

Atendendo a solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese/dissertação
será disponibilizado somente a partir de
11/07/2025.

At the author's request, the full text of
this thesis/dissertation will not be
available until Jul 11, 2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JAQUELINE LEMES RIBEIRO

EFEITOS DE PROBIÓTICOS E POSBIÓTICOS NA SAÚDE ÓSSEA

2023

JAQUELINE LEMES RIBEIRO

EFEITOS DE PROBIÓTICOS E POSBIÓTICOS NA SAÚDE ÓSSEA

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: inflamação, reparação tecidual e patologia do sistema estomatognático.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Ribeiro, Jaqueline Lemes

Efeitos de probióticos e posbióticos na saúde óssea / Jaqueline Lemes
Ribeiro. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
68 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.
Orientadora: Ana Lia Anbinder.

1. Probiótico. 2. Posbiótico. 3. Heat-killed. 4. Osteopenia. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A possibilidade de prevenir a perda óssea pós-menopausa com um método natural e não invasivo tem apelo importante. Bons resultados foram obtidos, e o uso de *L. reuteri* inativado é interessante porque apresentaria menos efeitos adversos, maior facilidade na produção, padronização, estabilidade e tempo de prateleira.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The possibility of preventing postmenopausal bone loss with a natural and non-invasive method has significant appeal. Good results have been achieved, and the use of inactivated *L. reuteri* is interesting because it would have fewer adverse effects, easier production, standardization, increased stability, and shelf life.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Assoc. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª. Assoc. Carla Taddei de Castro Neves

Universidade de São Paulo (USP)

Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Campus de São Paulo

Profª. Assoc. Cristiane Furuse

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia

Campus de Araçatuba

Profª. Titular Cristiane Yumi Koga Ito

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira

Universidade Braz Cubas

Faculdade de Odontologia

Campus de Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 11 de julho de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos os pesquisadores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e dar forças a cada passo da minha vida pessoal e acadêmica.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos. Aos meus pais, *Wander* e *Sandra*, por absolutamente tudo o que já fizeram e fazem por mim; nenhuma palavra seria suficiente para expressar tamanha gratidão que sinto. Aos meus irmãos, *Ferdinando*, *Sabrina*, *Vitória* e *Elisandra*, pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu melhor amigo, e agora noivo, *Rafael*, por todo o incentivo, paciência e compreensão. Por me acalmar nos momentos de ansiedade, me aconselhar, me mostrar que as coisas podem ser mais simples do que eu imagino. Por me cuidar e me enxergar com um carinho que às vezes nem eu me enxergo. À família do *Rafael*, pelo incentivo, apoio, acolhimento e compreensão.

À minha orientadora, *Ana Lia Anbinder*. Obrigada por todos os ensinamentos, apoio e incentivo. A tenho como melhor exemplo de professora, orientadora, pesquisadora e patologista. Muito obrigada por toda a parceria, confiança, preocupação, pela paciência nos meus momentos de estresse, pelas oportunidades que me deu, e pelos conselhos preciosos durante todos esses anos. Por ter me ensinado a ser professora, e a fazer pesquisa de forma ética. Por todos os momentos bons, conquistas, acertos e por ter me ensinado a ser resiliente nos momentos difíceis. Serei eternamente grata. Minha vida acadêmica com toda a certeza não seria a mesma sem a sua liderança.

Aos professores da banca, pelo aceite do convite, pelo tempo dedicado a este momento e pelas contribuições científicas valiosas.

Ao ICT-Unesp, que tem sido minha segunda casa desde 2010, nas pessoas da diretora Prof^a *Rebeca Di Nicoló* e do vice-diretor Prof. *Claudio Talge*. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB), na pessoa do coordenador Prof. *Alexandre Luiz Souto Borges*. Obrigada pela oportunidade e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado no período de março/2020 a julho/2023.

Às Profas. *Juliana Campos Junqueira* e *Luana Marotta*, por terem aberto as portas do laboratório de Microbiologia e Imunologia e do Laboratório de Estudos Interdisciplinar em Células, respectivamente, para desenvolvimento de parte deste trabalho.

À Profa. *Cristiane Yumi Koga Ito*, por ter cedido gentilmente as células Caco-2.

À *Biogaia*, por ter cedido a cepa de *Limosilactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475.

Aos técnicos do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, por estarem sempre dispostos a ajudar, em especial ao *Sérgio Giovanni Alves*, pelos momentos de descontração, conselhos e conversas sobre nossos gatos.

Às companheiras de equipe, *Renata Mendonça Moraes*, *Thais Aguiar Santos* e *Luísa Souza Battistelli*, muitíssimo obrigada! Este trabalho não seria o mesmo sem vocês. Sou grata pelo companheirismo, apoio e ajuda nos meses de biotério, dias de laboratório, conversas, conselhos, correções, e pelas nossas pausas para o cafezinho.

Às amigas que a pós-graduação me deu e levarei para a vida, *Bruna Carvalho*, *Maíra Garcia* e *Natália Carvalho*, por toda a ajuda direta no trabalho, mas principalmente pelos nossos momentos de descontração e amparo, que com certeza tornou essa jornada mais leve. Em especial à *Maíra*, minha companheira de almoços, que sempre deu um jeito de adoçar meu dia, fosse com palavras de incentivo e conselhos, ou literalmente com doces caseiros. À *Noala Milhan*, pela amizade, conselhos, e ajuda, desde o começo do mestrado.

Aos colegas de pós-graduação *Kamilla Alves*, *Luis Augusto*, *Maria Letícia* e *Mateus Dutra*, por toda nossa troca, científica ou pessoal.

À *Juliani Ribeiro*, por toda a ajuda durante a eutanásia dos animais. À *Noala* e *Diego Moraes*, pela imensa ajuda no início do trabalho *in vitro*.

Aos amigos *Adeísa Escobar*, *Adélia Silva*, *Bruna Caroline*, *Daniel Henrique*, *Diogo Moura*, *Letícia Rodrigues* e *Nayara Sá*, por serem compreensivos com minhas ausências e ansiedade, pelo companheirismo e apoio.

Aos docentes da pós-graduação e funcionários da Universidade, que colaboraram cada um à sua maneira. E a tantas outras pessoas, que auxiliaram direta ou indiretamente, na confecção deste trabalho.

RESUMO

Ribeiro JL. Efeitos de probióticos e posbióticos na saúde óssea [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

O envelhecimento da população tem sido acompanhado por um aumento significativo nas doenças crônicas, com destaque para a osteoporose. A busca por tratamentos alternativos tem levado ao estudo dos probióticos para prevenção e tratamento da perda óssea pós-menopáusia, com resultados encorajadores. Embora os benefícios dos probióticos sejam numerosos, eles são bactérias vivas e a administração de organismos vivos não é isenta de riscos. Os posbióticos são probióticos inativados ou seus produtos, e poucos são os estudos que avaliam seus efeitos ósseos. Nós revisamos a literatura sobre probióticos e posbióticos na saúde óssea e avaliamos os efeitos de *Limosilactobacillus reuteri* 6475 viável e inativado por calor em camundongos ovariectomizados. Mecanismos de ação semelhantes, como modulação da expressão de citocinas e ativação de sistemas de sinalização celular, são observados em probióticos e posbióticos, e os últimos têm vantagens como maior estabilidade e facilidade de incorporação em alimentos, embora seus efeitos a longo prazo, estabilidade e modo de ação ainda precisem ser estudados. Para que estas terapias sejam validadas clinicamente, é fundamental padronizar metodologias, aumentar o tamanho das amostras, realizar estudos randomizados e cegos, e definir detalhes como cepa, dose e duração do tratamento. Em um estudo in vivo, avaliamos os efeitos de *L. reuteri* (ATCC PTA 6475), e sua forma inativada (*heat-killed*) na perda óssea induzida por ovariectomia (ovx). Camundongos adultos, fêmeas, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (*sham*); Ovx; Ovx + posbiótico; Ovx + probiótico. *L. reuteri* foi administrado aos grupos (10^9 UFC/dia) por gavagem. O tratamento se iniciou uma semana após a ovx e teve duração de 28 dias. Na análise por microscopia eletrônica de varredura, o probiótico manteve sua estrutura intacta, e no posbiótico foram observados alguns rompimentos na superfície celular. Foi avaliada a microarquitetura de fêmur, utilizando microtomografia computadorizada. Análise de expressão gênica em íleo foi feita para avaliar junções intercelulares intestinais e citocinas pró-inflamatórias, por meio dos marcadores *Ocludina*, *Tnf- α* e *Il-6*. Os dados foram submetidos ao teste estatístico mais conveniente ($\alpha = 0,05$). Os grupos Ovx apresentaram menor porcentagem de volume ósseo (BV/TV), menor número de trabéculas ósseas e maior porosidade total, em comparação ao grupo controle, porém os grupos que receberam *L. reuteri* apresentaram maior BV/TV quando comparados ao grupo Ovx. O tratamento com *L. reuteri* em suas duas formas levou à maior espessura trabecular, quando comparados ao controle e ao grupo Ovx. Todos apresentaram semelhança na expressão gênica da *Ocludina*, *Tnf- α* e *Il-6* em intestino. Ambas as formas, viável e inativada por calor, preveniram a perda óssea induzida por depleção de estrógeno.

Palavras-chave: probiótico; posbiótico; *heat-killed*; osteopenia.

ABSTRACT

Ribeiro JL. *Effects of probiotics and postbiotics in bone health [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.*

The aging of the population has been accompanied by a significant increase in chronic diseases, with osteoporosis standing out. The search for alternative treatments has led to the study of probiotics for the prevention and treatment of postmenopausal bone loss, with encouraging results. Although the benefits of probiotics are numerous, they are live bacteria, and the administration of live organisms is not risk-free. Postbiotics are inactivated probiotics or their products, and few studies have evaluated their bone effects. We reviewed the literature on probiotics and postbiotics in bone health and assessed the effects of both viable and heat-killed *Limosilactobacillus reuteri* 6475 in ovariectomized mice. Similar mechanisms of action, such as the modulation of cytokine expression and activation of cellular signaling pathways, are observed in probiotics and postbiotics, and the latter have advantages such as greater stability and ease of incorporation into food, although their long-term effects, stability, and mode of action still need to be studied. To clinically validate these therapies, it is crucial to standardize methodologies, increase sample sizes, conduct randomized and blinded studies, and define details such as strain, dosage, and treatment duration. In an in vivo study, we evaluated the effects of *L. reuteri* (ATCC PTA 6475) and its heat-killed form on ovariectomy (ovx)-induced bone loss. Adult female mice were randomly divided into four groups: control (sham); OVX; OVX + postbiotic; OVX + probiotic. *L. reuteri* was administered to the groups (10^9 CFU/day) by gavage. Treatment began one week after ovx and lasted for 28 days. Scanning electron microscopy analysis showed that the probiotic maintained its intact structure, while some cell surface disruptions were observed in the postbiotic. Femur microarchitecture was evaluated using computerized microtomography. Gene expression analysis in the ileum was performed to assess intestinal intercellular junctions and pro-inflammatory cytokines, using markers Occludin, Tnf- α , and Il-6. The data were subjected to the most appropriate statistical test ($\alpha = 0.05$). The OvX groups showed a lower percentage of bone volume (BV/TV), a lower number of trabecular bones, and greater total porosity compared to the control group. However, the groups that received *L. reuteri* showed higher BV/TV compared to the OvX group. Treatment with both forms of *L. reuteri* led to greater trabecular thickness compared to the control and OvX groups. All groups exhibited similarity in the gene expression of Occludin, Tnf- α , and Il-6 in the intestine. Both viable and heat-killed forms prevented estrogen depletion-induced bone loss.

Keywords: probiotic; postbiotic; heat-killed; osteopenia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 ARTIGOS	13
2.1 Artigo 1 - Ribeiro JL, Santos TA, Anbinder AL. Benefícios que até a morte não separa: a promessa dos probióticos e posbióticos para a saúde óssea / <i>Benefits that death does not part: the promise of probiotics and postbiotics for bone health.</i>	14
2.2 Artigo 2 - Ribeiro JL, Santos TA, Garcia MT, Carvalho BFC, Esteves JS, Moraes RM, Anbinder AL. <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475 inativado por calor previne a perda óssea em camundongos ovariectomizados / <i>Heat-killed <u>Limosilactobacillus reuteri</u> ATCC PTA 6475 prevents bone loss in ovariectomized mice</i>	40
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	60
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO.....	68

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pela redução da massa óssea e degradação da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em fragilidade óssea e aumento do risco de fratura (National Institutes of Health, 2001). É uma doença altamente prevalente, e estima-se que no Brasil, aproximadamente 33% das mulheres pós-menopáusicas (International Osteoporosis Foundation, 2020) e mais da metade dos indivíduos acima de 50 anos, nos Estados Unidos, apresentem osteoporose ou osteopenia (Wright et al., 2014). Estima-se que uma a cada duas mulheres e um em cada quatro homens acima de 50 anos sofram alguma fratura devido à osteoporose (McCabe et al., 2013). Calcula-se que a prevalência da osteoporose em mulheres, mundialmente, seja de 18,3% (95% IC 16,2 – 20,7), enquanto nos homens seja de 11,7% (95% IC 9,6 – 14,1) (Salari et al., 2021). Além da alta prevalência, esta doença progride de forma silenciosa, podendo chegar a um estágio grave (geralmente fraturas) sem que o hospedeiro tenha alguma sintomatologia. A osteoporose se tornou um problema de saúde pública em âmbito mundial, causando aproximadamente 8,9 milhões de fraturas, e ainda assim sua magnitude não é totalmente compreendida, devido à variabilidade nos métodos de avaliação (OMS, 2004). Além disso, as despesas com fraturas relacionadas à osteoporose são significantes, custando aproximadamente £4 bilhões por ano no Reino Unido, e US\$17,9 bilhões nos Estados Unidos (Clynes et al., 2020). Muitos fatores podem afetar a quantidade de massa óssea, podendo ser fixos ou modificáveis, como idade avançada, disfunções na tireoide e paratireoide, baixo peso (má nutrição), uso prolongado de medicamentos, artrite reumatoide, diabetes, transplantes, deficiência hormonal, deficiência de vitamina D, consumo de álcool e cigarro (Gallagher, Tella, 2014).

Quanto à sua classificação, a osteoporose pode ser primária ou secundária. A osteoporose primária pode ocorrer em ambos os sexos, em qualquer idade, mas frequentemente ocorre após a menopausa em mulheres, e em homens de idade avançada. Já a osteoporose secundária ocorre como consequência de uso contínuo de medicamentos (como glicocorticoides), outras condições ou doenças (National Institutes of Health, 2001). A osteoporose pós-

menopausa (OPM) é o tipo mais comum, e ocorre em consequência da redução de produção hormonal e estimula a rápida reabsorção de osso trabecular (Dar et al., 2018).

Inúmeras terapias têm sido desenvolvidas para o tratamento da osteoporose, com intuito de diminuir a perda óssea, prevenir fraturas e balancear a formação/reabsorção óssea. O tratamento pode ser farmacológico ou não farmacológico. Para indivíduos com baixo risco de fratura, é indicado somente o tratamento não farmacológico, que é baseado na ingestão de cálcio, vitamina D, proteínas, cessação do uso de tabaco e álcool, prática de exercícios físicos, e alterações na dieta. Para indivíduos com médio/alto risco de fratura, além do tratamento não farmacológico, medicamentos antirreabsortivos (como bisfosfonatos) e a terapia de reposição hormonal, nas mulheres, também são indicados (Gallagher, Tella, 2014).

A terapia de reposição hormonal é um dos tratamentos mais utilizados para o alívio dos sintomas associados à menopausa e para prevenção de consequências clínicas da deficiência de estrógeno. Entretanto, o uso hormonal prolongado pode causar efeitos adversos (principalmente aumento no risco de acidentes tromboembólicos, infartos e câncer de mama), o que tem levado a diminuição no seu uso, e a um aumento no desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas como o uso de probióticos e vitaminas (Borrelli, Ernst, 2010).

Pesquisas realizadas em seres humanos e animais têm demonstrado de maneira consistente que a microbiota presente no intestino desempenha um papel crucial na manutenção da saúde do hospedeiro. Essa função abrange diversas áreas, como o metabolismo (incluindo a produção de hormônios como a dopamina e a serotonina), a absorção de nutrientes essenciais, a proteção contra patógenos por meio da integridade da barreira intestinal, e o fortalecimento do sistema imunológico (Bhardwaj et al., 2022). As junções intercelulares (TJs), estruturas proteicas que selam os espaços entre as células epiteliais intestinais, são responsáveis por essa integridade. Adaptações dinâmicas dessas TJs permitem que respondam a fatores externos, como a presença de resíduos alimentares, bactérias benéficas e patógenos (Ulluwishewa et al., 2011). O estrógeno desempenha um papel vital na preservação dessas junções, ativando vias que aumentam a resistência elétrica

através da barreira transepitelial, efetivamente impedindo a entrada de patógenos. Como resultado, uma deficiência neste hormônio enfraquece a barreira intestinal, aumentando o contato com antígenos e bactérias, o que desencadeia uma resposta inflamatória (Xu et al., 2017).

Probióticos são microrganismos não patogênicos, que quando administrados em quantidades adequadas, podem ser benéficos à saúde do hospedeiro (Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002). Muitos gêneros de bactérias são utilizados devido a seus efeitos probióticos, como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Bifidobacterium*. Bactérias probióticas são naturalmente encontradas em membranas mucosas como boca, pele, órgãos genitais, urinários, trato gastrointestinal, e comumente adicionadas a produtos fermentados como laticínios e cerveja (Collins et al., 2017b). O consumo de probióticos tem demonstrado diversas vantagens, como melhora na saúde óssea, manutenção na função da barreira intestinal e na função do sistema imune, resultando em uma melhora sistêmica na saúde do hospedeiro, incluindo saúde óssea (McCabe, Parameswaran, 2018). O uso de *Limosilactobacillus reuteri*, em especial, da cepa ATCC PTA 6475, tem sido associado à redução da perda óssea devido à deficiência de hormônios ovarianos em estudo em animais e humanos (Britton 2014, Nilsson 2018).

Apesar dos bons resultados obtidos pelo uso dos probióticos, as células vivas contidas nos produtos eventualmente perdem sua viabilidade, e uma quantidade de células inativas permanece (Nighswonger et al., 1996). Devido ao uso de bactérias vivas, a preocupação com a segurança de alguns grupos, como de pacientes pediátricos e populações vulneráveis, tem crescido, levando a um aumento no interesse no uso de bactérias mortas, ou não-viáveis (Piqué et al., 2019).

Na literatura têm sido propostos termos como “probióticos não-viáveis”, “paraprobióticos”, “probiótico fantasma”, “probiótico inativado”, e mais recentemente, “posbiótico”, para se referirem ao uso de microrganismos inativados e/ou seus componentes, em quantidade adequada para promover benefícios à saúde (Vinderola et al., 2022). Os posbióticos possuem vantagens como maior facilidade na padronização, armazenagem e transporte (Piqué et al., 2019) em relação ao uso de células vivas. Os possíveis mecanismos de ação

pelos quais os posbióticos melhoram a saúde do hospedeiro ainda vêm sendo estudados.

A inativação das bactérias pode ser feita de diversas formas, como calor, métodos químicos (formalina), raios ultravioleta ou gama, e sonicação, sendo o calor o método mais utilizado (Deshpande et al., 2018). Os métodos de inativação podem afetar de diferentes formas os componentes estruturais celulares, e influenciar a atividade imunomodulatória (Taverniti, Guglielmetti, 2011).

Frente à necessidade de novas alternativas terapêuticas ou adjuntas ao tratamento da osteoporose, doença crônica que pode ser considerada um problema de saúde pública na população com a maior expectativa de vida, e ao crescente uso de probióticos e posbióticos, levantamos a hipótese de que *L. reuteri* na sua forma viável e inativada, podem ser efetivos na melhora da saúde e prevenção da perda óssea que ocorre pós-menopausa. O estudo dos efeitos de *L. reuteri* viável e inativado pode esclarecer os mecanismos de ação do probiótico e possibilitar o uso comercial de outras preparações, dado que os posbióticos teriam produção facilitada, maior estabilidade e tempo de prateleira, além de ser um tratamento de fácil acesso à população.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nas últimas décadas, a população brasileira tem envelhecido consideravelmente, com associação ao aumento na prevalência de doenças crônicas (Baccaro et al., 2015). A osteoporose é uma das doenças mais relacionadas ao envelhecimento da população (Zeng et al., 2021). Sendo um problema de saúde pública em âmbito mundial, a busca por novas possibilidades terapêuticas vem sendo explorada, e dentre elas, o uso de probióticos.

O uso de probióticos tem sido extensivamente testado, e demonstrado resultados promissores na prevenção e tratamento da perda óssea pós-menopausa (Jansson et al., 2019; Lambert et al., 2017; Nilsson et al., 2018; Takimoto et al., 2018), assim como o uso de posbióticos (Jang et al., 2021; Jhong et al., 2022; Montazeri-Najafabady et al., 2021; Myeong et al., 2023; Yeom et al., 2021). Os mecanismos e os efeitos na saúde exercidos pelos posbióticos têm se mostrado bastante semelhantes aos observados nos probióticos, como a estimulação/supressão da expressão de citocinas e a ativação do sistema de sinalização celular, além de efeitos antimicrobianos. Essa similaridade sugere que a perda de viabilidade devido à inativação celular não compromete suas funções benéficas (Siciliano et al., 2021).

Em nosso estudo, a administração diária de *L. reuteri* ATCC PTA 6475, em sua forma viável e inativada, levou a uma menor perda óssea em camundongos ovariectomizados. Esses resultados estão alinhados com a compreensão existente sobre a conexão entre o intestino e os ossos e a influência da microbiota intestinal na saúde óssea (Ohlsson, Sjögren, 2018). Entretanto, o mecanismo pelo qual isso acontece, ainda é incerto.

Sabendo que a deficiência hormonal pós-menopausa leva a um aumento da permeabilidade da barreira intestinal (Li et al., 2016), avaliamos um marcador intestinal de junção intercelular, *Ocludina*, no íleo. Entretanto, não obtivemos diferença estatística entre os grupos. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa, existem várias famílias de proteínas juncionais que não foram avaliadas (Claudinas, Jam-3, Zônula ocludens, por exemplo). Esta foi uma limitação do nosso estudo, onde apenas avaliamos uma proteína juncional, em um determinado período (28 dias) e em

um segmento intestinal. Segundo Collins et al. (2017), as alterações induzidas pela Ovx são região- e tempo-dependentes (Collins et al., 2017a).

Além da *Ocludina*, avaliamos em íleo as citocinas pró-inflamatórias *Tnf- α* e *Il-6*. Estudos já demonstraram que os probióticos possuem influência na expressão de citocinas inflamatórias (Britton et al., 2014; Collins et al., 2016; McCabe et al., 2013). Não houve diferença estatística entre os grupos, porém os gráficos exibiram um padrão coerente, mostrando uma tendência a diminuição da expressão dessas citocinas nos grupos que receberam *L. reuteri*.

Nosso principal desfecho confirmou nossa hipótese inicial: o posbiótico teve um efeito positivo na manutenção da saúde óssea após ovariectomia. Embora sejam considerados reguladores do metabolismo ósseo, o papel dos probióticos como tratamento adjuvante e preventivo para a osteoporose tem gerado debate devido à falta de consenso sobre sua eficácia (Zeng et al., 2021), e ainda não há estudos clínicos randomizados com o uso de posbióticos. Em nosso estudo, a administração de *L. reuteri* inativado levou a uma menor perda óssea, quando comparado ao grupo Ovx, aumentando BV/TV e Tb.Th, com efeito similar ao do probiótico na microarquitetura óssea. Nossos resultados estão em concordância com o obtido por outros pesquisadores (Jang et al., 2021; Jhong et al., 2022; Kimoto-Nira et al., 2009, 2007; Montazeri-Najafabady et al., 2021; Myeong et al., 2023).

O uso de *L. reuteri* inativado nos trouxe bons resultados como opção terapêutica e ajuda a confirmar que bactérias vivas nem sempre são necessárias para obter efeitos benéficos. Entretanto, o modo de ação dos posbióticos, seu impacto no sistema imunológico do hospedeiro e no metabolismo ósseo ainda foram pouco explorados.

O próprio processo de inativação pode introduzir propriedades únicas ou modulações nos componentes bacterianos (Akter et al., 2020), exigindo uma avaliação e padronização dos métodos utilizados. A inativação pode ser feita por diferentes métodos: aplicação de calor, químicos, raios ultravioleta ou gama, entre outros. O método mais utilizado para inativação dos probióticos é o calor (geralmente entre 70-100 °C) (Piqué et al., 2019). Em nosso estudo, utilizamos temperatura acima de 100 °C, porém, ao avaliarmos a estrutura bacteriana através de microscopia eletrônica de varredura, constatamos que os posbióticos mantiveram sua estrutura, apresentando apenas algumas rupturas na superfície celular. Tratamentos térmicos

normalmente causam danos à membrana celular, perda de alguns nutrientes e íons, além de inativação de algumas enzimas essenciais e coagulação proteica (Akter et al., 2020). Entretanto, mesmo com essas alterações, obtivemos resultados semelhantes entre as formas viável e inativada.

Manter a viabilidade do probiótico em produtos é um fator crítico, tornando o uso de posbióticos de extremo interesse financeiro, uma vez que possuiria maior tempo de prateleira, estabilidade em maior faixa de pH e temperatura, além da incorporação em alimentos antes do processo térmico, sem a perda da funcionalidade (Siciliano et al., 2021). Explorar a estabilidade e o prazo de validade dos posbióticos é crucial para suas aplicações práticas. Compreender a estabilidade e a eficácia desses produtos a longo prazo será essencial para sua implementação bem-sucedida em ambientes clínicos.

Com os numerosos estudos associando o uso de probióticos com saúde óssea, podemos aprender com os erros. Algumas limitações em estudos existentes impedem que a terapia probiótica seja validada e tenha recomendação clínica. Os estudos clínicos são muito heterogêneos, o que impede a comparação dos resultados entre si (Zeng et al., 2021). Em pesquisas futuras, a metodologia deve ser padronizada, com amostras maiores e adequadas, randomização, cegamento, métodos de análise de alta qualidade, estabelecer o desfecho principal, dose, cepa, maior duração do tratamento (superior a 12 meses) (Billington et al., 2021; Zeng et al., 2021), métodos de inativação (no caso de posbióticos), e descrição de eventos adversos ou efeitos colaterais. Outro ponto importante é a padronização da descrição dos métodos – como doses, concentrações, volume administrado por animal, que devem estar descritos de forma precisa, para que os experimentos sejam reproduzíveis.

O uso de posbióticos representa uma grande oportunidade para o desenvolvimento de novas terapias, principalmente para os grupos de risco. Os resultados positivos obtidos com o uso de *L. reuteri*, tanto viável quanto inativado, destacam suas aplicações potenciais na prevenção e no tratamento da perda óssea pós-menopausa. Isso abre caminhos para pesquisas adicionais, com implicações teóricas e práticas. Estudos futuros devem se concentrar em ensaios clínicos randomizados padronizados e de alta qualidade, além de elucidar os mecanismos de ação específicos tanto para as formas viáveis quanto inativadas de *L. reuteri*, e otimizar suas aplicações práticas em ambientes clínicos. Ao fazer isso, os estudos

podem ampliar nosso conhecimento sobre o papel dos probióticos na saúde óssea e desenvolver estratégias inovadoras para prevenir e tratar a perda óssea pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

- Akter S, Park JH, Jung HK. Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2020 Apr 28;30(4):477–81. doi: 10.4014/JMB.1911.11019. PubMed PMID: 31986247.
- Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*. 2015 Mar 20;10:583–91. doi: 10.2147/CIA.S54614. PubMed PMID: 25848234.
- Bhardwaj A, Sapra L, Tiwari A, Mishra PK, Sharma S, Srivastava RK. “Osteomicrobiology”: the nexus between bone and bugs. *Front Microbiol*. 2022 Jan 25;12:812466. doi: 10.3389/fmicb.2021.812466. PubMed PMID: 35145499.
- Billington EO, Mahajan A, Benham JL, Raman M. Effects of probiotics on bone mineral density and bone turnover: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021 Nov 8;1-12. doi: 10.1080/10408398.2021.1998760. PubMed PMID: 34748440.
- Borrelli F, Ernst E. Alternative and complementary therapies for the menopause. *Maturitas*. 2010 Aug;66(4):333–43. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.05.010. PubMed PMID: 20580501.
- Britton RA, Irwin R, Quach D, Schaefer L, Zhang J, Parameswaran N, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *J Cell Physiol*. 2014 Nov;229(11):1822–30. doi: 10.1002/jcp.24636. PubMed PMID: 24677054.
- Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, Fuggle NR, Dennison EM, Cooper C. The epidemiology of osteoporosis. *Br Med Bull*. 2020 May 15;133(1):105-17. doi: 10.1093/bmb/ldaa005. PubMed PMID: 32282039.
- Collins FL, Irwin R, Bierhalter H, Schepper J, Britton RA, Parameswaran N, et al. *Lactobacillus reuteri* 6475 increases bone density in intact females only under an inflammatory setting. *PLoS One*. 2016 Apr 8;11(4):1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0153180. PubMed PMID: 27058036.
- Collins FL, Rios-Arce ND, Atkinson S, Bierhalter H, Schoenherr D, Bazil JN, et al. Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiol Rep*. 2017a May;5(9):1–22. doi: 10.14814/phy2.13263. PubMed PMID: 28468850.
- Collins FL, Rios-arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR. The potential of probiotics as a therapy for osteoporosis. *Microbiol Spectr*. 2017b Aug;5(4):1–26. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016.The. PubMed PMID: 28840819.

Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: the nexus between bone and immune system. *Front Biosci*. 2018 Jan 1;23(3):464–92. doi: 10.2741/4600. PubMed PMID: 28930556.

Deshpande G, Athalye-Jape G, Patole S. Para-probiotics for preterm neonates—the next frontier. *Nutrients*. 2018 Jul 5;10(7):1–9. doi: 10.3390/nu10070871. PubMed PMID: 29976885.

Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [Internet]. 2002;1–11.

Gallagher J, Tella S. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Jul;142:155–70. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008. PubMed PMID: 24176761.

International Osteoporosis Foundation [internet]. *Epidemiologia Brasil*. Int Osteoporos Found. 2020;1–6.

Jang AR, Park JS, Kim DK, Park JY, Ahn JH, Kim DY, et al. Cell-free culture supernatant of *Lactobacillus curvatus* Wikim38 inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation and ameliorates bone loss in ovariectomized mice. *Lett Appl Microbiol*. 2021 Sep;73(3):383–91. doi: 10.1111/lam.13525. PubMed PMID: 34173250.

Jansson PA, Curiac D, Ahrén IL, Hansson F, Niskanen TM, Sjögren K, et al. Probiotic treatment using a mix of three *Lactobacillus* strains for lumbar spine bone loss in postmenopausal women: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Rheumatol*. 2019 1(3):154–62. doi: 10.1016/S2665-9913(19)30068-2.

Jhong JH, Tsai WH, Yang LC, Chou CH, Lee TY, Yeh YT, et al. Heat-killed *Lactocaseibacillus paracasei* GMNL-653 exerts antiosteoporotic effects by restoring the gut microbiota dysbiosis in ovariectomized mice. *Front Nutr*. 2022 Feb 4;9:804210. doi: 10.3389/fnut.2022.804210. PubMed PMID: 35187034.

Kimoto-Nira H, Mizumachi K, Okamoto T, Sasaki K, Kurisaki JI. Influence of long-term consumption of a *Lactococcus lactis* strain on the intestinal immunity and intestinal flora of the senescence-accelerated mouse. *Br J Nutr*. 2009 Jul;102(2):181–5. doi: 10.1017/S0007114508143574. PubMed PMID: 19586567.

Kimoto-Nira H, Suzuki C, Kobayashi M, Sasaki K, Kurisaki JI, Mizumachi K. Anti-ageing effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *Br J Nutr*. 2007 Dec;98(6):1178–86. doi: 10.1017/S0007114507787469. PubMed PMID: 17617939.

Lambert MNT, Thybo CB, Lykkeboe S, Rasmussen LM, Frette X, Christensen LP, et al. Combined bioavailable isoflavones and probiotics improve bone status and estrogen metabolism in postmenopausal osteopenic women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2017 Sep;106(3):909–20. doi: 10.3945/ajcn.117.153353. PubMed PMID: 28768651.

Li JY, Chassaing B, Tyagi AM, Vaccaro C, Luo T, Adams J, et al. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J Clin Invest*. 2016 Jun 1;126(6):2049–63. doi: 10.1172/JCI86062. PubMed PMID: 27111232.

McCabe LR, Irwin R, Laura S, Britton RA. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1793–8. doi: 10.1002/jcp.24340. PubMed PMID: 23389860.

Mccabe LR, Parameswaran N. Advances in probiotic regulation of bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2018 Apr;102(4):480–8. doi: 10.1007/s00223-018-0403-7. PubMed PMID: 29453726.

Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Dabbaghmanesh MH, Ashoori Y, Talezadeh P, Koochpeyma F, et al. Exploring the bone sparing effects of postbiotics in the post-menopausal rat model. *BMC Complement Med Ther*. 2021 May 28;21(1). doi: 10.1186/s12906-021-03327-w. PubMed PMID: 34049521.

Myeong JY, Jung HY, Chae HS, Cho HH, Kim DK, Jang YJ, et al. Protective effects of the postbiotic *Lactobacillus plantarum* MD35 on bone loss in an ovariectomized mice model. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023 Apr 1. doi: 10.1007/s12602-023-10065-7. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 37002419.

National Institutes of Health. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. [Internet]. *Am Med Assoc*. 2001;2852001:785–95.

Nighswonger BD, Brashears MM, Gilliland SE. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J Dairy Sci*. 1996 Feb;79(2):212–9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76353-1. PubMed PMID: 8708082.

Nilsson AG, Sundh D, Bäckhed F, Lorentzon M. *Lactobacillus reuteri* reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial. *J Intern Med*. 2018 Sep;284(3):307–17. doi: 10.1111/joim.12805. PubMed PMID: 29926979.

Ohlsson C, Sjögren K. Osteomicrobiology: a new cross-disciplinary research field. *Calcif Tissue Int*. 2018 Apr;102(4):426–32. doi: 10.1007/s00223-017-0336-6. PubMed PMID: 29079994.

Piqué N, Berlanga M, Miñana-galbis D. Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *Int J Mol Sci*. 2019 May 23;20(10):2534. doi: 10.3390/ijms20102534. PubMed PMID: 31126033.

Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, Behzadi MH, Rabieenia E, Shohaimi S, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2021 Oct 17;16(1):609. doi: 10.1186/s13018-021-02772-0. PubMed PMID: 34657598.

Siciliano RA, Reale A, Mazzeo MF, Morandi S, Silveti T, Brasca M. Paraprobiotics: a new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*. 2021 Apr 8;13(4):1225. doi: 10.3390/nu13041225. PubMed PMID: 33917707.

Takimoto T, Hatanaka M, Hoshino T, Takara T, Tanaka K, Shimizu A, et al. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 on bone mineral density in healthy postmenopausal Japanese women: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Biosci Microbiota Food Health*. 2018;37(4):87-96. doi: 10.12938/bmfh.18-006. PubMed PMID: 30370192.

Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011 Aug;6(3):261–74. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x. PubMed PMID: 21499799.

Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr*. 2011 May;141(5):769-76. doi: 10.3945/jn.110.135657. PubMed PMID: 21430248.

Vinderola G, Sanders ME, Salminen S. The concept of postbiotics. *Foods*. 2022 Apr 8;11(8):1077. doi: 10.3390/foods11081077. PubMed PMID: 35454664.

World Health Organization. WHO Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. [Internet]. *Summ Meeti Rep*. 2004;5–7.

Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res*. 2014 Nov;29(11):2520–6. doi: 10.1002/jbmr.2269. PubMed PMID: 24771492.

Xu X, Jia X, Mo L, Liu C, Zheng L, Yuan Q, et al. Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone Res*. 2017 Oct 4;5:17046. doi: 10.1038/boneres.2017.46. PubMed PMID: 28983411.

Yeom J, Ma S, Lim YH. Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 enhances osteoblast differentiation and mineralization by increasing the OPG/RANKL ratio. *Microorganisms*. 2021 Mar 24;9(4):673. doi: 10.3390/microorganisms9040673. PubMed PMID: 33805153.

Zeng L, Yu G, Yang K, Hao W, Chen H. The improving effect and safety of probiotic supplements on patients with osteoporosis and osteopenia: a systematic review and meta-analysis of 10 randomized controlled trials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Jul 24;2021:9924410. doi: 10.1155/2021/9924410. PubMed PMID: 34349831.