



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA



LARISSA SBAGLIA CELIBERTO

“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”

ARARAQUARA - SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA



LARISSA SBAGLIA CELIBERTO

“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”

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área Ciência dos Alimentos.

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

ARARAQUARA - SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C392e Celiberto, Larissa Sbaglia
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 / Larissa Sbaglia Celiberto. – Araraquara, 2014
105 f.

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

Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

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

CAPES: 50700006



BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini (orientadora)

Dr^a. Raquel Bedani

Dr^a. Kátia Sivieri

**ARARAQUARA - SP
2014**

Aos meus pais, Alcidio e Marilda,
por estarem sempre ao meu lado me
incentivando, apoiando e sendo meus
melhores exemplos.

A minha querida irmã Fernanda, pela
torcida de sempre e por ser a grande
alegria da minha vida.

Ao Moisés, pelo amor e companheirismo
durante todos esses anos juntos, e por
sempre acreditar no meu melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar os meus caminhos e por me presentear com uma vida tão abençoada.

A Prof^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, por sua orientação, ensinamentos e amizade durante esses anos de convivência. Obrigada por acreditar em meu potencial e por me mostrar os caminhos da ciência.

Ao prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi e a Dr^a. Raquel Bedani, pelas valiosas sugestões e contribuições ao longo deste trabalho e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Probióticos: Ana, Camilla, Erica, Fernanda, Mariana e Nadiége, pelo companheirismo no dia a dia de trabalho.

A Fernanda, Josiane, Juliana, Mariana, Nadiége, Roseli e Thaís, pela contribuição no período experimental deste projeto.

A Roseli e a Josiane, pelos ensinamentos e contribuições nestes anos de trabalho.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr-UNESP, pelo aprendizado e experiência concedidos durante o curso de mestrado.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à 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.

À Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz de Abreu Glória e a Edineia do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo auxílio nas análises de poliaminas.

À Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amancio Varesche e a Maria Angela do Departamento de Engenharia Ambiental da EESC/USP, pelo auxílio nas análises de ácidos graxos de cadeia curta.

À Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e a Naiara do Departamento de Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da FCFAr-UNESP, pelo auxílio nas análises de citocinas.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e ao Fábio do Departamento de Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da FCFAr-UNESP, pelo auxílio nas técnicas de biologia molecular.

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

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO GERAL	12
GENERAL ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

CAPÍTULO I

Artigo submetido à revista "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety".

Probióticos: evidências científicas no contexto das doenças inflamatórias intestinais

RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Doenças inflamatórias intestinais	24
2.2 Microbiota e doenças inflamatórias intestinais	26
2.3 Patogênese das doenças inflamatórias intestinais.....	28
2.4 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais	29
2.5 Probióticos e doenças inflamatórias intestinais	30
2.6 Probióticos no contexto da individualidade humana.....	38
3. CONCLUSÃO.....	40
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

CAPÍTULO II

Influência do consumo de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) na colite quimicamente induzida em ratos

RESUMO.....	52
-------------	----

ABSTRACT	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Material.....	57
2.2 Métodos	57
2.2.1 Obtenção do produto fermentado	57
2.2.1 Obtenção do produto não fermentado (placebo)	58
2.3 Estudo em modelo animal	58
2.3.1 Indução e medida da colite	59
2.3.2 Administração dos produtos	60
2.3.3 Avaliação do cólon	60
2.3.4 Avaliação macroscópica	60
2.3.5 Avaliação histológica	61
2.3.6 Avaliação microbiológica.....	61
2.3.7 Determinação de aminos bioativas	62
2.3.8 Determinação de citocinas.....	62
2.3.9 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	63
2.3.10 Determinação da sobrevivência intestinal dos microrganismos probióticos.....	63
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Estudo em modelo animal	65
4.1.1 Indução e medida da colite	65
4.1.2 Avaliação macroscópica	67
4.1.3 Avaliação histológica	69
4.1.4 Avaliação microbiológica.....	72
4.1.5 Determinação de aminos bioativas	80
4.1.6 Determinação de citocinas.....	83
4.1.7 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	86
4.1.8 Determinação da sobrevivência intestinal dos microrganismos probióticos.....	89
5. CONCLUSÃO.....	92

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
-------------------------------	----

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
------------------------------------	----

ANEXOS

Anexo 1. 1) Acomodação de ratos Wistar em estante ventilada com sistema de filtração de ar e controle de temperatura e umidade, utilizada no desenvolvimento do protocolo experimental. 2) e 3) Animais acomodados em caixas de polipropileno, com água e ração disponíveis..104

Anexo 2. 1) Ratos Wistar momentos antes de administrar o produto. 2) e 3) Administração do produto e fármaco por gavagem com o animal imobilizado por tração manual104

Anexo 3. Galeria API 20-Strep (Biomeri  ux, França) utilizada na identifica  o das espécies de *Enterococcus* spp.105

Anexo 4. Galeria 50 CHL (Biomeri  ux, França) utilizada na identifica  o das espécies de *Bifidobacterium* spp.....105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Publicações mostrando resultados com o uso de probióticos em doenças inflamatórias intestinais em modelo animal	35
Tabela 2. Publicações mostrando resultados com o uso de probióticos em doenças inflamatórias intestinais em modelo humano	37

CAPÍTULO II

Tabela 1. Índice de atividade da doença	59
Tabela 2. Critério para avaliação macroscópica de dano no cólon.....	61
Tabela 3. Índice de atividade da doença por grupo durante o período da indução	66
Tabela 4. Análise macroscópica dos danos ao longo do cólon e do reto.....	68
Tabela 5. População de <i>Enterococcus</i> spp.....	73
Tabela 6. População de <i>Lactobacillus</i> spp.....	75
Tabela 7. População de <i>Bifidobacterium</i> spp.	76
Tabela 8. População de <i>Clostridium</i> spp.	78
Tabela 9. População de enterobactérias.....	78
Tabela 10. População de <i>Bacteroides</i> spp.	79
Tabela 11. Teores de aminos bioativas detectadas em amostras de fezes dos animais ..	81

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema de indução da colite e administração dos produtos durante o período experimental	60
Figura 2. Análise macroscópica do cólon e reto dos diferentes grupos de animais	67
Figura 3. Fotomicrografias representativas do cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais, corados com hematoxilina/eosina	71
Figura 4. Concentração de citocinas nos diferentes grupos do protocolo experimental	84
Figura 5. Concentração de AGCC (mM/g) encontrados nos diferentes grupos ao longo do protocolo experimental	87
Figura 6. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas de fezes dos diferentes grupos de animais.....	91

RESUMO GERAL

As doenças inflamatórias intestinais (DII), entre elas a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) compreendem um grupo de patologias que possuem como principal característica a inflamação da mucosa intestinal. Embora sua origem ainda não seja completamente conhecida, existe uma crescente evidência baseada em estudos recentes associando predisposição genética, composição da microbiota intestinal e sistema imunológico como fatores precursores para a iniciação e progressão dessas patologias. O uso de determinadas cepas probióticas vem sendo apontado como uma forma promissora de se reduzir o risco de doenças inflamatórias intestinais, mais precisamente da colite ulcerativa. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os benefícios dos probióticos, indicando que algumas cepas bacterianas são capazes de modular positivamente a microbiota intestinal e o sistema imune, além de produzirem metabólitos com capacidade anti-inflamatória. Como os efeitos e os mecanismos de ação envolvidos são cepa-específicos, é de extrema importância a realização de novos estudos para compreender as interações entre microbiota intestinal e hospedeiro, contribuindo para o entendimento do potencial terapêutico dos probióticos nas doenças relacionadas ao desequilíbrio da microbiota intestinal. O presente trabalho se propõe a investigar 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 colite induzida quimicamente em ratos. A colite foi induzida, pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS) a 4%, que foi dissolvido na água fornecida diariamente aos animais e administrado durante um período de sete dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco 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. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina). Ao longo do período experimental de 30 dias foram monitorados os seguintes parâmetros: peso corpóreo dos animais, ingestão hídrica e alimentar, consistência e presença de sangue oculto nas fezes, composição da microbiota fecal, sobrevivência gastrointestinal dos microrganismos probióticos e concentração de poliaminas e ácidos graxos de cadeia curta

(AGCC) nas fezes. No final do protocolo, os animais foram eutanasiados e o intestino grosso foi removido para realização das análises macroscópica e histológica, assim como a determinação de citocinas no cólon. De acordo com os resultados obtidos os animais que consumiram o produto probiótico (CLF) apresentaram redução dos sintomas da colite durante o período de indução e menor grau de inflamação e ulceração no cólon e no reto, em relação aos animais dos grupos CL ($p<0,01$), CLS ($p<0,01$) e CLP ($p<0,05$). As análises histológicas mostraram que o intestino grosso dos ratos dos grupos CL e CLS apresentaram áreas de ulceração e hiperplasia nas criptas, ausentes nos animais que receberam o produto probiótico e o placebo. A investigação da composição da microbiota fecal revelou que somente a ingestão do produto fermentado probiótico resultou em aumento significativo na população de *Lactobacillus* spp. ($0,84 \log_{10}$ UFC/g) e *Bifidobacterium* spp. ($1,35 \log_{10}$ UFC/g) ao final do protocolo. O grupo CLF também apresentou um aumento da amina espermidina e dos AGCC propionato e acetato, ao longo do protocolo experimental. Em adição, análises bioquímicas e moleculares confirmaram a sobrevivência intestinal da cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 no grupo de animais que ingeriu o produto fermentado. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a ingestão regular do produto fermentado probiótico e, em menor grau do produto não fermentado (placebo), podem reduzir o risco de desenvolvimento de colite ulcerativa em ratos.

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

GENERAL ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), comprise a group of disorders and their main characteristic is an inflammation of the intestinal mucosa. Although its origin is not yet fully known, there is growing evidence linking genetics predisposition, composition of the intestinal microbiota and immune system factors as precursors for the initiation and progression of these pathologies. The use of certain probiotic microorganisms has been considered as promising way to reduce the risk of inflammatory bowel disease, specifically ulcerative colitis. Several mechanisms have been proposed to explain the benefits of probiotics, indicating that some bacterial strains are able to positively modulate the intestinal microbiota and the immune system, and produce metabolites with anti-inflammatory capacity. As the effects and the mechanisms involved are strain-specific, further studies are extremely important to understand the interactions between gut microbiota and host, contributing to the knowledge on therapeutic potential of probiotics in diseases related to dysbiosis. This current paper aims to bring together the various results and information based on scientific evidence that are related to probiotics and the inflammatory bowel disease, with emphasis on the possible mechanisms involved in this action. Furthermore, the effects of daily ingestion of a product based on an aqueous extract of soybean, fermented by *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* 416 with the addition of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, were also investigated on chemically induced colitis in rats. Colitis was induced by 4% dextran sulfate sodium (DSS), dissolved in the drinking water supplied to the animal, which was ingested daily for a period of seven days. The animals will then be assigned randomly to four groups (n=10): **Group C:** healthy animals that do not receive the products under study; **Group CL:** animals with chemically induced colitis that do not receive the products under study; **Group CLF:** animals with chemically induced colitis that receive the fermented product; **Group CLP:** animals with chemically induced colitis that receive the non-fermented product (placebo); **Group CLS:** animals with chemically induced colitis that receive sulfasalazine. Throughout the trial period of 30 days the following parameters were monitored: body weight of animals, daily water and food intake, consistency and presence of fecal occult blood, fecal microbiota composition, gastrointestinal survival of probiotic microorganisms and concentrations of polyamines and

short-chain fatty acids in the faeces. At the end of the treatment period the animals were euthanized and the intestine removed to perform histological analysis of the colon and rectum, and determine the concentration of cytokines in the colon. Animals that consumed the probiotic product (CLF) decreased symptoms of colitis during the induction period and showed lower degree of inflammation and ulceration in the colon and rectum compared to animals in groups CL ($p < 0.01$), CLS ($p < 0.01$) and CLP ($p > 0.05$). Histological analyzes showed that large intestine of rats in groups CL and CLS showed areas of ulceration and crypt hyperplasia, and this was absent in animals receiving the probiotic product and placebo. The investigation fecal microbiota composition showed that only ingestion of probiotic fermented product resulted in a significant increase in the population of *Lactobacillus* spp. ($0.84 \log_{10}$ CFU/g) and *Bifidobacterium* spp. ($1.35 \log_{10}$ CFU/g) at the end of the protocol. The CLF group also showed an increase in spermidine amine and SCFA propionate and acetate, throughout the experimental protocol. Furthermore, the intestinal survival of *E. faecium* CRL 183 was confirmed by biochemical and molecular analyzes. This study suggests that regular intake of probiotic fermented product and to a lesser extent the non-fermented product (placebo) may reduce the risk of developing ulcerative colitis in rats.

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

Introdução

A patogênese da colite ulcerativa (CU) e da doença de Crohn (DC), consideradas as principais doenças inflamatórias intestinais (DII), envolve de uma complexa interação entre fatores ambientais, genéticos e imunológicos (HANAUER, 2006). As DII são condições crônicas, sem cura, que apresentam períodos de remissão e recidivas frequentes (SOUZA *et al.*, 2002).

Pacientes acometidos por DII, inclusive os portadores de CU, apresentam alta morbidade, além de um maior risco de desenvolver câncer de cólon. Dessa forma, a prevenção das recidivas e o tratamento adequado de tais patologias se faz necessário, como uma forma de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (HONG *et al.*, 2010).

Cabe destacar a importância do estudo de formas alternativas para a redução dos sintomas e ou da incidência de doenças inflamatórias intestinais, uma vez que as terapias convencionais (antiperistálticos, antidiarréicos, sedativos, corticosteróides e imunossupressores), frequentemente são ineficazes ou produzem efeitos colaterais severos (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2010; PEARSON, 2004).

Nesse sentido, o uso de determinadas cepas de microrganismos probióticos vem sendo apontado como uma possível, e promissora, abordagem terapêutica na diminuição do risco de doenças inflamatórias intestinais, mais precisamente na colite ulcerativa (CUI *et al.*, 2004; ÓCON *et al.*, 2013). Diversos microrganismos probióticos têm apresentado potencial para auxiliarem no alívio dos sintomas das DII, uma vez que, algumas cepas possuem a capacidade de modular positivamente a microbiota intestinal e o sistema imunológico, resultando em um equilíbrio positivo dos prováveis fatores que desencadeiam esse tipo de doença (CUI *et al.*, 2004; ÓCON *et al.*, 2013).

Em 1999, Rossi e colaboradores desenvolveram um produto fermentado à base de soja, utilizando como culturas iniciadoras as cepas *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416. O produto obtido apresentou propriedades funcionais - como redução do risco de desenvolvimento de câncer de mama e de cólon e modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal e do sistema imune - comprovadas em modelos *in vitro* e *in vivo* (CAVALLINI *et al.*, 2009a, 2009b, 2011; ROSSI *et al.*, 1999, 2000, 2003; SIVIERI *et al.* 2008).

Baseados nos resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa em relação aos efeitos de modulação da microbiota intestinal e melhora nos parâmetros

imunológicos, o produto à base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416, apresenta potencial para ser utilizado na redução do risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Uma forma de potencializar os efeitos do produto citado acima seria a adição da cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 que apresenta propriedades imunomodulatórias, associada à reconhecida capacidade do gênero *Bifidobacterium* spp. de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (MEDINA *et al.*, 2007). A investigação de parâmetros imunológicos (perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias), a determinação da composição da microbiota e a produção de ácidos graxos de cadeia curta e de poliaminas são fundamentais para a elucidação de possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, em particular da colite ulcerativa (CAMPOS, 1999; KAOUASS *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 2001; SEGAIN *et al.*, 2000; SHEPPACH, 1992).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi 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 colite induzida quimicamente em ratos e investigar os possíveis mecanismos associados.

Referências bibliográficas

- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.S.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.23, n.3, p.172-182, 2003.
- CAMPOS, F.G.C.M.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.; TERRA, R.M.; WAITZBERG, D.L. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.19, n.1, p.11-6, 1999.
- CAVALLINI, D.C.U.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; BONDESPACHO, L.Q.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1, 2009a.
- CAVALLINI, D.C.U.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; BEDANI, R.; BONDESPACHO, L.Q.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1-10, 2009b.
- CAVALLINI, D.C.U.; SUZUKI, J.Y.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; PINTO, R.A.; ROSSI, E.A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.126, 2011.
- CUI, H.; CHEN, C.; WANG, J.; YANG, Y.; CUN, Y.; WU, J.; LIU, Y.; DAN, H.; JIAN, Y.; CHEN, X. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.10, p.1521-1525, 2004.
- HANAUER, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Disease**, v.12, p.S3-S9, 2006.
- HONG, S.S.; CHATURVEDI, R.; PIAZUELO, B.; COBURN, L.A.; WILLIAMS, C.S.; DELGADO, A.G.; CASERO, R.A.; SCHWARTZ, D.A.; WILSON, K.T. Increased expression and cellular localization of spermine oxidase in ulcerative colitis and relationship to disease activity. **Inflammatory Bowel Disease**, v.16, p.1557-1566, 2010.
- KAOUASS, M.; DELOYER, P.; WERY, I.; DANDRIFOSSE, G. Analysis of structural and biochemical events occurring in the small intestine after dietary polyamine ingestion in suckling rats. **Digestive Disease Sciences**, v. 41, p.1434-1444, 1996
- MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p.181-186, 2001.
- MEDINA, M.; IZQUIERDO, E.; ENNAHAR, S.; SANZ, Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. **Clinical and Experimental Immunology**, v.150, p.531-538, 2007.

OCÓN, B., ANZOLA, A.; ORTEGA-GONZALEZ, M.; ZARZUELO, A.; SUÁREZ, M.D.; MEDINA, F.S.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Active hexose-correlated compound and *Bifidobacterium longum* BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis. **European Journal of Nutrition**, v.52, n.2, p.457-466, 2013.

OLIVEIRA, F.M.; EMERICK, A.P.C.; SOARES, E.G. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.1031-1037, 2010.

PEARSON, C. 2004. Inflammatory bowel disease. **Clinical Advanced Nutrition**, v.100, n.9, p. 86-90, 2004.

ROSSI, E.A.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **European Food Research and Technology**, v. 5, p. 305-307, 1999.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I. S. ; SQUINZARI, M. M.; SILVA JÚNIOR, S. I. ; VALDEZ, G.F. Effects of a novel fermented soy production the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, p. 213-216, 2000.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M. N.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, p. 47-51, 2003.

SCHEPPACH, W.; SOMMER, H.; KIRCHNER, T.; PAGANELLI, G.M.; BARTRAN, P.; CHRIST, S.; RICHTER, F.; DUSL, G.; KASPER, H. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.103, p.51, 1992.

SEGAIN, J.P.; RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE, D.; BOURREILLE, A.; LERAY, V.; GERVOIS, N.; ROSALES, C.; FERRIER, L.; BONNET, C.; BLOTTIÈRE, H.M.; GALMICHE, J.P. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v.47, p.397-403, 2000.

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. **European Food Research and Technology**, v.228, p.231-237, 2008.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, U.G. 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. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n.2, p. 98-105, 2002.

CAPÍTULO I

PROBIÓTICOS: EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS NO CONTEXTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem, geralmente, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI), e têm como principal característica a inflamação da mucosa intestinal. Embora sua origem ainda não seja completamente conhecida, existe uma crescente evidência associando fator genético, composição da microbiota intestinal e sistema imunológico como fatores precursores para a iniciação e progressão dessas condições intestinais. O uso de determinados microrganismos probióticos vem sendo apontado como uma possível, e promissora, abordagem terapêutica na diminuição do risco de doenças inflamatórias intestinais, mais precisamente na colite ulcerativa. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os benefícios do probióticos, indicando que algumas cepas bacterianas são capazes de modular positivamente a microbiota intestinal e o sistema imune, além de produzirem metabólitos com capacidade anti-inflamatória. O presente trabalho se propõe a reunir os diversos resultados e informações baseadas em evidências científicas, que estejam relacionadas aos probióticos e às doenças inflamatórias intestinais, com ênfase nos possíveis mecanismos envolvidos nessa ação.

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, probióticos, microbiota intestinal

PROBIOTICS: THE SCIENTIFIC EVIDENCE IN THE CONTEXT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) generally comprises Crohn's disease (CD) and idiopathic ulcerative rectocolitis (UC), and their main characteristic is an inflammation of the intestinal mucosa. Although its origin is not yet fully known, there is growing evidence linking genetic factor, the composition of the intestinal microbiota and immune system factors as precursors for the initiation and progression of intestinal conditions. The use of certain probiotic microorganisms has been touted as a possible and promising therapeutic approach in reducing the risk of inflammatory bowel disease, specifically ulcerative colitis. Several mechanisms have been proposed to explain the benefits of probiotics, indicating that some bacterial strains are able to positively modulate the intestinal microbiota and the immune system, and produce metabolites with anti-inflammatory capacity. This current paper aims to bring together the various results and information based on scientific evidence that are related to probiotics and the inflammatory bowel disease, with emphasis on the possible mechanisms involved in this action.

Keywords: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, probiotics, intestinal microbiota

1. Introdução

Doença inflamatória intestinal (DII) é o termo genérico utilizado para designar um grupo de patologias - que inclui a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) - que afetam a mucosa intestinal. A patogênese das DII envolve, provavelmente, susceptibilidade genética, associada à alteração na resposta imune da mucosa intestinal em relação à microbiota entérica, resultando em uma inflamação crônica do intestino (HANAUER, 2006). Frequentemente, indivíduos acometidos por DII apresentam disbiose, com aumento de bactérias potencialmente patogênicas e redução de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (GUARNER *et al.*, 2002; NEUT *et al.*, 2002).

A microbiota intestinal exerce um importante efeito na resposta imune do hospedeiro, dessa forma, a manutenção da homeostase dessa população de microrganismos pode refletir positivamente na evolução das DII. Atualmente, diferentes cepas de microrganismos probióticos, em particular as pertencentes ao grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), têm sido estudadas como uma alternativa para o alívio dos sintomas das DII, e os resultados obtidos são promissores (GEIER *et al.*, 2007; NANDA-KUMAR *et al.*, 2008; OSMAN *et al.*, 2006; URONIS *et al.*, 2011).

A grande maioria das BAL potencialmente probióticas pertence ao filo *Firmicutes*, um grupo bastante diverso de bactérias com baixo conteúdo G+C em seu genoma e que inclui os gêneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (STOLAKI *et al.*, 2012). O gênero *Bifidobacterium* é considerado por muitos cientistas como membro do grupo das BAL, uma vez que compartilha algumas características típicas deste grupo como, por exemplo, a produção de ácido lático. No entanto, esse gênero pertence ao filo *Actinobacteria*, um grupo de bactérias que apresenta um elevado conteúdo G+C no seu genoma e um modo de fermentação de açúcares distinto se comparado às BAL pertencentes ao filo *Firmicutes* (STOLAKI *et al.*, 2012). Para fins didáticos, nesse artigo o gênero *Bifidobacterium* será considerado como membro do grupo das BAL.

A maioria dos estudos conduzidos com o objetivo de verificar o efeito de probióticos no desenvolvimento de DII utilizou cepas de BAL liofilizadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Entretanto, os microrganismos probióticos podem ser veiculados em alimentos e consumidos diariamente como parte da dieta usual. Dessa

forma, tais alimentos também poderiam atuar na redução do risco de desenvolvimento da patologia em indivíduos susceptíveis.

O objetivo desse capítulo é revisar os resultados de trabalhos que utilizaram diferentes modelos de estudo para avaliar o uso de probióticos no controle de DII, verificando a relação entre microbioma intestinal e o desenvolvimento da patologia, com ênfase nos possíveis mecanismos associados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Doenças inflamatórias intestinais

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI), também conhecida como colite ulcerativa (CU) são as formas mais comuns das doenças inflamatórias intestinais (DII), caracterizando-se por uma inflamação crônica do intestino, podendo apresentar recidivas frequentes e formas clínicas graves (JEWEL, 1998; KRONBLUTH *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2002).

Considerando as alterações histopatológicas, existem diferenças significativas entre a colite ulcerativa e a doença de Crohn. A CU é uma reação inflamatória difusa, caracterizada pela presença de abscessos nas criptas intestinais e infiltrados de neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos, que acometem a mucosa do cólon e do reto de forma contínua (BULLER *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2010; PODOLSKY, 2002). A doença apresenta períodos de remissões e recidivas, que ocorrem, geralmente, na mesma região anteriormente afetada. Os sintomas mais comuns apresentados por indivíduos acometidos por CU são: diarreia, sangramento retal, tenesmo, eliminação de muco e dor abdominal (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2010). Por outro lado, a DC é uma inflamação crônica que pode acometer todo o segmento intestinal, caracterizando-se por apresentar regiões afetadas, intercaladas por zonas saudáveis (BULLER *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2010; PODOLSKY, 2002). Acomete, com maior frequência, o íleo terminal e o cólon, iniciando-se tipicamente com crises de diarreia, febre, dor abdominal recorrente e emagrecimento. Na evolução do quadro clínico podem surgir complicações locais e sistêmicas (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As DII atingem pessoas de todas as faixas etárias, apresentando um pico de incidência entre 15 e 30 anos de idade, e um segundo pico ocorrendo em indivíduos idosos (HANAUER, 2006). Esse tipo de patologia é mais comum no norte da Europa e nos Estados Unidos (BSG, 2003), sendo considerada rara nos países da América do Sul (D'OLIVEIRA *et al.*, 1984; SONNENBERG, 1986). No entanto, pesquisas realizadas nas últimas décadas indicam um aumento na incidência das DII em países cujas condições socioeconômicas estão em ascensão (APPLEYARD *et al.*, 2004; EKBOM *et al.*, 1991; IRVINE *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2002; STEINWURZ, 1998).

O aumento dos casos de DII pode ser parcialmente explicado pela evolução nos métodos de diagnóstico da doença. Além disso, o maior acesso da população a ambientes limpos e com controle higiênico-sanitário vem contribuindo para a diminuição de infecções comuns na infância, o que pode de certa forma, influenciar na susceptibilidade de doenças associadas a fatores genéticos, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais (BLOOMFIELD *et al.*, 2006; KOLOSKI *et al.*, 2008; LUTHER *et al.*, 2010).

Apesar da etiologia pouco conhecida, indivíduos com histórico familiar parecem estar mais susceptíveis ao desenvolvimento das DII e a associação de fatores genéticos e ambientais é fundamental para a manifestação da doença. Os fatores ambientais envolvidos nas DII incluem: uso de tabaco e de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), grau de exposição aos patógenos intestinais e composição da dieta e da microbiota intestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SHANAHAN, 2002).

Os estudos que relacionam a composição da dieta com o desenvolvimento das DII são inconclusivos, porém, evidências sugerem que dietas ricas em ácidos graxos e a ingestão frequente de alimentos do tipo “*fast food*” aumentam o risco de manifestação da doença (KRISHNAN & KORZENIK, 2002; PERSSON, AHLBOL & HELLERS, 1992). Outros estudos indicam que essas patologias estão frequentemente associadas a distúrbios nutricionais significativos como, por exemplo, desnutrição protéico-calórica, deficiência de vitaminas e de elementos-traço (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Considerando que a DC e a RCUI são doenças inflamatórias, a composição da microbiota intestinal é um fator fundamental para o desenvolvimento dessas patologias, por afetar diretamente a resposta imune do hospedeiro. Estudos realizados em modelos animais

indicam que roedores “*germ free*” não desenvolvem DII. Logo, acredita-se que a manifestação da doença pode envolver complexas respostas imunológicas da mucosa aos antígenos de bactérias entéricas (DUCHMANN *et al.*, 1995, 1999; MATSUMOTO *et al.*, 1998, 2005; SADLACK *et al.*, 1993).

2.2 Microbiota e doenças inflamatórias intestinais

Estudos utilizando técnicas de biologia molecular mostram que apenas de sete a nove filos de bactérias estão presentes em amostras de fezes ou de mucosa intestinal humana. Entre esses filos, Bacteroidetes e Firmicutes são os encontrados em maior proporção, seguidos por Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. Os gêneros de bactérias mais abundantes na microbiota humana são *Bacteroides* spp., *Faecalibacterium* spp. e *Bifidobacterium* spp., sendo que a maior variação individual ocorre em níveis taxonômicos inferiores (espécies e cepas) (ARUMUGAM *et al.*, 2011; ECKBURG *et al.*, 2005).

Caporaso e colaboradores (2011) constataram que a microbiota humana apresenta um fenômeno conhecido como resiliência, ou seja, sofre variações em função da dieta, tempo de transito intestinal, uso de medicações e outros fatores ambientais, porém tende a retornar à composição inicial. Um estudo metagenômico, conduzido com voluntários adultos da América do Norte, Europa e Japão, concluiu que a composição da microbiota pode ser dividida em três “enterótipos” identificados pela variação na população de *Bacteroides* spp. (enterotype 1), *Prevotella* spp. (enterotype 2) e *Ruminococcus* spp. (enterotype 3) (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

Diversos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de verificar possíveis relações entre enterótipos/composição da microbiota e a prevalência de certas patologias (ARUMUGAM *et al.*, 2011; BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011; QIN *et al.*, 2010).

A microbiota de pacientes acometidos por colite ulcerativa apresenta modificações quantitativas e qualitativas em sua composição, com expressiva redução na diversidade de espécies. Um estudo conduzido por Norr e colaboradores (2010) observou uma diferença significativa na composição da microbiota entre pacientes saudáveis e pacientes portadores de

colite ulcerativa ou síndrome do intestino irritável. Em ambas as patologias, ao contrário do que se esperava, houve uma diminuição de espécies de *Bacteroides* spp., e tal fato pode estar associado a uma perda da função protetora desse gênero de bactérias durante a inflamação (NORR *et al.*, 2010; OTT *et al.*, 2004). Apesar deste gênero ser comumente associado a inflamações intestinais, estudos recentes indicam que determinadas espécies, como *B. vulgatus* e *B. ovatus*, vem mostrando uma ação protetora em casos de colite ulcerativa. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para compreender o mecanismo de ação que indica tal benefício (NORR *et al.*, 2010; CONTE *et al.*, 2006; HUDCOVIC *et al.*, 2009; SYDORA *et al.*, 2005; TAKAISHI *et al.*, 2008; WAIDMANN *et al.*, 2003).

Lepage e colaboradores (2011) verificaram que pacientes com colite ulcerativa apresentam uma expressão genética diferente na mucosa intestinal, menor diversidade de bactérias, e maior quantidade de bactérias aeróbias comparados aos seus irmãos gêmeos saudáveis. O perfil genético da mucosa parece interagir com a microbiota intestinal, porém essa interação não foi vista em pacientes com colite ulcerativa, indicando que algumas funções bacterianas como, por exemplo, produção de butirato, podem afetar a expressão genética da mucosa. Além disso, os irmãos saudáveis do estudo apresentaram uma população maior de *Faecalibacterium prausnitzii* em relação aos portadores de colite ulcerativa, e este microrganismo vem recebendo destaque por suas propriedades anti-inflamatórias (SOKOL *et al.*, 2009).

Diversos estudos relacionam microbiota intestinal, resposta imune e fator genético como os três fatores principais para o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Contudo, a maneira como esses fatores interagem ainda não foi completamente elucidada e representa um grande desafio aos pesquisadores (LEPAGE *et al.*, 2011).

Os indivíduos com doença de Crohn, outro tipo de doença inflamatória intestinal, também apresentam disbiose frequentemente (TAMBOLI *et al.*, 2004). Um estudo clínico feito por Manichanh e colaboradores (2005) sugere que pacientes com doença de Crohn têm uma menor diversidade de bactérias do filo Firmicutes em relação a pacientes saudáveis. Tal observação foi feita no período de remissão da doença, e pode ser resultado de uma modificação primária da microbiota, ou seja, antes das típicas mudanças causadas pelo processo de inflamação.

Alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de verificar as diferenças na microbiota de pacientes saudáveis e portadores da doença de Crohn. Os resultados mostram que enquanto indivíduos saudáveis apresentam uma maior população de *Faecalibacterium prausnitzii*, em indivíduos com a doença, a espécie *Escherichia coli* era mais representativa (MONDOT *et al.*, 2011; WILLING *et al.*, 2009).

2.3 Patogênese das doenças inflamatórias intestinais

O mecanismo envolvido no desenvolvimento das DII é complexo e ainda não foi completamente elucidado. Porém, estudos indicam que DC e a RCUI podem ser resultado de uma resposta imune anormal em relação à microbiota intestinal, em indivíduos geneticamente predispostos (KASER *et al.*, 2010).

A modificação na tolerância em relação à microbiota intestinal resulta em ativação de macrófagos e de células T, com produção de citocinas, aumento de moléculas de adesão e quimiocinas, seguido por recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Essas células efectoras transitam através da mucosa e formam abscessos nas criptas, com interrupção da função normal da barreira epitelial. Esse processo aumenta o acesso de bactérias à mucosa, ampliando ou perpetuando o processo inflamatório. Em adição, alterações na regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias também colaboram para a falha da função da barreira epitelial (DIONNE *et al.*, 1999; SHANAHAN, 2000; VAN HEEL *et al.*, 2001 e 2002). Na DC ocorre aumento na resposta mediada pelas células T-helper 1 (TH1), com aumento na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, enquanto na RCUI verifica-se ativação excessiva das células T-helper 2 (TH2), e aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-1 β , entre outras. A inflamação da mucosa também é influenciada pela redução de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- β , que resulta em perda da tolerância a antígenos comuns, colaborando para a perpetuação do processo inflamatório (BOUMA & STROBER, 2003; HANAUER, 2006; SHANAHAN, 2000).

2.4 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais

As DII são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, pois influenciam diretamente a qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico e profissional. Estudos também mostram uma alta incidência de problemas adversos durante a gestação de mulheres portadoras de DII. Foi observado que mulheres com DC ou CU apresentavam maior chance de parto prematuro e de ter filhos com baixo peso ao nascer (CORNISH *et al.*, 2007; MAHADEVAN *et al.*, 2007; SCHNITZLER *et al.*, 2011). Outro fator que agrava a situação dos pacientes portadores de DII em alguns países é a falta de estudos e a divulgação restrita desse grupo de doenças, contribuindo para o atraso no diagnóstico e aumento da morbidade (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PONTES *et al.*, 2004). Nesse sentido, a escolha de um tratamento adequado é essencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de DII.

O tratamento convencional com o uso de fármacos vem sendo cada vez mais pesquisado e tem por objetivo a diminuição dos sintomas e do processo inflamatório. São recomendados antiperistálticos, antidiarréicos e sedativos para que o intestino inflamado descanse e se recupere (SMELTZER *et al.*, 2002). Os aminosalicilatos são considerados uma boa opção aos pacientes portadores de DII, principalmente o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) (GREEN *et al.*, 1998; PEARSON, 2004). Os corticosteróides, especialmente prednisona, hidrocortisona e budenisonide, têm trazido bons resultados no tratamento das DII, inibindo rapidamente a inflamação e, conseqüentemente, reduzindo os seus sintomas. Porém, o uso prolongado desse tipo de medicamento pode desenvolver outras doenças, como hipertensão arterial, diabetes e osteoporose, comprometendo o sucesso do tratamento (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2010; PEARSON, 2004). Em 20% dos pacientes portadores de DII as terapias anteriormente citadas não respondem positivamente, sendo necessária a instituição de terapia imunossupressora, com administração de azatioprina, metotrexato e ciclosporina (PEARSON, 2004).

Novas abordagens terapêuticas para DII estão sendo pesquisadas, entre elas merecem destaque o uso anticorpos monoclonais anti-TNF- α e a administração de microrganismos probióticos capazes de modular a microbiota intestinal e interferir na resposta imune do hospedeiro (HOWARTH, 2008; JUILLERAT *et al.*, 2008; OSMAN *et al.*, 2006).

2.5 Probióticos e doenças inflamatórias intestinais

“Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em doses apropriadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Nos últimos anos houve um avanço significativo na compreensão dos mecanismos de ação das diferentes cepas probióticas e como elas se relacionam com as DII (FEDORAK *et al.*, 2004).

Sabe-se que as DII se manifestam em indivíduos com uma certa predisposição genética e representam uma resposta inflamatória anormal, em relação a bactérias patogênicas presentes no lúmen intestinal. Além disso, essas bactérias presentes no lúmen parecem fazer parte não só do início, mas também da perpetuação do processo inflamatório. Em diversas pesquisas com modelo animal, observa-se que a inflamação intestinal é iniciada e perpetuada na presença de diferentes bactérias entéricas, enquanto animais da categoria "*germ free*" diminuem o risco ou atenuam drasticamente o desenvolvimento da doença. Além disso, estudos adicionais sugerem que as bactérias presentes no lúmen intestinal são capazes de penetrar a mucosa e intensificar a inflamação do epitélio intestinal (CLAVEL & HALLER, 2007; DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 2004; HALLER *et al.*, 2010; SARTOR, 2006; SWIDSINSKI *et al.*, 2002).

Neste contexto, a função das bactérias probióticas inclui a alteração positiva da composição da microbiota intestinal, modulação da resposta imune e produção de substâncias envolvidas na regeneração da mucosa intestinal (HALLER *et al.*, 2010; FEDORAK *et al.*, 2004).

A dose de probióticos necessária para que esses microrganismos possam desempenhar efeitos benéficos à saúde pode variar em função da cepa e do produto. Em geral, produtos que contenham microrganismos probióticos devem, portanto, apresentar um número mínimo de células viáveis, com eficácia comprovada (por meio de ensaios em humanos), estimado entre 10^6 - 10^8 UFC/g de produto final ou 10^8 - 10^{10} UFC/dia (considerando 100 g ou 100 mL de alimento) (CHAMPAGNE *et al.*, 2011). No entanto, poucos são os estudos dose-resposta para se determinar a „dose efetiva mínima“ necessária para promover, por exemplo, a redução do risco de DII. Esses estudos poderiam explicar algumas discrepâncias encontradas nos resultados obtidos em diversos estudos *in vivo* (CHEN *et al.*, 2013).

Nessa linha, Chen e colaboradores (2013) avaliaram a administração de diferentes doses (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 UFC/10g de peso corpóreo) de *L. acidophilus* SCM-S095 em camundongos com colite induzida por DSS. Os autores concluíram que a dose de 10^5 UFC/g de peso corpóreo fornece um efeito terapêutico satisfatório em colite experimental, sendo que o alívio dos sintomas de CU foi correlacionado a uma modulação da composição da microbiota do cólon distal.

A compreensão dos mecanismos de ação das bactérias probióticas, especialmente no caso do DII, permitirá o desenvolvimento de critérios para a seleção da cepa probiótica adequada a cada tipo de doença, a determinação das doses ideais e do tempo de administração, além de possibilitar combinações sinérgicas entre diferentes espécies bacterianas (FEDORAK *et al.*, 2004).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito benéfico dos probióticos em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, os quais incluem: redução de microrganismos patogênicos por competição e por produção de substâncias antimicrobianas (ácidos láctico e acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas); imunomodulação e/ou estimulação do sistema imune associado às células epiteliais, com produção de interleucinas anti-inflamatórias, como a IL-10; manutenção e melhora da função da barreira intestinal; e produção de AGCC e de poliaminas (FEDORAK *et al.*, 2004; HOWARTH, 2008; O'HARA *et al.*, 2007).

O funcionamento do sistema imunológico, tanto sistêmico quanto na mucosa intestinal, pode ser modulado por algumas cepas bacterianas (FEDORAK *et al.*, 2004). Vários estudos indicam que diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. possuem naturalmente propriedades anti-inflamatórias, sendo capazes de aumentar a proliferação de linfócitos, melhorar as respostas imune inata e adaptativa e estimular a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (ROLFE, 2000). Segundo Medina e colaboradores (2007), a cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 induz a produção de IL-10, podendo ser utilizada no controle de DII. Rachmilewitz e colaboradores (2004) constataram que uma mistura de microrganismos probióticos (VSL#3: *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, e *B. infantis*) foi eficaz na diminuição do risco de colite induzida em animais. Outros trabalhos evidenciaram a eficácia da mesma mistura de probióticos na redução da inflamação e na remissão da RCUI em adultos e crianças

(BIBILONI *et al.*, 2005; MIELE *et al.*, 2009). Em outro estudo, a administração de cepas de *Bifidobacterium infantis* (DSM 15158 e DSM 15159), associadas ou não a substâncias prebióticas (inulina e oligofrutose), resultou em melhora no quadro de colite aguda induzida por dextran sulfato de sódio, com redução na produção de IL 1- β e aumento na produção de AGCC (OSMAN *et al.*, 2006).

Os AGCC (acetato, propionato e butirato) são formados no cólon, através da fermentação bacteriana anaeróbica de carboidratos não digeridos e não absorvidos pelo intestino delgado (ASSUMPÇÃO, 1999). Estudos relacionando AGCC com colite ulcerativa ainda são controversos. No entanto, sabe-se que os AGCC – em especial o butirato - exercem importante papel na fisiologia normal do cólon, pois constituem a principal fonte de energia para o enterócito, estimulam a proliferação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e aumentam a absorção de água e sódio (CAMPOS, 1999; HOVE, 1995; ROEDIGER, 1980; SEGAIN *et al.*, 2000; SHEPPACH, 1992).

Outras substâncias produzidas por algumas cepas de bactérias probióticas e que estão relacionadas à redução do risco de DII são as aminas bioativas putrescina, espermidina, espermina e cadaverina. As aminas são amplamente distribuídas no organismo e estão envolvidas na síntese e estabilização de proteínas, DNA e RNA, ajuste da atividade enzimática e proliferação e diferenciação celular (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

Estudos indicam que as aminas bioativas são de extrema importância para a regeneração da mucosa intestinal. Kaouass e colaboradores (1996) verificaram que a mucosa intestinal de ratos foi totalmente regenerada 48 horas após a administração oral de espermidina. Outros estudos também concluíram que a administração de espermina a ratos jovens promove uma maturação precoce das células da mucosa intestinal (DORHOUT *et al.*, 1997; DUFOUR *et al.*, 1988).

Um estudo realizado em indivíduos idosos constatou elevação na concentração fecal de poliaminas, após a ingestão diária de um iogurte probiótico contendo *B. lactis* LKM512. Considerando que as poliaminas de origem alimentar são rapidamente absorvidas no intestino delgado, o aumento na concentração fecal dessas substâncias deve-se, provavelmente, ao metabolismo do microrganismo probiótico (*B. lactis* LKM512) no intestino (BARDOCZ *et al.*, 1993; MATSUMOTO *et al.*, 2001). Os autores ainda observaram que a ingestão do

iogurte probiótico promoveu redução significativa nos níveis de mutagenicidade ($p < 0,05$) e que esses resultados se correlacionam negativamente com a concentração de poliaminas fecais (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

Matsumoto e colaboradores (2011) utilizaram o mesmo microrganismo, *B. lactis* LKM512, para estudar a longevidade em camundongos. Os resultados mostraram um aumento da longevidade no grupo tratado com o probiótico, possivelmente devido à supressão da inflamação crônica no cólon, sugerindo que a ingestão de alguns probióticos específicos pode melhorar substancialmente a saúde intestinal e aumentar o tempo de vida dos animais.

Um produto à base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416, tem sido intensamente investigado e entre os efeitos positivos decorrentes da sua ingestão regular merecem destaque: modulação da microbiota intestinal, com aumento na população de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. e redução de enterobactérias (CAVALLINI *et al.*, 2011); modulação do sistema imune (VENDRAMINI, 2002) e redução no desenvolvimento de câncer de cólon (SIVIERI *et al.*, 2008). 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 dextran sulfate sodium (DSS), em ratos 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 (CAVALLINI *et al.*, 2013; CELIBERTO *et al.*, 2013). A adição da cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 ao produto se justifica face a suas propriedades imunomoduladoras, associada à reconhecida capacidade do gênero *Bifidobacterium* spp. de aumentar a produção de AGCC (MEDINA *et al.*, 2007).

Os resultados mostraram que a bebida fermentada de soja (contendo *E. faecium* CRL 183 e *B. longum* ATCC 15707) alterou positivamente a microbiota de ratos, pois aumentou a população de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp, que são gêneros de microrganismos importantes na manutenção e 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 índice de atividade da doença (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 (CAVALLINI *et al.*, 2013; CELIBERTO *et al.*, 2013).

A tabela 1 apresenta alguns estudos em modelo animal mostrando o efeito de probióticos em doenças inflamatórias intestinais, em particular a colite ulcerativa.

Diversas cepas de *B. longum* foram submetidas a testes *in vitro* por Medina e colaboradores (2007), com o objetivo de conhecer seus respectivos efeitos na atividade imunomodulatória e suas aplicações na prática clínica. Os resultados indicam que a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias é particular de cada cepa, sugerindo que as diferentes linhagens de *B. longum* podem ter aplicações distintas em determinadas condições patológicas. Algumas das cepas utilizadas (ATCC15707, NCC2705, BIF53, NCIMB8809, BB536) foram capazes de modular positivamente o sistema imune, aumentando a produção de IL-10, e sugerindo assim um papel protetor nas defesas do organismo.

Apesar de diversos estudos suportarem a hipótese de que os probióticos apresentam um efeito positivo nas DII, outros estudos apresentam resultados controversos (Tabela 2). Wildt e colaboradores (2011) verificaram, a partir de um estudo duplo-cego randomizado e controlado por placebo, que pacientes que consumiram cápsulas contendo *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* BB-12 durante 52 semanas apresentaram menos relapsos e períodos de remissão mais longos. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo placebo. De acordo com os autores, os resultados observados poderiam ser mais expressivos com a utilização de outras cepas probióticas ou doses diárias.

Nessa linha, Shen e colaboradores (2009) sugeriram, baseados em uma meta-análise, que a administração de *Lactobacillus johnsonii* LA1 e *Lactobacillus rhamnosus* LGG na terapia de manutenção da doença de Crohn não foi eficiente na redução da incidência de relapsos. Adicionalmente, comparados com o placebo, a administração de LGG como terapia de manutenção pode aumentar as taxas de relapsos na DC. De acordo com os autores, nenhuma evidência sugeriu um benefício significativo de LGG e LA1 para a terapia de manutenção tanto em adultos quanto em crianças com DC.

Fujimori e colaboradores (2009) realizaram um ensaio randomizado controlado por placebo a fim de avaliar a eficácia do consumo de *B. longum* (10^9 UFC/dia) e *psyllium* (8 g/dia) administrados aos voluntários isoladamente ou associados no tratamento da CU. Os autores verificaram que apenas o grupo que consumiu o probiótico + *psyllium* apresentou uma melhora significativa dos escores dos questionários de DII, sugerindo que a associação é mais efetiva do que *B. longum* ou *psyllium* isolados na manutenção da remissão em pacientes com CU.

Em um estudo *crossover* realizado por Ahmed e colaboradores (*in press*) não foi evidenciada mudança na composição da microbiota intestinal de pacientes com CU e DC que consumiram cápsulas contendo probióticos (*L. acidophilus* LA-5, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* STY-31; 4×10^9 UFC/cápsula) e oligofrutose (15g/dia) durante 1 mês. Os autores destacaram, ainda, que esse estudo apresentou algumas limitações que envolveram o número limitado de voluntários, o período curto de administração do probióticos e a falta de um período *wash out* no protocolo experimental.

Tabela 1 - Publicações mostrando resultados com o uso de probióticos em doenças inflamatórias intestinais em modelo animal

Patologia	Produto	Cepa e dose	Resultados	Referências
Colite ulcerativa	Cultura probiótica	<i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>L. plantarum</i> Lp-115 (10^{10} UFC: 1xdia por 5 dias antes da indução).	- Não houve diferença significativa em relação ao grupo não tratado	DANIEL <i>et al.</i> , 2006.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por leite desnatado	<i>Lactobacillus fermentum</i> 5716 (10^8 UFC: 1xdia por 3 semanas, iniciando 2 semanas antes da indução).	- Modulação da microbiota intestinal - Recuperação do tecido inflamado - ↓ TNF- α , ON e MPO	PERAN <i>et al.</i> , 2006.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por leite desnatado	<i>Lactobacillus fermentum</i> BR11 (10^8 UFC: 2xdia por 2 semanas, iniciando 1 semana antes da indução).	- ↓ IAD e ↑ ganho de peso - Prevenção do encurtamento do cólon e hiperplasia da cripta	GEIER <i>et al.</i> , 2007.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica	<i>L. acidophilus</i> (10^7 UFC; 1xdia por 14 dias).	- ↓ IAD - ↓ CRP, TNF- α e IL-6	ABDIN <i>et al.</i> , 2008

Patologia	Produto	Cepa e dose	Resultados	Referências
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por solução salina	<i>Lactobacillus plantarum</i> K68 (10 ⁹ UFC; 1xdia por 1 semana, iniciando 1 semana antes da indução).	- ↓ IAD - Scores histopatológicos - ↓ citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) - ↓ dos níveis de expressão de RNAm de TNF- α , COX-2, FOXp3, SOCS3 e TLR4	LIU <i>et al.</i> , 2011
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por água	VSL#3 (10 ⁹ UFC: 1xdia por 18 semanas, iniciando 1 semana antes da indução)	- ↓ severidade da colite crônica	URONIS <i>et al.</i> , 2011
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por leite desnatado	<i>Lactobacillus fermentum</i> CFR 2195 (10 ⁸ UFC: 1xdia por 3 semanas, iniciando 2 semanas antes da indução).	- ↑ atividade anti-inflamatória - ↓ IAD e MPO - ↓ dano histológico no tecido	GIRISHKUMAR <i>et al.</i> , 2012.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica	<i>Bifidobacterium breve</i> NCC2950 (10 ¹⁰ UFC: 1xdia por 3 semanas, iniciando 2 semana antes da indução).	- ↓ severidade da colite crônica - ↑ da função da barreira intestinal	NATIVIDAD <i>et al.</i> , 2012.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica veiculada por solução salina	<i>Lactobacillus crispatus</i> M206119 (10 ⁹ UFC: 1xdia por 2 semanas, iniciando 2 dias antes da indução).	- ↑ da severidade da doença - ↑ encurtamento do cólon - ↑ diarreia e sangue nas fezes - ↑ danos histológicos	ZHOU <i>et al.</i> , 2012.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 (10 ⁶ UFC: 1xdia por 1 semana, iniciando 1 semana antes da indução).	- ↑ atividade anti-inflamatória - ↑ ganho de peso e ↓ encurtamento do cólon - ↓ ON e MPO	ÓCON <i>et al.</i> , 2013.

ON= óxido nítrico; MPO= enzima mieloperoxidase; IAD=índice de atividade da doença

Tabela 2 - Publicações mostrando resultados com o uso de probióticos em doenças inflamatórias intestinais em modelo humano

Patologia	Produto	Cepa e dose	Resultados	Referências
Colite ulcerativa	Cultura probiótica liofilizada	VSL#3 (10^{11} UFC; 1xdia por 12 meses)	- Modulação positiva da microbiota - Diminuição do risco de recidiva da doença	VENTURI <i>et al.</i> , 1999.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica	BIFICO (combinação de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Enterococcus</i>) (1,26g; 1xdia por 8 semanas)	- Modulação positiva da microbiota - ↓TNF- α , IL-1 β e ↑IL-10	CUI <i>et al.</i> , 2004.
Colite ulcerativa	Leite fermentado com probióticos	<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult, <i>Bifidobacterium bifidum</i> Yakult, <i>Lactobacillus acidophilus</i> (10^9 UFC; 1xdia por 12 semanas)	- Diminuição do risco de recidiva da doença	KATO <i>et al.</i> , 2004.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica liofilizada	VSL#3 (10^9 UFC; 2xdia por 12 semanas)	- ↓ IAD - ↓ na frequência de evacuação e no sangramento retal	MAKHARIA <i>et al.</i> , 2008.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica liofilizada	VSL#3 (10^{10} UFC; 1xdia por 12 meses)	- Diminuição do risco de recidiva da doença	MIELE <i>et al.</i> , 2009.
Colite ulcerativa	Cultura probiótica liofilizada	VSL#3 ($3,6 \times 10^{12}$; 2xdia por 12 semanas).	- ↓ IAD na sexta semana - Remissão da doença na 12ª semana	SOOD <i>et al.</i> , 2009
Colite ulcerativa	Cultura probiótica liofilizada	VSL#3 (10^{10} UFC; 2xdia por 8 semanas)	- Melhora clínica dos pacientes tratados com VSL#3 - ↑ IL-10 e ↓ IL-12, p40 e TLR-2	NG <i>et al.</i> , 2010.
Colite ulcerativa	Cápsulas contendo cultura probiótica liofilizada	<i>L. acidophilus</i> La-5 e <i>B. animalis</i> Bb-12 ($2,5 \times 10^{12}$; 3xdia por 52 semanas)	- Não houve diferença significativa em relação ao grupo não tratado	WILDT <i>et al.</i> , 2011

IAD= índice de atividade da doença

Apesar das limitações envolvendo os estudos clínicos, parece haver um consenso, cada vez mais presente entre os especialistas nessa área, de que algumas cepas probióticas podem ser eficazes no tratamento de DII, embora os efeitos benéficos apresentem graus variáveis e

possam estar limitados à dose e ao tempo de duração de administração dos probióticos aos pacientes.

Paralelamente, estudos utilizando voluntários saudáveis têm apresentado resultados menos claros no que diz respeito aos efeitos benéficos de probióticos, e tal fato também pode ser atribuído aos diferentes regimes de administração e dosagem do microrganismo, além da diferença entre cepas de uma mesma espécie bacteriana. Também é importante ressaltar que ensaios clínicos com indivíduos saudáveis não dispõem de biomarcadores devidamente validados e confiáveis para quantificar um “*status* de saúde”, representando assim um grande desafio na avaliação dos efeitos dos probióticos em seres humanos saudáveis. Outro fator a ser considerado, é que a resposta ao consumo de probióticos vai depender do estado de saúde inicial do consumidor, e este pode ser pessoa-dependente ou até afetar o impacto imunomodulatório das intervenções causadas pelo microrganismo, pois tudo indica que o efeito dos probióticos nos indivíduos é também influenciado pelas características genéticas dos mesmos (BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011).

Consideradas em conjunto, as evidências científicas sobre os efeitos dos probióticos são mais convincentes no caso da colite ulcerativa, enquanto que para a doença de Crohn os resultados ainda são escassos. Adicionalmente, o número de estudos clínicos que avaliam o efeito dos probióticos sobre as doenças inflamatórias intestinais ainda é limitado, o que justifica a necessidade da condução de novos estudos nessa área de pesquisa (LYRA *et al.*, 2012).

2.6 Probióticos no contexto da individualidade humana

Os avanços nas técnicas de biologia molecular e a sua aplicação em diferentes abordagens e experimentos têm levado a uma rápida proliferação da era “-ômica” (genômica, nutrigenômica, proteômica, transcriptômica, metabolômica, etc.). Pesquisadores e profissionais da saúde utilizam cada vez mais essas novas tecnologias a fim de analisar a base molecular específica em que determinados componentes da dieta exercem seus efeitos (RIMBACH *et al.*, 2008).

A nutrigenômica busca estudar a influência da nutrição no ser humano de forma individualizada. Em outras palavras, visa entender como os nutrientes modulam o

funcionamento do genoma e como as características do genoma influenciam a resposta à alimentação, necessidade de nutrientes e risco para doenças crônicas relacionadas à dieta, compreendendo assim os mecanismos subjacentes a estas predisposições genéticas. Nesse contexto, a promoção da saúde será possível através do estabelecimento de recomendações nutricionais personalizadas (DEBUSK *et al.*, 2005; MULLER & KERSTEN, 2003).

A genética tem um papel fundamental na determinação do risco de um indivíduo de desenvolver uma certa doença. Diferenças populacionais em polimorfismos de nucleotídeo único (PNUs) podem ter um efeito importante sobre o risco da doença, e a variação genética inter-individual pode ser um determinante para diferenças em relação às exigências nutricionais (GRODY, 2003; MULLER & KERSTEN, 2003).

Diversos estudos apontam efeitos benéficos dos probióticos em determinadas doenças, como: colite ulcerativa, diarreia causada por antibióticos e hipercolesterolemia (ALFALEH *et al.*, 2010; CAVALLINI *et al.*, 2009a, 2009b, 2011; DESHPANDE *et al.*, 2010; HOLUBAR *et al.*, 2010; KALE-PRADHAM *et al.*, 2010). Contudo, algumas pesquisas não observam resultados positivos consistentes em outras situações (BOYLE *et al.*, 2009; MOAYYEDI, 2010), indicando que os efeitos probióticos são cepa específicos e proporcionam efeitos benéficos mais significativos em indivíduos imunocomprometidos ou com um problema de saúde pré existente (BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011).

Um dos mecanismos propostos pelo qual os probióticos agem é através de moléculas bacterianas que modulam o sistema imunológico do hospedeiro. Os sistemas imune inato e adaptativo estão estreitamente integrados com outras funções do intestino, pois mais de 80% das células epiteliais intestinais estão envolvidas na absorção de nutrientes e em funções metabólicas. A camada epitelial tem uma função bimodal, maximizando a absorção de nutrientes, enquanto impede a passagem de componentes indesejados tais como determinadas bactérias (BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011; O'HARA *et al.*, 2006).

Estudos indicam que nem todas as pessoas apresentam consequências fisiológicas semelhantes com as intervenções probióticas, uma vez que essas respostas dependem fortemente de interações moleculares do organismo de cada indivíduo. Esta informação pode ser um dos motivos pelo qual alguns voluntários não respondem à intervenção com microrganismo probiótico, indicando que a aplicação será mais eficaz em uma abordagem

personalizada onde os indivíduos são divididos em grupos de fenótipos já pré definidos (BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011; DE ROSS & KATAN, 2000; MULLER & KERSTEN, 2003; SZAJEWSKA, RUSZCZYNSKY & RADZIKOWSKY, 2006).

Em relação às pesquisas envolvendo probióticos e doenças inflamatórias intestinais, existe uma variedade de estudos mostrando efeitos positivos (CAVALLINI *et al*, 2013; CELIBERTO *et al*, 2013; NATIVIDAD *et al*, 2012; ÓCON *et al*, 2013). Contudo, outros trabalhos não apresentam resultados promissores (ZHOU *et al*, 2012), indicando que o efeito de microrganismos é cepa específico e, em alguns casos, pode exacerbar processos patológicos, pois as bactérias probióticas nem sempre têm efeitos terapêuticos similares, reforçando a importância de se estudar a ação de probióticos de forma individualizada (GEIER *et al.*, 2007; RIOUX & FEDORAK, 2006).

A individualidade molecular do tecido da mucosa intestinal ainda não foi completamente elucidada, mas fica cada vez mais evidente que as respostas podem depender de uma multiplicidade de fatores potencialmente interligados, como o genótipo do hospedeiro, estilo de vida e hábitos alimentares, bem como a composição da microbiota endógena (ARUMUGAN *et al.*, 2011; BRON, VAN BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2011; QIN *et al.*, 2010).

3. Conclusão

Evidências científicas indicam que uma microbiota intestinal desequilibrada pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas, as DII. Os probióticos podem dar suporte à homeostase intestinal, uma vez que podem influenciar a microbiota intestinal, a barreira intestinal e a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Diversos estudos *in vivo* têm destacado os efeitos benéficos advindos do consumo de probióticos no tratamento de DII, em particular da colite ulcerativa. Vale ressaltar que os efeitos, bem como os mecanismos de ação envolvidos, são considerados cepa-específicos. A seleção de cepas probióticas deve ser direcionada aos efeitos desejáveis apresentados pelos microrganismos de interesse, comprovados através da realização de testes *in vitro* e *in vivo*, isoladamente e quando incorporados ao alimento ou a uma formulação farmacêutica de interesse. É de grande

importância que novas pesquisas sejam realizadas, no sentido de se compreender melhor as interações entre microbiota intestinal e hospedeiro, contribuindo para o entendimento do potencial terapêutico dos probióticos nas doenças relacionadas ao desequilíbrio da microbiota intestinal. Nesse sentido, estudos clínicos randomizados e controlados por placebo, que utilizem, por exemplo, um número maior de participantes, devem ser realizados a fim de se esclarecer a eficácia da terapia com probióticos contra as DII.

4. Referências Bibliográficas (padrão *Institute of Food Technologists*)

Abdin A, Saeid EM. 2008. An experimental study on ulcerative colitis as a potential target for probiotic therapy by *Lactobacillus acidophilus* with or without “olsalazine”. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.2, p.296-303.

Alfaleh K, Anabrees J, Bassler. 2010. D. Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a meta-analysis. **Neonatology**, v. 97, p.93-99.

Ahmed J, Reddy BS, Molbak L, Leser TD, Macfie J. 2013. Impact of probiotics on colonic microflora in patients with colitis: a prospective double blind randomized crossover study. **International Journal of Surgery**. *in press*

Appleyard C, Hernández G; Ríos-Bedoya CF. 2004. Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. **Inflammatory Bowel Disease**, v.10, p.106-111.

Arumugan M, Raes J, Pelletier E and others. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v.473, p.174-180.

Assumpção IR, Rodrigues M, Barbieri D. 1999. Tratamento da retocolite ulcerativa inespecífica em criança com enemas contendo butirato. Relato de caso. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.36, n.4, p. 238-243.

Bardocz S, Grant G, Brown DS, Ralph A, Pusztai A. 1993. Polyamines in food: implications for growth and health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, p. 66-71.

Bibiloni R, Fedorak RN, Tannok GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.100, p.1539 – 1546.

Biondo-Simões, MLP, Mandelli KK, Pereira MSC, Faturi J.L. 2003. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.23, n.3, p.172-182.

Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RW and others. 2006. Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. **Clinical Experimental Allergy**, v. 36, p.402-425.

British Society of Gastroenterology. 2003. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease. London: **BSG**.

- Bron PA, Van Baarlen A, Kleerebezem M. 2011. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature reviews – microbiology**, v.10, p.66-78.
- Bouma G, Strober W. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.521–533.
- Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. 2009. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. **Clinical and Experimental Allergy**, v.39, p.1117-1127.
- Buller H, Chin S, Kirschner B, Kohn J, Markowitz J, Moore D, Murch S, Taminiau J. 2002. Inflammatory bowel disease in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 35, n.2, p.151-158.
- Campos FG, Habr-Gama A, Plopper C, Terra RM, Waitzberg DL. 1999. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 19, n. 1, p. 11-16.
- Caporaso JG, Lauber CL, Christian LL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, Knight R. 2012. Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biology**, n.12, R50.
- Cavallini DCU, Bedani R, Pauly ND, Bondespach LQ, Vendramini RC, Rossi EA. 2009a. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1.
- Cavallini DCU, Abdalla DSP, Vendramini RC, Bedani R, Bondespach LQ, Pauly-Silveira ND, Valdez GF, Rossi EA. 2009b. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1-10.
- Cavallini DCU, Suzuki JY, Abdalla DSP, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, Pinto RA, Rossi EA. 2011. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.126.
- Cavallini DCU, Celiberto LS, Roselino MN, Bedani R, Pauly-Silveira ND, Valdez GF, Pinto RA, Rossi EA. 2013. Effect of a probiotic fermented soy product on colonic inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. **7th Probiotics & Prebiotics new foods**, Rome.
- Celiberto, L.S.; Roselino, M.N.; Bedani, R.; Rossi, E.A.; Pinto, R.A.; Pauly-Silveira, N.D.; Valdez, G.F.; Cavallini, D.C.U. 2013. 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.
- Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. 2011. Recommendations for viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193.
- Chen LL, Zou YY, Lu FG, Li FJ, Lian GH. 2013. Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, p.5347-5256.
- Clavel T, Haller D. 2007. Bacteria and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. **Inflammatory Bowel Disease**, v.13, p.1153-64.

- Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S. 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v.55, n.12, p.1760-1767.
- Cornish JA, Tan E, Teare J and others. 2007. A meta-analysis on the influence of inflammatory bowel disease on pregnancy. **Gut**, v.56, p.830-837.
- Cui H, Chen C, Wang J, Yang Y, Cun Y, Wu J, Liu Y, Dan H, Jian Y, Chen X. 2004. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.10, p.1521-1525.
- Daniel C, Poirot S, Goudercourt D, Dennin V, Leyer G, Pot B. 2006. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, v.9, p.5799-5805.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.127, p.412-21.
- DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornimam KS. 2005. Nutritional genomics in practice where do we begin? **Journal of the American Dietetics Association**, v.105, p.589-598.
- De Ross NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. 2000. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.405-411.
- Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. 2010. Update meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. **Pediatrics**, v.125, p.921-930.
- Dionne S, Ruemmele FM, Seidman EG. 1999. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: role of cytokines and immune cell-enterocyte interactions. In: BRISTIAN, B.R.; WALKER-SMITH, J.A. Inflammatory bowel diseases. **Nestlé Nutrition Workshop Series**, v.2, p.41-62.
- D'Oliveira R, Mayberry JF, Newcombe R, Rhodes J. 1984. International comparison of mortality from inflammatory bowel disease in the Latin-speaking countries Venezuela, Italy, and France. **Digestion**, v.29, p.239-241.
- Dorhout B, Van Faassen A, Van Beusekom CM, Kingma AW, De Hoog E, Nagel GT, Karrenbeld A, Boersma ER, Muskiet FA. 1997. Oral administration of deuterium-labelled polyamines to sucking rat pups: luminal uptake, metabolic fate and effects on gastrointestinal maturation. **British Journal of Nutrition**, v.78, p.639-54.
- Duchmann R, Kaiser I, Herhann E, Mayet W, Ewe K, Büschenfelde KHM. 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 102, p.448-55.
- Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Büschenfelde KHM. 1999. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigen from resident intestinal flora in humans. **Gut**, v. 44, n.6, p.812-818.
- Dufour C, Dandridge G, Forget P, Vermesse F, Romain N, Lepoint P. 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. **Gastroenterology**, v.95, p.112-6.

- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n.5728, p.1635-1638.
- Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. 1991. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. **Gastroenterology**, v.100, n.2, p.350-358.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v.308, n.5728, p.1635-1638.
- Fedorak RN, Madsen KL. 2004. Probiotics and the Management of Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.10, n.3, p. 286-299.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines. **Evaluation of probiotics in food**, p.60, London, Ontario, Canada.
- Fujimori S, Gudis K, Mitsui K, Seo T, Yonezawa M, Tanaka S, Tatsuguchi A, Sakamoto C. 2009. A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. **Nutrition**, v.25, p.520-525.
- Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. 2007. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potent new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) in rats. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 267-274.
- Gerishkumar B, Henry DE, Srinivasan K, Prapulla SG. 2012. Beneficial effect of a probiotic *Lactobacillus fermentum* CFR 2195 in trinitrobenzenesulfonate induced colitis in rat. **Annals Food science and technology**, v.13, n.2, p.231-239.
- Green JR, Lobo AJ, Holdsworth CD, Leicester RJ, Gibson JA, Kerr GD, Hodgson HJ, Parkins KJ, Taylor MD. 1998. Balsalazide is more effective and better tolerated than mesalamine in the treatment of acute ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.114, p.15-22.
- Grody WW. 2003. Molecular genetic risk screening. **Annual Review of Medicine**, v. 54, p.473–490.
- Guarner F, Casellas F, Borruel N, Antolin M, Videla S, Vilaseca J, Malagelada JR. 2002. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 4, p. S34-S38.
- Haller D, Antoine JM, Bengmark S, Enck P, Rijkers GT, Lenoir-Wijnkoop I. 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. **American Society for Nutrition**, p.690s-699s.
- Hanauer SB. 2006. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Disease**, v.12, p.S3-S9.
- Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. 2010. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. **Cochrane Database Systematic Review**, v.6.
- Hove H, Mortesen PB. 1995. Influence of intestinal inflammation (IBD) and small and large bowel length on fecal short-chain fatty acids and lactate. **Digestive Diseases and Sciences**, v.40, p.1372-80.

- Howarth GS. 2008. Inflammatory bowel disease, a dysregulated host-microbiota interaction: are probiotics a new therapeutic option? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.23, p.1775-1784.
- Hudcovic T, Kozakova H, Kolynska J, Stepankova R, Hrnecir T, Tlaskalova-Hogenova H. 2009. Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long lasting dextran sodium sulfate treatment. **Physiological Research**, v.58, n.1, p.101-110.
- Irvine E, Farrokhyar F, Swarbrick ET. 2001. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 36, p.2-15.
- Jewel DP. 1998. Ulcerative colitis. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis and management. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISENGER, M.H. **Philadelphia**: Saunders, v.6, p.1735–1761.
- Juillerat P, Pittet V, Bulliard JL and others. 2008. Prevalence of inflammatory bowel disease in the Canton of Vaud (Switzerland): a population-based cohort study. **Journal of Crohn's & Colitis**, v.2, p.131-41.
- Kale-Pradhan PB, Jassal HK, Wilhelm SM. 2010. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta analysis. **Pharmacotherapy**, v.30, p.119-126.
- Kaouass M, Deloyer P, Wery I, Dandrifosse G. 1996. Analysis of structural and biochemical events occurring in the small intestine after dietary polyamine ingestion in suckling rats. **Digestive Disease Sciences**, v. 41, p.1434–1444.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. 2010. Inflammatory Bowel Disease. **Annual Review of Immunology**, v.28, p.573–621.
- Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. 2004. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology and Therapy**, v.20, n.10, p.1133-1141.
- Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. 2008. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, p.165-173.
- Krishnan A, Korzenik JR. 2002. Inflammatory bowel disease and environmental influences. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.31, p.21-39.
- Kronbluth A, Sachar DK, Salomon P. 1998. Crohn's disease. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISENGER, M.H. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. **Philadelphia**: Saunders, v.6, p.1708-34..
- Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Doré J, Raedler A, Schreiber S. 2011. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.141, p.227-236.
- Liu YW, Su YW, Ong WK, Cheng TH, Tsai YC. 2011. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* K68 ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in BALB/c mice via the anti-inflammatory and immunomodulatory activities. **International Immunopharmacology**, v.11, p.2159–2166.

- Luther J, Dave M, Higgins PDR, Kao JY. 2010. Association between helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. **Inflammatory Bowel Disease**, v.16, n.6.
- Lyra A, Lahtinen S, Ouwehand A. C. 2012. Gastrointestinal benefits of probiotics: clinical evidence. In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Boca Raton: CRC, p. 509-523.
- Mahadevan U, Sandborn WJ, Li DK and others. 2007. Pregnancy outcomes in women with inflammatory bowel disease: a large community-based study of Northern California. **Gastroenterology**, v.33, p.1106-1112.
- Makharia GK, Sood A, Midha V, Ahuja V, Singal DK, Arora R, Sood S, Goswami P, De Simone C, Sahu AR, Tandon RK. 2008. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a probiotic preparation, VSL#3, for the treatment of mild to moderate active ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.134, n.4, p.A-99.
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Doré J. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, n.2, p.205-211.
- Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, Umesaki Y. 1998. Inflammatory bowel disease- like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. **Gut**, v.43, p.71-78.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. 2001. Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p.181-186.
- Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. 2005. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.140, p.417-426.
- Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. **PLoS One**, v.6, n.8, e23652.
- Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. 2007. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. **Clinical and Experimental Immunology**, v.150, p.531-538.
- Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. 2009. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.10, p.437-443.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quiglye EM. 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. **Gut**, v.59, p.325-332.
- Mondot S, Kang S, Furet JP, Aguirre de Carcer D, Mcsweeney C, Morrison M, Marteau P, Dore J, Leclerc M. 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of crohn's disease microbiota. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.17, n.1, p.185-192.
- Müller M, Kersten S. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature reviews – genetics**, v.4, p.315-322.

- Nanda-Kumar NS, Balamurugan R, Jayakanthan K, Pulimood A, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS. 2008. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulphate. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.23, p.1834-1839.
- Natividad JMM, Petit V, Huang X, De Palma G, Jury J, Sanz Y, Philpott D, Rodenas CLG, McCoy KD, Verdu EF. 2012. Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in *Nod1^{-/-}, nod2^{-/-}* mice. **Inflammatory Bowel Disease**, v.18, n.8, p.1434-1446.
- Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, Cortot A, Quandalle P, Van Kruiningen H, Colombel JF. 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, p. 939-946.
- Ng SC, Plamondon S, Kamm MA, Hart AL, Al-Hassi, HO, Guenther T, Stagg AJ. Knight, SC. 2010. Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.16, n.8, p.1286-1298.
- Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Kemsley EK, Lund EK, Jamieson C, Johnson IT, Narbad A. 2010. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. **BMC Gastroenterology**. v.12, p.134-142.
- Ocón B, Anzola A, Ortega-Gonzalez M, Zarzuelo A, Suárez MD, Medina FS, Martínez-Augustin O. 2013. Active hexose-correlated compound and *Bifidobacterium longum* BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis. **European Journal of Nutrition**, v.52, n.2. p.457-466.
- O'Hara AM, O'Reagan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock, J, O'Mahony L, Shanahan F. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. **Immunology**, v. 118, p.202-215.
- O'Hara AM, Shanahan F. 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. **The Scientific World Journal**, v.7, p. 31-46.
- Oliveira FM, Emerick APC, Soares EG. 2010. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.1031-1037.
- Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. 2006. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. **BMC Gastroenterology**, v.6, p.6-31.
- Ott SJ, Schreiber S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 53, p.685-693.
- Pearson, C. 2004. Inflammatory bowel disease. **Clinical Advanced Nutrition**, v.100, n.9, p. 86-90.
- Persson PG, Ahlbom A, HELLERS G. 1992. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. **Epidemiology**, v. 3. p. 47-52.
- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. 2006. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. **International Journal of Colorectal Disease**, v.21, p.737-746.
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p.417-429.

- Pontes RWA, Miszputen SJ, Ferreira-Filho OF, Miranda C, Ferraz MB. 2004. Qualidade de vida em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal: tradução para o português e validação do questionário “Inflammatory Bowel Disease Questionnaire” (IBDQ). **Arquivos de Gastroenterologia**, v.41, n.2, p.137-143.
- Qin J, Li R, Raes J and others. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz K. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. **Gastroenterology**, v.126, p.520-528.
- Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD. 2008. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1308–1319.
- Rioux KP, Fedorak RN. 2006. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, p. 260–263.
- Roediger W. 1980. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease. **The Lancet**, v.2, p.712–715.
- Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p.396S–402S.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with disrupted interleukin-2 gene. **Cell Press**, v. 17, p.253-261.
- Sartor RB. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v.3, p.390-407.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartran P, Christ S, Richter F, Dusl G, Kasper H. 1992. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.103, p.51.
- Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Ballet V, Noman M, Assche GV, Spitz B, Hoffman I, Van Steen K, Vermeire S, Rutgeerts P. 2011. Outcome of pregnancy in women with inflammatory bowel disease treated with antitumor necrosis factor therapy. **Inflammatory Bowel Disease**, v.17, n.9.
- Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottière HM, Galmiche JP. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn’s disease. **Gut**, v.47, p.397–403.
- Shanahan F. 2000. Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 6, n. 2, p. 107-115.
- Shanahan F. Crohn’s disease. 2002. **The Lancet**, v.359, p.62-69.
- Shen J, Ran HZ, Yin MH, Zhou TX, Xiao DS. 2009. Meta-analysis: the effect and adverse events of Lactobacilli versus placebo in maintenance therapy for Crohn disease. **Internal Medicine Journal**, v.39, p.103-109.
- Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, Benzatti F, Vendramini RC, Rossi EA. 2008. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically

induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**, v.228, p.231-237.

Smeltzer SC, Bare BG. 2002. Tratado de enfermagem médico- cirúrgica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**..

Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. 2009. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. **Inflammatory Bowel Disease**, v.15, p.1183-1189.

Sonnenberg A. 1986. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. **Diseases of the Colon & Rectum**, v.29, p.854-861.

Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, Tandon RK. 2009. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.1202-1209.

Souza MHL P, Troncon LEA, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA, Passos ADC, Martinelli ALC, Meneghelli UG. 2002. 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. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n.2, p. 98-105.

Steinwurz F. 1998. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.35, p.237-239.

Stolaki M, De Vos W, Kleerebezem M, Zoetendal E. 2012. Lactic acid bacteria in the gut. In: Lahtinen, S.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S.; von Wright, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Boca Raton: CRC, p. 385-401.

Sydora BC, Tavernini MM, Doyle JSG, Fedorak RN. 2005. Association with selected bacteria does not cause enterocolitis in IL-10 gene-deficient mice despite a systemic immune response. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, n.5, p.905-913.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S. and others. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.122, p.44-54.

Szajewska H, Ruszczynski M, Radzikowsky A. 2006. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta analysis of randomized controlled trials. **Journal of Pediatrics**, v.149, p. 367-372.

Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, Nagamu I, Ogata H, Iwao Y, Nomoto K, Tanaka R, Hibi T. 2008. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v.298, n.5-6, p.463-472.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P. 2004. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 51, p.1-4.

Uronis JM, Arthur JC, Keku T, Fodor A, Carroll IM, Cruz ML, Appleyard CB, Jobin C. 2011. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.17, n.1, p.289-297.

- Van Heel DA, McGovern DPB, Jewell DP. 2001. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. **The Lancet**, v. 441, p. 1902-1904.
- Van Heel DA, Udalova I, Silva A, McGovern D and others. 2002. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF-Kb transcription factors. **Human Molecular Genetics**, v.11, p.1281-1289.
- Vendramini AP. 2002. Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP**.
- Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. 1999. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.13, p.1103-1108.
- Waidmann M, Bechtold O, Frick, JS, Lehr HA, Schubert S, Dobrindt U, Löffler J, Bohn E, Autenrieth IB. 2003. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. **Gastroenterology**, v.125, n.1, p.162-177.
- Wildt A, Nordgaard I, Hansen U, Brockmann E, Rumessen JJ. 2011. A randomized double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.5, p.115-121.
- Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Jarnerot G, Lars Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. 2009. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.15, n.5, p.653-660.
- Zhou, FX, Chen L, Liu XW, Ouyang CH, Wu XP, Wang XH, Wang CL, Lu FG. 2012. *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. **World journal of Gastroenterology**, v.18, n.19, p.2344-2356.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) NA COLITE QUIMICAMENTE INDUZIDA EM RATOS

RESUMO

Algumas cepas de microrganismos probióticos apresentam potencial para auxiliarem no alívio dos sintomas das doenças inflamatórias intestinais (DII). Esse trabalho teve como objetivo 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 colite induzida quimicamente em ratos e investigar os possíveis mecanismos associados. A colite foi induzida quimicamente, pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS) a 4%, que foi dissolvido na água fornecida diariamente aos animais e administrado durante um período de sete dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco 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. **Grupo CLP:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o produto não fermentado (placebo). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina). Ao longo do período experimental de 30 dias foram monitorados os seguintes parâmetros: peso corpóreo dos animais, ingestão hídrica e alimentar, consistência e presença de sangue oculto nas fezes, composição da microbiota fecal, sobrevivência gastrintestinal dos microrganismos probióticos e concentração de poliaminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes. No final do protocolo, os animais foram eutanasiados e o intestino grosso foi removido para realização das análises macroscópica e histológica, assim como a determinação de citocinas no cólon. De acordo com os resultados obtidos os animais que consumiram o produto probiótico (CLF) apresentaram redução dos sintomas da colite durante o período de indução e menor grau de inflamação e ulceração no cólon e no reto, em relação aos animais dos grupos CL ($p<0,01$), CLS ($p<0,01$) e CLP ($p<0,05$). As análises histológicas mostraram que o intestino grosso dos ratos dos grupos CL e CLS apresentaram áreas de ulceração e hiperplasia nas criptas, ausentes nos animais que receberam o produto probiótico e o placebo. A investigação da composição

da microbiota fecal revelou que somente a ingestão do produto fermentado probiótico resultou em aumento significativo na população de *Lactobacillus* spp. ($0,84 \log_{10}$ UFC/g) e *Bifidobacterium* spp. ($1,35 \log_{10}$ UFC/g) ao final do protocolo. O grupo CLF também apresentou um aumento da amina espermidina e dos AGCC propionato e acetato, ao longo do protocolo experimental. Em adição, análises bioquímicas e moleculares confirmaram a sobrevivência intestinal da cepa *Enterococcus faecium* CRL 183 no grupo de animais que ingeriu o produto fermentado. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a ingestão regular do produto fermentado probiótico e, em menor grau do produto não fermentado (placebo), podem reduzir o risco de desenvolvimento de colite ulcerativa em ratos.

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

INFLUENCE OF A PROBIOTIC BEVERAGE CONSUMPTION (*Enterococcus faecium* CRL 183 AND *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) ON CHEMICALLY INDUCED COLITIS IN RATS

ABSTRACT

Some strains of probiotic microorganism have the potential to assist in relieving the symptoms of inflammatory bowel disease (IBD). The aim of this study is to determine the effects of daily ingestion of a product based on an aqueous extract of soybean, fermented by *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* 416 with the addition of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, on chemically induced colitis in rats and to investigate the possible associated mechanisms. Colitis was induced chemically by 4% dextran sulfate sodium (DSS), dissolved in the drinking water supplied to the animal, which was ingested daily for a period of seven days. The animals will then be assigned randomly to four groups (n=10): **Group C:** healthy animals that do not receive the products under study; **Group CL:** animals with chemically induced colitis that do not receive the products under study; **Group CLF:** animals with chemically induced colitis that receive the fermented product; **Group CLP:** animals with chemically induced colitis that receive the non-fermented product (placebo); **Group CLS:** animals with chemically induced colitis that receive sulfasalazine. Throughout the trial period of 30 days the following parameters were monitored: body weight of animals, daily water and food intake, consistency and presence of fecal occult blood, fecal microbiota composition, gastrointestinal survival of probiotic microorganisms and concentrations of polyamines and short-chain fatty acids in the faeces. At the end of the treatment period the animals were euthanized and the intestine removed to perform histological analysis of the colon and rectum, and determine the concentration of cytokines in the colon. Animals that consumed the probiotic product (CLF) decreased symptoms of colitis during the induction period and showed lower degree of inflammation and ulceration in the colon and rectum compared to animals in groups CL ($p < 0.01$), CLS ($p < 0.01$) and CLP ($p > 0.05$). Histological analyzes showed that large intestine of rats in groups CL and CLS showed areas of ulceration and crypt hyperplasia, and this was absent in animals receiving the probiotic product and placebo. The investigation fecal microbiota composition showed that only ingestion of probiotic fermented product resulted in a significant increase in the

population of *Lactobacillus* spp. (0.84 log₁₀ CFU/g) and *Bifidobacterium* spp. (1.35 log₁₀ CFU/g) at the end of the protocol. The CLF group also showed an increase in spermidine amine and SCFA propionate and acetate, throughout the experimental protocol. Furthermore, the intestinal survival of *Enterococcus faecium* CRL 183 in the group that ingested the fermented product was confirmed by biochemical and molecular analyzes. This study suggests that regular intake of probiotic fermented product and to a lesser extent the non-fermented product (placebo) may reduce the risk of developing ulcerative colitis in rats.

Key-words: fermented soy product, probiotics, intestinal microbiota, ulcerative colitis, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum*.

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) apresentam um grande impacto na área de saúde, afetando aproximadamente 4 milhões de pessoas no mundo inteiro. Elas englobam um grupo de patologias complexas que afetam a integridade da mucosa intestinal, e as suas formas mais comuns são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI). A origem das DII ainda não foi completamente elucidada, mas acredita-se que fatores como susceptibilidade genética, disbiose intestinal e sistema imunológico estejam envolvidos tanto na iniciação quanto na progressão da doença (HANAUER, 2006; SHAHIDI *et al.*, 2012).

Atualmente, diferentes cepas de microrganismos probióticos têm sido estudadas como uma alternativa para o alívio dos sintomas das DII, e os resultados obtidos são promissores (GEIER *et al.*, 2007; NANDA-KUMAR *et al.*, 2008; OSMAN *et al.*, 2006; URONIS *et al.*, 2011). Os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos dos probióticos em relação às DII incluem: redução de microrganismos patogênicos, modulação do sistema imune e produção de substâncias envolvidas na proliferação e maturação celular, como AGCC e poliaminas, entre outras. Medina e colaboradores (2007) concluíram que a cepa *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 é capaz de modular benéficamente o sistema imune, através da produção de IL-10, podendo ser utilizada no controle de DII. Um estudo recente mostrou que uma proteína solúvel derivada de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) foi capaz de melhorar a apoptose de células epiteliais intestinais (YAN; POLK, 2012).

Diversos estudos relacionando DII e probióticos obtiveram resultados positivos utilizando cepas de bactérias lácticas liofilizadas, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (CUI *et al.*, 2004; PERAN *et al.*, 2006; GIRISHKUMAR *et al.*, 2012; ÓCON *et al.*, 2013). Contudo, os microrganismos probióticos podem ser veiculados em alimentos e consumidos diariamente como parte da dieta usual. Dessa forma, tais alimentos também poderiam atuar na redução do risco de desenvolvimento da patologia em indivíduos susceptíveis.

Estudos anteriores mostraram que um produto desenvolvido em nosso laboratório, a partir do extrato aquoso de soja e fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416, apresenta propriedades funcionais importantes, merecendo

destaque a capacidade de modulação do sistema imune, a alteração positiva da microbiota intestinal e a redução no desenvolvimento do câncer de cólon em ratos (CAVALLINI *et al.*, 2011; SIVIERI *et al.*, 2008; VENDRAMINI, 2002).

Apoiados nos resultados anteriormente obtidos, hipotetizamos que o extrato aquoso de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, pode apresentar potencial para atuar na redução do risco de desenvolvimento de DII. Nesse contexto, o presente trabalho propõe a investigação do efeito desse produto na colite induzida em ratos e a monitoração de parâmetros importantes para a regeneração da mucosa, como concentração de poliaminas, de AGCC e de citocinas.

2. Material e métodos

2.1 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 (cedida pela Universidade Federal de Viçosa).

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção do 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, de acordo com a metodologia descrita por Rossi *et al.* (1984). 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 (coadjuvante tecnológico). A fermentação foi realizada a 37°C até o produto atingir pH 4,5. A cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 foi adicionada após o

término do processo fermentativo, em quantidade calculada para alcançar 10^8 UFC/g de produto. As células foram inoculadas 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.

A viabilidade das cepas *Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* 416 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 foi determinada imediatamente após o preparo (T0) e com sete dias de armazenamento à temperatura de refrigeração (5°C) (T1). Para a contagem de *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram utilizados os meios Lactobacilli Man Rogosa Sharpe Ágar (Difco, França), M17 Ágar (Difco, França), e BIM-25 (Reinforced Clostridium Ágar - Difco, França - com adição de ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B, sulfato de canamicina, ácido iodoacético e cloreto trifetil tetrazólio), respectivamente. As placas de MRS e M17 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 (SILVA *et al.*, 2007).

2.2.2 Obtenção do 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, 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.

2.3 Estudo em modelo animal

Foram utilizados ratos machos procedentes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB), “Specific Pathogen Free” (SPF), da linhagem Wistar, pesando, em média, 200g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em estante com sistema de filtração de ar e controle de temperatura e umidade relativa do ar ($23 \pm 2^\circ\text{C}$; 60-70% umidade) e ciclos de 12

horas com e sem luz (Alesco, Brasil) (Anexo 1). Todos os animais do protocolo receberam água e ração (Presence, Brasil) *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco 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.

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

Grupo CLS: Animais com colite quimicamente induzida e que receberam o fármaco sulfassalazina.

2.3.1 Indução e medida da colite

A colite foi induzida quimicamente, pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS - MP Biomedicals, EUA; PM= 36.000 – 50.000). O DSS (4%) foi dissolvido na água fornecida diariamente aos animais, e administrado durante um período de sete dias.

A severidade da colite foi medida, diariamente, seguindo metodologia proposta por Murthy e colaboradores (1993) que leva em consideração três parâmetros: perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangramento oculto nas fezes (Tabela 1). Para a determinação da presença de sangue oculto nas fezes foi utilizado o kit comercial Hemoplus (Newprov, Brasil).

Tabela 1 - Índice de atividade da doença

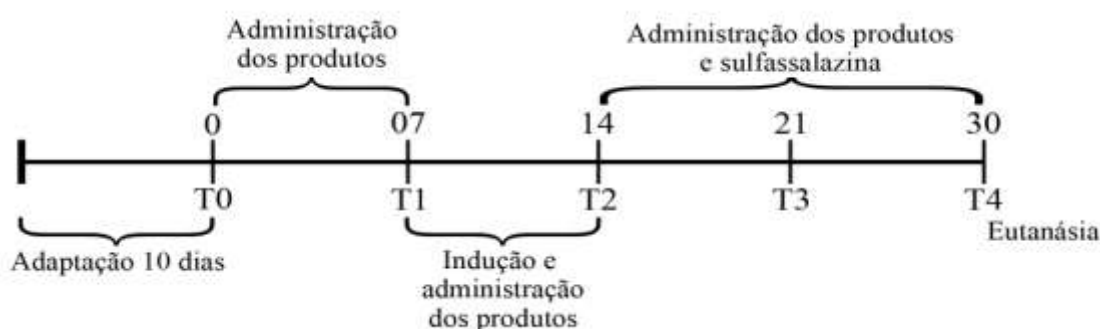
Pontuação do índice de atividade da doença (IAD)			
Pontuação	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangue oculto/aparente
0	Nenhuma	Normal	Negativo
1	1 a 5	Fezes pastosas	Positivo
2	5 a 10		
3	10 a 20		
4	> 20	Diarréia	Sangue aparente

Adaptado de MURTHY e colaboradores (1993)

2.3.2 Administração dos produtos

Os animais dos grupos fermentado probiótico (CLF) e placebo (CLP) receberam diariamente, por gavagem, no período da manhã, 2,0mL dos produtos em estudo (quantidade suficiente para garantir a ingestão diária de 10^8 UFC dos microrganismos probióticos). A administração dos produtos 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. Os animais do grupo Sulfassalazina (CLS) receberam o fármaco (Sigma, EUA) diariamente, por gavagem (100mg/kg/peso, dissolvido em 2,0mL de água esterilizada), após a indução da colite, ou seja, a partir do 14º dia (Figura 1). Os animais dos grupos Controle (C) e Colite (CL) receberam diariamente, por gavagem, a mesma quantidade de água esterilizada (2,0 mL) (Anexo 2).

Figura 1 - Esquema de indução da colite e administração dos produtos durante o período experimental.



2.3.3 Avaliação do cólon

Após 30 dias de 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.

2.3.4 Avaliação Macroscópica

As amostras do intestino grosso dos diferentes grupos experimentais foram fotografadas para análise macroscópica e analisadas segundo metodologia adaptada de Bell e colaboradores (1995) e Camuesco e colaboradores (2005), que leva em consideração a

extensão e severidade do dano no tecido. Cada amostra recebeu uma pontuação de 0 a 10 de acordo com o dano macroscópico visível (Tabela 2).

Tabela 2 - Critério para avaliação macroscópica de dano no cólon.

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 e colaboradores (1995)

2.3.5 Avaliação Histológica

Para a avaliação dos achados histológicos, as amostras foram fixadas por imersão em formaldeído 10%, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70° GL. Posteriormente 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 (NANDA-KUMAR *et al.*, 2008).

2.3.6 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 (T1); após a indução da colite (T2), uma semana após o término da indução da colite (T3) e no final do experimento (T4). 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 para análise posterior.

A análise da composição da microbiota fecal foi baseada na determinação da população de bactérias pertencentes aos gêneros: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., enterobactérias, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e *Enterococcus* spp. As amostras de fezes foram diluídas e inoculadas em meios de cultura seletivos: *Lactobacillus* spp. - ágar Man Rogosa Sharpe, 37°C/48h, anaerobiose (YOSHIOKA, ISEKI & FUJITA, 1983); *Bifidobacterium* spp. - BIM-25; 37°C/72h, anaerobiose (MUNOA & PARES, 1988); enterobactérias - ágar MacConkey; 37°C/48h (BRIGIDI *et al.*, 2001); *Bacteroides* spp. - ágar Bacteróides Bile Esculina; 37°C/72h, anaerobiose (LIVINGSTON, KOMINOS & YEE, 1978); *Clostridium* spp. - Reinforced Clostridium Ágar, 37°C/48h, anaerobiose (MARZOTTO *et al.*, 2006); *Enterococcus* spp. - ágar KF *Streptococcus*; 37°C/48h (EDLUND *et al.*, 2000).

2.3.7 Determinação de aminas bioativas

As aminas (cadaverina, putrescina, espermina e espermidina) foram extraídas com ácido tricloroacético a 5%, separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por fluorimetria, após derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído. Condições cromatográficas: coluna C18 (300 mm x 3,9 mm x 10µm), fluxo de 0,8mL/minuto, volume de injeção de 10µL, detector fluorimétrico a 340 nm de excitação e 445nm de emissão. Foram empregadas duas fases móveis: A=acetato de sódio 0,2M e octanossulfonato de sódio 15mM (pH 4,9); B=acetonitrila (CIRILO *et al.*, 2003; GLÓRIA *et al.*, 2005).

2.3.8 Determinação de citocinas

As amostras de cólon foram pesadas, homogeneizadas por um minuto em tampão fosfato e centrifugadas (10.000g x 4°C x 5 minutos). A concentração de IL-1β, IL-6 IL-10, TGF-β e TNF-α foi determinada no sobrenadante, utilizando kits comerciais (OSMAN *et al.*, 2006).

2.3.9 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes foi determinada por cromatografia gasosa (CG), segundo metodologias descritas por Van de Wiele e colaboradores (2004) e Zhao, Nyman e Jonsson (2006), com modificações e expressa como total de acetato, butirato e propionato. Condições cromatográficas: coluna DB-FFAP; taxas de fluxo de hidrogênio, ar e nitrogênio como gás de maquiagem foram 30, 300 e 20 mL/minuto, respectivamente; fluxo de 20mL/minuto e volume de injeção de 1µL. O tempo de execução de cada análise foi de 17,5min (VAN DE WIELE et al.

2.3.10 Determinação da sobrevivência intestinal dos microrganismos probióticos

A confirmação do gênero *Enterococcus* spp. foi feita em meio ágar bile esculina azida, para todas as colônias com morfologias distintas. Para a identificação das espécies de *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram utilizados os kits API-20 Strep e API 50CHL, respectivamente (Biomérieux, França).

Colônias com identificação positiva para *E. faecium* e *B. longum* foram submetidas à confirmação de espécie por PCR. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o Kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen, EUA).

PCR *Enterococcus faecium*

Primers: Enf 1 (5'-ATTACGGAGACTACACACTTTG-3') e Ent 2 (5'-TAGCCATAGAAGTTACATCAAG-3'), referentes à região 16S-23S rRNA. **Condições de reação:** 1,5mmol.L⁻¹ de MgCL₂, 100µmol de desoxiribonucleotídeos, 1µmol de cada *primer*, 2 ng de DNA genômico e 2U de enzima Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µL. **Parâmetros para a amplificação:** 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 53°C e 1 minuto a 72°C. O programa também incluiu a pré-incubação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 72°C e extensão final a 72°C por 5 minutos (LANGA et al., 2003; CANO et al., 2007).

PCR *Bifidobacterium longum* ATCC 15707

Primers: BiLON-1 (5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3') e BiLON-2 (5'-GGGAAGCCGTATCTCTACGA-3') - 16S rRNA. **Condições de reação:** 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCL₂, 200 µmol de desoxiribonucleotídeos, 0,25mM de cada *primer*, 2 ng de DNA genômico e 0.9 U de enzima Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 µL. **Parâmetros para a amplificação:** um ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e, finalmente, um ciclo de 5 minutos a 72°C (MATSUKI *et al.*, 1999).

Os produtos finais foram separados utilizando gel de eletroforese com 1,5% de agarose em tampão TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1mM), corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

3. Análise Estatística dos Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa para análise estatística Biostat 5.0, sendo adotado o nível mínimo de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

4. Resultados e Discussão

O produto probiótico administrado aos animais do grupo CLF foi fermentado com um inóculo misto de *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183, no entanto, apenas este último teve suas propriedades funcionais comprovadas em estudos *in vivo* e *in vitro* (SHIGUEMOTO *et al.*, 2007; REDONDO, 2008; BEDANI *et al.*, 2011; CAVALLINI *et al.*, 2011, SIVIERI *et al.*, KINOUCI *et al.*, 2012). A utilização de *Lactobacillus helveticus* 416 se justifica, até o momento, por razões tecnológicas. A cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 foi adicionada ao produto devido às suas propriedades imunomoduladoras (MEDINA *et al.*, 2007).

Durante as quatro semanas do protocolo, o produto fermentado probiótico apresentou população superior a 10^8 UFC/g ($8 \log_{10}$ UFC/g) dos três microrganismos analisados, número considerado adequado para que os mesmos exerçam seus efeitos probióticos (ANVISA, 2008; ROBERFROID, 1999).

4.1 Estudo em modelo animal

4.1.1 Indução e medida da colite

O comportamento dos animais dos diferentes grupos foi comparado para constatação do desenvolvimento da patologia, durante os sete dias de indução (T2). Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos em relação à ingestão hídrica e alimentar (dados não apresentados). Os grupos de animais que receberam dextran sulfato de sódio (CL, CLP, CLF e CLS) apresentaram sinais de presença de retocolite, indicada, principalmente, pelo aumento do índice de atividade da doença (IAD) durante o período de indução (Tabela 3).

A determinação do índice de atividade da doença foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Murthy *et al.* (1993), que leva em consideração peso corporal dos animais, consistência das fezes e presença de sangue oculto nas fezes, durante o período de indução (Tabela 1).

Os animais do grupo controle não apresentaram perda de peso, alteração na consistência das fezes e presença de sangue oculto nas fezes, durante os sete dias de tratamento. Por outro lado, os animais dos grupos que recebiam água com adição de 4% de DSS apresentaram perda de peso corporal e/ou fezes com consistência alterada (pastosa e diarreia) e/ou presença de sangue oculto e aparente nas fezes a partir do terceiro dia da indução. Esses resultados são compatíveis com o de outros autores que utilizaram o mesmo método de indução (GEIER *et al.*, 2007; MALAGO & NONDOLI, 2008; OSMAN *et al.*, 2006; OZAKI *et al.*, 2012).

Vale destacar que o grupo de animais que consumiu o produto à base de soja probiótico (CLF) apresentou menor alteração nos parâmetros avaliados durante o período de indução, caracterizado pela menor perda de peso, consistência normal das fezes até o 4º dia e presença de sangue oculto ou aparente nas fezes somente nos dias 6 e 7. Esses resultados indicam um possível efeito protetor da bebida probiótica em estudo.

Tabela 3 - Índice de atividade da doença por grupo durante o período de indução

Período de indução (dias)	C				CL				CLF				CLP				CLS			
	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/SA	IAD	Perda de peso (%)	Cons. das fezes	SO/SA	IAD	Perda de peso (%)	Cons. das fezes	SO/SA	IAD
0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0
1	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0	0	N	-	0
2	0	N	-	0	0	P	-	2	0	N	-	0	0	N	-	0	0	P	-	2
3	0	N	-	0	0,05	P	-	2	1,29	N	-	1	1,33	P	-	3	0	P	SA	6
4	0	N	-	0	0	P	SA	6	0	N	-	0	0	P	-	2	0	P	SA	6
5	0	N	-	0	0	P	SA	6	0	P	-	2	2,33	P	SA	7	0,23	P	+	4
6	0	N	-	0	0,14	D	SA	8	0	P	SA	6	0	P	SA	6	1,24	D	SA	9
7	0	N	-	0	0	D	SA	8	0,05	P	+	4	0,83	P	+	4	1,19	D	+	7
Total				0				32				13				22				34

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

Consistência das fezes: **N**=normal, **P**=pastosa, **D**=diarréia. **SA**: sangue aparente, **SO**: sangue oculto. (+): presença de sangue oculto, (-): ausência de sangue oculto.

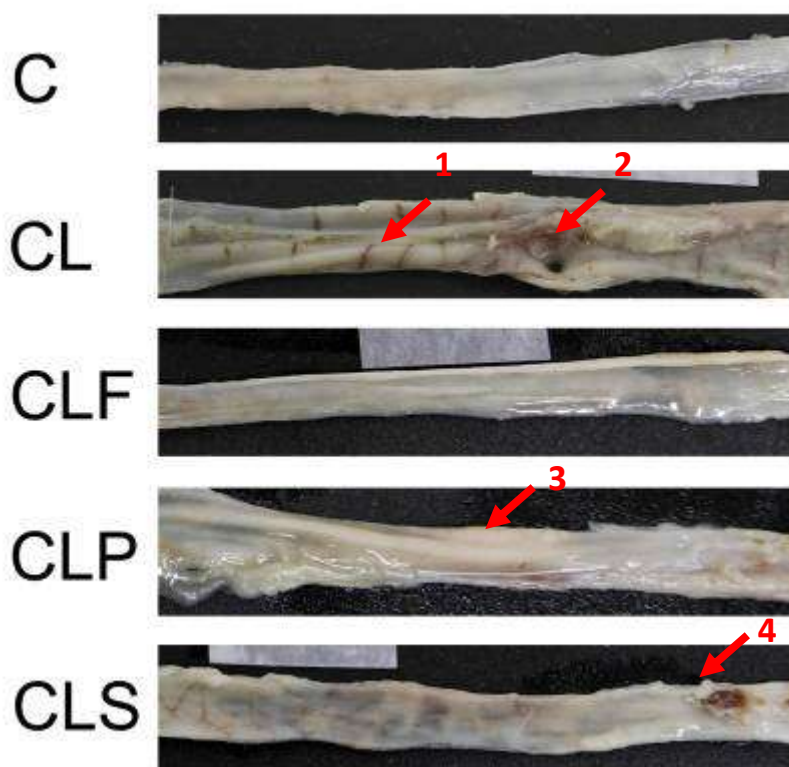
Grupo C: Animais sadios que não receberam os produtos em estudo. **Grupo CL**: Animais com colite quimicamente induzida e que não receberam os produtos em estudo.

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). **Grupo CLS**: Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

4.1.2 Avaliação Macroscópica

Através da análise macroscópica, ilustrada na Figura 2, foi possível constatar que o cólon e o reto dos animais dos grupos CL e CLS apresentaram áreas edemaciadas e ulceradas ao longo do intestino. No grupo que recebeu o produto placebo (CLP) foram constatadas áreas edemaciadas, sem a presença de ulcerações. Os intestinos dos animais dos grupos controle e CLF não apresentaram áreas edemaciadas ou úlceras visíveis como nos outros grupos induzidos à colite, indicando que o consumo do produto fermentado de soja em estudo auxiliou na manutenção da integridade da mucosa intestinal.

Figura 2 - Análise macroscópica do cólon e reto dos diferentes grupos de animais.



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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

1 e 3: regiões com edema; 2 e 4: regiões com ulcerações.

O efeito benéfico do probiótico fica evidente na análise macroscópica dos tecidos utilizando a escala proposta por Bell e colaboradores (1995). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, o grupo de animais que consumiu a bebida probiótica apresentou um menor grau de inflamações e/ou ulcerações em relação aos demais grupos induzidos, diferindo significativamente dos grupos CL e CLS ($p<0,01$). A relação peso/comprimento do intestino grosso também é um parâmetro usualmente avaliado para verificar a severidade da colite, pois a doença geralmente resulta em um cólon edemaciado e encurtado por conta dos danos causados. Não foram verificadas alterações na relação peso/comprimento do intestino grosso entre os diferentes grupos experimentais ($p<0,05$), porém é possível observar que a relação no grupo CL foi a mais elevada em número absoluto, indicando um dano maior nos tecidos desse grupo. Vale ressaltar ainda que o grupo CLF apresentou uma relação muito próxima ao grupo controle, o que pode estar relacionado ao efeito protetor da bebida probiótica.

Tabela 4 – Análise macroscópica dos danos ao longo do cólon e do reto

Grupo	Pontuação	Cólon (mg/cm)
C	0	127,06 ^a ±14,62
CL	3,44 ^a ±0,73	142,03 ^a ±18,85
CLF	0,80^c±0,63	128,90 ^a ±15,74
CLP	1,20 ^{bc} ±0,87	135,93 ^a ±15,03
CLS	2,20 ^b ±0,97	127,39 ^a ±9,09

Pontuação de cada grupo foi determinada segundo critério descrito por Bell e colaboradores (1995) (Tabela 2). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. A análise estatística foi feita entre os grupos induzidos à colite. **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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

Os danos na mucosa do intestino grosso são frequentemente avaliados como indicadores do grau de inflamação do tecido, e a hiperplasia das criptas pode ser um mecanismo compensatório para a perda de criptas causada pelas ulcerações (GEIER *et al.*, 2007; HOWARTH *et al.*, 2008; VOWINKEL *et al.*, 2004.).

4.1.3 Avaliação Histológica

A análise histológica confirmou o efeito benéfico do produto probiótico, uma vez que, foram encontradas no material proveniente dos grupos CL e CLS, regiões de ulceração, inflamação e criptas alteradas, ausentes nos animais dos grupos C e CLF.

Os intestinos dos animais que receberam o produto fermentado (CLF) apresentaram um infiltrado de células decorrentes da inflamação do tecido, não sendo evidenciadas alterações nas criptas e no epitélio e regiões de ulceração, sugerindo que o probiótico pode ter amenizado a gravidade da inflamação induzida quimicamente com dextran sulfato de sódio.

Um estudo comparou o efeito de quatro microrganismos com potencial probiótico na colite induzida quimicamente (DSS) em ratos, e os resultados mostraram que *Lactobacillus fermentum* BR11, foi capaz de atenuar uma colite moderada nos animais induzidos. O microrganismo reduziu o índice de atividade da doença, preveniu o encurtamento do cólon, aumentou o ganho de peso dos animais e diminuiu o risco de hiperplasia nas criptas (GEIER *et al.*, 2007).

Outros estudos não foram capazes de mostrar o efeito positivo de probióticos no desenvolvimento da colite. Estudo conduzido por Zhou e colaboradores (2012) verificou o efeito da cepa probiótica *Lactobacillus crispatus* M206119 no desenvolvimento de colite em camundongos, induzida pela administração de DSS. Os animais tratados com a suspensão do microrganismo apresentaram maior gravidade da colite em relação ao grupo controle, maior perda de peso, diarreia, sangue nas fezes, diminuição do comprimento do cólon, maior dano histológico e infiltrado de neutrófilos (ZHOU *et al.*, 2012). Tal fato indica que o efeito de microrganismos probióticos é cepa específico e, em alguns casos, pode exacerbar processos patológicos. Logo, são necessários diferentes estudos da eficácia das cepas bacterianas em modelos animais, antes de serem testadas em seres humanos (GEIER *et al.*, 2007).

No presente estudo, a análise histológica mostrou que o intestino grosso dos animais que consumiram o produto não fermentado (placebo), não apresentou áreas de ulceração ou criptas alteradas, sugerindo um efeito protetor do produto à base de soja em relação ao desenvolvimento da colite. Os efeitos positivos observados nos animais do grupo placebo podem ser, parcialmente, explicados pela composição do produto à base de soja, e consequentemente, pela presença de componentes bioativos dessa leguminosa, com especial

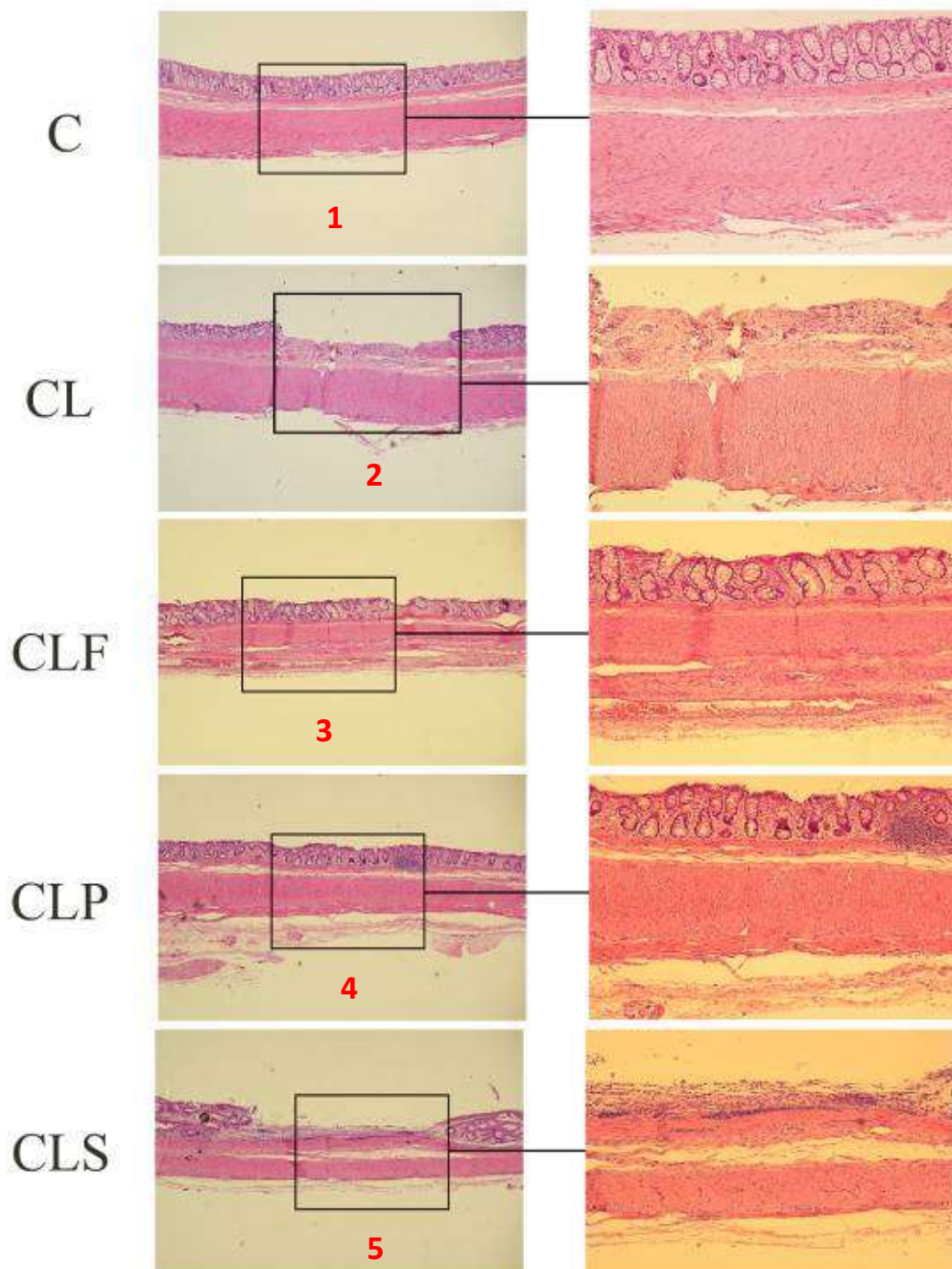
destaque para as isoflavonas, que possuem ação anti-inflamatória bem documentada (GARCIA-LAFUENTE *et al.*, 2009; MOUSSA *et al.*, 2012).

Um estudo conduzido por Jiang e colaboradores (2011), utilizou camundongos para verificar o efeito da dieta contendo caseína, proteína de soja ou proteína de soro de leite e da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG, na colite induzida por DSS. Os resultados obtidos indicam que a proteína da soja atenuou o grau de inflamação e a expressão de TNF α , independentemente da presença do probiótico. A lunasina, um peptídeo bioativo presente na proteína da soja foi relacionada ao efeito anti-inflamatório observado.

A sulfassalazina, composta pela união do ácido 5-aminosalicílico (molécula biologicamente ativa) e do radical sulfapiridina, é um fármaco analgésico anti-inflamatório-não-esteroidal (AINE), da classe dos salicilatos, amplamente utilizado para o tratamento de retocolite ulcerativa média e moderada (TRAVIS *et al.*, 2008). O aparecimento de efeitos colaterais e reações alérgicas são comuns com o uso desse medicamento ocorrendo em mais de um terço dos pacientes que recebem dose de manutenção do fármaco e em metade dos que recebem doses terapêuticas (GISBERT, 2002). O mecanismo de ação da sulfassalazina inclui redução na produção de interleucina 1 β , inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares, da lipoxigenase das células e da produção dos leucotrienos pró-inflamatórios (LTB $_4$ e 5-HETE) pelos macrófagos da parede intestinal e de prostaglandinas (MAHIDA *et al.*, 1991; PODOLSKI, 2002). No presente estudo a sulfassalazina não foi capaz de controlar o processo inflamatório característico da colite ulcerativa, uma vez que o intestino dos animais que receberam esse fármaco apresentou características semelhantes ao grupo induzido com DSS e que não recebeu tratamento (CL). Uma possível explicação para o resultado obtido seria o curto período de tratamento (16 dias), uma vez que a administração do fármaco ocorreu somente após a indução da colite.

Na figura 3 estão apresentadas as imagens microscópicas do cólon e reto dos animais em estudo.

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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina). Aumento de 100x e 400x.

1: Epitélio sem alterações; **2 e 5:** epitélios com interrupção da cripta, caracterizando uma região de ulceração; **3 e 4:** regiões com um infiltrado de células inflamatórias, porém sem alteração na cripta.

4.1.4 Avaliação Microbiológica

Estudos clínicos e experimentais em diferentes modelos indicam que é de extrema importância conhecer a composição da microbiota intestinal característica da patologia, pois tal fato pode contribuir para um melhor entendimento da etiologia da colite ulcerativa (NEMOTO *et al.*, 2012). A patogênese da doença ainda não foi completamente elucidada, contudo pesquisas indicam que ocorre uma intolerância a determinadas bactérias comensais da microbiota, provocando assim um desequilíbrio na resposta imunológica que resulta no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (ETTREIKI *et al.*, 2012; SEKSIK *et al.*, 2003).

Uronis e colaboradores (2011) verificaram o efeito de uma mistura de diversos microrganismos probióticos (VSL#3) na microbiota intestinal de ratos induzidos à colite por ácido 2,4,6-tri-nitro-benzeno-sulfônico (TNBS). O estudo mostrou uma redução significativa no grau de colite crônica em ratos que recebiam os probióticos em relação ao grupo controle. Além disso, os resultados indicam uma correlação negativa entre o grau de inflamação da colite e a diversidade dos microrganismos da microbiota intestinal.

No início do protocolo a composição da microbiota dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais mostrou-se significativamente diferente ($p < 0,05$) para a maioria dos gêneros estudados. Dessa forma, a comparação entre tempos mostrou-se mais relevante para acompanhar possíveis modificações na composição da microbiota durante o experimento. Apesar de ter sido realizada a análise estatística dos dados obtidos da composição da microbiota fecal ($p < 0,05$), consideramos que variações menores que meio ciclo logarítmico ($0,5 \log_{10} \text{UFC/g}$) não apresentam significado do ponto de vista microbiológico (BEDANI *et al.*, 2013). Diferenças menores que meio ciclo logarítmico podem ser decorrentes de variações na própria análise.

Na tabela 5 estão apresentados os resultados da população de *Enterococcus* spp. presente nas fezes dos diferentes grupos experimentais ao longo do protocolo.

Tabela 5 - População de *Enterococcus* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	5,67 $\pm$ 0,03 ^a	5,08 $\pm$ 0,04 ^c	5,76 $\pm$ 0,01 ^a	5,30 $\pm$ 0,04 ^b	5,83 $\pm$ 0,16 ^a
CL	6,34 $\pm$ 0,06 ^a	4,66 $\pm$ 0,08 ^e	5,98 $\pm$ 0,08 ^b	5,18 $\pm$ 0,10 ^d	5,56 $\pm$ 0,04 ^c
CLF	6,04 $\pm$ 0,01 ^b	6,06 $\pm$ 0,06 ^b	6,40 $\pm$ 0,11 ^a	5,72 $\pm$ 0,11 ^c	5,59 $\pm$ 0,10 ^c
CLP	5,56 $\pm$ 0,04 ^a	4,13 $\pm$ 0,00 ^c	4,80 $\pm$ 0,45 ^b	5,81 $\pm$ 0,04 ^a	6,04 $\pm$ 0,02 ^a
CLS	5,90 $\pm$ 0,01 ^{ab}	6,03 $\pm$ 0,06 ^a	5,81 $\pm$ 0,09 ^b	4,73 $\pm$ 0,02 ^c	5,85 $\pm$ 0,06 ^b

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

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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Os resultados mostram que o grupo controle (C) manteve uma população na ordem de 10^5 UFC/g durante todo o experimento, enquanto os grupos restantes que receberam o indutor DSS variaram a ordem de grandeza. A população de *Enterococcus* spp. do grupo que recebeu o produto fermentado contendo microrganismo probiótico *Enterococcus faecium* CRL183 (CLF) manteve-se estável até o final do período de indução (T2, variação de 0,36 $\log_{10}$ UFC/g). No entanto, no final do protocolo (T4) observou-se uma pequena redução na população desse gênero no mesmo grupo experimental, apesar dessa redução ter sido inferior a meio ciclo logarítmico (0,45 $\log_{10}$ UFC/g).

A redução da população de *Enterococcus* spp. no grupo que recebeu o produto fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 (CLF), apesar de baixa, não era esperada. Porém, o gênero *Enterococcus* spp. compreende várias espécies de microrganismos, algumas delas sendo inclusive consideradas patogênicas (FRANZ *et al.*, 2011) e as alterações observadas não significam, necessariamente, redução da espécie probiótica. A confirmação dessa hipótese será possível através da realização de testes bioquímicos e moleculares, propostos na próxima etapa do estudo.

Em 2010, Bedani e colaboradores verificaram aumento da população de *Enterococcus* spp. em ratos alimentados com um produto à base de soja, fermentado com *E. faecium* CRL 183 ou com a cultura pura de *E. faecium* CRL 183. No entanto, os animais que consumiram o produto fermentado de soja esterilizado também apresentaram um aumento do gênero

Enterococcus spp., indicando que, provavelmente, o processo fermentativo produz determinados metabólitos que influenciam na população deste gênero de microrganismos.

Um estudo feito por Cavallini e colaboradores (2011) utilizou o mesmo produto fermentado de soja (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416) para verificar a relação entre a microbiota fecal de coelhos e fatores de risco de doenças cardiovasculares. Após 60 dias de experimento, verificou-se, através de análises microbiológicas e de testes bioquímicos e moleculares, um aumento na população de *Enterococcus faecium* nos animais que receberam o produto fermentado de soja, indicando assim, uma persistência do microrganismo probiótico na microbiota durante esse período.

Enquanto existem gêneros bacterianos potencialmente patogênicos, outros são considerados benéficos para o hospedeiro, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., que têm sido apontados como importantes microrganismos com atividades imunomoduladoras e anticarcinogências (BEDANI *et al.*, 2010; BOURLIOUX *et al.*, 2003; CAVALLINI *et al.*, 2011; KAUR *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que a variação na população de *Lactobacillus* spp., em todos os grupos, ao longo do protocolo experimental foi inferior a um ciclo logarítmico. Durante o período de indução (T2) os grupos CLF, CLP e CLS apresentaram um aumento na população de *Lactobacillus* spp., em relação ao período anterior (T1), indicando que o indutor dextran sulfato de sódio não influencia negativamente a viabilidade desse gênero de microrganismo nos grupos que receberam tratamento. É interessante observar que, no final do protocolo (T4), o grupo que recebeu o produto fermentado probiótico (CLF) exibiu o maior aumento na população de *Lactobacillus* spp. ($0,84 \log_{10} \text{UFC/g}$) em relação ao início do experimento (T0), sugerindo um efeito benéfico do produto em questão. Essa variação pode ser explicada, ao menos parcialmente, pela presença de *Lactobacillus helveticus* 416 no produto fermentado.

Tabela 6 - População de *Lactobacillus* spp. (log₁₀UFC/g)

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	6,83±0,08 ^a	6,09±0,09 ^c	6,43±0,05 ^b	5,78±0,02 ^d	6,45±0,02 ^b
CL	6,65±0,00 ^a	6,47±0,05 ^b	6,76±0,01 ^a	5,95±0,08 ^c	6,41±0,01 ^b
CLF	6,04±0,01 ^d	5,86±0,04 ^e	6,62±0,01 ^b	6,52±0,01 ^c	6,88±0,02 ^a
CLP	6,45±0,05 ^{bc}	5,79±0,05 ^d	6,56±0,07 ^b	6,42±0,02 ^c	6,86±0,04 ^a
CLS	6,47±0,02 ^b	6,03±0,06 ^c	6,80±0,08 ^a	6,45±0,02 ^b	6,81±0,10 ^a

Médias com letras iguais da mesma linha não diferem estatisticamente entre si (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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Estudo anterior, utilizando coelhos como modelo animal, 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 (1,27 log₁₀UFC/g) na população fecal de *Lactobacillus* spp. (CAVALLINI *et al.*, 2011).

Estudo conduzido por Peran e colaboradores (2006) verificou o efeito da administração de *Lactobacillus fermentum* 5716, uma cepa isolada do leite materno, na microbiota intestinal de ratos com colite induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico. No final do experimento, 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. Não foram verificadas alterações significativas na população de *Bifidobacterium* spp. e de bactérias potencialmente patogênicas como as pertencentes ao grupo coliformes e enterobactérias.

O uso de probióticos para diminuir ou tratar infecções bacterianas é uma área de pesquisa bastante explorada nos tempos atuais (VENTURA *et al.*, 2009). Bullock e colaboradores (2004) concluíram que pacientes com colite ulcerativa ativa ou em remissão apresentavam redução na população de *Lactobacillus* spp. Em 2009, Wine e colaboradores realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a capacidade de cepas do gênero *Lactobacillus* spp. reduzirem a invasão de células epiteliais pelo microrganismo *Campylobacter jejuni*, uma vez que tal espécie é a causa bacteriana mais comum de enterocolite em seres humanos. Os

resultados do estudo indicam que a cepa *L. helveticus* R0052 foi eficiente em reduzir a invasão de células epiteliais por duas cepas de *C. jejuni*. Embora essas condições não ilustrem o cenário de modelos *in vivo*, este resultado oferece uma oportunidade valiosa para estudar a interação entre um patógeno entérico e um microrganismo potencialmente benéfico, contribuindo assim para estudos posteriores em diferentes modelos.

Estudos apontam que o aumento da população de *Bifidobacterium* spp. no cólon geralmente traz benefícios ao seu hospedeiro, como a modulação do sistema imune, a produção de AGCC e redução do pH intestinal. Além disso, esse gênero também está relacionado com a inibição da multiplicação de microrganismos patogênicos (MITSUOKA, 1990). Por outro lado, Mylonaki e colaboradores (2005) verificaram redução na população de *Bifidobacterium* spp. associada ao epitélio retal de pacientes portadores de colite ulcerativa, em comparação com pacientes controle.

De acordo com os resultados da Tabela 7, é possível observar que os grupos C, CL e CLS apresentaram redução de aproximadamente um ciclo logarítmico na população de *Bifidobacterium* spp. ao longo do protocolo experimental, enquanto o grupo CLP não apresentou variação relevante durante o mesmo período. O grupo que consumiu o produto probiótico (CLF) apresentou um aumento significativo na população de *Bifidobacterium* spp. de mais de um ciclo logarítmico ($1,35 \log_{10}$ UFC/g) durante o protocolo, provavelmente decorrente da adição deste gênero no produto.

Tabela 7 - População de *Bifidobacterium* spp. ($\log_{10}$ UFC/g)

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	7,02±0,00 ^a	6,58±0,05 ^b	6,36±0,10 ^c	6,34±0,08 ^c	5,99±0,02 ^d
CL	6,92±0,01 ^a	5,96±0,05 ^c	6,52±0,02 ^b	5,92±0,01 ^c	5,75±0,09 ^d
CLF	5,11±0,01 ^c	6,00±0,20 ^b	6,53±0,08 ^a	6,40±0,03 ^a	6,46±0,05 ^a
CLP	5,90±0,01 ^c	5,37±0,07 ^d	5,92±0,04 ^c	6,39±0,04 ^a	6,17±0,10 ^b
CLS	6,78±0,01 ^a	6,01±0,11 ^b	5,39±0,06 ^d	5,70±0,02 ^c	5,85±0,06 ^{bc}

Médias com letras iguais da mesma linha 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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Estudos anteriores reportaram um aumento da população de *Bifidobacterium* spp. em animais que consumiram o mesmo produto fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416, sem adição de *Bifidobacterium. longum*, sugerindo que os microrganismos probióticos atuam modulando benéficamente a microbiota fecal (BEDANI *et al.*, 2010, CAVALLINI *et al.*, 2011).

Em 2011, Messaoudi e colaboradores investigaram os possíveis efeitos do consumo de probióticos em animais e humanos que sofriam de ansiedade, depressão e estresse, pois estudos anteriores deste mesmo grupo de pesquisa relacionaram esses sintomas com casos de distúrbios ou doenças inflamatórias intestinais. Foi verificado que o consumo de uma formulação probiótica (*L. helveticus* R0052 e *B. longum* R0175), combinado ao tratamento psicológico, foi capaz de reduzir os sintomas estudados e, indiretamente, reduzir a incidência de DII. Tal fato pode ser atribuído à diminuição de microrganismos patógenos na microbiota intestinal, diminuição de citocinas pró-inflamatórias e da comunicação com o sistema nervoso central através de fibras sensoriais vagais e neurotransmissores (FORSYTHE *et al.*, 2010; RAMIAH *et al.*, 2008; YAN & POLK, 2002).

Estudos anteriores apontam que a diminuição da população de *Clostridium* spp. pode trazer benefícios ao organismo, pois a atividade metabólica ou o caráter patogênico de algumas espécies podem ser prejudiciais à saúde do hospedeiro (BEDANI *et al.*, 2010; MONTESI *et al.*, 2005). Além disso, bactérias do gênero *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp. estão comumente relacionadas a processos inflamatórios intestinais (BEDANI *et al.*, 2010; GUARNER *et al.*, 2003).

No presente estudo observou-se pouca variação na população de *Clostridium* spp. em todos os grupos induzidos ao final do experimento (inferior a meio ciclo logarítmico), ou seja, a administração do produto probiótico não influenciou a população desse gênero de bactéria (Tabela 8). Esses resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa, em estudo que utilizou coelhos como modelo animal (CAVALLINI *et al.*, 2011).

Tabela 8 - População de *Clostridium* spp. (log₁₀UFC/g)

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	6,86±0,03 ^a	6,41±0,10 ^b	6,37±0,16 ^b	6,56±0,07 ^b	6,10±0,07 ^c
CL	6,78±0,02 ^a	5,72±0,02 ^d	6,82±0,04 ^a	5,99±0,02 ^c	6,41±0,08 ^b
CLF	6,45±0,08 ^a	5,80±0,04 ^b	6,48±0,07 ^a	6,39±0,06 ^a	6,55±0,07 ^a
CLP	6,40±0,17 ^b	5,81±0,06 ^c	6,71±0,09 ^a	6,48±0,04 ^{ab}	6,65±0,03 ^a
CLS	6,63±0,04 ^{ab}	6,72±0,03 ^a	6,45±0,05 ^b	6,52±0,06 ^b	6,59±0,11 ^{ab}

Médias com letras iguais da mesma linha 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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Outro grupo de bactérias pesquisado nas fezes dos animais em estudo foi enterobactérias (Tabela 9), que compreende diversos gêneros potencialmente patogênicos como: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp. (BEDANI *et al.*, 2010). Estudo conduzido por Sokol e colaboradores (2006) constatou maior prevalência de *E.coli* em fezes de pacientes com colite ulcerativa, em comparação com pacientes sadios (controle).

Tabela 9 - População de enterobactérias (log₁₀UFC/g)

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	3,17±0,06 ^{ab}	2,76±0,03 ^c	3,43±0,10 ^a	3,05±0,04 ^{bc}	2,91±0,19 ^{bc}
CL	3,63±0,11 ^a	3,14±0,03 ^{bc}	3,24±0,06 ^b	2,99±0,03 ^c	3,27±0,03 ^b
CLF	3,01±0,00 ^{ba}	2,34±0,31 ^c	3,26±0,03 ^a	2,85±0,06 ^b	2,82±0,08 ^b
CLP	2,48±0,13 ^d	2,65±0,08 ^{cd}	3,27±0,15 ^a	2,93±0,04 ^b	2,77±0,01 ^{bc}
CLS	2,85±0,02 ^b	3,06±0,06 ^a	2,77±0,14 ^{bc}	2,66±0,00 ^c	2,65±0,02 ^c

Médias com letras iguais da mesma linha 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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Estudos anteriores mostraram que o consumo de *Lactobacillus plantarum* reduziu a população de enterobactérias em animais, incluindo espécies dos gêneros *Escherichia* spp. e *Salmonella* spp., diminuiu a translocação bacteriana através do epitélio intestinal, e foi capaz de modular o sistema imune, controlando as respostas anti e pró inflamatórias. Em seres humanos, *L. plantarum* foi capaz de reduzir os sintomas da síndrome do intestino irritável, que inclui inchaço e cólicas abdominais (LAM *et al.*, 2012; NARUSZEWICZ *et al.*, 2002).

Apesar de um estudo anterior ter constatado redução de mais de três ciclos logarítmicos com a administração do mesmo produto probiótico, sem adição de *B. longum*, em modelo animal utilizando coelhos (CAVALLINI *et al.*, 2011), não foi possível verificar resultado semelhante no presente estudo. De acordo com o resultado da tabela 11, constatou-se que apesar das variações na população de enterobactérias terem sido significativas ($p < 0,05$) no final do protocolo, esse efeito não apresenta relevância do ponto de vista microbiológico ($< 0,5 \log_{10}$ UFC/g). Tal resultado pode ser justificado pelo fato do modelo animal utilizado no estudo ser livre de patógenos específicos (SPF), não apresentando assim bactérias patogênicas normalmente encontradas em animais da mesma espécie.

A população de *Bacteroides* spp. manteve-se baixa (média de 2,65 a 3,08 $\log_{10}$ UFC/g) e sem grandes alterações durante todo o experimento, exceto para o grupo que recebeu a sulfassalazina, no qual verificou-se redução de aproximadamente um ciclo logarítmico no final do estudo (Tabela 10).

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

Grupos	T0	T1	T2	T3	T4
C	3,02±0,02 ^b	3,70±0,01 ^a	2,41±0,08 ^c	3,02±0,10 ^b	3,01±0,09 ^b
CL	3,03±0,03 ^b	3,65±0,06 ^a	2,48±0,03 ^c	3,08±0,01 ^b	3,18±0,02 ^b
CLF	2,77±0,01 ^a	2,53±0,08 ^a	2,65±0,08 ^a	2,70±0,10 ^a	2,59±0,02 ^a
CLP	2,77±0,07 ^a	2,74±0,12 ^a	2,46±0,05 ^b	2,60±0,02 ^a	2,69±0,06 ^a
CLS	3,77±0,13 ^a	2,58±0,13 ^b	2,56±0,22 ^b	2,48±0,01 ^b	2,73±0,02 ^b

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

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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1=** uma semana após a ingestão dos produtos, **T2=** período de indução da colite, **T3=** uma semana após o término da indução da colite, **T4=** final do experimento.

Alguns estudos associam o gênero *Bacteroides* spp. a um aumento no fator de risco para o câncer de cólon, pois determinados metabólitos produzidos por tais microrganismos podem ser prejudiciais. Além disso, algumas espécies, como *B. fragilis*, estão relacionadas à etiologia da diarreia em animais e humanos (BEDANI *et al.*, 2010; KINGSTON *et al.*, 1990; KRZYZANOWSKY, 2003).

4.1.5 Determinação de aminos bioativas

As aminos bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular e componentes indispensáveis às células vivas do organismo, pois atuam diretamente no metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Elas exercem um papel importante na regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas, e são responsáveis por mediar a ação de hormônios e fatores de crescimento (BÁRDOCZ, 1999; GUIDI, 2005).

Além disso, as aminos bioativas são capazes de estimular a diferenciação celular, interagindo e modulando vários sistemas intracelulares. De acordo com Drolet e colaboradores (1986) e Bardócz (1995), as poliaminas espermina e espermidina, assim como as diaminas putrescina e cadaverina, são eficientes sequestrantes de radicais livres em diversos sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro*. As aminos espermidina e espermina também são importantes na renovação e funcionalidade do trato gastrointestinal e na maturação da mucosa intestinal (BARDÓCZ *et al.*, 1993; MOINARD *et al.*, 2005).

Os teores das aminos putrescina, cadaverina e espermidina encontrados nas fezes dos animais em estudo estão apresentados na Tabela 11. As análises foram realizadas em triplicata, por grupo de animais.

Tabela 11 - Teores de aminas bioativas detectadas em amostras de fezes dos animais

Grupos	T0	T2	T4
	Putrescina (mg/100g)		
C	0,13±0,02 ^{aA}	0,11±0,01 ^{aD}	0,15±0,02 ^{aD}
CL	0,18±0,01 ^{bA}	0,91±0,02 ^{aB}	0,20±0,03 ^{bCD}
CLF	0,18±0,02 ^{bA}	0,65±0,03 ^{aC}	0,24±0,02 ^{bC}
CLP	0,15±0,03 ^{cA}	0,68±0,03 ^{aC}	0,48±0,02 ^{bA}
CLS	0,13±0,01 ^{cA}	1,41±0,00 ^{aA}	0,33±0,04 ^{bB}
	Cadaverina (mg/100g)		
C	0,29±0,04 ^{aA}	0,16±0,02 ^{bD}	0,25±0,03 ^{aB}
CL	0,31±0,02 ^{aA}	0,25±0,02 ^{bC}	0,26±0,02 ^{bB}
CLF	0,30±0,04 ^{bA}	0,13±0,03 ^{cD}	0,44±0,05 ^{aA}
CLP	0,35±0,02 ^{bA}	0,44±0,04 ^{aA}	0,42±0,04 ^{aA}
CLS	0,31±0,04 ^{aA}	0,34±0,03 ^{aB}	0,25±0,04 ^{aB}
	Espermidina (mg/100g)		
C	4,65±0,06 ^{cD}	6,11±0,02 ^{bE}	6,26±0,07 ^{aE}
CL	4,77±0,04 ^{cC}	6,96±0,13 ^{aD}	6,76±0,03 ^{bD}
CLF	2,62±0,04 ^{cE}	10,78±0,03 ^{aA}	7,17±0,01 ^{bC}
CLP	6,16±0,04 ^{cA}	8,71±0,04 ^{bC}	9,22±0,03 ^{aB}
CLS	5,93±0,04 ^{cB}	9,23±0,01 ^{bB}	9,76±0,02 ^{aA}

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença na comparação entre tempos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na comparação entre grupos (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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T2**= período de indução da colite, **T4**= final do experimento.

O grupo C manteve os teores da amina putrescina praticamente constantes durante todo o período experimental ($p < 0,01$). A concentração de cadaverina diminuiu significativamente no final do período de indução (T2), enquanto o de espermidina aumentou após o mesmo período (T2 e T4).

No grupo CL houve um aumento de putrescina e espermidina logo após a indução da colite e os teores de cadaverina foram reduzidos no mesmo período.

Os grupos CLF, CLP e CLS também exibiram um aumento significativo ($p < 0,01$) de putrescina e espermidina após o período de indução. Em relação à cadaverina observou-se um comportamento distinto entre os grupos experimentais: os animais que receberam o produto placebo (CLP) apresentaram aumento dessa amina após a indução da colite e esse efeito persistiu até o final do experimento; no grupo CLF houve uma diminuição de cadaverina após a indução da colite, e um aumento no final do protocolo em relação ao tempo inicial ($p < 0,01$);

no grupo tratado com o fármaco (CLS) não houve variação significativa na concentração dessa amina bioativa.

O grupo CLF apresentou o maior aumento de espermidina durante o protocolo experimental, comparado aos grupos restantes. Este resultado pode ser explicado pelo fato de dois dos gêneros de microrganismos administrados no produto (*Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.) terem atividade descarboxilante sobre os aminoácidos de origem alimentar, sendo essa uma das formas de origem das aminas biogênicas (MARINO *et al.*, 2000).

No presente estudo também foi realizada a pesquisa de espermina, no entanto, os teores dessa amina ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado (HPLC). A baixa concentração dessa amina pode ser explicada pelo próprio metabolismo das poliaminas, podendo ocorrer uma retro conversão de espermina a espermidina pela ação da enzima espermina oxidase (SMO) (HONG *et al.*, 2010).

Na comparação entre grupos, os animais induzidos à colite, tratados ou não, apresentaram teores de putrescina superiores ao do grupo controle uma semana após o período da indução (T2). Em relação à amina cadaverina, o grupo que ingeriu o produto fermentado exibiu uma diminuição dessa amina após o período de indução (T2), ficando com teor próximo ao grupo de animais não induzidos à colite, contudo, os grupos CLF e CLP exibiram aumento nessa amina, diferindo dos demais no final do experimento. Considerando que os teores de espermidina foram estatisticamente diferentes ($p < 0,01$) no início do protocolo experimental (T0), a comparação entre tempos forneceu informações pouco relevantes em relação a essa amina. No entanto, é possível observar que o grupo CLF apresentou os maiores valores dessa amina logo após o término da indução (T2).

Um estudo conduzido por Matsumoto e Benno (2007) comparou a microbiota fecal e os teores de poliaminas entre indivíduos saudáveis e idosos hospitalizados. Foi demonstrado que os voluntários saudáveis apresentaram teores mais elevados de aminas nas fezes, principalmente de putrescina. Também foi indicado que essas aminas eram originadas através de microrganismos do gênero *Clostridium* spp., sugerindo uma relação entre a concentração de poliaminas e a composição da microbiota fecal.

Em 1992, Obayahi e colaboradores investigaram o metabolismo de poliaminas na mucosa de pacientes com colite nas fases aguda e de remissão, assim como em voluntários saudáveis. Os resultados mostraram uma maior concentração da amina espermidina na fase

aguda da doença, comparada à fase de remissão ou ao grupo controle. Contudo, a atividade das enzimas responsáveis pela síntese das poliaminas foi mais baixa, mostrando que o aumento de espermidina durante a fase aguda pode não ter sido devido a uma maior síntese ou degradação das poliaminas, e sim ao aumento da absorção de espermidina exógena.

As poliaminas podem apresentar atividade anti-inflamatória inibindo a produção de citocinas inflamatórias nos macrófagos, bem como regulando a ativação de NF- κ B. Matsumoto e colaboradores (2011) verificaram o efeito da cepa probiótica *Bifidobacterium lactis* LKM512, na concentração de poliaminas no intestino de camundongos. O protocolo experimental teve 11 meses de duração e os animais receberam uma solução contendo a cepa probiótica três vezes por semana. O grupo que recebeu *B. lactis* LKM512 apresentou uma maior concentração de poliaminas nas fezes, especialmente de espermina. No entanto, a sequência genômica do microrganismo *B. lactis* LKM512 mostrou que essa cepa não possui a capacidade de sintetizar espermina, mas pode alterar a microbiota colônica induzindo, indiretamente, a produção de aminas bioativas.

4.1.6 Determinação de citocinas

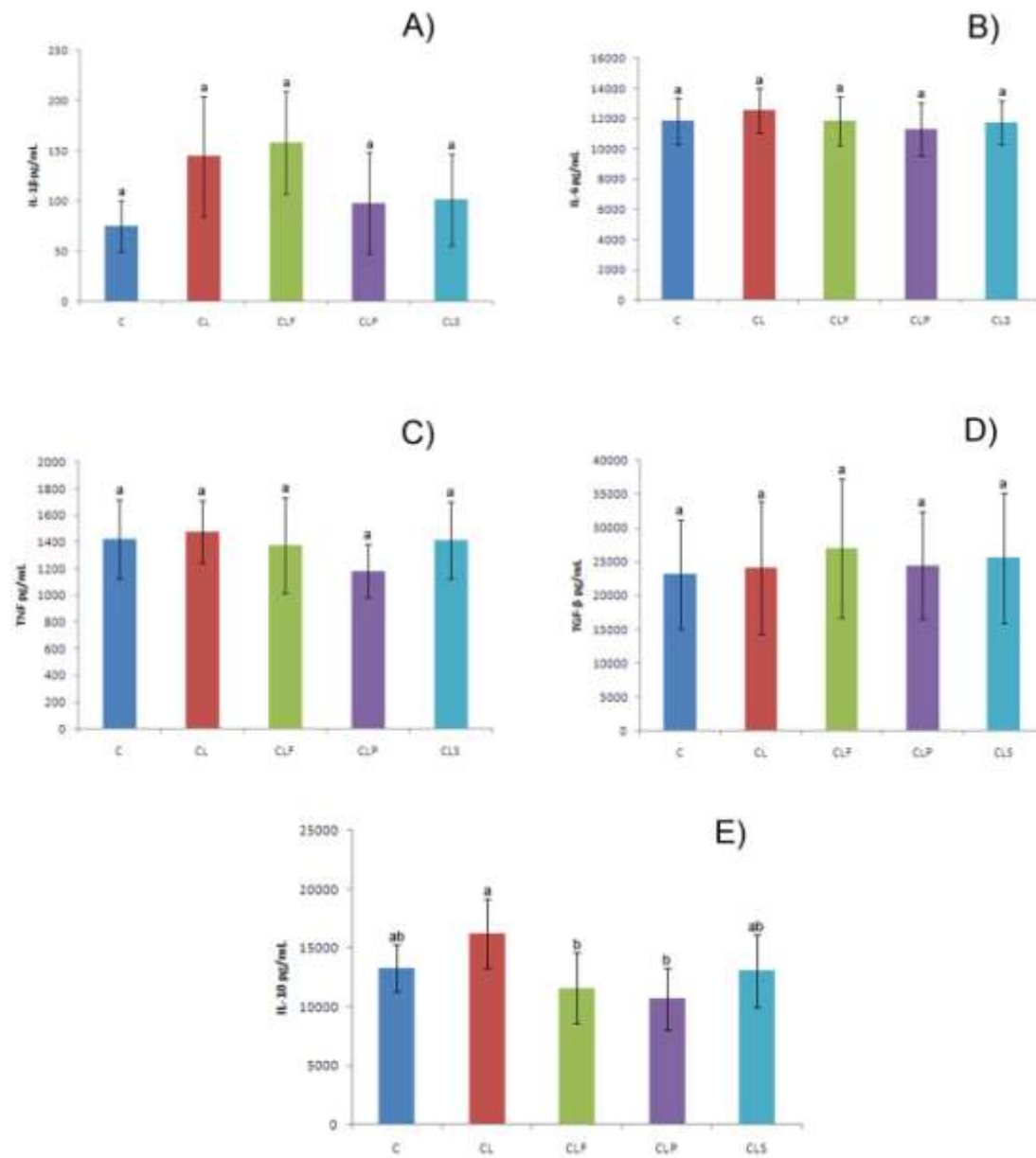
Apesar de não ter a origem completamente desvendada, dados da literatura sugerem que as doenças inflamatórias intestinais costumam se manifestar em decorrência de fatores diversos, sendo um deles o desequilíbrio no sistema imunológico. Acredita-se que a inflamação seja, em muitos casos de DII, uma resposta aos antígenos produzidos pelas bactérias presentes na microbiota entérica (JURJUS *et al.*, 2004; HANAUER, 2006; BENTO, 2012).

Foram investigadas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com o objetivo de melhor compreender o processo inflamatório decorrente da administração de DSS nos animais, bem como o efeito dos produtos em estudo na patogênese da doença. As amostras de cólon utilizadas nesta análise foram coletadas no final do experimento, logo representam a fase crônica ou de remissão da colite ulcerativa.

Não houve diferença estatística ($p < 0,01$) entre os grupos na concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β (Figura 4). Conforme mostrado na Figura 4, o grupo CL

apresentou a maior concentração da citocina IL-10, diferindo significativamente ($p<0,01$) dos grupos CLF e CLP.

Figura 4 - Concentração de citocinas no cólon dos diferentes grupos ao final de 30 dias de protocolo experimental.



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

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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

A= concentração de IL-1β, B = concentração de IL-6, C= concentração de TNF-α, D = concentração de TGF-β, E= concentração de IL-10.

Estudos indicam que um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias está diretamente relacionado com a fisiopatologia das DII (ROGLER & ANDUS, 1998). A citocina TNF- α atua como um importante mediador inflamatório na colite ulcerativa. Contudo, dados da literatura sugerem que esta citocina esteja presente principalmente na fase aguda do processo inflamatório, e tal fato auxilia na explicação dos resultados encontrados neste trabalho, uma vez que foi avaliada a fase crônica ou de remissão da doença (BENTO, 2012).

A IL-1 β também é considerada um potente mediador inflamatório, e costuma ter sua expressão aumentada em pacientes com DII (JURJUS *et al.*, 2004, BENTO, 2012). Esta citocina faz uma ligação ao seu receptor específico (IL-1R) e promove a migração de neutrófilos para o foco inflamatório de forma indireta (LIN *et al.*, 2011; BENTO, 2012). Os resultados apresentados na Figura 4 sugerem que na fase crônica ou de remissão da colite, a expressão de IL-1 β é diferente.

Diversas pesquisas utilizando modelos *in vivo* de colite ulcerativa demonstraram que a ingestão diária de determinadas cepas probióticas resultam em um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (CUI *et al.*, 2004; PERAN *et al.*, 2006; GIRISHKUMAR *et al.*, 2012; ÓCON *et al.*, 2013). No presente trabalho, os animais que consumiram a bebida probiótica e a bebida placebo (CLF e CLP) apresentaram uma expressão de IL-10 diminuída, em comparação aos animais sem tratamento (CL), apesar dos estudos histológicos indicarem uma melhor restauração do tecido colônico desses animais. (Figura 3). Um estudo conduzido por Bento (2012) utilizou camundongos com colite induzida por DSS, e observou um aumento de IL-10 apenas nas fases de recuperação do processo inflamatório intestinal. Sendo assim, é possível que os grupos CLF e CLP tenham tido uma recuperação mais rápida devido aos produtos administrados nesses tratamentos, e que o grupo CL, por ser um controle positivo, tenha apresentado uma elevada concentração de IL-10 como um mecanismo compensatório da inflamação.

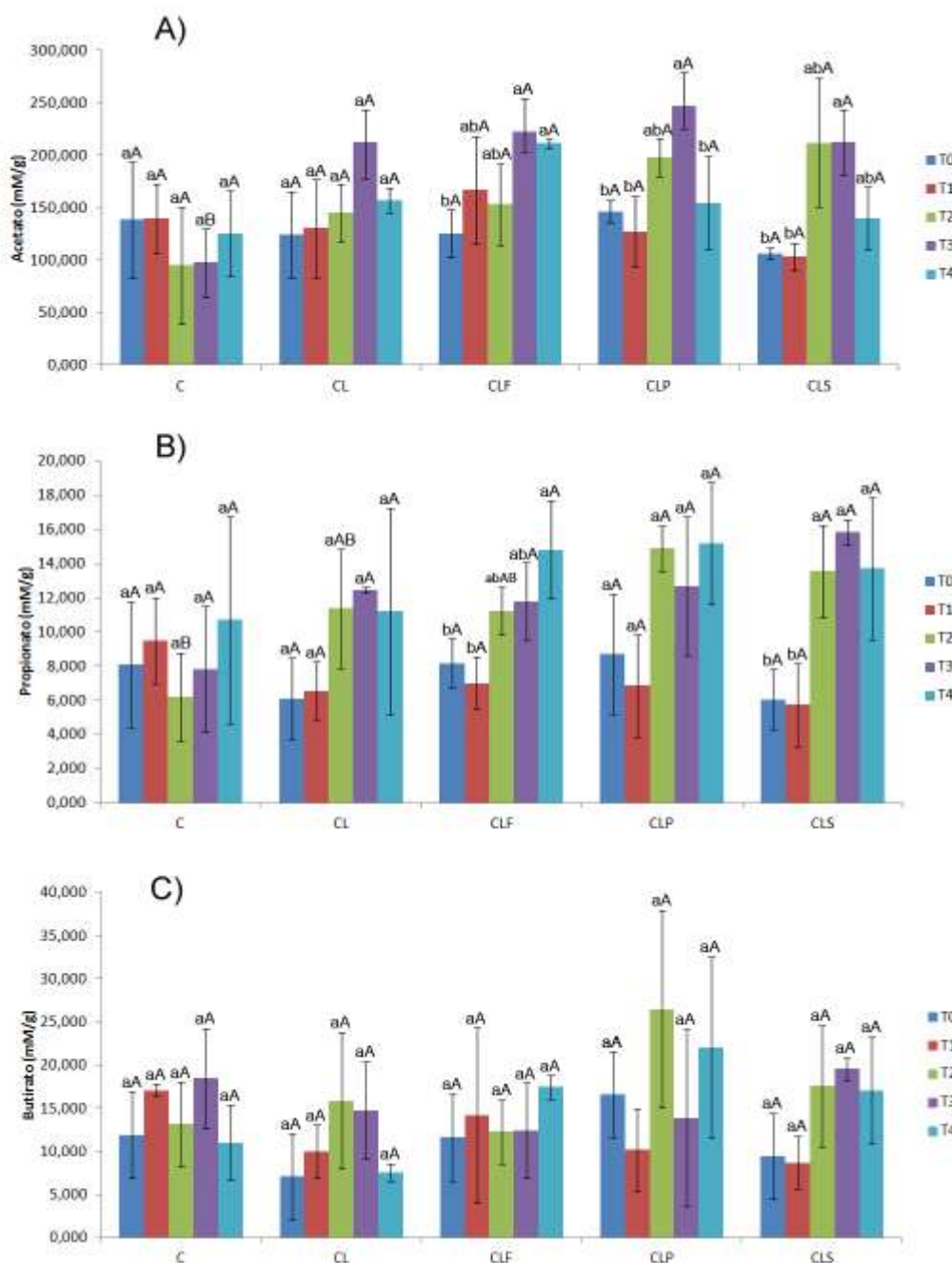
4.1.7 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC acetato, propionato e butirato estão presentes em grande quantidade no cólon, e são decorrentes da fermentação bacteriana de carboidratos típica dessa região do intestino (VINOLO, 2010). A quantidade desses compostos pode ser influenciada basicamente por três fatores: composição da dieta, microbiota intestinal e porção do intestino (HOOPER *et al.*, 2002; VINOLO, 2010).

Além de serem considerados importantes substratos para os enterócitos, os AGCC também são capazes de modular a resposta inflamatória (PERAN *et al.*, 2006; RANGANNA *et al.*, 2003; WEBER & KERR, 2006).

A Figura 5 apresenta a variação na concentração dos ácidos graxos, acetato, propionato e butirato, respectivamente, presente no cólon dos animais.

Figura 5 – Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (mM/g) encontrado nas fezes dos diferentes grupos ao longo do período experimental.



Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença na comparação entre tempos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na comparação entre grupos (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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

T0= antes da administração dos produtos (período de adaptação), **T1**= uma semana após a ingestão dos produtos, **T2**= período de indução da colite, **T3**= uma semana após o término da indução da colite, **T4**= final do experimento.

A= produção de acetato, B= produção de propionato, C= produção de butirato.

Os grupos C e CL não apresentaram variação significativa ($p < 0,05$), ao longo de todo o protocolo experimental, nos três ácidos graxos investigados. Tal fato indica que o reagente dextran sulfato de sódio não influenciou a produção de acetato, propionato e butirato nestes grupos em questão.

Os animais do grupo tratado com o produto fermentado (CLF) exibiram aumento na concentração de acetato e propionato durante o período experimental, principalmente nas duas últimas semanas de estudo, ou seja, após a indução da colite.

A ingestão regular do produto placebo (CLP) resultou em aumento na concentração de acetato ($p < 0,05$) somente no T3 (uma semana após a indução da colite). Não verificou-se alteração significativa na concentração de propionato no grupo CLP ao longo do protocolo.

O grupo CLS apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de acetato e propionato após o período de indução, sendo que esse efeito persistiu até o final do experimento somente para o propionato.

Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de butirato ao longo do período experimental para todos os grupos estudados.

Na comparação entre grupos, os animais induzidos à colite, tratados ou não, apresentaram teores de acetato superiores ao do grupo controle uma semana após o término da indução (T3). Em relação ao propionato, o grupo que ingeriu o produto placebo exibiu aumento nesse AGCC após o período de indução (T2), diferindo significativamente apenas do grupo controle.

Pesquisas recentes têm sugerido que o aumento dos AGCC, principalmente do butirato, exerce um papel positivo na modulação do sistema imune, e consequentemente nas doenças inflamatórias. Cerca de 80% de butirato é metabolizado pelos enterócitos, logo ele é o principal substrato das células do intestino. Porém, grande parte desse ácido é extraída pelo fígado, deixando a sua concentração plasmática relativamente baixa (COOK & SELLIN, 1998; WOLEVER *et al.*, 2002, VINOLO, 2010). O acetato, apesar de ser o mais abundante, é rapidamente absorvido e transportado pelo fígado, onde será utilizado em diferentes vias metabólicas. Já o propionato, permanece em baixa concentração na corrente sanguínea após a passagem pelo fígado (COOK & SELLIN, 1998; WOLEVER *et al.*, 1991).

Segain e colaboradores (2000) avaliaram o efeito do butirato em células obtidas de biópsias do intestino de pacientes portadores de doença de Crohn, e verificaram uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias pela inibição do fator nuclear kappa B (NFκB).

Um estudo conduzido por Peran e colaboradores (2006) utilizou a espécie *Lactobacillus fermentum* em ratos induzidos à colite por (TNBS). Os pesquisadores observaram um aumento na concentração de AGCC e uma maior regeneração da mucosa intestinal no grupo que consumiu o probiótico, indicando uma relação positiva entre o microrganismo utilizado e produção de AGCC.

Em 2008, Nassri e colaboradores avaliaram o efeito da irrigação de uma solução de AGCC em ratos com colite por exclusão, doença descrita como uma inflamação em segmentos do cólon desprovidos do trânsito fecal. Os resultados mostraram uma diminuição do processo inflamatório, além de uma menor congestão vascular e deposição de colágeno, no grupo que recebeu a solução de AGCC. O efeito positivo demonstrado neste estudo indica que os AGCC são capazes de auxiliar a cicatrização de processos inflamatórios no cólon, uma vez que eles atuam como substratos energéticos importantes para os colonócitos (HARIG *et al.*, 1989; NASSRI *et al.*, 2008).

Apesar dos efeitos positivos observados em relação à inibição do desenvolvimento da colite, o produto fermentado (CLF) não foi capaz de promover um aumento significativo de butirato no período estudado. Tal resultado pode ser parcialmente atribuído pelo fato da concentração desse ácido ser instável no cólon, uma vez que grande parte dele será imediatamente utilizada pelos colonócitos, ou até mesmo pelas próprias bactérias presentes na microbiota intestinal (TOPPING & CLIFTON, 2001).

4.1.8 Determinação da sobrevivência intestinal dos microrganismos probióticos

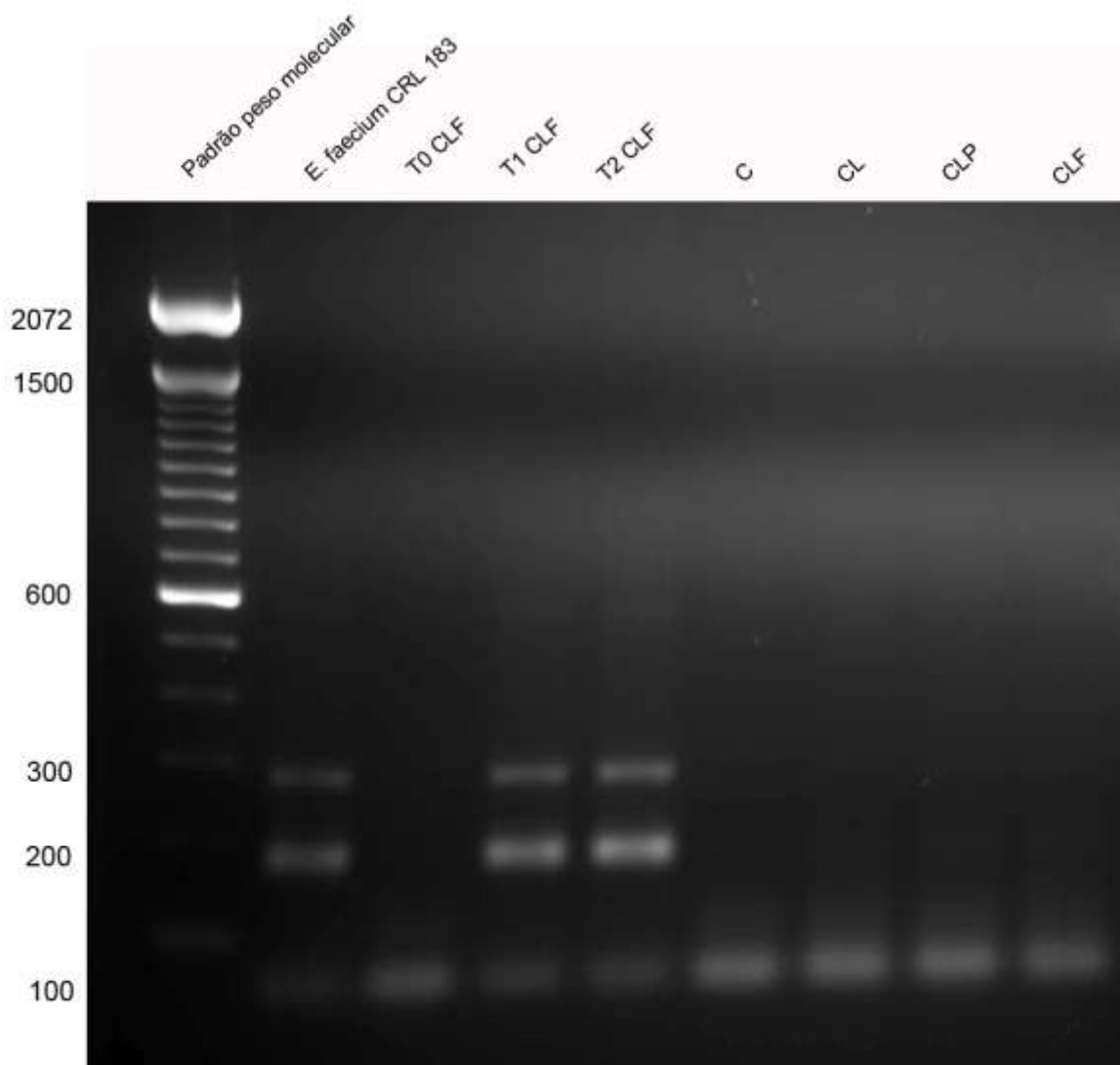
Para que um microrganismo probiótico possa exercer seu efeito benéfico no organismo, ele deve ser capaz de aderir ao epitélio da mucosa intestinal e colonizar, ao menos temporariamente, o intestino (MATER *et al.*, 2005; BEDANI, 2008). Visando um melhor entendimento dos resultados apresentados nas análises microbiológicas, foi feita a identificação das espécies dos gêneros *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. encontradas

nas fezes dos animais utilizados no protocolo experimental. Colônias com morfologias distintas dos gêneros *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foram selecionadas e submetidas a testes bioquímicos com as galerias API 20-Strep e API 50 CHL, respectivamente (Anexos 3 e 4).

No início do protocolo experimental as espécies de *Enterococcus* spp. identificadas no grupo CLF, através do sistema API 20 Strep, foram *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. avium*. Este resultado mostra que as espécies encontradas já faziam parte da microbiota intestinal dos animais estudados, pois até o momento nenhum produto havia sido administrado. As mesmas espécies foram confirmadas em amostras coletadas na metade do experimento, indicando que o reagente usado na indução da colite (DSS) não influenciou na diversidade das espécies do gênero *Enterococcus* spp. Já as colônias selecionadas ao final do experimento eram predominantemente da espécie *E. faecium*, sugerindo que a cepa administrada no produto fermentado de soja foi capaz de sobreviver às condições do trato gastrointestinal e possivelmente, colonizar o intestino dos animais do grupo CLF. Esta hipótese foi confirmada através de técnica de biologia molecular (PCR), com a utilização de *primer* específico para a espécie *E. faecium* e, utilizando a cepa CRL 183 como controle. Após a administração dos produtos, apenas as colônias do grupo CLF foram confirmadas por PCR como sendo pertencentes à cepa *E. faecium* CRL 183. Nas amostras dos demais grupos não houve confirmação da cepa estudada (Figura 6).

As colônias isoladas dos grupos restantes (C, CL, CLP e CLS) foram identificadas como pertencentes às espécies *Streptococcus uberis*, *E. faecalis*, *E. faecium*., e *E. avium*, em todos os tempos analisados. Cabe destacar que não observou-se alteração na diversidade das espécies identificadas ao longo do período experimental.

Figura 6. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas das fezes dos diferentes grupos de animais.



Coluna 1: padrão de peso molecular; coluna 2: *E. faecium* CRL 183; coluna 3: T0 do grupo CLF (antes da administração dos produtos), coluna 4: T1 do grupo CLF (após 2 semanas de administração dos produtos); coluna 5: T2 do grupo CLF (após 4 semanas de administração dos produtos); coluna 6: grupo C; coluna 7: grupo CL; coluna 8: grupo CLP; coluna 9: grupo CLS.

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). **Grupo CLS:** Animais com colite quimicamente induzida e que receberam fármaco (sulfassalazina).

Em relação ao gênero *Bifidobacterium* spp., foi avaliada a capacidade de fermentar diferentes tipos de carboidratos, através do sistema API 50 CHL. Os estudos que utilizam o sistema API 50 CHL para identificar espécies de *Bifidobacterium* spp. são bastante contraditórios, pois o mesmo não é específico para esse gênero bacteriano. A identificação de espécies foi baseada no perfil de fermentação de carboidratos de cada espécie de *Bifidobacterium* spp. (dados da literatura) (TOURÉ *et al.*, 2003; SAKATA *et al.*, 2002). No presente estudo, o perfil de fermentação de carboidratos de uma cepa pura de *B. longum* ATCC 15707 foi determinado, para efeito de comparação.

As amostras isoladas do gênero *Bifidobacterium* spp. no grupo CLF apresentaram no início do experimento, capacidade de fermentar carboidratos típicos das espécies *B. longum*, *B. bifidum* e *B. infantis*. Já ao final do protocolo, os carboidratos utilizados na fermentação eram característicos da espécie *B. longum*.

As colônias isoladas dos grupos restantes (C, CL, CLP e CLS) foram identificadas como pertencentes às espécies *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. breve* e *B. adolescentis*. e não verificou-se alteração na diversidade das espécies identificadas ao longo do período experimental.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a cepa *B. longum* ATCC 15707, administrada na bebida fermentada à base de soja, pode ter sobrevivido às condições adversas do trato gastrointestinal dos animais do grupo CLF. Contudo, a confirmação através de técnica de biologia molecular (PCR) se faz necessária para afirmar tal suposição.

Até presente momento não foi possível a realização da confirmação de espécie por PCR, uma vez que a técnica se encontra em fase de padronização.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a ingestão regular do produto fermentado probiótico à base de soja (CLF), e em menor grau, do mesmo produto sem a adição de probióticos (CLP), foi capaz de reduzir o risco de desenvolvimento da colite ulcerativa em ratos, uma vez que constatou-se diminuição do índice de atividade da doença durante o período de indução e menor alteração do cólon ao final do protocolo, em

comparação com os demais grupos induzidos à colite. Em adição, a análise da composição da microbiota fecal revelou que a ingestão do produto fermentado probiótico resultou em aumento na população de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., gêneros considerados importantes para a manutenção da integridade das células epiteliais do cólon. O grupo CLF também apresentou um aumento da amina espermidina e dos AGCC propionato e acetato, ao longo do protocolo experimental. Além disso, a sobrevivência intestinal dos microrganismos probióticos administrados foi confirmada através de análises bioquímicas, e do microrganismo *E. faecium* CRL 183 por testes moleculares, indicando que o mesmo é capaz de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal e exercer benefícios no cólon.

6. Considerações finais

Apoiados nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que o extrato aquoso de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, apresenta potencial para atuar na redução do risco de desenvolvimento de DII. Contudo, um estudo mais aprofundado se faz necessário para um melhor entendimento desse efeito benéfico. Nesse contexto, serão realizados trabalhos futuros para investigar o efeito do referido produto em diferentes estágios da colite induzida em ratos, bem como a monitoração de parâmetros importantes para a regeneração da mucosa intestinal (citocinas, ácidos graxos de cadeia curta, poliaminas, mieloperoxidase, óxido nítrico, malonaldeído). Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação envolvidos no efeito benéfico observado anteriormente, serão propostas técnicas mais sofisticadas de análise como imuno-histoquímica, que juntamente com os dados histológicos auxiliarão o entendimento do processo inflamatório, e técnicas independentes de cultivo, a fim de verificar a relação entre modificações na microbiota fecal e desenvolvimento da colite. Caso o efeito benéfico continue a ser comprovado em estudos posteriores utilizando modelo animal, o produto probiótico em questão deverá ser futuramente, submetido a estudos clínicos para comprovação do efeito em humanos.

7. Referências bibliográficas (padrão ABNT)

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.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, p. 66-71, 1993.

BEDANI, R. Influência do consumo de "iogurte" de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL183 na microbiota intestinal de animais e humanos. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP**, 2008.

BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p. 233–238, 2010.

BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; CANO, V.S.P.; VALENTINI, S.R.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.42, n.3, p.1238-1247, 2011.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; ISAY SAAD, S.M. 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 Microbiology**, v. 34, p. 382-389, 2013.

BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v.268, p.622-630, 1995.

BENTO, A.F. Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo DSS: papel dos mediadores lipídicos derivados do omega -3 na resolução da colite experimental. Tese (Doutorado em Farmacologia), **Departamento de Farmacologia/UFSC**, 2012.

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. **Research in Microbiology**, v.152, p.735–741, 2001.

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, 14 June 2002. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.675–678, 2003.

BULLOCK, N.R.; BOOTH, J.C.; GIBSON, G.R. Comparative composition of bacteria of human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.5, p.59-64, 2004.

CAMPOS, F.G.C.M.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.; TERRA, R.M.; WAITZBERG, D.L. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.19, n.1, p.11-6, 1999.

CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.11, p.265–271, 2005.

CANO, V.P.S.; VALENTINI, S.R.; SIVIERI, K.; ROSSI, E.A. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL183 in long-term experiments. **Le Lait**, v. 87, p. 59-69, 2007.

CAVALLINI, D.C.U.; SUZUKI, J.Y.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; PINTO, R.A.; ROSSI, E.A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.126, 2011.

CIRILO, M.P.G.; COELHO, A.F.S.; ARAUJO, C.M.; GONCALVES, F.R.B.; NOGUEIRA, F.D.; GLORIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. **Food Chemistry**, v.82, p.397-402, 2003.

COOK, S. I.; SELLIN, J.H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, n.6, p.499-507, 1998.

CUI, H.; CHEN, C.; WANG, J.; YANG, Y.; CUN, Y.; WU, J.; LIU, Y.; DAN, H.; JIAN, Y.; CHEN, X. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.10, p.1521-1525, 2004.

DROLET, G.; DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**, v.25, p.367-371, 1986.

EDLUND, C.; BEYER, G.; HIEMER-BAU, M.; ZIEGE, S.; LODE, H.; NORD, C.E. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.32, p.81–85, 2000.

ETTREIKI, C.; GADONNA-WIDHEM, P.; MANGIN, I.; COEFFIER, M.; DELAYRE-ORTHEZ, C.; ANTON, P.M. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. **World Journal of Gastroenterology**, v.18, n.21, p.2619-2629, 2012.

FORSYTHE, P.; SUDO, N.; DINAN, T.; *et al.* Mood and gut feel-ings. **Brain, Behavior and Immunity**, v.24, p. 9–16, 2010.

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIQUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.125-140, 2011.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

GEIER, M.S.; BUTLER, R.N.; GIFFARD, P.M.; HOWARTH, G.S. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potent new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) in rats. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 267-274, 2007.

GIRISHKUMAR, B.; HENRY, D.E.; SRINIVASAN, K.; PRAPULLA, S.G. Beneficial effect of a probiotic *Lactobacillus fermentum* CFR 2195 in trinitrobenzenesulfonate induced colitis in rat. **Annals Food science and technology**, v.13, n.2, p.231-239, 2012.

GISBERT, J.P.; GOMOLLÓN, F.; MATÉ, J.; PAJARES, J.M. Role of 5-aminosalicylic acid (5-asa) in treatment of inflammatory bowel disease: a systemic review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n.3, p.471-488, 2002.

GLORIA, M.B.A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p.7480-7485, 2005.

GUARNER, F; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.361, p.512–519, 2003.

GUIDI, L.R. Aminoácidos bioativos em molho de soja: validação de método e ocorrência. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), **Faculdade de Farmácia/UFMG**, 2010.

HANAUER, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Disease**, v.12, p.S3-S9, 2006.

HARIG, J.M.; SOERGEL, K.H.; KOMOROWSKI, R.A.; WOOD, C.M. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. **New England Journal of Medicine**, v.320, p.23-28, 1989.

HOOVER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.283-307, 2002.

HONG, S.S.; CHATURVEDI, R.; PIAZUELO, B.; COBURN, L.A.; WILLIAMS, C.S.; DELGADO, A.G.; CASERO, R.A.; SCHWARTZ, D.A.; WILSON, K.T. Increased expression and cellular localization of spermine oxidase in ulcerative colitis and relationship to disease activity. **Inflammatory Bowel Disease**, v.16, p.1557-1566, 2010.

HOWARTH, G.S. Inflammatory bowel disease, a dysregulated host-microbiota interaction: are probiotics a new therapeutic option? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.23, p.1775-1784, 2008.

JIANG, H.; PRZYBYSZEWski, J.; MITRA, D.; BECKER, C.; BREHM-STECHER, B.; TENTINGER, A.; MACDONALD, R.S. Soy protein diet, but not *Lactobacillus rhamnosus* GG, decreases mucin-1, trefoil factor-3, and tumor necrosis factor- α in colon of dextran sodium sulfate-treated c57bl/6 mice. **The Journal of Nutrition**, v.141, p. 1239–1246, 2011.

JURJUS, A.R., KHOURY, N.N. REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.50, n.2, p.81-92, 2004.

KAUR IP, CHOPRA K AND SAINI A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1–9, 2002.

KINGSTON, D.G.I.; VANTASSEL-RLANDWILKINS, T.D. The *fecapentenes*, potent mutagens from human feces. **Chemical Research in Toxicology**, v.3, p.391–400, 1990.

KRZYŻANOWSKY, F.; AVILA-CAMPOS, M. Detection of nonenterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in São Paulo, Brazil. **Revista Inst Med Trop Sao Paulo**, v.45, p.1–3, 2003.

KINOUCHI, F.L.; MAIA, D.; RIBEIRO, L.; PLACERES, M.; VALDEZ, G.; COLOMBO, L.; ROSSI, E.A; CARLOS, I.Z . A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.4144-4148, 2012.

LANGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, R.; REVIRIEGO, C.; MARÍN, M.L.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Differentiation of *Enterococcus faecium* from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains by PCR and dot-blot hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.197-200, 2003.

LAM, VY.; SU, J.; KOPROWSKI, S.; HSU, A.; TWEDDELL, J.S.; RAFIEE, P.; GROSS, G.J.; SALZMAN, N.H.; BAKER, J.E. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.26, n.4 p. 1727-1735, 2012.

LIN, W., TSAI, W. L., SHAO, R.X., WU, G., PENG, L.F., BARLOW, L.L., CHUNG, W.J., ZHANG, L., ZHAO, H., JANG, J.Y. CHUNG, R.T. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor betal production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB - dependent manner. **Gastroenterology**, v.138, n.7, p.2509-18, 2011.

LIVINGSTON, S.J.; KOMINOS, S.D.; YEE, R.B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, p.448-453, 1978.

MAHIDA, Y.R.; LAMMING, C.E.D.; A GALLAGHER, HAWTHORNE, A.B.; HAWKEY, C.J. 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin II production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v.32, p.50-54, 1991.

MALAGO, J.J.; NONDOLI, N. Sodium arsenite reduces severity of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rats. **Journal of Zhejiang University Science**, v.9, n.4, p.341-350, 2008.

MARINO, M.; MAIFRENI, S.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.2, p.169-173, 2000.

MARZOTTO, M.; MAFFEIS, C.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R.; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei*: A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Research in Microbiology**, v.157, p.857-866, 2006.

MATER, D.D.G; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M.I.; MOGENET, A.; BRESSON, I.L.; CORTHIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiology Letters**, v.250, p.185-187, 2005.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R.; FUKUDA, M.; OYAIZU, H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA gene-targeted species-specific primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4506-4512, 1999.

MATSUMOTO, M.; BENNO, Y The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: a pilot study. **Microbiology and Immunology**, v.51, n.1, p. 25-35, 2007.

MATSUMOTO, M.; KURIHARA, S.; KIBE, R.; ASHIDA, H.; BENNO, Y. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. **PLoS One**, v.6, n.8, 2011.

MEDINA, M.; IZQUIERDO, E.; ENNAHAR, S.; SANZ, Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. **Clinical and Experimental Immunology**, v.150, p.531–538, 2007.

MESSAOUDI, M.; LALONDE, R.; VIOLLE, N. *et al.* Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. **British Journal of Nutrition**, v.105, p.755-76, 2011.

MITSUOKA T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.236-268, 1990.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v.24, p.184-197, 2005.

MONTESI, A.; GARCÍA-ALBIACH, R.; POZUELO, M.J.; PINTADO, C.; GONI, I.; ROTGER, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.281-289, 2005.

MOUSSA, L.; BÉZIRARD, V.; SALVADOR-CARTIER, C.; BACQUIÉ, V.; LENCINA, C.; LÉVÊQUE, M.; BRANISTE, V.; MÉNARD, S.; THÉODOROU, V.; HOUDEAU, E. 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**, v.7, n.11, e49547, 2012.

MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environment Microbiology**, v.54, p.1715–1718, 1988.

MURTHY, S.N.S.; COOPER, H.S.; SHIM, H.; SHAH, R.S.; IBRAHIM, S.A.; SEDERGRAN, D.J. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. **Digestive Diseases and Sciences**, v.38, p.1722-1734, 1993.

MYLONAKI, M.; RAYMENT, N.B.; RAMPTON, D. *et al.* Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.11, p.482-487, 2005.

NANDA-KUMAR, N.S.; BALAMURUGAN, R.; JAYAKANTHAN, K.; PULIMOOD, A.; PUGAZHENDHI, S.; RAMAKRISHNA, B.S. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulphate. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.23, p.1834-1839, 2008.

NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M.L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76(6), p.1249-55, 2002.

NASSRI, C.G.G.; NASSRI, A.B; FAVERO, E.; ROTTA, C.M.; MARTINEZ, C.A.R.; MARGARIDO, N.F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.28, n.3, p.306-314, 2008.

NEMOTO, H.; KATAOKA, K.; ISHIKAWA, H.; IKATA, K.; ARIMUCHI, H.; IWASAKI, T.; OHNISHI, Y.; KUWAHARA, T.; YASUTOMO, K. reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.57, n.11, p.2955-2964.

OBAYASHI, M.; MATSUI-YUASA, I.; MATSUMOTO, T.; KITANO, A.; KOBAYASHI, K.; OTANI, S. Polyamine metabolism in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.87, n.6, p.736-740, 1992.

OCÓN, B., ANZOLA, A.; ORTEGA-GONZALEZ, M.; ZARZUELO, A.; SUÁREZ, M.D.; MEDINA, F.S.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Active hexose-correlated compound and *Bifidobacterium longum* BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis. **European Journal of Nutrition**, v.52, n.2, p.457-466, 2013.

OGAWA, H. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.309, n.3, p.512-9, 2003.

OSMAN, N.; ADAWI, D.; MOLIN, G.; AHRNE, S.; BERGGREN, A.; JEPSSON, B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. **BMC Gastroenterology**, v.6, p.6-31, 2006.

OZAKI, K.; MAKINO, H.; AOKI, M.; MIYAKE, T.; YASUMASA, N.; OSAKO, M.K.; NAKAGAMI, H.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Therapeutic effect of ribbon-type nuclear factor-kb decoy oligonucleotides in a rat model of inflammatory bowel disease. **Current Gene Therapy**, v.12, n.6, p.484-492(9), 2012.

PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; NIETO, A.; CONCHA, A.; ADRIO, J.L.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. **International Journal of Colorectal Disease**, v.21, p.737-746, 2006.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p.417-429, 2002.

RAMIAH, K.; VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. **Research in Microbiology**, v.159, p.470-475, 2008.

RANGANNA, K.; YOUSEFIPOUR, Z.; YATSU, F.M.; MILTON, S.G.; HAYES, BE. Gene expression profile of butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.254, n.1-2, p.21-36, 2003.

REDONDO, N.C. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP**, 2008.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n.7, p.1398S-1401S, 1999.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Surgery**, v.22, n.4, 1998.

ROSSI, E. A.; REDDY, K. V.; SILVA, R. S. S. F. Formulation of soy-whey yogurt, using response surface methodology. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, p. 387-390, 1984.

SAKATA, S.; KITAHARA, M.; SAKAMOTO, M.; HAYASHI, H.; FUKUYAMA, M.; BENNO, Y. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1945–1951, 2002.

SEGAIN, J.P.; RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE, D.; BOURREILLE, A.; LERAY, V.; GERVOIS, N.; ROSALES, C.; FERRIER, L.; BONNET, C.; BLOTTIÈRE, H.M.; GALMICHE, J.P. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v.47, p.397–403, 2000.

SEKSIK, P.; RIGOTTIER-GOIS, L.; GRAMET, G.; SUTREN, M.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; JIAN, R.; DORÉ, J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**, v.52, p.327-242, 2003.

SHAHIDI, N.; FU, Y.N.; QIAN, H.; BRESSLER, B. performance of interferon-gamma release assays in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.18, n. 11, p. 2034-42, 2012.

SHIGUEMOTO, G.E.; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C.H.; VALDEZ, G.M.F.; PEREZ SEA, A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, v. 57, p.261–270, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos** – 3ª.ed. São Paulo: Livraria Varela, v.1. p.536, 2007.

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. **European Food Research and Technology**, v.228, p.231-237, 2008.

SOKOL, H.; LEPAGE, P.; SEKSIK, P. *et al.* Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3172-3177, 2006.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1031-1064. 2001.

TOURÉ, R.; KHEADRL, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1058–1069, 2003.

TRAVIS, S.P.L.; STANGE, E.F.; LÉMANN, M.; ORESLAND, T.; BEMELMAN, W.A.; CHOWERS, Y. *et al.* European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. **Journal of Crohn's and Colitis**.v.2, n.1, p.24-62, 2008.

URONIS, J.M.; ARTHUR, J.C.; KEKU, T.; FODOR, A.; CARROLL, I.M.; CRUZ, M.L.; APPELYARD, C.B.; JOBIN, C. Gut microbial diversity is reduced by the probiotic vsl#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.17, n.1, p.289-297, 2011.

VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H VERSTRAETE, W. Prebiotic effect of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 51, n.1, p. 143 – 153, 2004.

VENDRAMINI, A.P. Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP**, 2002.

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M.J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T.R.; VAN SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.61–71, 2009.

VINOLO, M. A. R. Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiologia humana), **Universidade de São Paulo –USP**, 2010.

VOWINKEL, T.; KALOGERIS, T.J.; MORI, M.; KRIEGLSTEIN, C.F.; GRANGER, D.N. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.49, p.556-564, 2004.

YAN F, POLK DB. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. **Gut Microbes**, v. 3, p.25-28, 2012.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v. 72, p.317–321, 1983.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JÖNSSON, J.A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v.20, p.674–682, 2006.

ZHOU, F.X.; CHEN, L.; LIU, X.W.; OUYANG, C.H.; WU, X.P.; WANG, X.H.; WANG, C.L.; LU, F.G. *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. **World journal of Gastroenterology**, v.18, n.19, p.2344-2356, 2012.

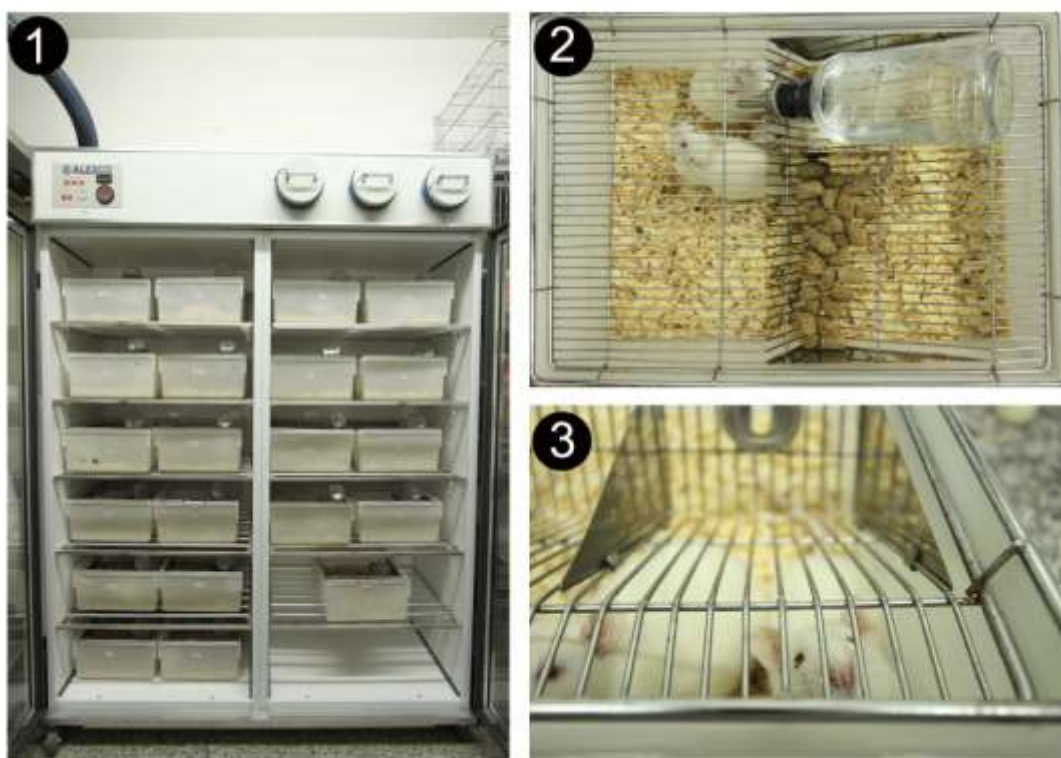
WEBER, T.E.; KERR, B.J. Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.113, n.1-2, p.139-147, 2006.

WINE, E.; GAREAU, MG.; JOHNSON-HENRY, K.; SHERMAN, P.M. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v.300, n.1, p.146-152, 2009.

WOLEVER, T.M.; SCHRADE, K.B.; VOGT, J.A.; TSIHILIAS, E.B.; MCBURNEY, M.I. Do colonic short chain fatty acids contribute to the long term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high fiber diet? *American Journal of Clinical Nutrition*, v.75, n.6, p.1023-1030, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 - 1) Acomodação de ratos Wistar em estante ventilada com sistema de filtração de ar e controle de temperatura e umidade, utilizada no desenvolvimento do protocolo experimental. 2) e 3) Animais acomodados em caixas de polipropileno, com água e ração disponíveis.



Anexo 2 - 1) Ratos Wistar momentos antes de administrar o produto. 2 e 3) Administração do produto e do fármaco por gavagem com o animal imobilizado por tração manual.



Anexo 3 - Galeria API 20-Strep (Biomeri  ux, França) utilizada na identifica  o das espécies de *Enterococcus* spp.



Anexo 4 - Galeria 50 CHL (Biomeri  ux, França) utilizada na identifica  o das espécies de *Bifidobacterium* spp.

