponto de vista microbiológico. Esses resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, em estudo que utilizou ratos Wistar como modelo animal (100).

Estudos indicam que o gênero *Bacteroides* spp. apresenta propriedades pró-inflamatórias e associam a presença de algumas espécies ao risco para câncer de cólon, pois tais bactérias produzem metabólitos que podem ser prejudiciais (120, 133-134).

No estudo conduzido por Ruseler et al. (135) a população de *Bacteroides* spp. foi semelhante entre pacientes portadores de DC e saudáveis. Porém, a população do grupo *Bacteroides fragilis* foi superior nos portadores de DC. Bloom

et al. (136) observaram que espécies comensais pertencentes ao gênero *Bacteroides* podem estar relacionadas ao desenvolvimento de DIIs, sob condições genéticas e ambientais específicas.

A duração do tratamento, a fase e o tipo da patologia e o modelo animal utilizado podem explicar, parcialmente, as diferenças observadas entre o presente estudo e os que foram realizados anteriormente com o mesmo produto probiótico à base de soja.

Os resultados relacionados à composição da microbiota fecal são importantes para o entendimento dos efeitos do produto probiótico no desenvolvimento da CU. Entretanto, devem ser interpretados com cautela, pois sabe-se que somente uma pequena parte dos microrganismos presentes na microbiota intestinal são cultiváveis por métodos tradicionais. As técnicas mais avançadas, que utilizam microbiologia molecular, apesar de caras, são as mais indicadas (137).

Outro fator que pode ter influenciado os resultados obtidos é o hábito coprofágico (ingestão de fezes com objetivo reabsorver proteínas excretadas) dos roedores (138-140). Ao ingerir as próprias fezes, poderia ocorrer uma modulação da microbiota não relacionada à ingestão dos produtos (probiótico e placebo), alterando os resultados obtidos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o produto probiótico à base de soja reduz o desenvolvimento de colite na fase aguda da doença. Esse efeito pode ser evidenciado pelo menor IAD na fase de indução, onde a pontuação média final do grupo CLF foi menor que a dos demais grupos em estudo. As análises histológicas confirmaram o efeito benéfico do produto fermentado na fase aguda da colite induzida por DSS, pois os animais do grupo CLF mantiveram a integridade das criptas, apesar de ter sido verificada a presença de células inflamatórias no cólon. O produto em questão também atuou positivamente na modulação da microbiota intestinal, através de um aumento na população de *Lactobacillus* spp. e menor aumento de enterobactérias após o período de indução da doença.

REFERÊNCIAS

01. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflam B Dis* 2006 Jan; 12 (1):S3-9.
02. Wehkamp J, Antoni L, Ostaff M, Stange EF. The intestinal barrier in health and chronic inflammation. Current understanding and implications for future therapeutic intervention. Germany: Falk Foundation e.V., 2013.
03. Guarner F, Casellas F, Borruel N, Antolin M, Videla S, Vilaseca J, et al. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Nutr* 2002 Dec; 56 (4): 34-38.
04. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre Jm, Lederman E, Gambiez L, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002 Apr; 97: 939-946.
05. Lepage P, Häsler R, Spehlmann Me, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterol* 2011 Apr; 141(1): 227-236.
06. Ritchie, ML & Romanuk, TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS ONE* 2012 Apr; 7(4): e34938.
07. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization [online], http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf, 2001.
08. Backhed F, Fraser Cm, Ringel Y, Sanders Me, Sartor Rb, Sherman Mp, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* 2012; 12 (5):611–22.
09. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus

statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014 Aug; 11(8):506-14.

10. Celiberto LS, Roselino MN, Bedani R, Rossi EA, Pinto RA, Pauly-Silveira ND, et al. Effect of a probiotic soy beverage and sulfasalazine on fecal microbiota of animals with colitis induced by dextran- sodium sulfate. 7th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

11. Chibbar R, Dieleman LA. Probiotics in the Management of Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49:50–55.

12. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* Jan 2009; 44(1):26-46.

13. Cavallini DCU, Celiberto LS, Roselino MN, Bedani R, Pauly-Silveira ND, Valdez GF et. al. Effect of a probiotic fermented soy product on colonic inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. 7th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

14. Jewel DP. Ulcerative colitis. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease pathophysiology, diagnosis and management. In:FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISENGER, M.H. Philadelphia: Saunders 1998; 6:1735–1761.

15. Souza MHLP, Troncon LEA, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do brasil. *Arq Gastroenterol* 2002 Abril; 39(2):98-105.

16. Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, Cosnes J. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update Place des facteurs environnementaux dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2009 Jun; 33(3):S145—S157.

17. Victoria CR, Sasaki LY, Nunes HRC. Incidence and Prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in Midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol* 2009 Jan-Mar; 46(1):20-25.
18. Matsuoka K, Mizuno S, Hayashi A, Hisamatsu T. Fecal Microbiota Transplantation for Gastrointestinal Diseases. *Keio J Med* 2014 Dec; 63(4):69-74.
19. Bamias G, Nyce MR, Rue SADL, Cominelli F. New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Ann Intern Med.* 2005 Dec 20;143(12):895-904.
20. Damman CJ, Miller SI, Surawicz CM, Zisman TL. The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 2012 Oct; 107(10):1452-9.
21. Tamboli CpP, Neut C, Desreumaux P. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004 Jan; 53(1):1–4.
22. Ott SJ, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut.*2004 May; 53(5):685-93.
23. Scaldaferri F, Gerardi V, Lopetuso LR, Del Zompo F, Mangiola F, Boškoski I, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: Their current usage and utility. *BioMed Resh Inter*, Article ID: 435268, 2013.
24. Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Fron Immun* 2013 Dec; 4:1–12.
25. Xu X, Xu P, Ma C, Tang J, Zhang X. Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnol Adv* 2013 Mar; 31(2):318–337.
26. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterol* 2014 May; 146(6):1489–1499.

27. Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, et al. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterol* 2015 Jul; 149(1):223–37.
28. Warinner C, Speller C, Collins MJ, Lewis CM. Ancient human microbiomes. *J Hum Evol* 2015 Feb; 79:125–136.
29. Thompson-Chagoya Na OC, Maldonadob J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nut* 2005 Jun; 24(3):339–352.
30. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007 May; 369(9573):1641-57.
31. Jess T, Loftus EVJ, Velayos FS, Harmsen WS, et al. Risk of Intestinal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study From Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterol* 2006 Apr;130(4):1039–1046.
32. Neto JDC, Barreto JBP, Freitas NS, Queiroz MA, et al. Cancer colorretal: características clínicas e anatomopatológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. *Rev Brás Coloproct* 2006 Jun; 26:430–43.
33. Linsalata M, Russo R. Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition* 2008 Apr; 24(4):382–389.
34. Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JAF. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 2010 May; 9(3):292-302.
35. Dave RI, Shah NP. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. *Int Dai J* 1997 Sep; 7:31-41.
36. Anekellaa K, Orsatb V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *Food Sci Tech* 2013 Jan; 50(1):17–24.
37. Durance T, Noorbakhsh R, Yaghmaee P. Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. *J Funct Foods* 2013 Jul; 5(3):1049–1056.

38. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 2001 Jan; 11(1-2):1-17.
39. Mattila-Sandholm T, Matto J, Saarela M. Lactic acid bacteria with health claims*interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int Dairy J* 1999; 9:25-35.
40. D'aimmo MR, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol* 2007 Apr; 115(1):35–42.
41. Hojsak I, Shamir R. Safety of probiotics. *World Rev Nut Diet* 2013 Apr; 107:161–170.
42. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB, et al. *Lactobacillus* GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003 Sep; 52(3):370–376.
43. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease: therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 20014 Apr; 56(6):809-818.
44. Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmasso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol* 2005 Mar; 156(2):256–262.
45. Dongarrà ML, Rizzello V, Muccio L, Fries W, Cascio A, Bonaccorsi I, Ferlazzo G. Mucosal immunology and probiotics. *Cur Allergy Asthma Rep* 2013 Feb; 13(1):19–26.
46. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Disc Today* Aug; 8(15):692–700.
47. WILLIAMS NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm* 2010 Mar; 67:449–458.
48. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003 Feb; 361(9356):512–519.

49. Kiso M, Takano R, Sakabe S, Katsura H, Shinya K, Uraki R, et al. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. Nat 2013 Mar Scientific Reports 3, Article number: 1563.
50. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. Int J Ob 2012 Jan; 36:817–825.
51. Gililand SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 1990 Mar; 87(1–2):175–188.
52. Tremellen K, Pearce K. Dysbiosis of Gut Microbiota (DOGMA) – A novel theory for the development of Polycystic Ovarian Syndrome. Med Hyp 2012 Jul; 79(1):104-112.
53. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: A clinical perspective. Postgrad Med J 2004 Feb; 80(947):516–526.
54. Cavallini DCU, Abdalla DSP, Vendramini RC, Bedani R, Bondespacho LQ, Pauly-Silveira ND, et al. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Lipids in Health and Disease 2009; 8:1, 2009a.
55. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001 Oct; 33(2):S17–S25.
56. Fedorak RN, Madsen KL Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2004 Dec; 10(3):286–299.
57. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. Gastroenterol 1999 May; 116(3):1107-1114.

58. Madsen K, Cornish A, Soper P, Mckaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterol* 2001 Sep; 121(3):580-591.
59. Matthes H, Krummenerl T, Giensch M, Wolff C, Schulze J. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Compl Alt Med* 2010 Apr; 10:13-20.
60. MARTEAU PR. Probiotics in clinical conditions. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002 Jun; 22(3):255–273.
61. Schiffrin E, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995 Mar; 78(3):491–97.
62. Ghouri Y, Richards D, Rahimi E, Krill J, Jelinek K, Dupont A. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics , prebiotics , and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014 Dec; 7: 473—487.
63. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Forti G, Modeo ME, Gigliobianco A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med Sci Mon* 2004; 10:126–131.
64. Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, et al. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 Jul; 7(11):1202-1209.
65. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a Probiotic Preparation (VSL#3) on Induction and Maintenance of Remission in Children With Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol* 2009 Jan; 104:437–443.
66. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the downregulation of pro-

inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. Clin Exp Immunol 2005 Jun; 140(3):417–426.

67. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2010 Sep; 16(33):4145-4151.

68. Sivieri K, Rossi EA, Cano VSP, Valentine RS. Survival of *Enterococcus faecium* CRL 183 through gastrointestinal transit in rats. Le Lait 2007; 87:59–69.

69. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. The Am J Clin Nutr 2001 Feb; 73(2):399–405.

70. Lund B, Admsson I, Edlund C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. Int J Food Microbiol 2002 Jul; 77(1-2):109–115.

71. Sivieri, K.; Spinardi-Barbisan, A.L.T.; Barbisan, L.F.; Bedani, R.; Pauly, N.D.; Carlos, I.Z.; Benzatti, F.; Vendramini, R.C.; Rossi, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. Eur Food Res Tech 2008 Dec; 228(2):231-237.

72. Rossi EA, Carlos IZ, Pei YC, Valdez GF. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. Eur Food Res Tech 1999 Sep; 5(5):305-307.

73. Rossi EA, Carlos IZ, Ueiji IS, Squinzari MM, Silva Júnior SI, et al. Effects of a novel fermented soy production the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. Arq Bras Card 2000 Mar; 74(3):213-216.

74. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Oliveira MN, Valdez GF. Effect of a new fermented soy milk product on serum lipid levels in normocholesterolemic adult men. Arch Latinoam Nutr 2003 Mar; 53(1):47-51.

75. Cavallini DCU, Abdalla DSP, Vendramini RC, Bedani R, Bondespacho LQ, Pauly-Silveira ND, et al. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid

parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. *Lip Health Dis* 2009 Oct; 8(40):1-10.

76. Cavallini DCU, Suzuki JY, Abdalla DSP, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. *Lip Health Dis* 2011 Jul; 10(1):126-134.

77. Cavallini DCU, Manzoni MJ, Bedani R, Roselino MN, Celiberto LS et al. Probiotic Soy Product Supplemented with Isoflavones Improves the Lipid Profile of Moderately Hypercholesterolemic Men: A Randomized Controlled Trial. *Nutr* 2016 Jan; 8(1):52-69.

78. Rossi EA, Reddy KV, Silva RSSF. Formulation of soy-whey yogurt, using response surface methodology. *Arq biol tecnol* 1984; 27:387-390.

79. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos – 3ª.ed. São Paulo: Livraria Varela 2007; 1:536.

80. Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, Sedergran D J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2):238-249.

81. Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 1993 Sep; 38(9):1722-1734.

82. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995 Apr; 268(4):622-630.

83. Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguezcabezas ME, et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflam B Dis* 2005 Mar; 11(3):265–271.

84. Nanda-Kumar NS, Balamurugan R, Jayakanthan K, Pulimood A, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulphate. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Dec; 23(12):1834-1839.
85. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatr* 1983 Sep; 72(3):317–21.
86. Munoa, FJ; Pares, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* 1988 Jul; 54(7):1715–1718.
87. Brigidi P, Vitali B, Swennen E, Bazzocchi G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res Microbiol* 2001 Oct; 152(8):735–741.
88. Livingston SJ, Kominos SD, Yee RB. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. *J Clin Microbiol* 1978 May; 7(5):448-453.
89. Marzotto M, Maffeis C, Paternoster T, Ferrario R, Rizzotti L, Pellegrino M, et al. *Lactobacillus paracasei*: A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Res Microbiol* 2006 Nov; 157(9):857–866.
90. Edlund C, Beyer G, Hiemer-Bau M, Ziege S, Lode H, Nord CE. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(1):81–85.
91. Bertazzoni E, Donelli G, Midtvedt T, Nicoli J, Sanz Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *J. Chemother* 2013; 25, 193–212.
92. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, jul./2008 Disponível

em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista__alega.htm.
Acesso em: 9 nov. 2012.

93. Perse M, Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J Biom Biotechnol* 2012; ID article: 718617.

94. Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterol* 2006 Oct; 6:6-31.

95. Malago JJ, Nondoli N. Sodium arsenite reduces severity of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rats. *J Zhejiang Univ Sci* 2008 Apr; 9(4):341-350.

96. Willenberg, Ostermanna AI, Giovannini S, Kershawb O, Keutz AV, Steinberg P, et al. Effect of acute and chronic DSS induced colitis on plasma eicosanoid and oxylipin levels in the rat. *Prostag Oth Lipid M* 2015 Jul; 120:155-60.

97. Elkatary R, Abdelrahman K, Hassanin A, Elmasry AI, Kare AE. Comparative Study between Effect of Simvastatin (5 mg/Kg) and Simvastatin (50 mg/Kg) in an Early Treatment of Experimentally Induced Colitis in Mice. *Br J Med Med Res* 2015 Jun; 8(11):937-47.

98. Chen LL, Xue HW, Yi C, Guang-Hui L, Jie Z, Chun-Hui O, et al. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol* 2009; 15:321-327.

99. Dai C, Zheng CQ, Meng F, Zhou Z, Sang L, Jiang M. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- κ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. *Mol Cell Biochem* 2013 Feb; 374(1):1-11.

100. Celiberto L S. Efeito de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, 2014.

101. Pan T, Guo HY, Zhang H, Liu AP, Wang XX, Ren FZ. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* alleviates clinical symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium salt in BALB/c mice. *Beneficial Microbes* 2014 Jun; 5(5):315–322.
102. Tamaki H, Nakase H, Inoue S, Kawanami C, Itani T, Ohana M, et al. Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig Endosc* 2016 Jan; 28(1):67-74.
103. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 May; 288(6):1328–1338.
104. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterol* 1990; 98(3):694-702.
105. Moussa L, Bézirard V, Salvador-Cartier C, Bacquié V, Lencina C, Lévêque M. et al. A low dose of fermented soy germ alleviates gut barrier injury, hyperalgesia and faecal protease activity in a rat model of inflammatory bowel disease. *Plos One* 2012 Nov; 7(11):e49547.
106. Hakansson A, Branning C, Molin G, Adawi D, Hagslatt ML, Jeppsson B, et al. Blueberry Husks and Probiotics Attenuate Colorectal Inflammation and Oncogenesis, and Liver Injuries in Rats Exposed to Cycling DSS-Treatment. *PLoS ONE* 2012 Mar; 7(3): e33510.
107. Persborn M, Gerritsen J, Wallon C, Carlsson A, Akkermans LMA, Söderholm JD. The effects of probiotics on barrier function and mucosal pouch microbiota during maintenance treatment for severe pouchitis in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Oct; 38(7):772–783.
108. Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Differential Targeting of the E-Cadherin/ -Catenin Complex by Gram-Positive Probiotic

Lactobacilli Improves Epithelial Barrier Function. *Appl Environ Microbiol* 2012 Feb; 78(4):1140–1147.

109. Chen YP, Hsu CA, Hung WT, Chen MJ. Effects of *Lactobacillus paracasei* 01 fermented milk beverage on protection of intestinal epithelial cell in vitro. *J Sci Food Agric* 2016 Apr; 96(6):2154-2160.

110. Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, et al. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PLoS ONE* 2015 Jul; 10(7): e0134050.

111. Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, et al. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2012 May; 57(11):2955-2964.

112. OREL R, Trop TK. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(33):11505-24.

113. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohns disease of the colon. *Gut* 2003 Jul; 52(2):327-242.

114. Ettreiki C, Gadonna-Widehem P, Mangin I, Coëffier M, Delayre-Orthez C, Anton PM. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. *World J Gastroenterol* 2012 Jun; 18(21):2619-2629.

115. Jian Ge, Xiaohua Zhang, Jin Liu, Zhenmei Fu, Xiuju Shi, Qingyan Li, et al. Elevated expression of interleukin-21 and its correlation to T-cell subpopulation in patients with ulcerative colitis. *Cen Eur J Immunol* 2015; 40(3):331-336.

116. Bedani R, Rossi EA, Isay Saad SM. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol* 2012 Jun; 34(2):382-389.

117. Henning C, Gautam D, Muriana P. Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. *Microorg* 2015 Feb; 3(1):1-16.
118. Bedani R, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, Valdez GF, Rossi EA. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef -based animal diet. *J Sci Food Agric* 2010 Jan; 90(2):233–238.
119. Campieri M, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Ugolini F. Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of post-operative recurrence of Crohn's disease: a randomized controlled study vs mesalamine. *Gastroenterol* 2000; 118(4):4179.
120. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol* 2000 Aug; 119(2):305-309.
121. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterol* 2001 Feb; 120(3):622-635.
122. Bourlioux P, Koletzko B, Guarne F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium, "The Intelligent Intestine". held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nut* 2003 Oct; 78(4):675–678.
123. Bullock NR, Booth JC, Gibson GR. Comparative composition of bacteria of human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2004; 5(2):59-64.
124. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Inter J Colorec Dis* 2006 Dec; 21(8):737-746.
125. Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1990 Dec; 6(4):236-268.

126. Fanning S, Hall LJ, Sinderen DV. *Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. 2012 Jun; 3(5):420-425.
127. CHENG A C, FERGUSON J K, RICHARDS M J. Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. Med J 2011 Mar; 194(12):353-358.
128. Buxey KN, Sia C, Bell S, Wale R, Wein D, Warriar SK. Clostridium colitis: challenges in diagnosis and treatment. ANZ J Surg 2014 Sep.
129. Guerrero PP, Sánchez FG, Saborido DG, Lozano IG. Infecciones por enterobacterias. Medicine 2014 May; 11(55):3276-3282.
130. Schröder C, Schmidt S, Garbe E, Röhm J, Giersiepen K. Effects of the regular intake of the probiotic *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) on respiratory and gastrointestinal infections in a workplace setting: a double-blind randomized placebocontrolled trial. BMC Nutrition 2015 Jan; 1:3.
131. Gorbach S L, Nahas L, Plaut A G, Weinstein L, Patterson JF, Levitan R. Studies of intestinal microflora. V.Fecal microbial ecology in ulcerative colitis and regional enteritis:relationship to severity of disease and chemotherapy. Gastroenterol 1968 Apr; 54(4):575-587.
132. Keighley MR, Arabi Y, Dimock F, Burdon DW, Allan RN, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. Gut 1978; 19(12):1099-104.
133. Keku TO, Dulal S, Deveau A, Jovov B, Han X. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2015; 308:G351–G363.
134. Zackular JP, Rogers MAM, Ruffin MT, Schloss PD. The Human Gut Microbiome as a Screening Tool for Colorectal Cancer. Cancer Prev Res 2014 Nov; 7(11):1112-1121.

135. Ruseler-Van Embden JG, Both-Patoir HC. Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983 Mar; 49(2):125-132.
136. Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, et al. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host & Microbe* 2011 May; 9:390–403.
137. Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinic Chim Acta* 2015 Dec; 451(part A):97–102.
138. Isogai E, Isogai H, Sawada H, Kaneko H, Ito N. Microbial Ecology of Plaque in Rats with Naturally Occurring Gingivitis. *Infect Immun* 1985 May; 48(2):520-527.
139. Schanaider A, Silva PC. The use of animals in experimental surgery. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Jul-Ag;19(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. Acessado em 17 de abril de 2016.

Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso U. Cavallini

Orientadora

Olivia Pizetta Zordão

Mestranda