MARIA DA PENHA PÍCCOLO RAMOS

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE *Bifidobacterium breve* CARREADO NO LEITE HUMANO NA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, NA HISTOMORFOMETRIA DO CÓLON, NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E DO NITROGÊNIO EM MODELO MURINO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARIA DA PENHA PÍCCOLO RAMOS

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE *Bifidobacterium breve* CARREADO NO LEITE HUMANO NA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, NA HISTOMORFOMETRIA DO CÓLON, NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E DO NITROGÊNIO EM MODELO MURINO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de dezembro de 2006.

Prof[a]. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Co-Orientadora)

Prof[a]. Neuza Maria Brunoro Costa
(Co-Orientadora)

Prof[a]. Iracilda Zeppone Carlos

Prof[a]. Sylvia do Carmo Castro Franceschini

Prof[a] Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

Aos meus avós paternos João e Angelina Píccolo (*in memoriam*).

Aos meus avós maternos Atilano e Sílvia Valentin Sobreira (*in memoriam)*.

Aos meus pais Mário e Celeste Sobreira Píccolo.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e familiares.

Aos meus filhos Leonardo e Lívia.

Ao Bernardo.

AGRADECIMENTO

À Deus, por tudo na minha vida.

Aos meus pais Mário e Celeste pelo amor incondicional, carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos filhos, Leonardo e Lívia que sempre compreenderam e estiveram presentes em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e familiares, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Nélio José Andrade, Coordenador da Pós-Graduação, à Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

A Profª. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pelo apoio constante e pela amizade ao longo desses anos.

A Profª. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, pelo apoio, pelo carinho, pela disponibilidade e pela valiosa contribuição na realização de todo o experimento relacionado aos animais.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, pela valiosa ajuda profissional.

A Profª. Iracilda Zeppone Carlos, pelo carinho, atenção, pela valiosa ajuda profissional no desenvolvimento deste trabalho e em especial a todos funcionários do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, São Paulo.

A Profª. Neuza Maria Brunoro Costa, pela receptividade e ajuda profissional.

A Profª. Sylvia do Carmo Castro Francheschini pela ajuda na correção dos artigos e pelo apoio em todo o trabalho

A Claudia Lúcia Oliveira Pinto (EPAMIG), pela ajuda profissional e apoio constante.

Ao Prof. Antônio Fernandes de Carvalho pela ajuda na correção dos artigos e pelo apoio recebido

Ao Prof.Jacques Robert Nicoli, Profª. Regina e estagiárias do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela valiosa ajuda no início deste estudo.

Ao Hospital São Sebastião, pelos funcionários e estagiárias que tanto coloboraram neste trabalho para o cadastramento das doadoras.

À minha irmã Maria Angelina Píccolo Maitan, pelo carinho e valiosa ajuda.

Ao Adauto Ferreira Barcelos pela amizade e valiosa ajuda neste trabalho.

A Tanira Corradi e filhos pela amizade constante.

À Luciana Rodrigues Cunha, pela amizade e imensa ajuda na realização desse trabalho.

Às minhas estagiárias(o) e grandes amigas(o) do Laboratório de Culturas Láticas do Bioagro, Flávia, Karina, Elisângela, Carolina, Mariana, Tobias e Natália pelo apoio, pela dedicação e pela preciosa ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Culturas Láticas do DTA/UFV, José Manoel, Natan, Célio, Romilda, Max, Juliana, Tiago, Felipe, pela colaboração, companheirismo e bons momentos passados juntos.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a, Geralda, Vaninha, Lúcia, Dona Lígia, Sr. Manoel, Sr. Luis, Dimas, Adão, Pio, Osvaldo, Fernando, Valério, Juarez, Sr. Zé, Tiago.

Aos funcionários do Bioagro, em especial o Sr. Paulo e Sr. Toninho e Domingos, pela colaboração, pelo carinho e pela ajuda durante o desenvolvimento desse experimento.

Aos colegas do Departamento de Nutrição, Sr. Adão, Cassiano, Pâmela, Jôsi pelo carinho, pela dedicação e pela ajuda durante todo o experimento com os animais.

Aos colegas(as) e estagiários(os) do Laboratório de Biologia Estrutural, Daniela, Lívia, Bruna, Karine, Alex, Nadja, Emanuel e Frederico Gomides, pela valiosa ajuda e amizade.

À Ana Maria, Zefa, Dora, José Carlos, Almira, Rosângela, Terezinha e familiares, sempre atenciosas nos momentos mais difíceis.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade, convívio e troca de experiências.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

BIOGRAFIA

MARIA DA PENHA PÍCCOLO RAMOS, filha de Mário Píccolo e Celeste Sobreira Píccolo, nasceu em 15 de julho de 1958, em Alegre, Espírito Santo. Em Julho de 1980, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa-MG.

Atuou no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, como Bolsista de Aperfeiçoamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de março de 1990 a fevereiro de 1992, e como bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI), CNPq-RHAE, no período de julho de 1992 a junho de 1994, no Laboratório de Culturas Láticas. Em agosto de 1994, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, MG, realizando seus estudos na área de probióticos, culturas láticas e microbiologia de leite e derivados. Aprovada em concurso para professora substituta no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, MG, realizando seus estudos na área de probióticos, microbiologia, culturas láticas e leite materno.

SUMÁRIO

Página

RESUMO x
ABSTRACT xiii
INTRODUÇÃO 16
2. REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1. Leite materno e saúde da criança 19
2.2. Probióticos na saúde humana 25
2.3. Probióticos e imunomodulação 27
2.4. Citocinas e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2) 34
2.4.1. Probióticos e produção de substâncias antimicrobianas 38
2.4.2. Estirpes probióticas bem caracterizadas e seus efeitos clínicos 38
2.5. Microbiota intestinal humana 41
2.5.1. Modulação microbiana intestinal e a camada de muco 43
2.5.2. A estrutura e importância do tubo gastrintestinal 44
2.6. Bactérias bífidas 47

CAPÍTULO 1 53
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LEITE HUMANO MADURO COLETADO EM DOMICÍLIO PARA USO EM BANCOS DE LEITE 53
1. INTRODUÇÃO 53
2. OBJETIVOS 56
3. MATERIAL E MÉTODOS 56
3.1. Coleta do leite humano e análise microbiolóicas dos grupos microbianos presentes nas amostras de leite cru e pasteurizado 56

Página

3.2. Composição das amostras de leite humano ordenhado em domicílio 57
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
5.1. Determinação de valores médios dos grupos microbianos e de pH no leite materno cru (LHC) e pasteurizado (LHP) no período de 10 a 30 dias de lactação 58

CAPÍTULO 2..... 64
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E MODULAÇÃO DA MICROBIOTA NO INTESTINO GROSSO POR MEIO DA INGESTÃO DE LEITE HUMANO E BACTÉRIA PROBIÓTICA EM MODELO MURINO..... 64
1. INTRODUÇÃO..... 64
2. OBJETIVO 67
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 67
3.1. Coleta e formação de *pools* de leite humano 67
3.2. Origem e manutenção das bactérias bífidas 67
3.3. Preparo do concentrado celular das bactérias bífidas..... 69
3.4. Animais..... 70
3.5. Coleta do conteúdo cecal 71
3.6. Processamento do cólon ascendente para análise histomorfométrica..... 71
3.7. Captura de imagens e análise histomorfométrica 72
3.8. Determinação de pH e contagem dos diferentes grupos microbianos presentes no conteúdo cecal 72
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 73
5.1. Número de células viáveis no concentrado celular de *Bifidobacterium breve*..... 73
5.2. Análise histomorfométrica da mucosa do cólon ascendente..... 73
5.3. Valores médios de pH e da concentração bacteriana do conteúdo cecal de animais..... 80

CAPÍTULO 3..... 82
INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE LEITE HUMANO ADICIONADO OU NÃO DE *Bifidobacterium breve* NA DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS IL-4, IL-6, IFN-γ TNF-α, DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DO NITROGÊNIO (NO) E DO OXIGÊNIO (H_2O_2) EM MODELO MURINO 82
1. INTRODUÇÃO..... 82
2. OBJETIVOS..... 86
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 86
3.1. Origem e manutenção das bactérias bífidas 87
3.2. Preparo do concentrado celular das bactérias bífidas a ser adicionado no leite pasteurizado..... 87
3.3. Coleta e preparo dos *pools* de leite humano..... 88
4. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO..... 88

Página

4.1. Obtenção de células do exsudato peritonial (PEC) 89
4.1.1. Ajuste de células peritoniais 90
4.2. Obtenção das células esplênicas 91
4.2.1. Ajuste das células esplênicas..... 91
4.3. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos (IC_{50}) 92
4.4. Quantificação dos compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio 92
4.4.1. Determinação da produção de óxido nítrico 92
4.4.2. Determinação de liberação de peróxido de hidrogênio 93
4.5. Determinação das citocinas IL-6, TNF-α, IL-4 e IFN-γ..... 94
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 95
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 95
6.1. Número de células viáveis no concentrado celular de *Bifidobacterium breve*..... 95
6.2. Viabilidade de macrófagos peritoniais (MTT) 96
6.3. Liberação de Interleucina- 6(IL-6) 97
6.4. Liberação de TNF-α 98
6.5. Liberação de H_2O_2..... 99
6.6. Liberação de Óxido Nítrico (NO) 100
6.7. Liberação de Interleucina-4 (IL-4) 101
6.8. Liberação de IFN-γ 102

CONCLUSÕES..... 109
REFERÊNCIAS 111

RESUMO

RAMOS, Maria da Penha Píccolo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carreado no leite humano na modulação da microbiota intestinal, na histomorfometria do cólon, na produção de citocinas e de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em modelo murino**. Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Orientadoras: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado e Neuza Maria Brunoro Costa.

O objetivo desse trabalho foi avaliar grupos microbianos presentes no leite materno obtido de doadoras voluntárias durante o período de lactação de 10 a 30 dias e sua importância em bancos de leite humano. Verificar também o pH e o processo de modulação dos diferentes grupos microbianos presentes no conteúdo cecal em modelo murino, por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve.* Analisar histomorfometricamente a região do cólon ascendente por meio da determinação da profundidade das criptas intestinais e verificar a resposta imunológica nos animais por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve* no exsudato peritonial e células esplênicas para quantificação de citocinas, compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio. A experimentação foi dividida em quatro fases: Na primeira fase, procedeu-se ao cadastramento das doadoras no hospital e coleta do leite materno em domicílio; determinação da qualidade higiênico-sanitária por meio

da quantificação de coliformes totais, mesófilos aeróbios totais e *Staphylococcus aureus* e determinação de pH em amostras de leite materno cru e pasteurizado. Na segunda fase foram selecionadas sete estirpes de bactérias bífidas (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 e 1111) para comporem o *pool* probiótico que foi adicionado ao leite pasteurizado administrado diariamente aos animais. Na terceira fase do experimento empregou-se em cada repetição 48 fêmeas da raça Wistar com 21 a 23 dias de vida, recém-desmamadas que foram divididas em quatro grupos experimentais: Basal; Controle (dieta); LP (leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado adicionado de bactérias bífidas). Os quatro animais que compuseram o grupo basal foram sacrificados no primeiro dia da experimentação (T0) e aqueles dos outros grupos foram alimentados diariamente (0,1 mL) via oral com auxílio de micropipeta esterilizada com diferentes dietas, durante 21 dias e posteriormente sacrificados. Determinou o pH e verificou-se a modulação de grupos microbianos presentes na região cecal por meio da determinação de contagens de bactérias bífidas, clostrídeos, *Lactobacillus spp*, coliformes totais e mesófilos aeróbios totais juntamente com a análise histomorfométrica da região do cólon ascendente desses animais por meio da determinação da profundidade das criptas intestinais; e na quarta fase do experimento foram utilizados 36 animais fêmeas da raça Wistar os quais foram alimentados diariamente (0,1 mL) via oral com auxílio de micropipeta esterilizada com diferentes tratamentos, que foram Controle (dieta); LP (leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado adicionado de bactérias bífidas), durante 30 dias. Posteriormente foram sacrificados para determinação da resposta imunológica por meio da determinação das citocinas IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α; da citotoxicidade celular, para determinação de compostos intermediários do nitrogênio (NO), e do oxigênio (H_2O_2), no sobrenadante de células do exsudato peritonial e esplênico. Conclui-se neste trabalho que apesar da eficiência do processo de pasteurização para patógenos verificado neste estudo, torna-se urgente a necessidade de conscientização por parte das doadoras no que se refere aos métodos de obtenção de coleta do leite materno. É preciso adoção de medidas mais rigorosas de monitoramento do controle de qualidade higiênico-sanitário na ordenha do leite humano coletado em domicílio, pois são imprescindíveis para garantir um alimento seguro para

os recém-nascidos. Verificou-se nesta experimentação na região do cólon ascendente dos animais um aumento médio do comprimento das criptas com a idade e que esse aumento foi mais pronunciado no grupo de animais que recebeu Leite Pasteurizado (LP) e, também os resultados mostraram que a adição de bactérias bífidas ao leite materno (LPB) não apresentou risco de alteração da histomorfometria do cólon ascendente quanto ao parâmetro avaliado. Esta informação fundamenta que a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado nos bancos de leite humano não interfere na integridade do epitélio e tem potencial de beneficiar as crianças que precisam fazer uso desta alternativa. Conclui-se também que bactérias bífidas adicionadas ao leite pasteurizado (LPB) exerceram efeito antagonista para coliformes totais na modulação da microbiota do conteúdo cecal, quando comparado com os outros tratamentos (LP e controle). Verificou-se também que as bactérias bífidas não apresentaram toxicidade oral com relação a viabilidade dos macrófagos e não promoveram efeito adverso na saúde dos animais testados. Finalmente, a administração de bactérias bífidas na dieta influenciou o sistema imunológico dos animais por meio da liberação dos mediadores apresentados. O acúmulo de informações sobre os efeitos benéficos dessas bactérias probióticas tem justificado sua adição em diversos produtos, incluindo o leite pasteurizado, sob a forma concentrada congelada nos bancos de leite humano, gerando alternativas na área de saúde pública no Brasil. E as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso das bactérias bífidas probióticas justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos e imunomoduladores.

ABSTRACT

RAMOS, Maria da Penha Píccolo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006.

Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Advisers: Izabel Regina Costa dos Santos Maldonado and Neuza Maria Brunoro Costa.

INTRODUÇÃO

O leite materno constitui um suplemento de fatores de proteção para o recém-nascido, além de restringir e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas; a efetividade dessa proteção é fundamental, principalmente em locais de baixo nível socioeconômico e condições sanitárias inadequadas, associadas ao estado fisiológico e grau de imaturidade do bebê (STEVENSON et al., 1985; NEWBURG, 2005; TANRIVERDI et al., 2006).

O leite materno, para ser usado nos bancos de leite, precisa ser submetido ao tratamento térmico de pasteurização, o que garante a sua inocuidade para as crianças, protegendo os recém-nascidos contra uma variedade de doenças. A importância dos bancos de leite humano é incontestável quanto aos aspectos de saúde pública, o Brasil é líder mundial no número desses bancos e o seu papel tem sido reconhecido pela Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento da Ciência, Educação e a Cultura (UNESCO). A coleta das amostras de leite humano deve ser realizada com assepsia, para que não haja contaminação do leite com microrganismos presentes nas porções externas das mamas e/ou do ambiente. O banco de leite humano é um centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e o tratamento térmico da pasteurização é de vital importância para manutenção da qualidade higiênico-sanitária do produto em bancos de leite humano (BRASIL, 1994).

Durante o processo de nascimento e logo após a exposição aos microrganismos, provenientes da mãe e do meio ambiente, dá-se início a um desenvolvimento lento e gradual de uma microbiota densa, e relativamente estável ao longo da vida (MACKIE et al., 1999). Há várias evidências científicas dos aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica, principalmente em relação ao papel desse ecossistema na nutrição e saúde (GIBSON; WILLIANS, 1999).

Lactobacilos e bifidobactérias predominam em crianças alimentadas ao seio, enquanto enterobactérias como *E. coli*, *Bacteroides* e *Staphylococci*, são predominantes em crianças alimentadas com fómulas. Acredita-se, geralmente, que o microambiente produzido por *lactobacilli* e *bifidobacteria*, incluindo o baixo pH do intestino, desencoraja a proliferação de bactérias patogênicas, contribuindo, portanto, para a defesa contra infecção, aumentando a proliferação das células da mucosa e através da assimilação de nutrientes (LUNDEQUIST et al., 1985; MITSUOKA, 1996; LONNERDAL, 1999; ISOLAURI et al., 2004; ISOLAURI, 2001)

A microbiota gastrointestinal pode determinar alterações na microarquitetura e fisiologia da mucosa ao longo do tubo digestivo. Pesquisas de interesse na área de saúde pública, que busquem alternativas a partir de terapias de interferência microbiana, têm sido sugeridas mundialmente com a finalidade, entre outras, de aumentar as respostas imunológicas nas mucosas, e bactérias bífidas probióticas são exemplos (ISOLAURI et al.;2000; RINNE et al., 2005; ISOLAURI et al., 2005).

A colonização e a diversidade dos grupos microbianos presentes no trato gastrointestinal são influenciadas por inúmeros fatores, dentre os quais a disponibilidade de nutrientes da dieta, o pH luminal, a presença de substâncias antimicrobianas e o estímulo do sistema imunológico MacFARLANE; CUMMINGS, 2002; SILVA et al., 2004; RINNE et al., 2005; SALMINEN et al., 2005; PENDERS, 2005).

As bactérias do ácido lático aparentemente aumentam várias funções do sistema imunológico, incluindo ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer. Tem sido proposto que a ingestão dessas bactérias pode aumentar a resistência a infecções por microrganismos patogênicos e que também apresentam potencial de prevenir o câncer. Acredita-se que essas atividades, além de outras,

devem provir da capacidade que têm essas bactérias de estimular macrófagos e linfócitos T (PARK et al., 1999; VINDEROLA, et al., 2004; RINNE et al., 2005; ISOLAURI et al., 2005).

Nos últimos anos, a contribuição do sistema imunológico de mucosas na defesa contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos foi reconhecida (PERDIGON et al., 1990; VINDEROLA et al., 2004). Como as mucosas funcionam como via de entrada de enteropatógenos, existe grande importância estratégica em se prevenir ou alterar o curso natural de doenças infecciosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário. No entanto, sua relativa inacessibilidade torna o sistema imunológico das mucosas difícil de se estudar de maneira seqüencial em experimentos *in vivo.*

Pesquisas com bactérias láticas, demonstram que os probióticos têm efeito imunoestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (CROSS, 2002). Esse efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000); e também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imunológico (CROSS, 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o pH e grupos microbianos presentes no leite materno obtido de doadoras voluntárias durante o período de lactação de 10 a 30 dias e sua importância em bancos de leite humano. Verificar em modelo murino o pH e o processo de modulação dos diferentes grupos microbianos presentes no conteúdo cecal, por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve* e analisar histomorfometricamente a região do cólon ascendente por meio da determinação da profundidade das criptas intestinais. Verificar a resposta imunológica nos animais por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve* no exsudato peritonial e células esplênicas para quantificação de citocinas, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α; da citotoxicidade celular, para determinação de compostos intermediários do nitrogênio (NO), e do oxigênio (H_2O_2), no período de 30 dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite materno e saúde da criança

O leite materno contém aproximadamente 88% de água e sua osmolaridade é similar à do plasma; portanto, o aleitamento exclusivo mantém a criança perfeitamente hidratada (AKRÊ, 1994; VALDÉS et al., 1996; ALMEIDA, 1999). Devido ao crescimento vagaroso da criança, o conteúdo total de proteína do leite humano é o mais baixo entre os mamíferos, e muitas das propriedades benéficas à amamentação infantil podem ser atribuídas ao segmento das proteínas, como fatores de defesa, enzimas digestivas, hormônios e fatores de crescimento (PICCIANO, 1998; KUNZ et al., 1999).

As proteínas do leite incluem caseínas (β-caseína, K-caseína e α-caseína), que estão na concentração média de 0,25 g/dL no leite maduro, e as proteínas séricas, α-lactoalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, albumina e enzimas, em concentração média de 0,7 g/dL. A caseína forma conglomerados estáveis com o cálcio e fósforo, favorecendo assim o transporte desses minerais. A α-lactoalbumina é importante para a síntese de lactose e fatores de proteção como lactoferrina, lisozima e imunoglobulinas; já a β-lactoglobulina, altamente alergênica, é predominante no leite de vaca, sendo somente detectada no leite humano, provavelmente ingerida pela mãe em lactação. A razão proteína/caseína sérica no leite humano varia de 80/20 a 60/40, fato

que resulta na formação de um coágulo gástrico mais macio, reduzindo o tempo de esvaziamento gástrico e facilitando a digestão (LONNERDAL; FORSUN, 1985; RIORDAN, 1998).

A composição de aminoácidos do leite humano é adequada, com níveis reduzidos de fenilalanina e tirosina, pois o recém-nascido mostra uma capacidade reduzida de metabolizar esses aminoácidos, que, em níveis altos no plasma, podem causar letargia (CALIL et al., 1992). A taurina, importante para o desenvolvimento da retina e para a estabilidade das membranas celulares, é encontrada em leite humano, porém não no de vaca. A razão dos aminoácidos sulfurados no leite humano é próxima a 1, razão esta sete vezes mais baixa do que a encontrada no leite de vaca. A enzima cistationase, que é responsável pela transformação da metionina em cistina, torna-se essencial para essas crianças (AKRÊ, 1994).

O leite humano também contém carnitina, uma proteína de alta biodisponibilidade que participa do processo de degradação de ácidos graxos de cadeia longa; importante para os recém-nascidos que mostram capacidade reduzida para sintetizá-la. Os lipídios, no leite humano, permitem a estabilização da emulsão e aumentam a biodisponibilidade dos componentes lipossolúveis; os componentes dos lipídios incluem triglicérides, fosfolipídio e colesterol, assim como ácidos graxos livres, e são derivados da gordura que circula, originada da alimentação e das reservas corporais da mãe, ou sintetizados da glicose no próprio seio (RIORDAN, 1998; SCAGLIA; LONGO, 1999).

Crianças amamentadas apresentam maior concentração de colesterol no plasma do que as alimentadas com leite artificial. Trabalhos mostram o efeito benéfico de uma concentração de colesterol mais alta durante essa fase da vida, com base na sua melhor biodisponibilidade para o desenvolvimento do cérebro e para manter os níveis de colesterol no sangue baixos e adequados durante a vida adulta (PICCIANO, 1998; e HAMOSH, SALEM Jr.,1998).

Quando comparado com o leite de outras espécies, o leite humano representa a melhor fonte de ácidos graxos essenciais para o recém-nascido, com a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (AGCL), com ênfase nos ácidos araquidônico (AA 20:4 n-6) e docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3). Esses compostos desempenham papel importante no

desenvolvimento e crescimento de órgãos e tecidos, principalmente nos primeiros meses de vida. O ácido araquidônico (AA) é um precursor das prostaglandinas e dos leucotrienos, e o ácido docosahexaenóico (DHA) é importante para o desenvolvimento do cérebro e da retina. A presença de DHA nas membranas de células especializadas, como as existentes no cérebro, parece afetar satisfatoriamente ao longo da vida o desenvolvimento cognitivo de crianças amamentadas (ANDERSON et al., 1999; MARANGONI et al., 2000).

Para tentar explicar os processos que fundamentam a transferência dos ácidos graxos da mãe para o leite materno, Marangoni et al. (2002) analisaram as concentrações dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa no plasma sanguíneo e no leite materno de 95 mães saudáveis, com seus respectivos bebês a termo (37-42 semanas), no primeiro dia do parto e durante três meses. Os pesquisadores constataram queda no conteúdo de gordura total no plasma das mães, devido principalmente ao decréscimo de triglicérides, concomitantemente com aumento de lipídeos no leite. Correlações significativas entre os níveis de ácidos graxos no plasma e no leite nos dois tempos avaliados foram observadas apenas para ácido linoléico (LA, 18:2 n-6) e α-ácido linolênico (α LNA, 18:3 n-3), enquanto para os ácidos araquidônico (AA, 20:4 n-6) e decosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3) elas foram verificadas no primeiro dia e três meses, respectivamente. Esses dados sugerem que os níveis de ácidos graxos polinsaturados no leite materno são intimamente dependentes da sua concentração no plasma materno, que por sua vez, depende da dieta, enquanto o acúmulo de AA e DHA no leite é o resultado de uma seqüência de transferência e de processos metabólicos endógenos que precisam ser mais pesquisados.

A presença de enzimas no leite materno, como a lipase lingual, gástrica, pancreática e, especialmente, a lipase estimulada pela bile fornecida pela gordura e ativada pelos sais de bile no duodeno, contribui para a digestão dos triglicérides nos recém-nascidos (PICCIANO, 1998). A concentração do principal carboidrato do leite humano (lactose) é de aproximadamente 7 g/dL, sendo ela metabolizada em galactose, importante para o cérebro em crescimento. A lactose facilita a absorção do cálcio e é utilizada pelas bactérias bífidas, produzindo ácidos orgânicos e inibindo a presença de

bactérias indesejáveis (MITSUOKA, 1989). Glicolipídios, glicoproteínas e oligossacarídeos exercem papel importante na defesa contra infecções. O leite maduro contém cerca de 1,5 g/dL de oligossacarídeos, e cada um destes possui uma combinação variável de glicose, galactose, ácido N-acetilneuramínico, fucose e N-acetilglicosamina (KUNZ et al., 2003).

A concentração de minerais no leite materno é aproximadamente 1/3 mais baixa do que no leite de vaca. Aliada ao reduzido conteúdo protéico, ela contribui para uma quantidade de solutos menor, que é adequada para os rins imaturos do recém-nascido. O conteúdo mineral total do leite humano é geralmente constante e inclui minerais como sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio e fósforo, bem como os elementos-traço ferro, flúor, zinco, cobre, manganês, selênio e iodo (LONNERDAL et al., 1982).

O cálcio está presente em pequenas quantidades no leite humano (aproximadamente 29 mg/dL), estando a maior parte ligada à caseína; a alfa lactalbumina é a principal proteína sérica que se liga a este mineral. Sua concentração é suficiente em recém-nascidos a termo, com uma razão cálcio/fósforo de 2:1, porém são muito baixas para satisfazer as necessidades da mineralização óssea em recém-nascidos pré-termo (LONNERDAL et al., 1982). De acordo com esse autor, o conteúdo de sódio e potássio do leite humano não satisfaz as necessidades dos bebês prematuros, que requerem grande quantidade deste mineral; contudo, a alta biodisponibilidade de zinco compensa a sua baixa concentração, sendo a deficiência desse mineral rara em crianças amamentadas, prevenindo assim a acrodermatite enteropática em recém-nascidos.

Apesar do baixo conteúdo de ferro, a absorção do leite humano é cinco vezes mais alta do que a do leite de vaca, sendo facilitada pela presença da lactose e vitamina C; assim, crianças amamentadas apresentam menor deficiência de ferro. De acordo com Ford et al. (1977), a pasteurização do leite nos bancos de leite humano reduz a concentração de algumas vitaminas, como o ácido fólico e cianocobalamina.

Todas as vitaminas hidrossolúveis são encontradas no leite materno; a concentração da vitamina C é 8 a 10 vezes mais alta do que no plasma materno. Em mães que consomem dietas vegetarianas, os níveis de vitamina B_{12} são freqüentemente mais baixos, podendo levar à deficiência em

crianças amamentadas. Conteúdos no leite materno de vitamina A e β-caroteno são influenciados pela dieta e pelo estado nutricional maternos (GEBRE-MEDHIN et al., 1976). Com relação às vitaminas K e D, a suplementação é requerida para todos os recém-nascidos, já que a produção endógena pelas bactérias entéricas começa apenas alguns dias após o nascimento e no caso de crianças que não estão regularmente expostas ao sol, respectivamente (VAN BEEK et al.,1995).

Os componentes protetores do leite humano que conferem proteção ativa e passiva ao recém-nascido e à criança em amamentação podem ser divididos em fatores celulares e humorais específicos e não-específicos. Os elementos de defesa incluem leucócitos, que estão presentes em grande número no começo da lactação e são conhecidos por exercerem atividade no trato gastrointestinal da criança em amamentação, induzindo uma resposta imune sistêmica local. As células imunocompetentes no leite humano são os macrófagos (40-50%) e os neutrófilos polimorfonucleares (40-50%), que têm capacidade fagocítica e exercem ações bactericidas e fungicidas. Além disso, os macrófagos sintetizam os componentes do sistema complemento (C3 e C4), lisozima e lactoferrina, e são um veículo para transporte e armazenagem de imunoglobulinas. Os linfócitos representam 5 a 10% das células brancas do leite e são principalmente formados por linfócitos T, que exercem ação citotóxica sobre microrganismos e estimulam o sistema imunológico da criança em amamentação, ao passo que os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos específicos contra inúmeros patógenos (FALLOT, et al., 1980; HOWIE et al., 1990; XANTHOU, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Os constituintes do leite humano podem interagir com o sistema imunológico do recém-nascido. Um significativo aumento de IgA secretória contida nas secreções salivares e nasais tem sido observado no aleitamento materno *versus* alimentação de fórmula durante os primeiros dias de vida. O leite humano contém grande número de fatores antivirais e bacterianos, como as IgG, IgA, IgM, mais de 20 enzimas ativas, lactoferrina e células, como linfócitos e macrófagos (LONNERDAL, 2002).

Goldman et al. (1994) sumarizaram a composição nutricional e imunológica do leite humano e seu uso na alimentação do recém-nascido pré-termo.

Durante o período do estudo, a sobrevivência de crianças de baixo peso melhorou, aumentando o entusiasmo pelo uso do leite materno para aqueles neonatos comprometidos imunologicamente.

Quando um patógeno no sistema digestivo ou respiratório da mãe é capturado por um macrófago, fornecendo uma informação antigênica é passada para os linfócitos T e então para os linfócitos B, que, os quais se diferenciam em plasmócitos, liberam anticorpos específicos diretamente dentro do seio, resultando na produção de anticorpos específicos, que são encontrados no leite materno protegendo o bebê (AKRÊ, 1994).

Os fatores solúveis específicos estão representados por imunoglobulinas. A imunoglobulina IgA corresponde a 10% da proteína do leite e previne a adesão de microrganismos à superfície intestinal, além de agir contra diversos agentes infecciosos, como rotavírus, vírus respiratório sincicial, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Giardia lamblia* e *Campylobacter*. A IgA secretora inclui IgA dimérica ligada aos receptores de imunoglobulina polimérica e conjugados à glicoproteína produzida nas células epiteliais, que representa o componente secretor. O leite de mães de recém-nascidos de baixo peso contém maior quantidade de IgA do que o de mães de crianças a termo, conferindo maior proteção durante o período em que a criança está mais suscetível a infecções (GRUMACH et al., 1993; HAMOSH; SALEM Jr., 1998; XANTHOU, 1998).

Muitos fatores de proteção não específicos são encontrados no leite humano. A lactoferrina é uma proteína que age como um agente bacteriostático, privando os microrganismos de ferro, além de exercer atividade bactericida, antiviral, antiinflamatória e imunomodulatória. A lisozima é um componente protéico encontrado em grande quantidade no leite humano, que medeia a lise de bactérias e pode exercer efeito imunomodulatório pela liberação de elementos da parede celular bacteriana (HAMOSH, SALEM Jr., 1998; XANTHOU, 1998).

Os componentes do sistema complemento são encontrados no colostro e no leito maduro, porém em menor quantidade no plasma materno ou na criança em amamentação e protege contra infecções respiratórias e entéricas. A proteína que liga a vitamina B_{12} previne a incorporação desta vitamina por *E. coli* e *Bacteroides*, inibindo seu crescimento (LAWRENCE, 2006).

Alguns elementos gordurosos do leite humano também apresentam funções antimicrobianas. Entre os componentes da membrana celular dos glóbulos de gordura, as glicoproteínas, como mucinas, impedem a ligação de bactérias e vírus à mucosa intestinal; a ação detergente dos ácidos graxos livres e monoglicerídeos liberados pela hidrólise de triglicerídeos medeiam a lise de bactérias, vírus e protozoários (HAMOSH; SALEM Jr., 1998).

Evidências indicam a existência de inúmeros outros fatores de proteção no leite materno, como os gangliosídeos, fator de resistência, interferon, fibronectina, glicosaminoglicanas e lipase da bile estimulada. Em adição às suas funções antiinfecciosas, novos estudos demonstraram que o leite humano pode modular a resposta imune na criança em amamentação através de substâncias imunomodulatórias e antiinflamatórias, que alteram a reação do hospedeiro à agressão (LONNERDAL, 2003).

Os fatores imunomodulatórios presentes no leite materno incluem prolactina, lactoferrina, nucleotídeos e citocinas, que, em adição às suas outras funções biológicas e antimicrobianas, são capazes de regular ativamente a síntese e o amadurecimento do sistema imunológico do recém-nascido. Essa atividade estimula a proliferação de linfócitos e a produção de imunoglobulinas, aumentando a atividade celular. Uma ação antiinflamatória do leite materno direta não foi ainda demonstrada *in vivo*, mas estudos epidemiológicos sugeriram que crianças em amamentação estão protegidas contra infecção, não tendo sido observadas lesões evidentes da mucosa intestinal ou respiratória decorrentes de uma resposta inflamatória. Isso é o resultado de um sistema antiinflamatório bem estabelecido no leite humano e descoberto apenas recentemente. Os fatores antiinflamatórios incluem antiproteases, interleucinas, prostaglandinas, acetil-hidrolase de fatores ativantes de plaquetas, IgA secretora e antioxidantes, como vitaminas e peroxidases (LONNERDAL, 2003).

2.2. Probióticos na saúde humana

O termo probiótico foi introduzido por Lilly e Stillwell (1965) para descrever substâncias produzidas por um microrganismo que estimulava o crescimento de outros microrganismos. Desde então, probióticos têm sido definidos de várias maneiras, dependendo dos mecanismos dos efeitos na

saúde e no bem-estar dos humanos. Para Fuller (1989), “probióticos são suplementos alimentares microbianos vivos que afetam beneficamente o animal hospedeiro, melhorando seu equilíbrio microbiano intestinal”. Posteriormente, Havenaar e Huis in Veld (1992) expandiram a definição para incluir usos em alimentos ou não, utilizando uma ou mais culturas probióticas. Salminen et al. (1998), juntamente com um grupo de especialistas europeus, propôs uma definição mais ampla, incluindo também mecanismos não mediados pela mudança da microbiota intestinal. Os principais microrganismos que apresentam propriedades probióticas são as bactérias láticas que possuem algumas características comuns: são Gram-positivas, catalase negativa, não-formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e produtoras de ácido lático (GOMES; MALCATA, 1999; FERREIRA, 2003). As bactérias láticas através da fermentação, transformam alguns açucares, especialmente a lactose em ácidos orgânicos, como os ácidos lático e acético. De acordo com Ferreira (2003), o termo “bactéria ácido lática” inclui atualmente 15 gêneros: *Aerococcus, Atopobium, Bifidobacterium, Brochothrix, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetrogenococcus, Vagococcus* e *Weissella*. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são correntemente utilizados em preparações probióticas em nível tecnológico, sendo não-patogênicas e consideradas como GRAS (Generally Recognised As Safe) (GOMES; MALCATA, 1999).

Microrganismos probióticos são considerados potencialmente bem sucedidos quando apresentam várias propriedades desejadas e são capazes de exercer efeitos benéficos. Os critérios de seleção considerados relevantes para qualquer microrganismo com potencial probiótico prevêem que sejam de origem humana, se for para uso em humanos (especificidade da estirpe); apresentem estabilidade com relação à acidez gástrica e à bile; sejam seguros para uso em alimentos e em ensaios clínicos (GRAS); apresentem efeitos benéficos na saúde, documentados cientificamente e clinicamente validados; e possuam propriedades tecnológicas desejáveis. Dependendo do resultado desejado, um probiótico precisa ter propriedades adicionais, como efeitos no metabolismo do colesterol; biodisponibilidade de vitaminas e minerais; redução da atividade de enzimas fecais pró-carcinogênicas; propriedades de resposta

imune; atuação no metabolismo da lactose com a liberação de β-galactosidase endógena, favorecendo indivíduos intolerantes à lactose; produção de substâncias antimicrobianas; e a característica de co-agregação com patógenos (exclusão competitiva). Entretanto, não há necessidade de preencher todos esses critérios de seleção na elaboração de um produto probiótico (SALMINEN et al., 1998).

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization), para assegurar qualidade e confiança no uso de probióticos em humanos, é preciso seguir alguns critérios e normas, dentre os quais: identificação do gênero e da estirpe por métodos aceitos internacionalmente, como hibridização DNA-DNA ou seqüência do DNA codificando 16SrRNA e identificação da estirpe por eletroforese; os produtos devem conter rótulos estipulando o gênero, a espécie, a quantidade e formulação (líquido, pó, microencapsulado, bactéria revestida), as condições de estocagem, a indicação da quantidade mínima para ingestão diária para conferir o efeito benéfico e o nível de comprovação deste efeito; testes de segurança, incluindo o de resistência a antibióticos, produção de toxinas, atividade hemolítica, a de infecção em modelos animais imunossuprimidos, bem como registrar efeitos nos consumidores e ter os benefícios avaliados em experimentos aleatórios duplo-cego com controle ao acaso (MOTTET; MICHETTI, 2005). A maioria das definições enfatiza que os microrganismos probióticos devem estar viáveis ao alcançar seu local de atuação. Em alguns casos, componentes de bactérias podem exercer efeitos benéficos à saúde, por meio da estimulação da resposta imune.

2.3. Probióticos e imunomodulação

Vários estudos têm reportado que probióticos não-viáveis são capazes de aderir às células em cultura de tecidos, indicando que a viabilidade não é necessária para o mecanismo de adesão. Probióticos inativados pelo calor inibiram a adesão e invasão de um número de bactérias diarreigênicas. Coconier et al. (1993) verificaram que no tratamento de diarréia aguda com *Lactobacillus acidophilus* LB, inativado por calor, a duração da diarréia foi significativamente reduzida, comparada com a reidratação oral, unicamente.

A suplementação de terapia de reidratação com *Lactobacillus* GG viáveis ou inativada por calor reduziu significativamente a duração de diarréia induzida por rotavírus, porém o nível de células secretoras IgA específicas para rotavírus foi significativamente mais alto no grupo que recebeu *Lactobacillus* GG viáveis, comparado com grupo que recebeu a bactéria inativada. As células intestinais produtoras de IgA encontram-se nas placas de Peyer; contudo, de acordo com Majama et al. (1995), a viabilidade das células probióticas pode ser crucial para a captação dos antígenos dos probióticos através das placas de Peyer, o que poderia ser decorrente da maior habilidade dos microrganismos viáveis, em comparação com os não-viáveis, para se ligarem a células M. Alternativamente, a viabilidade pode ser um pré-requisito para a habilidade de os *Lactobacilus* GG direcionarem a captação do antígeno macromolecular para as placas de Peyer. Outros estudos têm também mostrado que, sob administração oral, microrganismos viáveis levaram a uma resposta imunológica mais pronunciada do que aqueles inativados por calor. A produção de INF-γ por células T de indivíduos que consumiram iogurte foi maior naqueles que receberam iogurte contendo bactérias viáveis (HALPERN et al., 1991).

TRAPP et al., 1993, trabalhando com a linhagem de *L. casei Shirota,* morta por calor, administrada oralmente em ratos, diminuiu a produção da secreção de IgE induzida por antígenos. Possivelmente, através da regulação do equilíbrio de citocinas, favorecendo o desenvolvimento de células do tipo Th1. Estirpes de *Lactobacillus* GG e *L. rhamnosus* LC-705 tratadas com calor e aumentaram a sua capacidade de ligação em aflatoxinas. Possíveis mudanças na estrutura da parede celular, mais do que a inativação de estirpes, são responsáveis por aumentar a capacidade de ligação. Isso foi observado também em outros microrganismos, como *L. cremoris, L. lactis* ssp. *diacetylactis*, não-viáveis, que também se mostraram com boa capacidade de se ligarem a carcinógenos (SALMINEN et al., 1998).

Componentes da parede celular, como peptideoglicano, parece ter atividade adjuvante, conferindo estímulos ao sistema imunológico. Essas estruturas se mostram envolvidas na adesão de bactérias láticas à mucosa intestinal (LINK; PAHUD, 1990; FORCHIELLI; WALKER, 2005). Probióticos não-viáveis podem induzir também efeitos biológicos; no caso de probióticos administrados oralmente, adesão e viabilidade, ou a retenção de componentes

termolábeis, parecem ser importantes para o estímulo do sistema imunológico. Entretanto, em muitos casos, mesmo partes da parede celular são capazes de estimular o sistema imunológico, sugerindo que, para estirpes específicas, certos componentes podem ser os princípios ativos. A maioria dos estudos sobre probióticos inativados tem sido conduzida em células microbianas puras. Há, portanto, necessidade urgente de testar leites fermentados em estudos clínicos duplo-cego, placebo-controlado, bem planejados, a fim de estudar a importância dos microrganismos viáveis em alimentos (OUWEHAND et al., 1999).

A principal função do sistema imunológico é prover proteção ao hospedeiro contra a invasão de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A primeira linha de defesa contra os invasores é a barreira física, composta pela pele queratinizada e por membranas mucosas que revestem o trato respiratório e gastrointestinal; as barreiras químicas são representadas por uma variedade de enzimas e outras substâncias que têm ação microbicida direta ou inibem a aderência microbiana às superfícies orgânicas.

Qualquer invasor que ultrapasse essa primeira linha será combatido pelos componentes do sistema imunológico inato e, em seguida, pelo sistema imunológico específico. A imunidade inata envolve elementos como as proteínas do sistema complemento, as proteínas de fase aguda e as citocinas, e elementos celulares, como monócitos, macrófagos, granulócitos, células dentrídicas e células matadoras naturais (NK). Esse sistema caracteriza-se por ter capacidade limitada de diferenciar um microrganismo de outro e apresentar resposta semelhante para diferentes microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os componentes da imunidade específica são os linfócitos e seus produtos, como os anticorpos. Em contraste com a imunidade inata, esse sistema responde de maneira específica a cada microrganismo, possui memória e é capaz de responder mais vigorosamente a exposições repetidas do mesmo antígeno. As imunidades inata e específica funcionam de forma cooperativa. A imunidade inata não só faz a primeira defesa contra os microrganismos, como também desempenha importante papel na indução da resposta específica, e esta, por sua vez, aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Quanto aos recém-nascidos, outro componente da imunidade que atua enquanto a maturação de seu próprio sistema está se processando é a imunidade passivamente adquirida da mãe, por meio dos anticorpos de classe IgG e do leite humano e da microbiota intestinal da mãe. O leite humano contém numerosos componentes protetores; além de proteger a criança passivamente, ele estimula o sistema imunológico por meio de anticorpos antiidiotípicos e da captação de linfócitos, citocinas e outros elementos (HANSON, 2002).

A lactoferrina, componente protéico do leite, é relativamente resistente à digestão enzimática e possui efeitos microbicidas, imunoestimulatórios e antiinflamatórios, pela indução de menor síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (ELASS et al., 2002). A fração oligossacarídica do leite contém análogos a vários receptores para microrganismos na mucosa epitelial. A presença do leite humano durante a colonização neonatal e a subseqüente expansão da microbiota intestinal são fatores fundamentais, não somente para a prevenção de infecções, mas também para induzir a maturação do sistema imunológico (HANSON, 2002).

Prematuros extremos, devido a diferentes fatores, e principalmente bebês com cardiopatias e neuropatias graves, são freqüentemente impedidos de receberem o leite de suas próprias mães; conseqüentemente, a colonização intestinal dessas crianças se faz com uma microbiota desequilibrada, constituída pelas bactérias do ambiente das unidades de terapia intensiva, muitas vezes com bactérias virulentas e submetidas à pressão de seleção de antibacterianos, facilitando a invasão desses microrganismos (LAWRENCE; LAWRENCE, 2004; LAWRENCE, 2006).

A colonização e a diversidade dos grupos microbianos presentes no trato gastrointestinal são influenciadas por inúmeros fatores, entre os quais a disponibilidade de nutrientes da dieta, o pH luminal, a presença de substâncias antimicrobianas e o estímulo do sistema imunológico (SALMINEN et al., 1998; MacFARLANE; CUMMINGS, 2002; SILVA et al., 2004; PENDERS et al., 2005; RINNE et al., 2005).

As bactérias do ácido lático aparentemente aumentam várias funções do sistema imunológico, incluindo ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer. Tem

sido proposto que a ingestão dessas bactérias pode aumentar a resistência a infecções por microrganismos patogênicos e que também apresentam potencial de prevenir o câncer. Acredita-se que essas atividades, além de outras, devem provir da capacidade que têm estas bactérias de estimular macrófagos e linfócitos T (PARK et al., 1999; VINDEROLA et al., 2004; ISOLAURI; SALMINEN, 2005; RINNE et al., 2005).

Nos últimos anos, a contribuição do sistema imunológico de mucosas na defesa contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos tem sido reconhecida (PERDIGON et al., 1990; VINDEROLA et al., 2004). As mucosas funcionam como via de entrada de enteropatógenos, existe grande importância estratégica em se prevenir ou alterar o curso natural de doenças infecciosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário. Entretanto, sua relativa inacessibilidade torna o sistema imunológico das mucosas difícil de ser estudado de maneira seqüencial em experimentos *in vivo.*

A parede intestinal contém macrófagos e linfócitos (células T e B) em íntimo contato com os alimentos no processo de absorção (PESTKA, 1993). As células peritoniais contêm macrófagos, que, por serem células aderentes, se tornam de fácil obtenção, não requerendo desagregação mecânica ou digestão enzimática, como seria necessário para outros tecidos. Os leucócitos na cavidade peritonial fornecem uma proteção imediata contra microrganismos invasores, que podem penetrar na área abdominal devido à agressão intestinal ou lesão. Bellingan et al. (1996), demonstraram que os macrófagos migram do peritônio para os linfonodos, aumentando dessa forma a capacidade de responder a microrganismos invasores, como conseqüência da administração de bactérias láticas.

A cavidade peritonial é freqüentemente utilizada como uma fonte de macrófagos. O lavado peritonial produz cerca de 2 a $8x10^6$ células, das quais 20 a 40% são macrófagos, porém outros tipos celulares também estão presentes. As células B representam 10 a 40% da população, enquanto células T e outros tipos celulares, como as “natural killer” (NK), podem representar pelo menos 20% (PESTKA, 1993).

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imunológico. Eles se originam na medula óssea como monócitos sanguíneos e, após migração e maturação, vão para os tecidos como

macrófagos maduros. Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos, e suas principais funções incluem a fagocitose de partículas estranhas, a apresentação de antígenos e a produção de citocinas; compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2). Desse modo, os macrófagos podem participar de ambas as respostas imunes: inata e adaptativa (JANEWAY; TRAVERS, 2000). Eles exercem a maior função na defesa do hospedeiro contra infecções e formação de tumores. De particular interesse, o NO e o H_2O_2 produzidos pelos macrófagos atuam destruindo ou inibindo o crescimento de bactérias, fungos, parasitas e células tumorais.

O termo macrófago ativado é amplamente utilizado para designar o aumento de suas atividades biológicas. Muitos parâmetros, como aderência, fagocitose, atividade bactericida e características bioquímicas, podem ser tomados como indicativos do grau de ativação dessas células.

Perdigon et al. (1986) estudaram os efeitos da administração oral e intraperitonial de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* na ativação de macrófagos. Os autores utilizaram camundongos Swiss, que receberam as bactérias por oito dias. Após esse período, os macrófagos foram obtidos e avaliados quanto a sua atividade enzimática e capacidade de fagocitose. Os resultados mostraram que a atividade enzimática dos macrófagos nos animais que receberam *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* por via intraperitonial foi dez vezes maior que a do controle; na administração oral, foi cinco vezes maior. Já para o *L. casei,* essa atividade foi três vezes maior nos animais que receberam via intraperitonial e seis vezes maior por via oral. Nos testes de fagocitose, houve aumento em todos os animais tratados, porém aqueles tratados com *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* mostraram os melhores resultados, e eles concluíram que a ingestão de lactobacilos pode representar uma via de estimulação não-específica, podendo ser capaz de aumentar a resposta imune sistêmica ou modular as funções de células imunocompetentes.

Perdigon et al. (1990) verificaram o efeito da ingestão de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* na imunidade local da mucosa em resposta a enteropatógenos. Utilizaram camundongos Swiss, que receberam os microrganismos por via oral em sete dias. No oitavo dia, os animais foram desafiados

com uma dose letal de *Salmonella typhimurium.* Os resultados mostraram que houve aumento dos anticorpos contra *Salmonella* no fluido intestinal e os animais que receberam *L. casei*, bem como na concentração total das imunoglobulinas, detectado em animais tratados com *L. casei*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus,* sendo maiores os níveis de IgA que de IgG. Nos testes imunoenzimáticos houve somente aumento de IgA nos animais tratados com *L. casei.* Os autores concluíram que a ingestão de *L. casei* ou *S. thermophilus* poderia ser utilizada como um método imunobiológico no controle de desordens entéricas.

Esses mesmos autores mostraram, em 1991, que a ativação de macrófagos e linfócitos de camundongos foi muito maior nos animais que receberam produtos fermentados com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* ou ambos, em comparação com aqueles que receberam as culturas sem o processo de fermentação. Eles concluíram que o aumento da resposta imune se deveu às substâncias produzidas por esses microrganismos durante o processo de fermentação, tais como alguns metabólitos e peptídeos de caseína, enzimas bacterianas que promoveram a digestão dos constituintes do leite. Os autores consideraram que a degradação dos constituintes do leite permite maior absorção e estimulação antigênica e que a administração prolongada de leite fermentado por via oral não produz efeitos nocivos, como hepatomegalia, esplenomegalia ou toxicidade ao hospedeiro.

Um mecanismo que poderia explicar o efeito sistêmico da ingestão de lactobacilos poderia ser a translocação desses microrganismos para os linfonodos mesentéricos, onde eles poderiam ativar macrófagos ou células dendríticas, as quais liberariam citocinas pró-inflamatórias e ativadoras.

De acordo com Erickson e Hubbard (2000), os microrganismos probióticos que exercem influências favoráveis ao hospedeiro devido ao seu efeito na microbiota intestinal, podem agir na promoção da saúde humana. Embora a aplicação de probióticos tenha demonstrado tendências em relação à alteração de alguns aspectos da resposta imune, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não estão completamente esclarecidos. Para esses autores, a estimulação da imunidade específica e inespecífica deve resultar na produção de citocinas, e sua determinação pode ser um importante indicador da resposta imune intestinal.

2.4. Citocinas e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2)

As citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa. Elas são produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam diversas respostas de células envolvidas na imunidade e na inflamação. Na fase de ativação da resposta imune, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação de linfócitos; nas fases efetoras da imunidade inata e adaptativa, elas ativam diferentes células com a finalidade de eliminar microrganismos e outros antígenos. As citocinas também estimulam o desenvolvimento de células hematopoiéticas. Na medicina, elas são importantes agentes terapêuticos ou são considerados alvos para antagonistas específicos em numerosas doenças imunes (ROITT et al., 1999).

Dentre as citocinas, o IFN-γ é uma proteína produzida por células NK, TH1CD4+ e TCD8+. O IFN-γ é a citocina liberada pelos linfócitos T e células NK, que ativam o macrófago, destruindo microrganismos fagocitados. O IFN-γ ativa macrófagos, e estes, ativados, são capazes de produzir TNF-α, IL-6, Il-12, radicais de oxigênio e óxido nítrico. O óxido nítrico é produzido pela indução da enzima óxido nítrico sintase nas células imunes em resposta a citocinas, como TNF-α, IFN -γ e IL-2 (JANEWAY; TRAVERS, 1997). A IL-6 é uma citocina sintetizada por fagócitos mononucleares e outras células em resposta a microrganismos e a outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF-α, atuando sobre linfócitos T, B e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O TNF-α é uma das mais importantes citocinas, atuando no início da resposta imune e regulando a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, estando envolvida em eventos locais e sistêmicos, contínuos à inflamação (MARKHATADZE, 1998). O IFN-γ, produzido por células T e NK, aumenta a síntese de TNF-α por macrófagos estimulados com LPS, atuando nos fagócitos mononucleares, para estimular a secreção de IL-1, que por sua vez possui atividade complementar à do TNF-α. Pode-se perceber que as citocinas participam de uma imensa rede dentro do sistema imunológico, e vão interagindo com certas células, que, ao liberarem outros mediadores ou

citocinas, podem atuar sobre as primeiras células ou mesmo em células diferentes (MARKHATADZE, 1998).

A imunumodulação por probióticos através da produção de citocinas tem sido estudada intensivamente nos últimos anos no sobrenadante de células em linhagens de roedores e humanos (NICAISE et al., 1993; MIETTINEN et al., 1996, 1998; MARIN et al., 1997; PARK et al., 1999; TEJADA-SIMON et al., 1999; MAASSEN et al., 2000).

Silva et al. (2004) verificaram o efeito do tratamento oral com bactéria probiótica *Bifidobacterium longum* Bb 46 através do desafio intragástrico com *Salmonella Typhimurium*. Níveis de bactérias nas fezes foram detectados em ratos gnotobióticos e foi feito histopatologia do intestino e em sobrenadante de células esplênicas. Foi verificado níveis de imunoglobulinas IgM, IgG, IgG1, IgG2a, juntamente com a verificação da produção de INF-gama (INF-γ) e Interleucina 10 (IL-10) utilizando o Kit R&D Systems, Minneapolis, MN, USA. Os animais convencionais receberam 0,1 mL de leite probiótico com 10^8 UFC/mL diariamente, 10 dias antes do desafio oral com o patógeno, que foi em torno de 10^2UFC/mL; o tratamento com o produto probiótico continuou até o fim do experimento. Os animais gnotobióticos receberam uma única dose de probiótico no início do experimento. Grupos controle foram tratados com leite desnatado estéril e submetidos ao mesmo procedimento. A maior taxa de sobrevivência (40%) foi observada em animais tratados com probióticos, quando comparados com o grupo-controle (0%); esse efeito protetor foi observado pela histopatologia e pela análise morfométrica, entretanto níveis de *Salmonella Typhimurium* nas fezes foram similares nos grupos-controle e nos que receberam probióticos. Durante o desafio com o patógeno, notou-se decréscimo nos níveis de INF-γ e IgG2a nas fezes dos animais tratados com probióticos. Esses autores concluíram que o efeito protetor contra o desafio dos animais com o patógeno foi devido a uma redução da resposta inflamatória mediada pelo tratamento com *Bifidobacterium longum*, e não ao efeito antagonista populacional, e sugeriram que a suplementação à dieta com bactérias bífidas probióticas poderia fornecer efeitos benéficos contra infecções entéricas.

O efeito de outros lactobacilos sobre a imunidade também tem sido estudado. Ávila (1998) comparou a eficiência de *Lactobacillus acidophilus;* de

uma vacina específica, e da associação desses dois produtos no controle da diarréia por *E. coli* enterotoxigênica em leitões, e demonstraram que os melhores resultados foram obtidos com a combinação de vacina e probiótico. Outro lactobacilo, *Lactobacillus casei* var. Shirota, estimulou a resposta imune celular, aumentando as concentrações de IFN-γ, TNF-α e IL-12 e provocando redução nos títulos de vírus da influenza no trato respiratório quando administrada por via nasal e oral (HORI et al., 2002).

Pesquisas com bactérias láticas demonstram que os probióticos têm efeito imunoestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isso ocorre (CROSS, 2002). Esse efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN et al., 2001); também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imunológico (CROSS, 2002).

Maasen et al. (2000) comprovaram, no entanto, que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal dependia da estirpe de lactobacilos utilizada, salientando a necessidade de realizar uma cuidadosa seleção de microrganismos candidatos a probióticos. De acordo com o autor, *Lactobacillus casei* induziu uma resposta celular tipo 1 em camundongos gnotobióticos, aumentando a produção *in vitro* de IL-12 por células peritoniais e de IFN-γ, por células esplênicas. A administração protegeu camundongos contra patógenos intestinais pela indução do aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (KATO et al., 1983; PERDIGÓN et al.,1990), da atividade das células matadoras (*natural killer*) da produção de fator citotóxico pelas células de Kupfer e macrófagos peritoniais e da secreção de IgA no lúmen intestinal.

L. rhamnosus reduziu a morbidade causado por *E. coli* O157: H7 em camundongos infectados experimentalmente, estimulando o aumento da atividade fagocítica e dos títulos de anticorpos específicos na IgA (SHU; GILL, 2002). Perdigón et al. (2001) demonstraram que *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* interagiram com as células M das placas de Peyer,

estimulando a imunidade secretora específica. Vitini et al. (2000) testaram a influência da administração oral de diferentes espécies de bactérias láticas como *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* e *Streptococcus thermophilus*, e verificaram que o aumento da produção de IgA nem sempre esteve correlacionado com o aumento no número de células T CD_4+, significando que algumas bactérias testadas somente induziram uma ativação das células B produtoras de IgA. Também foi observado que não houve influência sobre as células T CD_8+, indicando que essas bactérias não foram capazes de induzir citotoxicidade.

Yasui et al. (1999) comprovaram que a administração de *Bifidobacterium breve* estimulou o sistema imunológico humoral em camundongos, provocando aumento da produção de IgA anti-rotavírus e de IgG antivírus da influenza, protegendo-os contra essas duas infecções. Shu e Gill (2002) relataram que leitões tratados com *Bifidobacterium lactis* HN109 apresentaram diminuição da diarréia associada com rotavírus e *E. coli*, concomitantemente com o aumento dos títulos de anticorpos contra patógenos específicos no trato gastrintestinal, da concentração de neutrófilos sangüíneos e da resposta proliferativa dos linfócitos T.

As propriedades funcionais de um produto fermentado de soja, utilizando *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*, foram estudadas por Rossi (2000) como sendo hipocolesterolêmico e não alergênico (CARLOS et al., 2000). Posteriormente, Vendramini (2002) estudou o efeito de um produto (iogurte de soja) quanto ao seu potencial estimulador do sistema imunológico. A autora verificou que o iogurte de soja fermentado com bactérias probióticas, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti*, administrado diariamente por 14 dias em camundongos Swiss, na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Na determinação de IL-1; IL-6; IL-12p40; IFN-γ e TNF-α, esta autora concluiu que as células dos animais que receberam o produto fermentado de soja apresentaram maior capacidade de indução da liberação dessas citocinas quando estimuladas com LPS do que células de animais que receberam o produto sem o processo de fermentação (placebo), ao passo que estes mostraram resultados melhores do que os de animais que receberam somente água, evidenciando a participação dos componentes da soja na liberação de citocinas. Houve maior liberação dos níveis de NO e H_2O_2,

somente com as células dos animais que receberam o produto fermentado de soja quando estimulados com LPS ou Zimosan, respectivamente e concluíram que não houve diferença entre os níveis liberados pelas células obtidas dos animais que receberam placebo e água.

2.4.1. Probióticos e produção de substâncias antimicrobianas

Bactérias láticas probióticas, como bactérias bífidas e lactobacilos, produzem substâncias antimicrobianas, como os ácidos orgânicos, especialmente os ácidos lático e acético. Outras produzem também peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono, sendo o modo de ação dos ácidos orgânicos (acético e lático) atribuído à redução direta do pH intracelular por ionização dos ácidos não-dissociados, pois eles podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons na célula, induzindo uma acidificação do citoplasma e dissipando o potencial de prótons da membrana; assim, ocorre inibição do mecanismo de transporte de substrato, sendo isso deletério para a célula (DIEZ-GONZALES; RUSSEL, 1997).

Bactérias láticas probióticas são metabolicamente ativas durante sua passagem através do intestino, e é provável que algumas dessas substâncias sejam produzidas. Esse fato vem da observação de que o consumo de certas estirpes probióticas reduz o pH fecal, indicando a produção de ácidos orgânicos.

2.4.2. Estirpes probióticas bem caracterizadas e seus efeitos clínicos

Efeitos relacionados à saúde clinicamente documentados específicos por linhagem, estão relacionados na Tabela 1. Há evidências do alívio de sintomas de intolerância à lactose por estirpes de probióticos específicos e de mudanças imunológicas relacionadas à hipersensibilidade ao leite. A diminuição do tempo de duração da diarréia por rotavírus usando *Lactobacillus* GG é provavelmente um dos melhores efeitos com probióticos documentados em vários estudos científicos pelo mundo e também em recente estudo multicêntrico na Europa. Esses efeitos estão relacionados com a modulação da

composição microbiana do intestino e com atividades e efeitos do sistema imunológico intestinal.

Estudos sobre prevenção de diarréia de viajante mostram resultados positivos para *Lactobacillus* GG e uma combinação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 com *Bifidobacterium lactis* Bb-12, mas existem poucos trabalhos usando estirpes definidas em diarréia aguda. Com isso, mais estudos sobre a diarréia com etiologia conhecida deveriam ser conduzidos, a fim de verificar os mecanismos e resultados.

Tabela 1 - Efeitos dos probióticos em estudos clínicos humanos

Problema	Efeitos Clínicos Documentados	Estirpe Probiótica	Referências
Intolerância à lactose	Digestão da lactose melhorada. Redução/falta de sintomas.	Yoghurt, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *L. bulgaricus*	Kolars et al. (1984) Marteau et al. (1990) Marteau et al. (1996) Pochart (1996)
Diarréia por rotavírus	Redução da duração da diarréia. Aumento da resposta imune. Excreção do rotavirus reduzida.	*Lactobacillus* GG, *L. reuteri*, *Bifidobacterium bifidum* *Streptococcus thermophilus*	Isolauri et al. (1991) Shornikova et al. (1997) Saavedra et al. (1994) Perman et al. (1994)
Diarréia do viajante	Reduzida incidência da diarréia.	*L. acidophilus* La-5, *B. lactis* Bb, *Lactobacillus* GG	Black et al. (1989) Oksanen et al. (1990) Hilton et al. (1997)
Imunomodulação	Maior número de células secretando IgA específico para o rotavírus, atividade adjuvante, fagocitose aumentada.	*Lactobacillus* GG, *L. ohnsonii* Lj-1, *B. lactis* Bb-12	Schiffin et al. (1994) Kaila et al. (1995) Pelto et al., 1998
Atividade enzimática fecal	Redução de urease, hidrolase ácida glicocólica, β-glucoronidase, nitroredutase e atividade azoredutase.	*Lactobacillus* GG, Yoghurt, *L. gasseri* (ADH), *L. casei* Shirota	Ling et al. (1994) Pedrosa et al. (1995) Spanhaak et al. (1998)
Câncer superficial de bexiga	Recorrência reduzida.	*L. casei* Shirota	Aso et al. (1995)
Câncer cervical	Sobrevivência prolongada e intervalo sem recaída.	*L.casei Shirota* LC 9018	Okawa et al. (1993)
Vaginite bacteriana	Reiinfecção reduzida.	*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GR-1	Sieber e Dietz (1998)

Fonte: OUWEHAND et al., 2001.

Estirpes específicas de bactérias probióticas são capazes de promover atividade inibitória em enzimas microbianas intestinais, provocando efeitos na

microecologia intestinal, levando a uma redução na atividade das enzimas microbianas iniciadoras de carcinógenos e podendo ter efeito benéfico no cólon, no trato urinário e na bexiga. Ao mesmo tempo, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico, pode melhorar a nutrição e a integridade da mucosa.

A administração oral de *Lactobacillus casei var.* Shirota mostrou propriedades inibitórias em tumores quimicamente induzidos em ratos. Em dois estudos clínicos, efeitos profiláticos da administração oral de *L. casei* Shirota na recorrência de câncer superficial de bexiga foram estudados. Trabalhos recentes também indicam que *L. casei* Shirota pode prolongar a sobrevivência durante os tratamentos específicos do câncer. Os efeitos benéficos da terapia de câncer com probióticos têm sido associados às suas propriedades anti-mutagênicas e à habilidade de modular parâmetros imunológicos, incluindo células T, células matadoras naturais (NK) e atividade de macrófagos, que são importantes no impedimento do desenvolvimento do tumor.

A imunomodulação por probióticos pode ser devido à habilidade de mudar a atividade das subpopulações de células T-auxiliares CD4+ para a ativação de células Th1. Os probióticos parecem causar essa mudança através da modulação dos padrões de citocinas. Estas, quando produzidas pelas células Th1, são de particular importância nas respostas imunológicas mediadas por células. As citocinas primárias secretadas por células Th1, IFN-γ, fator de necrose tumoral (TNF)-α e IL-2 mostraram ser produzidas em altos níveis na presença de probióticos. (IFN)-γ ativou macrófagos e induziu a diferenciação de linfócitos T citotóxicos; IL-2 ativa células NK; e linfócitos T citotóxicos e TNF-α têm propriedades tumorais citotóxicas. Também, como infecções virais foram sugeridas participarem da etiologia do câncer superficial de bexiga, as propriedades antivirais de IFN- γ e TNF-α podem ser importantes.

Além disso, IFN-γ tem efeitos sinergísticos na secreção de TNF-α, o qual também possui propriedades antivirais e tem sido sugerido ser agente terapêutico para pacientes com câncer de bexiga superficial com maior potencial. TNF-α pode também ser induzido por probióticos.

Em se tratando de vaginite bacteriana, ainda não há terapia de administração oral bem elucidada, porém, em estudos recentes, existem indicações

de que a adesão competitiva de bactérias probióticas, assim como o estímulo do sistema imunológico e a produção de agentes antimicrobianos, podem ser benéficos na prevenção e no tratamento dessa doença (SOBEL, 1999).

2.5. Microbiota intestinal humana

A microbiota normal constitui um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos e bioquímicos no hospedeiro. Ela é constituída por um número considerável de microrganismos, em torno de 10^{14} células viáveis por indivíduo, pertencentes a aproximadamente 300 a 400 espécies microbianas diferentes/ indivíduo e que desenvolvem três grandes funções importantes no local que colonizam (TANNOCK, 1998; AMROUCHE et al., 2006; FORCHIELLI; WALKER, 2005; RASTALL et al., 2005).

A primeira função da microbiota chamada de resistência à colonização ou efeito de barreira microbiológica, pode ser definida como a capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de microrganismos exógenos que por acaso penetram no ecossistema digestivo. Essa proteção envolve mecanismos como a competição por nutrientes essenciais, por sítios de aderência no epitélio e a produção de substâncias ou metabólitos antagonistas. A imunomodulação é outra função importante nas infecções, já que permite resposta das defesas imunológicas locais e sistêmicas do hospedeiro a uma tentativa de agressão por microrganismos patogênicos. A terceira função da microbiota é a sua contribuição nutricional. Ela oferece diversas fontes energéticas e de vitaminas, além de participar da regulação da fisiologia digestiva do hospedeiro. Algumas bactérias intestinais sintetizam vitaminas, incluindo riboflavina, B_{12}, K, tiamina, ácido fólico e ácido pantotênico, que são em parte absorvidas e utilizadas pelo hospedeiro. Os ácidos graxos voláteis, como o acético, butírico e propiônico, são importantes fontes energéticas e participam também do controle do pH intestinal, na absorção de água e sais, e, no caso do butirato, da diferenciação celular do epitélio intestinal (SAVAGE, 1977; MacFARLANE; CUMMINGS 2002).

Ao nascimento, a criança se apresenta totalmente livre de microbiota associada, e é fundamental para ela que as suas superfícies e mucosas sejam

rapidamente colonizadas pelos microrganismos que desenvolvem as funções citadas anteriormente. Aparentemente, a microbiota gastrointestinal de uma criança só atinge as características populacionais e funcionais de um adulto após seis meses a um ano de vida. Portanto, a fase de colonização digestiva no recém-nascido é um período crítico durante o qual a chegada de um microrganismo potencialmente patogênico a um ecossistema ainda incompleto e pouco funcional pode ser extremamente prejudicial. Diversas evidências sugerem ainda que uma seqüência de implantação anormal contribuiria para o estabelecimento de uma microbiota menos eficiente nas suas funções (BERG, 1996).

A primeira fonte de microrganismos que constituirá a microbiota digestiva normal do recém-nascido é a mãe, tanto durante o parto, sendo este natural ou cesariana. O bebê entra em contato com os ecossistemas vaginal e fecal da mãe, quanto posteriormente, quando entra em contato com o ecossistema cutâneo nos contatos íntimos da amamentação. Variações podem ocorrer na cinética de implantação do ecossistema digestivo do recém-nascido em função de fatores que perturbam o fornecimento dos microrganismos pela mãe, como, por exemplo, a necessidade de isolamento em Unidade de Terapia Intensiva, ou, quando prematuro, mantido em incubadoras (ROLF, 1990).

Fatores próprios do hospedeiro influenciam fundamentalmente a colonização, o controle, a composição e a função da microbiota intestinal. A natureza e quantidade desses fatores endógenos dependem provavelmente de características genéticas, nutricionais, fisiológicas e psicológicas do hospedeiro, entre outras. Alguns componentes do colostro e do leite humano são conhecidos por oferecerem condições nutricionais favoráveis à implantação de alguns grupos bacterianos de importância para a saúde do hospedeiro, como as bactérias bífidas (BERG, 1996).

Os fatores bífidos são oligossacarídeos presentes em quantidade elevada somente nas secreções lácteas humanas; pelas características de ligações das suas unidades, só podem ser utilizados pelas bactérias bífidas, podendo ser considerados, portanto, como fatores de crescimento que favorecem a implantação específica dessas bactérias no trato digestivo do recém-nascido humano. Uma vez instaladas, juntamente com a baixa capacidade tamponante do leite humano, permitem também melhor atuação

das bactérias produtoras de ácido lático, devido ao abaixamento do pH intestinal desfavorável ao crescimento de vários microrganismos patogênicos (SAVAGE, 1977; MacFARLANE; CUMMINGS, 2000; SAARELA et al., 2002; AMROUCHE et al., 2006).

2.5.1. Modulação microbiana intestinal e a camada de muco

O epitélio gastrintestinal é coberto por um gel de muco protetor composto predominantemente de glicoproteínas que são as mucinas, que oferecem numerosas vantagens ecológicas para as bactérias intestinais sendo um excelente nicho bacteriano, devido aos oligossacarídeos presente nas mucinas e representam uma fonte direta de carboidratos e peptídeos, nutrientes exógenos, incluindo vitaminas e minerais. As mucinas são secretadas da superfície apical de células tronco especializadas, são sintetizadas e secretadas pelas células caliciformes. Mudanças nas funções destas células e na composição química do muco intestinal são detectadas principalmente em relação a alterações da microbiota normal. Dados disponíveis na literatura científica indicam que a microbiota intestinal pode afetar a dinâmica das células caliciformes e a camada de muco diretamente através da liberação local de componentes bioativos ou indiretamente via ativação das células imunológicas do hospedeiro (DEPLANCKE; GASKINS, 2001).

Nos intestinos delgado e grosso, a microbiota influencia, entre outros processos, a diferenciação do epitélio intestinal; a síntese de mucinas pelas células caliciformes (DEPLANCKE; GASKINS, 2001); a distribuição e a constituição do tecido linfático associado à mucosa intestinal (GALT), o qual comporta grande parte de nossas células de defesa (FALK et al., 1998). O GALT é um importante regulador do crescimento bacteriano da luz intestinal, podendo impedir a adesão das bactérias na mucosa e diminuir a possibilidade de supercrescimento; as células de defesa da lâmina própria exercem controle sobre os microrganismos que conseguiram romper a barreira epitelial, impedindo a translocação para outros órgãos. Uma mucosa em boas condições, bem como um sistema imunológico atuante, apresentam as chances de translocação bacteriana minimizadas (BERG, 1999; ACHESON; LUCCIOLI, 2004).

A microbiota intestinal serve como estímulo primário para o desenvolvimento de componentes natos e adquiridos do sistema imunológico da mucosa. Muito da estrutura e das funções do intestino dos mamíferos parecem ter evoluído para impedir que o hospedeiro tolere os desafios antigênicos e químicos associados com o carregamento permanente de uma microbiota complexa. Os componentes natos e adquiridos do sistema imunológico do intestino interagem para mediar homeostase entre a microbiota e o hospedeiro em condições normais, no entanto a natureza antigênica da bactéria residente e a natureza sensível das células do hospedeiro contribuem para uma relação muito precária (DEPLANCKE ; GASKINS, 2001).

2.5.2. A estrutura e importância do tubo gastrintestinal

O tubo gastrintestinal ou digestório, após a cavidade oral, se diferencia em quatro órgãos: esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. A análise histológica revela que a parede de cada um deles é formada por quatro camadas concêntricas: mucosa, submucosa, muscular e adventícia ou serosa. A mucosa é a camada que está diretamente em contato com o lúmen (luz), sendo constituída por três tecidos: o epitélio de revestimento, o tecido conjuntivo frouxo que constitui a lâmina própria e o tecido muscular liso que forma a muscular da mucosa. A camada mucosa apresenta variações histológicas entre os segmentos ou órgãos do tubo gastrintestinal, dentre elas, as projeções da mucosa no intestino delgado, conhecidas por vilosidades ou vilos, que aumentam a capacidade de absorção e que somente existem no intestino delgado (KIERSZENBAUM, 2004). Cada vilosidade é revestida por epitélio simples cilíndrico, tendo um cerne de lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo irrigado com capilares sangüíneos e linfáticos. Entre as vilosidades existem pequenas aberturas de glândulas tubulares simples denominadas glândulas ou criptas intestinais (glândulas de Lieberkühn), que se estendem através de quase toda a lâmina própria até a muscular da mucosa. As criptas, ao contrário dos vilos, existem na mucosa do intestino, delgado e grosso. O tecido epitelial que forma as criptas apresenta diversos tipos celulares diferenciados, além de células tronco ou *stem cells*, que normalmente

proliferam para renovar o próprio epitélio das criptas e das vilosidades (KESSEL, 2001).

A mucosa gástrica e intestinal é recoberta por um fluido viscoso denominado muco que atua como meio de proteção, lubrificação e transporte entre o conteúdo luminal e o epitélio (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). A camada de muco, portanto, não deve ser confundida com a camada mucosa, pois apesar da interação que existe entre as duas, ambas são constituídas de componentes completamente distintos. Embora o muco seja um gel contínuo, a sua espessura é variável ao longo do tubo gastrintestinal. Em humanos, por exemplo, a camada de muco pode atingir a espessura de aproximadamente 450 micrômetros no estômago (DEPLANCKE; GASKINS, 2001), já que o epitélio da mucosa gástrica precisa ser protegido do conteúdo ácido existente na luz (KESSEL, 2001). Já no reto humano, a espessura da camada de muco está em torno de 285 micrômetros (MATSUO et al., 1997), sendo que uma das funções importantes do muco nesse local é facilitar o trânsito das fezes. O principal componente do muco são as mucinas, produzidas por células secretoras mucosas. Um exemplo típico de célula secretora mucosa é a célula caliciforme (*goblet cell*), um tipo celular muito freqüente nas criptas intestinais. As mucinas constituem um grupo heterogêneo de glicoproteínas de elevado peso molecular, caracterizadas pelo alto grau de O-glicosilação, de modo que o componente glicídico pode alcançar até 80% da massa da molécula (GÓES; TABOGA, 2005). Os oligossacarídeos das mucinas são utilizados pelas bactérias bífidas, microrganismos comensais que exercem efeitos benéficos no intestino grosso, destacando-se atividade anticarcinogênica e imunomodulação (KATAYAMA et al., 2005). Por outro lado, o muco também atua como importante barreira à penetração de patógenos, pois forma uma trama hidrofílica que agrega agentes antimicrobianos, como o fator *trefoil*, lisozima, transferrina e imunoglobulinas (GÓES; TABOGA, 2005).

As outras camadas que constituem a parede do tubo digestório também desempenham funções importantes, porém, não com a mesma relevância da mucosa, principalmente no que se refere aos processos de digestão, absorção e interação com a microflora. Entretanto, cabe citar que a submucosa consiste em tecido conjuntivo variável entre frouxo e denso e a muscular é, na maior parte do tubo digestório, composta de duas lâminas relativamente espessas de

músculo liso com orientações diferentes (circular interna e longitudinal externa). A camada mais delgada que recobre a superfície do tubo é designada de serosa, quando constituída por epitélio simples pavimentoso e tecido conjuntivo frouxo. Contudo, em alguns segmentos do tubo, como por exemplo, no esôfago, existe uma camada adventícia, no lugar da serosa e que consiste apenas em tecido conjuntivo frouxo (KESSEL, 2001)

As funções básicas do tubo gastrintestinal são a digestão e absorção seletiva dos nutrientes necessários para o crescimento e a manutenção da estrutura do organismo. A seletividade de suas propriedades digestivas e da absorção pressupõe tanto a passagem dos nutrientes da luz intestinal para a circulação sangüínea e linfática como a função de barreira contra agentes nocivos (POWELL, 1994).

Contudo, cabe ressaltar que o intestino grosso tem conformação anatômica e comportamento funcional diferenciados do restante do tubo digestório, inclusive em relação ao próprio intestino delgado. Em termos anatômicos, o intestino grosso se inicia na valva ileocecal e termina no ânus, sendo subdividido nos humanos em ceco, apêndice vermiforme ou cecal, colo ascendente, colo transverso, colo descendente, colo sigmóide e reto (KESSEL, 2001). Já, no rato, o intestino grosso é subdividido apenas em ceco, colo ascendente, colo descendente e reto, tendo um comprimento aproximado de 15 cm em ratos F-344 (KRINKE, 2000). As principais funções do intestino grosso são: absorção de água, intercâmbio de eletrólitos e de outras substâncias com o meio interno e a eliminação de resíduos alimentares não absorvidos sob a forma de fezes (KESSEL, 2001).

Sob o ponto de vista histológico e em comparação com o intestino delgado, a mucosa do intestino grosso apresenta criptas mais retas e longas. Além disso, as células caliciformes também são mais abundantes na mucosa do intestino grosso. A lâmina própria da mucosa e a camada submucosa do intestino grosso podem apresentar grande incidência de nódulos linfáticos, especialmente na altura do ceco (KESSEL, 2001).

O câncer de cólon é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade por câncer entre homens e mulheres. Existem evidências de que bactérias probióticas poderiam inibir a carcinogênese através de vários mecanismos, dentre eles, estímulo da resposta imune do hospedeiro, a ligação

e a degradação de compostos com potencial carcinogênico e alterações qualitativas e/ou quantitativas na microbiota intestinal envolvida na produção de carcinógenos (SAAD, 2006).

Uma das funções do trato gastrointestinal é a digestão e absorção seletiva dos nutrientes necessários para o crescimento e a manutenção da estrutura do organismo. A seletividade de suas propriedades digestivas e da absorção pressupõe tanto a passagem dos nutrientes do lúmen intestinal para a circulação sanguínea e linfática como a função de barreira contra agentes nocivos (POWELL, 1994). Ele está exposto, desde o nascimento e diariamente, a microrganismos potencialmente prejudiciais provenientes do meio (CLARKSON, 1995). Em indivíduos sadios existem mecanismos complexos, inter-relacionados, que permitem que se estabeleça e mantenha uma microbiota gastrointestinal resistente, normal, que se encontra em harmonia com o meio externo, especialmente durante as etapas da infância (GRACEY, 1999).

2.6. Bactérias bífidas

No final do século XIX, as bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez por Tissier no Instituto Pasteur, na França, sendo caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase-negativos, anaeróbios e sem flagelos. No que se refere à morfologia, podem se apresentar na forma de bacilos curtos e curvados e bacilos bifurcados. São caracterizadas por um conteúdo elevado de guanina e citosina, variando em termos molares de 54 a 67%; possuem também diferenças notáveis em relação às propriedades fisiológicas e bioquímicas, incluindo os constituintes da parede celular. A temperatura ótima de crescimento varia entre 37 e 41 ^{o}C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45 ^{o}C e 25-28 ^{o}C, respectivamente; em relação ao pH, o ótimo verifica-se entre 6 e 7, com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4,5-5,0, ou a valores de pH alcalinos de 8,0-8,5. São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e lático na proporção molar de 3:2 a partir de dois moles de hexose, sem produção de CO_2, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima-chave dessa via metabólica é a frutose 6-fosfato fosfocetolase (F6FFK), sendo usada como

marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies (RASIC; KURMANN, 1983; SGORBATI et al., 1995).

Bactérias bífidas são microrganismos de extrema importância presentes no complexo ecossistema do trato gastrointestinal do ser humano, de outros mamíferos e em abelhas; encontram-se distribuídas em diversos nichos ecológicos, sendo dependentes da idade e dieta alimentar. São microrganismos dominantes da microbiota endógena dos recém-nascidos, sendo o seu crescimento estimulado pelos componentes glicoprotéicos da k-caseína. Ocorrem alterações nos perfis das espécies ao longo da vida, uma vez que *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve*, típicos dos recém-nascidos, são substituídos nos adultos por *Bifidobacterium adolescentis*, porém *Bifidobacterium longum* é uma espécie que perdura ao longo de toda a vida do hospedeiro, sendo um dos motivos de ser a espécie mais utilizada em alimentos probióticos comercializados no mundo (GOMES; MALCATA., 1999; MITSUOKA, 1990; RASIC; KURMANN., 1983; SGORBATI et al., 1995).

Os fatores bifidogênicos são carboidratos que resistem ao metabolismo direto do hospedeiro e, por isso, atingem o intestino, onde são metabolizados preferencialmente por bifidobactérias. Esses fatores são incluídos no conceito de prebióticos, termo utilizado para compostos não digeríveis pelas enzimas digestivas, mas que afetam de modo benéfico o hospedeiro, através do favorecimento do crescimento e/ou exibição da atividade seletiva em relação a um número limitado de bactérias do intestino capazes de contribuir beneficamente para a saúde (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Lactobacilos e bifidobactérias predominam em crianças alimentadas com leite materno, enquanto *E. coli*, *Bacteroides* e *Staphylococci*, são predominantes em crianças alimentadas com fórmulas. Acredita-se, geralmente, que o microambiente produzido por *lactobacilli* e *bifidobacteria*, incluindo o baixo pH do intestino, inibe a proliferação de bactérias patogênicas, contribuindo, portanto, para a defesa contra infecção, aumentando a proliferação das células da mucosa e através da assimilação de nutrientes (LUNDEQUIST et al., 1985; MITSUOKA, 1996; LONNERDAL, 1999; ISOLAURI et al., 2004).

A maioria dos estudos até hoje é de natureza descritiva, em que compostos e células são isolados e caracterizados e testados *in vitro*; somente em alguns poucos casos foram conduzidos estudos com animais. São raros os ensaios clínicos (duplo-cego, placebo controlado) para avaliação do significado fisiológico e dos possíveis efeitos sinergísticos de cada componente presente no leite materno. Além dos mecanismos envolvidos entre estes componentes e bactérias benéficas ao hospedeiro, como as bactérias bífidas, as células intestinais e o sistema imunológico de desenvolvimento serão possivelmente elucidados com as técnicas já existentes, aliadas às novas técnicas de biologia molecular, fornecendo suporte adicional para o papel do aleitamento materno no desenvolvimento das doenças crônicas (LONNERDAL, 2000).

No nascimento, a microbiota intestinal é adquirida no canal do parto, e sua composição definitiva é obtida em torno dos dois anos de idade. No adulto, o número de bactérias da microbiota intestinal é 10 vezes maior que o de células formadoras de órgãos e tecidos, isto é, 10^{14} bactérias para 10^{13} células humanas (TANNOCK, 1999). Esta microbiota pode ser autóctone, que corresponde à microbiota normal ou indígena, ou alóctone, que é transitória e passa pelos intestinos, mas não o coloniza, como o faz a autóctone (TRABULSI; SAMPAIO, 2000). As bactérias da microbiota intestinal são encontradas nos intestinos delgado e grosso. No intestino delgado ascendente quantidade dessas bactérias é de aproximadamente 10^4 UFC/mL, e as espécies mais representativas são estafilococos, estreptococos e lactobacilos, sendo raramente encontradas bactérias anaeróbias. Já no íleo distal, o número de bactérias é bem maior, em torno de 10^8 UFC/mL, e a microbiota torna-se bastante diversificada, com a presença de coliformes e várias espécies de bactérias anaeróbias, como *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Clostridium*. O baixo potencial de oxirredução no íleo explica a presença da microbiota anaeróbia nessa região. Após a válvula ileocecal, a concentração bacteriana atinge 10^{10}-10^{11} UFC/mL do conteúdo intestinal. No intestino grosso, as bactérias anaeróbias superam as facultativas e aeróbias, predominando *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium,* porém *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Enterobacter* são também bastante freqüentes. Calcula-se que a microbiota intestinal compreenda em torno de 400 espécies, pertencentes a

20 a 40 gêneros, encontrados livremente na luz intestinal, e outros estão associados à camada de muco ou na superfície epitelial (TANNOCK, 1998).

Pesquisas recentes sobre infecções humanas sugerem que a microbiota intestinal desempenha um papel principal na resistência a infecções virais e na colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas (IBNOU-ZEKRI et al., 2003; ASAHARA et al., 2004). Essa proteção da microbiota pode ser melhorada pela ingestão de probióticos, os quais são microrganismos que favoravelmente influenciam a fisiologia pela modificação dessa microbiota intestinal (SALMINEN et al., 1998; RASTALL et al., 2005).

As bactérias bífidas descobertas por Tissier em 1899 são os principais componentes do trato gastrointestinal (MITSUOKA, 1990) e exercem efeito barreira e de defesa da mucosa (LOOIJESTEIJN et al., 2001; MULLIE et al. 2004).

A aderência das bactérias probióticas à mucosa intestinal, envolve a participação de adesinas bacterianas, da composição da parede celular e de receptores da mucosa intestinal. A interação entre esses elementos promove a fixação da bactéria à mucosa, o que impede sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e pelas correntes de fluidos, que tendem a levá-las para o exterior do organismo. A capacidade de aderir às células derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa já foi demonstrada, para algumas estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizadas como probióticos (TRABULSI; SAMPAIO, 2000). A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial e reversível é mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que não são consideradas específicas, mas são propriedades importantes (PELLETIER et al., 1997).

A propriedade de exclusão ou redução da aderência de enteropatógenos já foi demonstrada para vários probióticos, provavelmente sendo conseqüência do bloqueio de receptores que seriam utilizados por eles. Essa propriedade é muito importante, pois contribui para o efeito protetor dos probióticos contra infecções intestinais. Para que haja multiplicação das bactérias probióticas, elas devem competir em condições favoráveis de atmosfera e pH. Estudos experimentais, através da análise de material fecal têm demonstrado a multiplicação dos probióticos nos intestinos do homem e de animais de

laboratório. Além da produção de bacteriocinas, ocorre a liberação de ácidos, principalmente lático e acético, tornando o ambiente intestinal bastante desfavorável à proliferação de microrganismos patógenos ou putrefativos (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

Pesquisas têm demonstrado que bifidobactérias probióticas, especialmente *Bifidobacterium longum, Bifidobacterium infantis e Bifidobacterium breve*, estimulam o sistema imunológico; com isso, capacitam o hospedeiro a ter uma resistência maior a infecções gastrointestinais (MULLIE et al., 2004) e contribuem na redução das inflamações alérgicas. Evidências científicas sugerem que as bactérias probióticas exercem efeitos no sistema imunológico e que podem ser utilizadas no tratamento de patologias imunológicas (PERDIGON et al., 2001; DOGI; PERDIGON, 2006).

Ainda não está elucidado o mecanismo celular e/ou molecular para o efeito imunoestimulador de bactérias bífidas, porém o modo de ação no trato gastrintestinal parece ser não-específico, aumentando para uma grande variedade de antígenos, exercendo efeitos mediante interações entre o tecido linfóide e os microrganismos, como também por metabólitos produzidos *in situ* (ISOLAURI; SALMINEN, 2005); componentes da parede celular desempenham importante papel em mecanismos homeostáticos, assim como na imunidade não-específica, promovendo preferencialmente respostas Th1 pela secreção de IFN-γ. Também, experimentos utilizando *Lactobacillus* spp. estimularam não só a capacidade de produção de INF-γ em linfócitos esplênicos murinos como também estimularam mitoses, ao passo que a liberação de IL-4 e IL-5 não foi afetada (GILL, et al., 2000; HARSHARNJIT, 2003).

Amrouche et al. (2006) estudaram os efeitos dos componentes da parede celular, do citoplasma e de expolissacarídeos (EPS) na proliferação de linfócitos esplênicos murinos e na liberação de IFN-γ e IL-10. Foram utilizadas três bactérias bífidas (RBL64, RBL81 e RBL82) isoladas de fezes de recém-nascidos, juntamente com uma estirpe comercial *Bifidobacterium lactis* Bb12, utilizada como controle positivo. Esses autores concluíram que, entre os diferentes extratos celulares, os componentes da parede celular mostraram melhores efeitos na proliferação celular e liberação de citocinas, quando comparados com os demais. Valores detectados de IFN-γ ficaram na faixa de

4 ng/mL, e os de interleucina 10 (IL-10), em torno de 0,8 ng/mL, sugerindo que estes componentes da parede celular poderiam ser usados no controle de certas patologias do sistema imunológico.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o pH e grupos microbianos presentes no leite materno obtido de doadoras voluntárias durante o período de lactação de 10 a 30 dias e sua importância em bancos de leite humano. Verificar em modelo murino o pH e o processo de modulação dos diferentes grupos microbianos presentes no conteúdo cecal, por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve* e analisar histomorfometricamente a região do cólon ascendente por meio da determinação da profundidade das criptas intestinais. Verificar a citotoxicidade celular; verificar a resposta imunológica nos animais por meio da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve* no exsudato peritonial e células esplênicas para quantificação de citocinas, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α e para determinação de compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2) no período de 30 dias.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LEITE HUMANO MADURO COLETADO EM DOMICÍLIO PARA USO EM BANCOS DE LEITE

1. INTRODUÇÃO

Componentes presentes no leite materno incluem uma combinação de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas e células vivas, com inquestionáveis benefícios nutricionais, imunológicos, psicológicos e econômicos (CUMMINGHAM; JELLIFE; 1991; NDUATI et al., 2000). O efeito protetor do leite humano é atribuído a fatores únicos natos e adquiridos do próprio leite, o qual possui funções imunorregulatória, antiinflamatória e antiinfecciosa, incluindo anticorpo secretor, oligossacarídeos, glicoconjugados, lactoferrina, leucócitos, citocinas e outros.

O Ministério da Saúde (Lei nº 11.265, de 3 de janeiro de 2006) recomenda a amamentação exclusiva em bebês até seis meses de idade, e incentiva à continuidade do aleitamento materno até os dois anos de idade após a introdução de novos alimentos na dieta dos lactentes e das crianças de primeira infância. Se essas recomendações fossem seguidas, no mundo inteiro seria evitada, pelo menos em um ano, a morte de 1 milhão de crianças aproximadamente (MORROW; RANGEL; 2004; TANRIVERDI et al., 2006; BRASIL, 2006).

O leite materno constitui um suplemento de fatores de proteção para o recém-nascido, além de restringir e/ou inibir o crescimento de bactérias

patogênicas; a efetividade dessa proteção é fundamental, principalmente em locais de baixo nível socioeconômico e condições sanitárias inadequadas, associadas ao estado fisiológico e grau de imaturidade do bebê (STEVENSON et al., 1985; NEWBURG, 2005).

Devido aos inúmeros benefícios conferidos pelo leite materno às crianças e recém nascidos (sadios e/ou prematuros) e pelo fato de muitas mães serem privadas pelos mais diferentes motivos de amamentarem seus filhos é que os bancos de leite humano vêm crescendo e se tornado prática corrente em muitos países (GIULIANI, 2002).

Os Bancos de Leite Humano (BLH) são centros especializados, obrigatoriamente vinculados a um hospital materno e/ou infantil, responsáveis pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou nutricionista (BRASIL, 1994). O Brasil é referência mundial em Bancos de Leite Humano, exportando tecnologia para outros países e possui a maior e mais bem estruturada rede. Atualmente possui em torno de 190 unidades espalhadas por todo o Brasil (GIULIANI, 2002).

O leite materno, para ser usado nos bancos de leite, precisa ser submetido ao tratamento térmico de pasteurização, o que garante a sua inocuidade para as crianças, protegendo os recém-nascidos contra uma variedade de doenças. A importância dos bancos de leite humano é incontestável quanto aos aspectos de saúde pública. O Brasil é líder mundial no número desses bancos e o seu papel tem sido reconhecido pela Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento da Ciência, Educação e a Cultura (UNESCO). A coleta das amostras de leite humano deve ser realizada com assepsia, para que não haja contaminação do leite com microrganismos presentes nas porções externas das mamas e/ou do ambiente. O banco de leite humano é um centro especializado responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e o tratamento térmico da pasteurização é de vital importância para manutenção da qualidade higiênico-sanitária do produto em bancos de leite humano.

As mudanças que ocorrem na microbiota que coloniza o trato gastrointestinal possuem uma relação direta com as variações alimentares observadas

pelo lactente e a funcionalidade do intestino, pois alterações qualitativas e quantitativas podem desencadear doenças diarréicas associadas ou não à presença de enterotoxinas, com conseqüente má absorção dos nutrientes, perda de líquidos, desnutrição e, em alguns casos, o óbito (RUBALTELLI et al., 1998). As infecções, que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida, constituem uma das causas mais freqüentes de aumento dos índices de morbi-mortalidade entre lactentes. A freqüência e a gravidade dessas infecções, principalmente por bactérias Gram-negativas, influenciadas pela imaturidade do sistema imunológico, são uma peculiaridade dessa faixa etária (DUFFY et al., 2001).

Por definição, coliformes são bacilos aeróbicos e/ou anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, não-esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás. Esse grupo inclui vários gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae*, com potencial variado de patogenicidade para o homem. Os gêneros deste grupo são *Escherichia, Klebsiela e Enterobacter*, sendo o habitat natural e principal nicho das enterobactérias o trato intestinal do homem e de outros animais (SPECK, 1984). Assim, a presença dessas bactérias no leite humano é indicativa que este entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal.

A contagem total de mesófilos aeróbios é empregada para indicar a qualidade sanitária na obtenção de determinado produto. A alta contagem desse grupo de bactérias no leite materno é indicativa de contaminação na obtenção no momento da ordenha, sob o ponto de vista sanitário (SPECK, 1984).

Staphylococcus aureus é uma bactéria encontrada na orofaringe dos seres humanos com prevalência de 35 a 40%; e na boca e saliva, de 10 a 35%. Sua presença no leite humano pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados. A maior preocupação quanto à sua presença incide sobre a ocorrência de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização (ALMEIDA et al., 1998).

A veiculação de microrganismos patogênicos ou não no leite humano ordenhado (cru) e pasteurizado é um fator de risco em potencial para o recém-nascido. O objetivo deste trabalho foi a determinação da qualidade higiênico-sanitária das amostras de leite humano coletado em domicílio.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: determinar o pH e os grupos microbianos incluindo coliformes totais, mesófilos aeróbios totais, *Staphylococcus aureus*, em amostras de leite materno cru e pasteurizado (65 ºC/30 min) coletadas em domicílio de doadoras voluntárias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Viçosa (nº do processo 50702452817).

O cadastramento das doadoras foi realizado no Hospital São Sebastião, na cidade de Viçosa, MG, para posterior coleta em domicílio. Após a coleta, as amostras de leite materno foram levadas ao Laboratório de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro).

3.1. Coleta do leite humano e análise microbiolóicas dos grupos microbianos presentes nas amostras de leite cru e pasteurizado

Em cada repetição, as amostras de leite humano cru (LHC), recém-ordenhadas, foram obtidas de oito doadoras voluntárias de Viçosa-MG, saudáveis, com idade gestacional a termo e parto normal ou cesárea e tempo de lactação compreendido entre 10 e 30 dias. As amostras foram coletadas em domicílio, sem o uso medicamentoso ou de antibióticos. As recomendações adotadas para essa coleta e manutenção foram os descritos no Manual de Rotina para Bancos de leite humano (BRASIL, 1994). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Culturas Láticas (Bioagro/UFV). Após diluições adequadas e determinação do pH, as análises microbiológicas foram feitas empreando-se meios de cultura adequados para os grupos microbianos, estudados no leite cru e pasteurizado, sendo eles: coliformes totais: ágar Violet Red Bile, VRB 35 ºC/48 h (APHA, 2001), Mesófilos Aeróbios Totais, PCA 30 ºC/48 h (APHA, 2001) e *Staphylococcus aureus,* 35 ºC/24 h (AOAC 981.15 - Rapid *S. aureus* (RSA) (Count Plate).

3.2. Composição das amostras de leite humano ordenhado em domicílio

O *pool* do leite humano constituído de 224 coletas de leite foi dividido em duas partes iguais. Uma, mantida sob refrigeração, foi constituída de Leite Humano Cru, enquanto a outra foi pasteurizada (65 ^{o}C/30 minutos) e imediatamente resfriada (Figura 1).

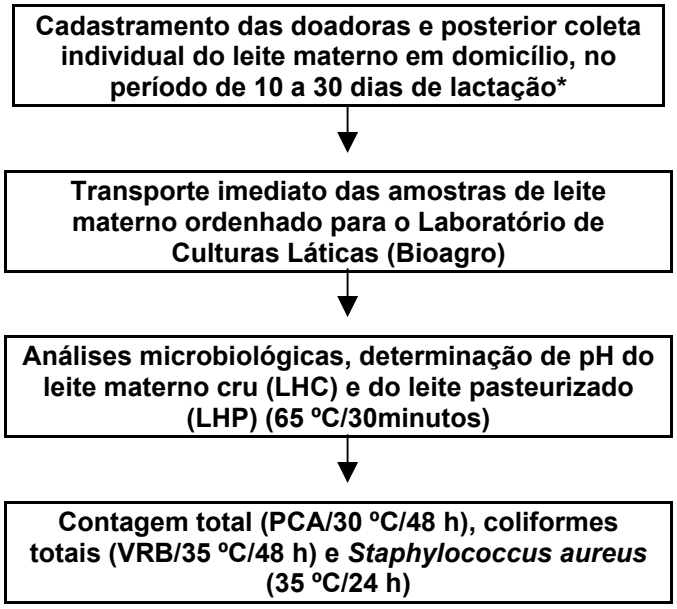

Figura 1 - Fluxograma de obtenção do leite humano ordenhado. Os padrões adotados para a coleta e manutenção do leite materno cru e pasteurizado foi conforme descrito no Manual de Rotina para Bancos de leite humano (BRASIL, 1994).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinação de pH e análises microbiológicas nas amostras de leite humano cru e leite humano pasteurizado, os dados foram analisados utilizando-se o teste t de Student a 5% de probabilidade (RIBEIRO Jr., 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de valores médios dos grupos microbianos e de pH no leite materno cru (LHC) e pasteurizado (LHP) no período de 10 a 30 dias de lactação

Pode-se observar na Tabela 1 que não houve variação nos valores encontrados de pH nas amostras de leite humano cru e leite pasteurizado no período de 10 a 30 dias de lactação, durante as quatro repetições.

Os valores médios obtidos pela avaliação microbiológica nas amostras de leite humano cru e pasteurizado são apresentados na Tabela 1. Em todas as amostras de leite cru (LHC), foram encontrados contagens altas de mesófilos aeróbios totais, coliformes totais e *Staphylococcus aureus.* Os valores médios, expressos em Log de UFC/mL, obtidos em quatro repetições nas amostras de leite cru foram de 4,07(0,02), 3,03(0,05) e 4,14(0,02) para mesófilos totais, coliformes e *S. aureus,* respectivamente. Nas amostras de leite materno pasteurizado não foi detectada presença de coliformes totais e *S. aureus;* para contagem total de mesófilos totais, a média foi de 2,95 (0,01). A adoção de práticas adequadas na obtenção das amostras de leite coletadas em domicílio e o controle eficaz da pasteurização do leite materno permitirão mantê-las estocadas e disponíveis nos bancos de leite.

Tabela 1 - Valores médios de pH, contagem total (PCA/30ºC/48h), coliformes totais (VRB/35 ºC/48 h) e *Staphylococcus aureus* (35 ºC/24 h), encontrados no leite materno cru e pasteurizado

Parâmetros	Leite Humano Cru (LHC)	Leite Humano Pasteurizado (LHP)
Contagem Total	4,07 **a**	2,95 **b**
Coliformes Totais	3,03 **a**	0,0 **b**
Staphylococcus aureus	4,14 **a**	0,0 **b**
pH	7,01**a**	6,99 **a**

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Observou-se que em todas as amostras de leite humano cru ordenhado (LHC) obtidas neste estudo apresentaram uma microbiota inicial inadequada, acima do permitido pela legislação vigente. A prevalência de microrganismos indicadores e patogênicos indica condições higiênico-sanitárias inadequadas

das amostras obtidas no momento da ordenha, em domicílio, apesar de todas as recomendações prescritas para as doadoras. Contudo, com relação ao leite pasteurizado (LHP), em 100% das amostras foi detectado ausência de coliformes totais e *Staphylococcus aureus,* porém em relação à contagem total de mesófilos, o valor médio foi de 2,95 (0,01), superior ao recomendado por esta Resolução (RDC 12/ M.S., 2001), e foi provavelmente devido a presença de termodúricos.

A Resolução RDC nº 12, de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde estabeleceu, pela primeira vez no Brasil, critérios para controle microbiológico do leite humano ordenhado. A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis permitida é de até 100 UFC/mL, com coliformes a 35 °C e *Staphylococcus coagulase* positiva ausentes em 1 mL e *Salmonella* sp. ausente em 25 mL. De acordo com o Ministério da Saúde (2001), o leite humano cru dos bancos de leite humano, se não utilizado de imediato, deve ser armazenado a 4 ºC por até 12 horas, ou a -4 ºC a -18 ºC por no máximo 15 dias; antes da pasteurização (65/30 ºC), o leite estocado deve ser submetido a testes microbiológicos e físico-químicos, para avaliação de sua qualidade

Borba (2001), analisou a presença de coliformes totais, enterococos, clostrídeos, bolores e leveduras e mesófilos totais em dezonove amostras individuais de leite humano obtido de cinco doadoras, sendo onze coletadas por expressão manual, quatro com bomba manual e quatro por gotejamento da mama. Os valores encontrados pelo autor para coliformes totais foram de 0,38, 1,42 e 1,45 respectivamente para leite obtido por expressão manual, bomba manual e gotejamento. Almeida (1986) encontrou contagens superiores de até 4,0 Log de UFC/mL em leite recém-ordenhado. Para mesófilos aeróbios totais, a contagem foi de 3,24 Log UFC/mL em leite coletado por compressão das mamas. Para esse mesmo grupo de microrganismos e a mesma técnica de coleta, os resultados publicados na literatura são variados. Para bolores e leveduras, os valores médios foram de 1,71 Log UFC/mL para leite expressado manualmente e de 2,0 Log UFC/mL para o coletado por bomba.

Almeida (1986) encontrou contagem de até 7,0 Log UFC/mL para o leite obtido de forma semelhante. Para clostrídeos, os valores médios foram de 1,94, 1,99 e 1,96 Log UFC/mL, respectivamente nas amostras de leite humano

obtido por coleta manual, bomba e gotejamento; contudo, não são encontradas referências sobre este grupo de microrganismos em análises de amostras de leite humano. Observa-se, neste estudo, que os resultados discutidos para os grupos microbianos pesquisados os valores encontrados foram superiores aos encontrados pela autora acima. A contaminação secundária do leite humano é devida à presença de microrganismos nos ductos lactíferos externos das mamas, à microbiota epidérmica dos mamilos, regiões circundantes, e mãos da doadora. Essa contaminação precisa ser minimizada, e o processo de pasteurização é necessário, salvo em casos que o leite da mãe destine-se ao próprio filho, e seja devidamente coletado e mantido estocado adequadamente (BRASIL, 1993).

Serafini et al. (2003) analisaram 194 amostras de leite humano cru e 144 de leite pasteurizado. Nas amostras de leite humano cru, foram isoladas 136 cepas (70,4%) de microrganismos indicadores e/ou potencialmente patogênicos; das 144 amostras de leite pasteurizado, 73 (50,7%) apresentaram contaminação. Nas amostras de LHO cru, foram isoladas três (2,2%) cepas de *Streptococcus* do grupo viridans, 10 (7,35%) *Staphylococcus aureus*; 28 (20,59%) *S. epidermidis* e 49 (36,0%) amostras contaminadas por Enterobacteriaceae. Foram observadas, ainda, 43 (31,6%) amostras de leite cru contaminadas por bolores e leveduras; das 144 amostras de leite pasteurizado, foram encontradas 73 cepas, sendo duas (2,7%) *Staphylococcus lugdenensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* do grupo viridans; cinco (6,9%) *Staphylococcus aureus*; 15 (20,6%) *S. epidermidis* e 12,3% das amostras foram detectadas *Enterobacteriaceae* e 37 (50,7%) amostras mostraram-se positivas para bolores e leveduras.

A presença de contaminantes no leite humano cru acarreta a redução do valor biológico em função da degradação da utilização de nutrientes do leite pela microbiota deteriorante e à diminuição dos fatores de defesa. Essas situações determinam, na maioria das vezes, a classificação do produto como impróprio para o consumo, tendo em vista a vulnerabilidade dos bebês que o receberão. Além disso, o processo de pasteurização será tanto menos eficiente quanto maior for o conteúdo microbiano do produto.

A presença de *Staphylococcus aureus* no leite humano pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais,

ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados; o maior problema é quanto à presença de cepas produtoras de toxinas resistentes à pasteurização (ALMEIDA et al., 1998).

Resultados semelhantes aos desta pesquisa foram encontrados por Pereira et al. (1995). Esses autores relataram a presença de *Staphylococcus* em todas amostras de leite materno procedentes de 19 mulheres com sintomas de mastite. Das 19 cepas, oito sintetizavam quantidades detectáveis de enterotoxinas. Carroll et al. (1979) observaram *S. aureus* em 13 (6,2%) amostras, das 207 de leite humano cru pesquisadas e outros autores encontraram *Staphylococcus coagulase* positiva nas amostras estudadas: 28,1% (NIKODEMUZ, 1986); 29% (ALMEIDA et al., 1998); e 51,7% (ALMEIDA et al., 1989).

Outros autores encontraram *E. coli* em 8,5% de 59 amostras de leite materno (SZOLLOSY et al.; 1974) e em 2% de 44 amostras. (EIDELMAN; SZILAGYI, 1979), indicando uma contaminação de oriem fecal do leite; as enterobactérias foram observadas em 15 amostras (7%) (CARROLL et al., 1979). Todos esses resultados revelaram a presença de enterobactérias em 25,3% das amostras de leite humano cru analisadas e em 6,2% do leite após pasteurização, o que resulta num produto com qualidade higiênica inferior ao desejado. De acordo com RAMOS et al.; 2005, resultados semelhantes continuam sendo observados até hoje.

De acordo com Almeida et al. (1989), é importante a determinação do grupo coliforme no controle da qualidade microbiológica dos bancos de leite humano, pois sua presença pode indicar contaminação, mesmo que indireta, de origem fecal, sem implicar necessariamente a presença de *E. coli*. Pesquisas têm mostrado que a contaminação por coliformes pode ser proveniente do ambiente. Novak, et al. (1989) avaliaram 472 amostras, que revelaram 38,4% deste grupo de bactérias; posteriormente, em 5.710 amostras de leite humano foram detectados coliformes em 1.139 (19,9%), e de 837 amostras, 71 (8,48%) estavam contaminadas com coliformes, porém apenas três por *E. coli*.

Serafini et al. (2003), detectaram que os coliformes estiveram presentes em 21,1% das amostras de leite cru e em 5,6% das amostras pasteurizadas, o que indicou que a eficiência da pasteurização pode ser comprometida por uma

alta população microbiana inicial. Nesse experimento, todas as amostras (100%) de leite cru continham coliformes totais; no leite pasteurizado não foram detectados coliformes totais e *Staphyloccocus aureus* em nenhuma das amostras. A maior preocupação quanto à presença de *S. aureus* incide sobre a ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos, que produzem toxinas resistentes à pasteurização quando a população atinge contagens da ordem de 10^5 UFC/mL.

De acordo com Mislivec et al. (1992), a presença de bolores e leveduras em leite pode indicar contaminação advinda do ambiente ou resultado de manipulação em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Almeida et al. (1986), encontraram uma prevalência de fungos e leveduras em 69,4% das amostras obtidas após emprego de método usual (água e sabão) de higiene da glândula mamária. Já Colaço et al. (2001) observaram 230 (6,5%) amostras com bolores e leveduras, de 7.570 analisadas.

Os resultados encontrados por Serafini et al. (2003), em relação a bolores e leveduras foram de 22% para leite cru, mostraram-se inferiores aos de outros autores citados, porém preocupantes para leite pasteurizado (25,7%), denotando possível contaminação ambiental pós-processamento ou ineficácia da pasteurização. A presença de leveduras patogênicas em leite humano ordenhado (LHO) pasteurizado poderia ser uma fonte de infecção para recém-nascidos durante o aleitamento. Os autores sugeriram, como uma das medidas de controle de qualidade dos bancos de leite, o uso da contagem de leveduras.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é preciso haver esforços para melhorar a qualidade microbiológica do leite humano ordenhado coletado em domicílio, mesmo o que se destina à pasteurização. Para isso, resultados e medidas mais rigorosas de monitoramento da qualidade do leite humano são imprescindíveis, no sentido de garantir um alimento seguro para os recém-nascidos.

A qualidade microbiológica do leite humano ordenhado dos bancos de leite humano é um assunto de saúde pública, considerando que crianças que consumirão esse produto têm baixa resistência a infecções neonatais. Apesar da eficiência do processo de pasteurização para patógenos verificado neste estudo, torna-se urgente a necessidade de conscientização por parte das doadoras no que se refere aos métodos de obtenção de coleta e ordenha domiciliar do leite materno. Resultados e medidas mais rigorosas de

monitoramento do controle de qualidade na ordenha do leite humano coletado em domicílio são imprescindíveis para garantir um alimento seguro para os recém-nascidos; e com isso, essas amostras podem ser mantidas estocadas e disponíveis por seis meses em bancos de leite humano.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E MODULAÇÃO DA MICROBIOTA NO INTESTINO GROSSO POR MEIO DA INGESTÃO DE LEITE HUMANO E BACTÉRIA PROBIÓTICA EM MODELO MURINO

1. INTRODUÇÃO

O aleitamento materno, devido à presença de imunoglobulinas e células imunocompetentes, protege os recém-nascidos contra uma variedade de doenças infecciosas (DAÍ; WALKER, 1999; NEWBURG, 2005). O colostro e o leite humano apresentam fatores de crescimento que promovem a implantação de algumas espécies bacterianas importantes no trato gastrointestinal (RUBALTELLI et al., 1998), entre elas as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium,* que fazem parte da microbiota benéfica do intestino delgado e grosso, respectivamente. Em crianças amamentadas com leite materno, as bactérias bífidas convertem a lactose em ácido acético e lático na proporção 3:2, o que reduz o pH intestinal. Além disso, o leite materno possui um terço da capacidade tamponante do leite de vaca, o que favorece a manutenção de um pH intestinal ácido, inibindo assim a multiplicação de bactérias coliformes e outras enterobactérias (MITSUOKA, 1996).

As bactérias bífidas também sintetizam vitaminas B_1 (tiamina), B_6 (ácido fólico), B_{12} (cianocobalamina) e ácido nicotínico, em diferentes proporções, contribuindo com a biodisponibilidade destas substâncias. Também foi demonstrado que estas bactérias inibem, no intestino grosso, a atuação de

enzimas pro-carcinogênicas, evitando com isso a ação de substâncias putrefativas, como amônia, H_2S, aminas, fenol, indol, escatol e ácidos biliares secundários, extremamente prejudiciais, pois estas substâncias são parcialmente absorvidas, contribuindo ao longo da vida para o processo de envelhecimento, câncer e outras doenças (MITSUOKA, 1996).

Principalmente as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são utilizadas como bactérias probióticas que, consumidas em número elevado, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos/quimioterapia ou por estresse do hospedeiro (FERREIRA, 2003).

Os bancos de leite humano consistem em centros de apoio à amamentação, onde o leite materno é recebido, processado e ofertado, de forma gratuita, a determinados recém-nascidos prematuros e lactentes em situações especiais. Borba (2001) avaliou o efeito do processo de pasteurização do leite sobre o crescimento, *in vitro*, de bifidobactérias de origem humana em leite doado por lactantes com período de lactação entre 10 e 30 dias após o parto e constatou que o leite materno pasteurizado apresentou efeito inibidor no crescimento das espécies de *Bifidobacterium* em estudo, enquanto no leite cru o crescimento foi estimulado. Quando culturas concentradas dessas bactérias bífidas foram adicionadas ao leite humano pasteurizado e cru, a viabilidade manteve-se sem alteração ao longo dos períodos de congelamento, após o descongelamento e refrigeração, de acordo com os protocolos de uso seguidos nos Bancos de leite (BORBA et al., 2003; RAMOS et al., 2005). Os autores sugeriram que a adição dessas bactérias probióticas, no leite materno depositado nos bancos, poderia se constituir num procedimento de rotina promissor, considerando-se os benefícios advindos da reposição deste grupo essencial para a manutenção do equilíbrio saudável da microbiota intestinal do recém nato e seus inúmeros benéficos (FERREIRA; TESHIMA 2000).

No intestino, delgado e grosso, a microbiota influencia, entre outros processos, a diferenciação e renovação do epitélio intestinal; a síntese de mucinas pelas células caliciformes (DEPLANCKE; GASKINS, 2001) e a distribuição do tecido linfático associado à mucosa intestinal (GALT), constituído principalmente de linfócitos B, plasmócitos, linfócitos T e macrófagos. Estas células, além de estarem espalhadas de forma difusa na lâmina própria da

mucosa do tubo gastrintestinal, podem estabelecer formações nodulares (nódulos ou folículos) que se distribuem nas camadas mucosa e submucosa da parede intestinal (FALK et al., 1998). No íleo e no apêndice do ceco, estes nódulos formam agregados denominados placas de Peyer (LÜLLMANN-RAUCH, 2006). No caso do rato, o ceco não apresenta o apêndice, mas a sua parede é rica nestes nódulos, especialmente na porção apical do ceco. O GALT é um importante regulador do crescimento bacteriano na luz do intestino, podendo impedir a adesão de bactérias patogênicas na mucosa, além de diminuir a possibilidade de supercrescimento. Além disso, as células de defesa da lâmina própria, na mucosa intestinal, exercem controle sobre os microrganismos que conseguiram romper a barreira epitelial, impedindo a translocação para outros órgãos. Porém, microrganismos patogênicos podem desenvolver formas de invasão sistêmica, pois não sendo destruídos por fagócitos na mucosa intestinal, conseguem romper a barreira intestinal e chegar aos linfonodos mesentéricos e a outros órgãos, causando lesões, resultando em uma resposta inflamatória intensa (BERG, 1995; ZARZAUR; KUOSK, 2001).

Evidências de que a microbiota intestinal influencia a distribuição de células caliciformes e a biossíntese de mucinas têm sido obtidas em vários estudos. Animais *germ-free* apresentam reduzido número de células caliciformes, em comparação aos animais convencionais (ISHIKAWA et al., 1989; KANDORI et al., 1996); apesar disso, a camada de muco que recobre o epitélio intestinal é nitidamente mais espessa do que a existente nos animais convencionais, devido à falta de enzimas bacterianas que possam degradar parte das mucinas. Conseqüentemente, animais *germ-free* apresentam alargamento do ceco, que pode ser revertido com a introdução de bactérias, especialmente dos gêneros *Peptostreptococcus, Ruminococcus* e *Bifidobacterium* (HOSKINS et al., 1985).

Considerando que bactérias probióticas podem influenciar o ecossistema intestinal, foi realizado este estudo, no qual se procurou avaliar os efeitos do leite humano, adicionado ou não de bactérias bífidas, sobre a microbiota e a estrutura da mucosa do intestino grosso de animais Wistar fêmeas.

2. OBJETIVO

Neste estudo foram utilizados animais da raça Wistar fêmeas que receberam leite humano pasteurizado adicionado ou não de bactérias bífidas, visando: a) Realizar análise histomorfométrica da mucosa do cólon ascendente no sentido de determinar o comprimento (profundidade) das criptas intestinais e b) Determinar o pH e identificar os diferentes grupos microbianos no conteúdo cecal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (nº do processo 50702452817).

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG) e de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Coleta e formação de *pools* de leite humano

As amostras de leite humano recém-ordenhadas, foram a cada três dias obtidas de oito doadoras voluntárias saudáveis, com idade gestacional de termo e parto normal ou cesárea, com tempo de lactação compreendido entre 10 e 30 dias, não fazendo uso medicamentoso ou de antibióticos. Os padrões adotados para coleta e manutenção foram os descritos no Manual de Rotina para Bancos de Leite Humano (BRASIL, 1994).

Durante a experimentação foram preparados 21*pools* totalizando 168 coletas de leite. Seguiu-se pasteurização (65 ^{o}C/30min.), resfriamento a 5 ^{o}C e adição ou não do concentrado celular de *Bifidobacterium breve* e fornecido aos animais diariamente por 21 dias, de acordo com a Figura 1.

3.2. Origem e manutenção das bactérias bífidas

Nesta pesquisa foi utilizado um *pool* de bactérias bífidas, obtido a partir de sete culturas isoladas de recém-nascidos alimentados exclusivamente com

Formação do *Pool* de Leite Materno

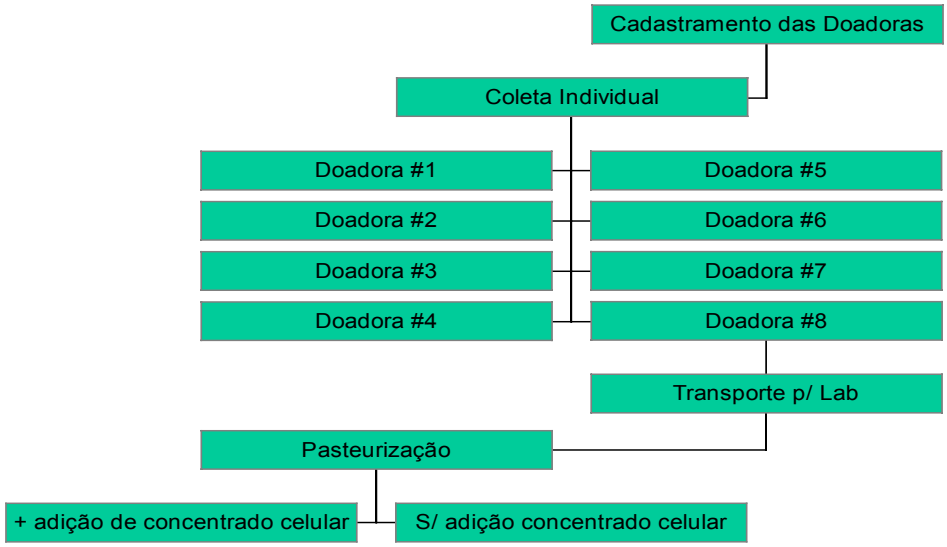

Figura 1 - Fluxograma da obtenção do leite humano de 8 doadoras e adição do concentrado celular de *Bifidobacterium breve*. Os padrões adotados para a coleta e manutenção do leite materno cru e pasteurizado foram os descritos no Manual de Rotina para Bancos de Leite Humano (BRASIL, 1994).

leite materno e sem uso de antibióticos (TESHIMA, 2005), pertencentes ao Banco de Culturas Láticas da Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC), DTA/UFV. Os isolados foram mantidos congelados a -80 ^{o}C, em LDR 12% (leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não-gordurosos adicionados de solução de glicerol 20% (v/v). Antes das experimentações, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) DIFCO®, esterilizado, e incubadas a 37 ^{o}C/18 h, em anaerobiose utilizando-se mistura anaeróbica (hidrogênio 10%, dióxido de carbono 5% e nitrogênio 85%), em câmara de anaerobiose (Anaerobic Workstation, Leeds, UK). Para confirmação da identidade, as culturas foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase, ao perfil de fermentação de carboidratos Kit API CH 50 (BioMerieux/ França). Em experimentações anteriores Teshima (2001), fez determinação da diversidade genética que foi realizada por meio de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (RIORDAN; FITZGERALD, 1997); e também a confirmação do

gênero *Bifidobacterium* foi feita pelo teste da presença da enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase, sendo um teste colorimétrico e qualitativo (SCARDOVI, 1994). De acordo com Cunha (2006), as sete bactérias bífidas que compuseram o *pool* utilizado neste trabalho apresentaram maior sensibilidade diante dos quatorze antibióticos testados e mais comumente usados em unidade neonatal de terapia intensiva (BAWER, 1967); maior resistência aos sais biliares e ao suco gástrico (NEUMANN; FERREIRA, 1995); exerceram antagonismo a cinco patógenos, não apresentaram toxicidade oral indireta e não promoveram translocação do tratogastrintestinal para o fígado, rins, coração e baço.

3.3. Preparo do concentrado celular das bactérias bífidas

As culturas de bactérias bífidas selecionadas pertencentes ao Banco de Culturas (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111) foram ativadas três vezes em caldo MRS modificado, sendo a última ativação feita em 420 mL do caldo em frasco erlenmeyer com tampa rosqueável e incubadas a 37 ^{o}C/24 h em anaerobiose. Nas duas primeiras repicagens utilizou-se 10% (v/v) de inóculo e na terceira, 2% (v/v), em relação ao volume final. Após o crescimento celular, o material (*pool*) foi distribuído em tubos esterilizados de centrífuga Nalgene de polipropileno estéreis, com tampas rosqueáveis, seguindo-se centrifugação a 2750 xg por 10 minutos a 4 ^{o}C, em centrífuga Beckman GS-6R. Após descarte do sobrenadante, o concentrado celular foi ressuspendido em 100 mL de tampão fosfato estéril, pH 7,2, e dividido (volumes iguais) em dois tubos de centrífuga. Seguiu-se nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas, e foram respectivamente ressuspendidos em leite materno cru e leite pasteurizado, constituindo-se assim de um concentrado de células contendo valores médios de 10^{10} UFC/mL. Uma alíquota de 1,0 mL de cada concentrado foi retirada, para contagem de células viáveis de bifidobactéria. O plaqueamento *pour plate* foi feito nas diluições 10^{8} e 10^{9} a 37 ºC/48 h em jarras de anaerobiose. O concentrado celular foi produzido em quantidade suficiente para três dias de alimentação, dividido em volumes diários e acondicionado em tubos de 5 mL previamente esterilizados e mantidos congelados a -20 ºC até o momento da administração aos animais.

3.4. Animais

Foram utilizados 48 animais da raça Wistar fêmeas com 21 dias de idade, recém-desmamadas, pesando entre 50 a 52g, obtidas do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Após pesagem, as ratas foram distribuídas em grupos, de maneira que a média de peso inicial entre os grupos fosse homogênea. No laboratório de Nutrição Experimental (UFV), os animais foram alocadas em gaiolas individuais e mantidas sob condições de temperatura controlada para 25 ºC +/- 5 e ciclos de claro e escuro de 12 horas. Foram mantidos diariamente com ração (Labina®, S.P) (12 g na primeira semana, 15g na segunda e 18 g até o final da experimentação), e água *ad libitum* durante os 21 dias da experimentação e submetidos aos seguintes tratamentos abaixo. Toda a experimentação foi feita com 3 repetições (pH e modulação da microbiota), e para as análises histomorfométricas foram utilizados os dados dos animais das duas primeiras repetições.

Grupo Basal: constituído de quatro animais, que foram sacrificados no dia de chegada (utilizado no controle da modulação microbiana) .

Grupo Controle: constituído de quatro animais, que receberam a dieta (ração), e 0,1 mL de água destilada por 21 dias administrado via oral (para manter o mesmo nível de estresse dos animais que receberam leite pasteurizado), e água destilada *ad libitum*.

Grupo Teste Leite Pasteurizado (LP): constituído de quatro animais, que receberam a dieta (ração) e 0,1 mL de leite materno pasteurizado, diariamente administrado via oral, e água destilada *ad libitum*.

Grupo Teste Leite Materno Pasteurizado + bactérias bífidas (LPB): Constituído de quatro animais, que receberam a dieta (ração) e 0,1 mL de leite materno pasteurizado + bactérias bífidas, diariamente administrado via oral, e água destilada *ad libitum*.

3.5. Coleta do conteúdo cecal

No tempo 0 (zero), dia de chegada dos animais, quatro animais foram sacrificados (grupo basal). Ao final do período de 21 dias de administração dos tratamentos os quatro animais de cada grupo foram submetidos a um jejum de 12 horas, e sacrificados por asfixia com éter etílico e por meio de duas incisões na região abdominal, procedendo-se a retirada do intestino grosso. O ceco foi separado do cólon, sendo o conteúdo cecal rapidamente colhido e acondicionado em saco plástico estéril de polietileno (saco amostrador Whirl-Pak, Millipore) identificado e previamente pesado. As amostras de conteúdo cecal foram mantidas sob refrigeração até o momento do plaqueamento no Laboratório de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV).

3.6. Processamento do cólon ascendente para análise histomorfométrica

No Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG/UFV), os fragmentos do cólon ascendente, medindo aproximadamente dois centímetros de comprimento, foram colhidos de 16 animais (quatro de cada grupo) e fixados em Carnoy (solução fixadora à base de colorofórmio e ácido acético), durante um período de seis horas e imediatamente transferidos para solução de álcool 80%, no qual foram mantidos até o processamento para inclusão em parafina. Os cortes histológicos transversais e com espessura de 5 µm foram obtidos em micrótomo LEICA 2045 e colocados sobre lâminas histológicas, obedecendo-se um intervalo entre cortes, de 40 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris para evidenciar os núcleos celulares e também submetidos à técnica histoquímica do PAS (ácido periódico-Schiff) + Alcian Blue (pH 2,5), de acordo com Bancroft e Stevens (1996) para revelação de glicoproteínas neutras e ácidas. A reação do PAS + Alcian Blue, na dependência do tipo de glicoproteínas presentes na preparação, poderá oferecer três padrões de cor: vermelho magenta, indicadora de glicoproteínas neutras; azul esverdeado, que acusa a presença de glicoproteínas ácidas e o tom variando de violeta a púrpura, indicativo da mistura de glicoproteínas neutras e ácidas.

3.7. Captura de imagens e análise histomorfométrica

As preparações histológicas do cólon foram observadas em microscópio Olympus AX-70, acoplado a uma câmara de captura de imagens (SPOT), utilizando-se objetiva de 20X e *zoom* de 1,25. Realizou-se a captura de pelo menos doze imagens da mucosa do cólon por animal, selecionando-se áreas nas quais as criptas foram seccionadas em orientação longitudinal. Estas imagens foram salvas na extensão "jpg" e posteriormente analisadas no Programa IMAGE PRO PLUS, versão 4.5 para Windows 98, para determinação do comprimento (profundidade) expresso em micrômetros (μm), de 20 criptas por animal, totalizando 80 valores/grupo.

3.8. Determinação de pH e contagem dos diferentes grupos microbianos presentes no conteúdo cecal

Após pesagem do conteúdo cecal, como indicado no item 3, diluições apropriadas foram realizadas para as análises microbiológicas e procedeu-se à leitura de pH(peagômetro Digimed DM-20–(Datamed). Foi feito plaqueamento em profundidade para todos os grupos microbianos avaliados. Bactérias bífidas, foram determinadas em ágar MRS(De Man Rogosa e Sharpe, 1960) modificado, acrescido de 1% de solução de cisteína 0,05% esterilizada a frio, clostrídeos em agar, RCM (Reinforced Clostridial Medium, (DIFCO®), sendo ambas as incubações a 37 ºC/48 h em anaerobiose (Probac/Anaerobac); *Lactobacillus* spp., em ágar MRS (DIFCO®), e incubação a 37 ºC/48 h, coliformes totais em VRB (DIFCO®), sobre camada, incubação a 30 ºC/48 h; e mesófilos aeróbios totais, em ágar PCA (Plate Count Agar, (DIFCO®), com as placas sendo incubadas a 30 ºC/48 h.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram delineados em blocos casualizados. Na análise da profundidade de criptas intestinais do cólon ascendente e na modulação dos grupos microbianos no conteúdo cecal, utilizou-se ANOVA. Quando os fatores apresentaram efeitos significativos a 5% de probabilidade, foi realizado o teste de Tukey para comparação das médias (RIBEIRO Jr., 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Número de células viáveis no concentrado celular de *Bifidobacterium breve*

A contagem média do concentrado celular de *Bifidobacterium breve* utilizados durante esta experimentação apresentou média de $1,33x10^{10}$ UFC/mL o que conferiu concentrações apropriadas do probiótico durante a experimentação

5.2. Análise histomorfométrica da mucosa do cólon ascendente

A análise das preparações histológicas demonstrou que os tratamentos não comprometeram a integridade das camadas que formam a parede do cólon ascendente. Na maioria das preparações, o cólon apresentou um lúmen reduzido, em decorrência de pregas desenvolvidas (Figura 2a), projetadas para o lúmen e formadas pelas camadas mucosa e submucosa.

Entre os fixadores utilizados na rotina histológica, o Carnoy é considerado um dos mais adequados para a preservação do muco (MATSUO et al. 1997). Porém, o muco é altamente hidrófilo e durante o processamento histológico para inclusão em parafina, ocorrem perdas significativas desse gel. Apesar disso, foi possível verificar espessa camada de muco, de coloração predominantemente púrpura, espalhada na luz intestinal e sobre a camada mucosa caracterizada por ausência de vilosidades e pela presença de criptas profundas (Figura 2b). No epitélio da cripta verificou-se quantidade acentuada de células mucosas de dois tipos: células caliciformes e células secretoras de profundidade de cripta. Com a reação histoquímica do PAS + AB, as células caliciformes apresentaram o citoplasma apical repleto de secreção de coloração púrpura. Além disso, as células caliciformes são mais freqüentes nas porções mediana e apical de cada cripta. Por outro lado, as células secretoras de profundidade de cripta, descritas em detalhe por ALTMANN (1983), estão concentradas na porção basal da cripta. (1983). Estas células apresentam secreção citoplasmática de coloração azul esverdeada, portanto rica em glicoproteínas ácidas, que segundo FONTAINE et al. (1996) protegem contra a translocação bacteriana, pois estas são menos degradadas pelas glicosidases

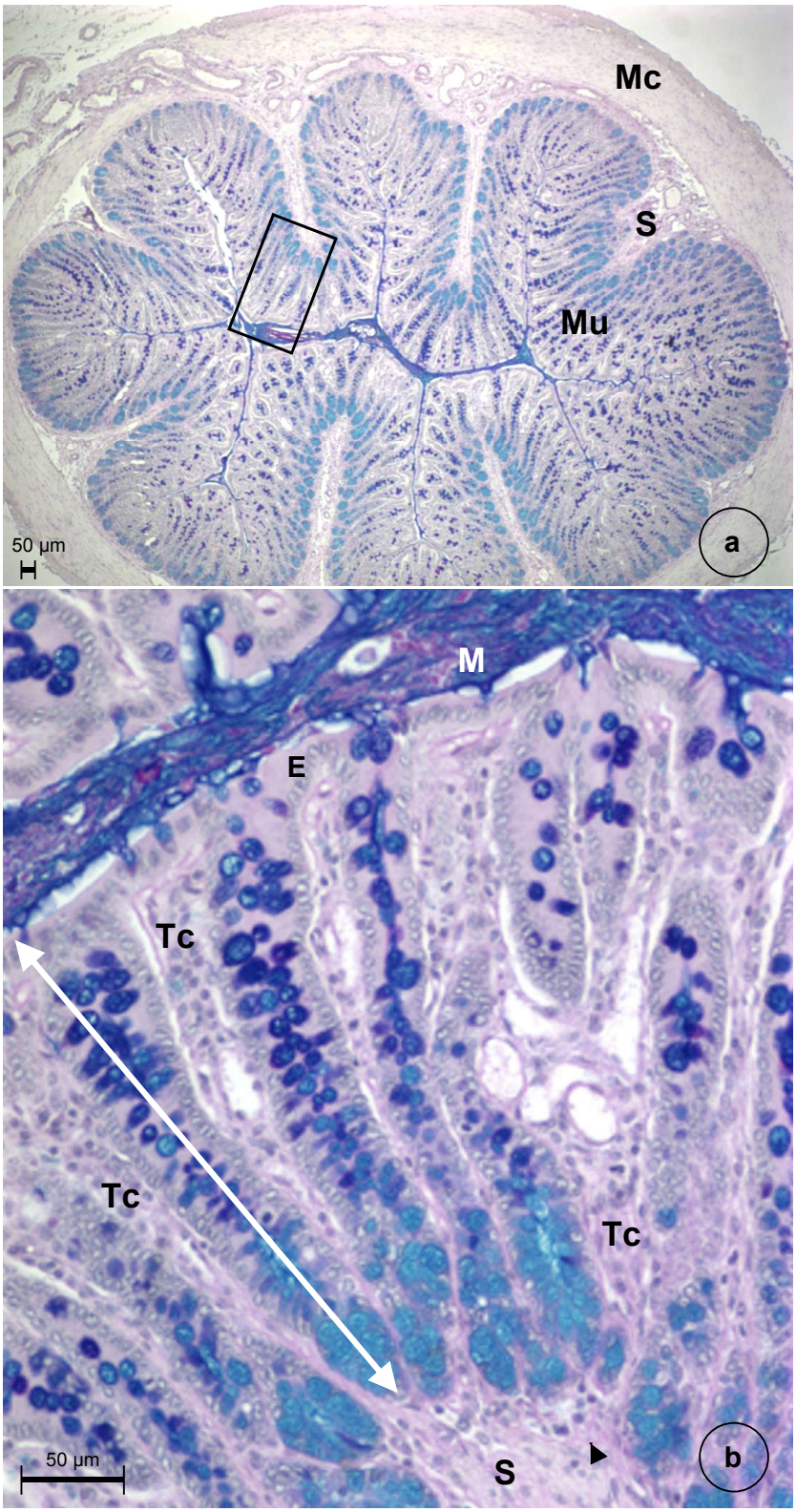

Figura 2 - Cólon ascendente de rato do grupo **LPB**. (a) Visão panorâmica; (b) Detalhe da mucosa na região delimitada pelo retângulo da Fig. 2a, apresentando as criptas envolvidas pelo tecido conjuntivo frouxo **(Tc)** da lâmina própria. **Mu**: mucosa; **S**: submucosa; **Mc**: muscular (linha branca indica profundidade da cripta); **E**: epitélio da mucosa; **M**: muco na luz do cólon; linha com dupla seta indicando a profundidade de cripta e **ponta de seta** na muscular da mucosa. Corados em PAS + AB pH 2,5.

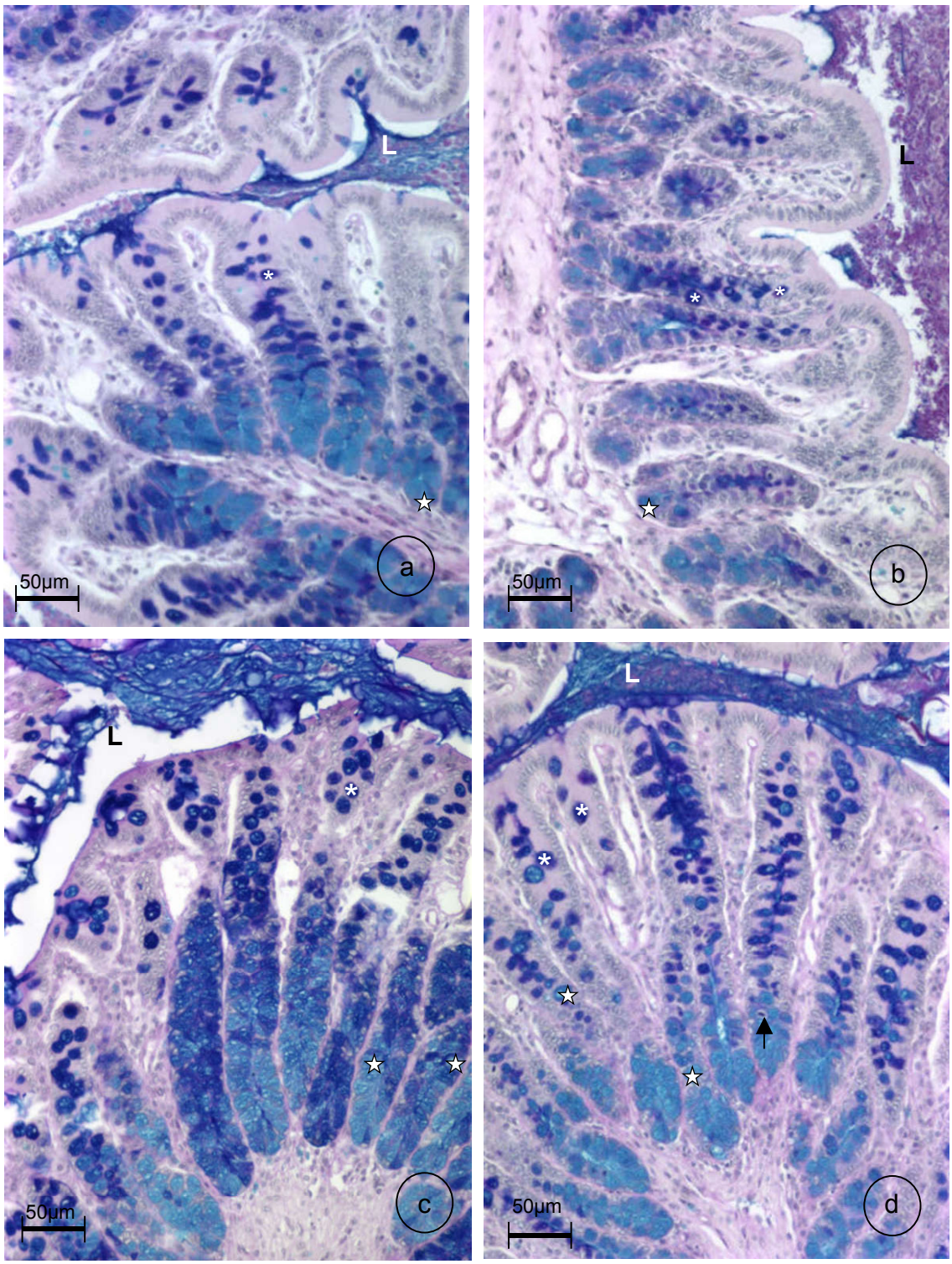

Figura 3 - Criptas do cólon ascendente de rato. (a) **Grupo Basal**; (b) **Grupo Controle**; (c) **Grupo LP**; (d) **Grupo LPB**. O * indica citoplasma de célula caliciforme PAS+AB pH 2,5+ e a ☆ marca citoplasma de células secretoras de profundidade de cripta AB pH 2,5+. A **seta** assinala figura de mitose no epitélio da cripta. **L**: luz do cólon corados em PAS+ AB pH 2,5.

bacterianas. A distribuição das células de profundidade de cripta se constituiu num referencial importante para o reconhecimento seguro da porção basal da cripta, pois na obtenção da medida de comprimento, só foram consideradas aquelas criptas que apresentavam nitidamente as porções basal, mediana e apical (Fig. 2b).

Furlan et al. (2004) numa revisão abrangente indica como fatores tróficos sobre a mucosa intestinal as aminas biogênicas, aminoácidos (glutamina), mamanoligossacarídeos (MOS); frutooligossacarídeos (FOS); prebióticos e probióticos. Na presente experimentação a ação probiótica não exerceu efeito adverso ao epitélio colônico intestinal. Esta integridade pode ser constatada nas fotomicrografias (Figuras 2 e 3).

O desenvolvimento e a própria manutenção da mucosa intestinal, sobretudo com relação ao epitélio, é decorrente de dois eventos citológicos importantes e associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células tronco localizadas nas criptas e a perda de células por descamação e apoptose. No caso específico das criptas do cólon ascendente, as células-tronco estão localizadas na parte mediana da cripta, havendo migração bidirecional de células em diferenciação tanto para o ápice quanto para a base da cripta (KARAM, 1999). Além das células mucosas, as criptas são constituídas ainda por células enteroendócrinas, células epiteliais cilíndricas de função absortiva e pelas células vacuolizadas, consideradas precursoras das células absortivas. A profundidade de cripta é um dos parâmetros importantes na análise histomorfométrica do cólon, pois a cripta é a unidade proliferativa do epitélio intestinal.

Na Figura 3 pode-se verificar que as criptas dos animais dos grupos LP e LPB aparentemente são mais profundas em comparação aos grupos basal e controle, fenômeno que também pode ser constatado através dos valores médios apresentados na Tabela 1.

Na Figura 4, o histograma ilustra, para cada grupo em estudo, a distribuição de 80 valores para comprimento de cripta, em classes crescentes. No grupo basal, por exemplo, não foi encontrado valor igual ou maior a 300 μm, mas 50 valores se concentraram dentro da classe de comprimento equivalente a 180→219 μm. No grupo controle, 35 valores se concentraram na classe de

180→219 μm. Ainda nesse grupo, não foi obtido nenhum valor igual ou superior a 340 μm. No grupo LP, cerca de 20 valores ficaram agrupados na classe de 300→339 e outros 20 na classe 340→379 micrômetros. No grupo LPB, a maioria dos valores ficou distribuída entre 180 a 359 μm, sendo que a classe 220→259 μm apresentou o maior número de valores.

Tabela 1 - Valores médios de profundidade de criptas do cólon ascendente de animais dos grupos controle, leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Grupo	Valor Médio
Controle (dieta)	191,05 b
LP	280,80 a*
LPB	230,78 ab

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

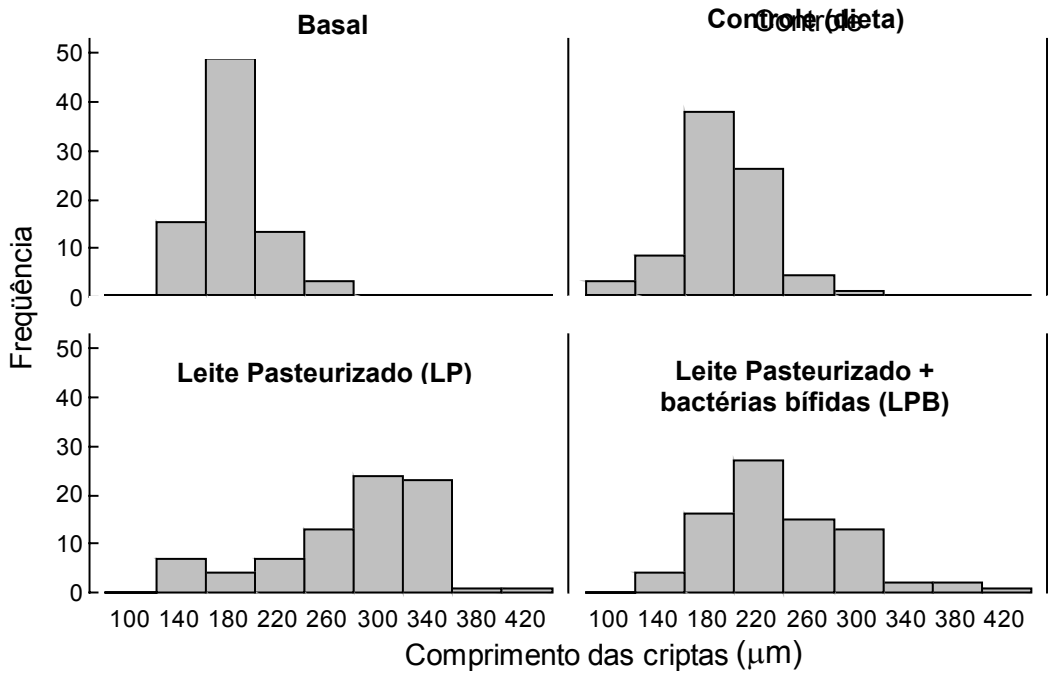

Figura 4 - Distribuição dos valores obtidos para profundidade de cripta (μm) em classes crescentes nos grupos basal, controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB)

Os valores médios foram positivos (Tabela 1), indicando um aumento do comprimento das criptas com o avançar da idade, porém esse fenômeno foi mais pronunciado nos grupos que receberam Leite Pasteurizado (LP) e Leite Pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB), e observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos Leite Pasteurizado (LP) e Controle; porém o tratamento LPB foi estatisticamente igual aos tratamentos LP e Controle.

Os estudos que avaliaram profundidade de cripta em animais tratados com bactérias probióticas geralmente se concentram no intestino delgado (BRADLEY et al., 1994; PLUSKE et al., 1997; PELICANO et al., 2003), talvez por ser este o segmento do tubo digestório, no qual ocorre a absorção dos nutrientes e a conclusão da digestão. No entanto, os resultados destes estudos são contraditórios, pois Pelicano et al. (2003) não observaram diferenças significativas para o parâmetro profundidade de cripta entre grupo controle e grupos tratados com bactérias probióticas. Já outros autores verificaram que as criptas intestinais de animais tratados com probióticos são mais profundas do que as criptas de animais controle (BRADLEY et al. 1994; PLUSKE et al., 1997).

No caso específico do intestino delgado, sabe-se que o equilíbrio entre renovação celular e perda de células, que ocorre normalmente no ápice dos vilos, determina um *turnover* celular constante que resulta na manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, na manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal (PELICANO et al., 2003). Segundo Ribeiro (1996), as bactérias probióticas competem com bactérias patogênicas pelos sítios de adesão na mucosa intestinal, diminuindo a incidência de diarréias e melhorando a absorção dos nutrientes disponíveis, sendo que esse mecanismo interfere diretamente na estrutura da mucosa intestinal.

No presente estudo, constatou-se que os maiores valores para profundidade de cripta foram obtidos nos animais do grupo LP, talvez em função da presença de vários oligossacarídeos na composição do leite que atuam como prebióticos (NEWBURG et al., 2005). Kleesen et al. (2003), trabalhando com ratos tratados com dieta comercial ou dieta mais oligofrutose, observaram que animais que receberam dieta mais oligofrutose apresentaram criptas do cólon significativamente mais profundas do que aqueles só tratados com dieta.

Os autores também constataram que ratos tratados com oligofrutose apresentaram maior quantidade de bactérias bífidas associadas à mucosa intestinal do que os animais controle (só tratados com dieta). Estes resultados foram interpretados como conseqüência de um mecanismo benéfico para promover a estabilidade da mucosa, considerada a barreira natural para inibir a translocação de patógenos e provavelmente, o efeito observado do estímulo conforme os autores, resultou da ação que os prebióticos exercem sobre a bactéria bífida consumida favorecendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que sabidamente têm efeito na proteção epitelial diminuindo o pH colônico e a biodisponibilidade de aminas tóxicas.

Contudo, o grupo LPB quanto ao parâmetro profundidade de cripta não apresentou diferença significativa em relação aos grupos controle e LP. O procedimento pelo qual o concentrado de bactérias bífidas foi oferecido aos ratos, o tempo de experimentação e até mesmo o fato de serem ratos aparentemente sadios, são exemplos de possíveis fatores que podem ter contribuído para a obtenção deste resultado.

É importante mencionar que embora a profundidade de cripta seja um parâmetro importante na análise histomorfométrica da mucosa intestinal, a sua interpretação de maneira isolada se torna extremamente limitada. Na verdade o processo de renovação celular na cripta está sujeito à interação de diversos fatores e deve ser sempre analisado dentro de um conjunto mais amplo e composto de outros parâmetros, dentre eles, o tamanho da amostra, freqüência de células secretoras e de mitoses. Os resultados da presente experimentação sugerem que a adição de bactérias bífidas não apresentou riscos de alteração da histomorfometria do cólon ascendente quanto ao parâmetro avaliado e a adição de bactérias bífidas no leite pasteurizado em um modelo murino não afetou a morfometria das criptas do cólon ascendente. Esta informação fundamenta que a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado nos bancos de leite humano não interfere e tem potencial de beneficiar as crianças que precisam fazer uso desta alternativa.

5.3. Valores médios de pH e da concentração bacteriana do conteúdo cecal de animais

As concentrações de bactérias bífidas, lactobacilos, clostrideos, coliformes totais, mesófilos aeróbios totais (expressos em Log UFC/g), e valores de pH do conteúdo cecal de animais alimentados com dieta (controle), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de *Bifidobacterium breve* (LPB) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias da concentração bacteriana do conteúdo cecal de animais alimentados com controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB) por 21 dias

pH e grupos microbianos no conteúdo cecal	Tratamento			
	Basal	Controle (dieta)	Leite Pasteurizado (LP)	Leite Past. + bact.bífidas (LPB)
Bactérias bífidas	8,32 a*	8,32 a	8,32 a	8,34 a
Lactobacilos	8,45 a	8,31 ab	8,23 ab	8,15 b
Clostrídeos	8,52 a	8,26 ab	8,17 b	8,17 b
Coliformes Totais	4,74 a	5,01 ab	4,05bc	3,63 c
Mesófilos A. Totais	8,15 a	8,15 a	8,10 a	7,97 b
pH	6,39 a	6,89 a	6,98 a	6,98 a

* Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dos grupos microbianos avaliados não foram constatados diferença significativa para os valores de pH e bactérias bífidas. Contudo, diferenças ($p \leq 0,05$), são observadas nas concentrações dos coliformes totais e mesófilos totais. Os dados indicam diferença na concentração de coliformes totais e mesófilos no grupo de animais que recebeu o leite com probiótico e esta diferença é de aproximadamente dois ciclos logarítmicos para os coliformes.

As bactérias bífidas, após os 21 dias da experimentação, provavelmente por meio de seus metabólitos, entre os quais os ácidos orgânicos lático e acético exerceram antagonismo sobre o grupo coliforme. Os valores médios de pH no entanto mantiveram-se praticamente inalterados. Vários trabalhos na literatura científica corroboram estes dados. Estudos *in vitro* Gibson e Wang (1994), mostraram a capacidade de bifidobactéria inibir o crescimento de *E. coli* e *Clostridium perfringens* em pH 7,0. Em trabalho posterior,

Gibson et al. (1995) verificaram que a administração em ratos de probióticos, prebióticos e simbióticos. O grupo de animais que recebeu simbiótico resultou em aumento no número de células de *Bifidobacterium*, em detrimento de outros gêneros anaeróbicos, como *Bacteroides, Fusobacterium e Clostriduim,* indicando também um efeito antagônico a grupos indesejáveis.

Em estudos com ratos em que se compararam tratamentos contendo probiótico, prebiótico e simbiótico, a administração de simbióticos resultou em concentrações mais elevadas de bactérias bífidas no cólon demonstrando o efeito estimulante do prebiótico no crescimento dessas bactérias (TESHIMA, 2001). A autora observou ainda que houve redução no número de aeróbios totais e *E. coli* no ceco e cólon dos animais que receberam prebióticos e simbióticos, o que resultou numa prevalência no intestino grosso de uma microbiota anaeróbica. Dinoto et al. (2006), em estudo semelhante, pesquisando os efeitos da administração de prebióticos (rafinose) e *Bifidobacterium breve* JCM 1192^T por 21 dias na modulação da microbiota cecal de ratos verificaram um aumento na população do grupo *Bifidobacterium* dos animais que receberam o simbiótico. Na presente experimentação, o número de bactérias bífidas manteve-se elevado em todos os tratamentos (> Log 8,3). A microbiota endógena é difícil de ser alterada e em animais hígidos com um sistema microbiano equilibrado e, sem desafio com patógenos alterações em grupos benéficos são difíceis de serem visualizadas. Nesta experimentação, a adição de bactérias bífidas probióticas ao leite pasteurizado alterou beneficamente a microbiota intestinal de ratos diminuindo a concentração de bactérias do grupo coliforme. Portanto, a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado nos bancos de leite humano tem potencial de atuar beneficamente melhorando o perfil microbiológico intestinal das crianças que tenham necessidade de fazer uso desta alternativa.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE LEITE HUMANO ADICIONADO OU NÃO DE *Bifidobacterium breve* NA DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS IL-4, IL-6, IFN-γ TNF-α, DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DO NITROGÊNIO (NO) E DO OXIGÊNIO (H_2O_2) EM MODELO MURINO

1. INTRODUÇÃO

A principal função do sistema imunológico é prover proteção ao hospedeiro contra a invasão de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A primeira linha de defesa contra os invasores é a barreira física, composta pela pele queratinizada, pelas membranas mucosas que revestem o trato respiratório e gastrointestinal e pelas barreiras químicas, representadas por uma variedade de enzimas e outras substâncias que têm ação microbicida direta ou inibem a aderência microbiana às superfícies orgânicas.

Qualquer invasor que ultrapasse essa primeira linha será combatido pelos componentes do sistema imunológico inato e, em seguida, pelo sistema imunológico específico. A imunidade inata envolve elementos tais como as proteínas do sistema complemento, as proteínas de fase aguda e as citocinas, e elementos celulares, como monócitos, macrófagos, granulócitos, células dentrídicas e células matadoras natural (NK). Esse sistema caracteriza-se por ter capacidade limitada de diferenciar um microrganismo de outro e apresentar resposta semelhante para diferentes microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os componentes da imunidade específica são os linfócitos e seus produtos, como os anticorpos; em contraste com a imunidade inata, esse sistema responde de maneira específica a cada microrganismo, possui memória e é capaz de responder mais vigorosamente a exposições repetidas do mesmo antígeno. As imunidades inata e específica funcionam de forma cooperativa. A imunidade inata não só faz a primeira defesa contra os microrganismos, como também desempenha importante papel na indução da resposta específica, e esta, por sua vez, aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata (RINNE et al., 2005).

Quanto aos recém-nascidos, outro componente da imunidade que atua enquanto a maturação de seu próprio sistema está se processando é a imunidade passivamente adquirida da mãe, por meio dos anticorpos de classe IgG do leite humano e da microbiota intestinal da mãe. O leite humano contém numerosos componentes protetores, além de proteger a criança passivamente, ele estimula o sistema imunológico, por meio de anticorpos, citocinas e outros elementos (HANSON, 2002).

A imunoglobulina A secretória (IgAs), provê proteção contra todos os microrganismos que a mãe tenha ou não no seu trato digestivo, evitando que esses adiram às superfícies mucosas. A lactoferrina, o principal componente protéico do leite maduro, é relativamente resistente à digestão enzimática e possui efeitos microbicidas, imunoestimulatórios e antiinflamatórios (ELASS et al., 2002). A fração oligossacarídica do leite contém análogos a vários receptores para microrganismos na mucosa epitelial. A presença do leite humano durante a colonização neonatal, e a subseqüente expansão da microbiota intestinal, é um fator fundamental não somente para a prevenção de infecções, mas também para induzir a maturação do sistema imunológico (HANSON, 2002).

Prematuros extremos, devido a diferentes fatores, são freqüentemente impedidos de receber o leite de suas próprias mães; conseqüentemente, a colonização intestinal dessas crianças se faz com uma microbiota desequilibrada, constituída pelas bactérias do ambiente das unidades de terapia intensiva, muitas vezes com bactérias virulentas e submetidas à pressão de seleção de antibacterianos, facilitando a invasão desses microrganismos (LAWRENCE, 2001).

A colonização e a diversidade dos grupos microbianos presentes no trato gastrointestinal são influenciadas por inúmeros fatores, dentre os quais a disponibilidade de nutrientes da dieta, o pH luminal, a presença de substâncias antimicrobianas e o estímulo do sistema imunológico MacFARLANE; CUMMINGS, 2002; SILVA et al., 2004; RINNE et al., 2005; SALMINEN et al., 2005; PENDERS, 2005).

As bactérias do ácido lático aparentemente aumentam várias funções do sistema imunológico, incluindo ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer. Tem sido proposto que a ingestão dessas bactérias pode aumentar a resistência a infecções por microrganismos patogênicos e que também apresentam potencial de prevenir o câncer. Acredita-se que essas atividades, além de outras, devem provir da capacidade que têm essas bactérias de estimular macrófagos e linfócitos T (PARK et al., 1999; VINDEROLA, et al., 2004; ISOLAURI et al., 2005; RINNE et al., 2005;).

Nos últimos anos, a contribuição do sistema imunológico de mucosas na defesa contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos foi reconhecida (PERDIGON et al., 1990; VINDEROLA et al., 2004). Como as mucosas funcionam como porta de entrada de enteropatógenos, existe grande importância estratégica em se prevenir ou alterar o curso natural de doenças infecciosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário. No entanto, sua relativa inacessibilidade torna o sistema imunológico das mucosas difícil de se estudar de maneira seqüencial em experimentos *in vivo.*

O sistema imunológico da mucosa é formado pelas placas de Peyer, pela lâmina própria e pela parede intestinal, enquanto os linfonodos dispersos pelo organismo e o baço representam o compartimento imune sistêmico. A parede intestinal contém macrófagos e linfócitos (células T e B) em íntimo contato com os alimentos no processo de absorção (PESTKA, 1993). As células peritoniais contêm macrófagos que, por serem células aderentes, se tornam de fácil obtenção, não requerendo desagregação mecânica ou digestão enzimática, como seria necessário para outros tecidos. Os leucócitos na cavidade peritonial fornecem uma proteção imediata contra microrganismos invasores, que podem penetrar na área abdominal devido à agressão intestinal ou lesão. Bellingan et al. (1996) demonstraram que os macrófagos migram do

peritônio para os linfonodos, aumentando dessa forma a capacidade de responder a microrganismos invasores como uma conseqüência da administração de bactérias láticas.

Perdigon et al. (1990) verificaram o efeito da ingestão de *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* na imunidade local da mucosa em resposta a enteropatógenos. Esses autores utilizaram camundongos Swiss, que receberam os microrganismos por via oral em sete dias. No oitavo dia, os animais foram desafiados com uma dose letal de *Salmonella typhimurium.* Os resultados mostraram que houve aumento dos anticorpos contra *Salmonella* no fluido intestinal dos animais que receberam *L. casei*, havendo também aumento na concentração total das Igs, detectado em animais tratados com *L. casei*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus,* sendo maiores os níveis de IgA que de IgG. Nos testes imunoenzimáticos houve somente aumento de IgA nos animais tratados com *L. casei.* Assim, sugeriu-se que a ingestão de *L. casei* ou *S. thermophilus* poderia ser utilizada como um método imunobiológico no controle de desordens entéricas.

Esses mesmos autores mostraram, em 1991, que a ativação de macrófagos e linfócitos de camundongos foi muito maior nos animais que receberam produtos fermentados com *L. casei* e *L. acidophilus* ou ambos, em comparação com os animais que receberam as culturas sem o processo de fermentação. Eles concluíram que o aumento da resposta imune foi devido às substâncias produzidas por esses microrganismos durante o processo de fermentação, como alguns metabólitos e peptídeos de caseína, enzimas bacterianas que promoveram a digestão dos constituintes do leite. Os autores consideraram que a degradação dos constituintes do leite permite maior absorção e estimulação antigênica e que a administração prolongada de leites fermentados por via oral não produz efeitos nocivos, como hepatomegalia, esplenomegalia ou toxicidade ao hospedeio.

De acordo com Ericson et al. (2000), os microrganismos probióticos que possuem influências favoráveis nos processos fisiológicos e patológicos do seu hospedeiro, por seu efeito na microbiota intestinal, podem agir na promoção da saúde humana. Embora a aplicação de probióticos tenha demonstrado tendências em relação à alteração de alguns aspectos da resposta imunológica, os mecanismos pelos quais isso ocorre não estão completamente esclarecidos.

Para os autores, a estimulação da imunidade específica e inespecífica deve resultar na produção de citocinas, e sua determinação pode ser um importante indicador da resposta imune.

Pesquisas com bactérias lácticas, demonstram que os probióticos têm efeito imunoestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (CROSS, 2002). Esse efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000); e também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imunológico (CROSS, 2002). Diante do exposto, propôs-se nesta experimentação verificar em modelo murino a presença de mediadores da resposta imunológica em culturas de células esplênicas e do exsudato peritonial.

2. OBJETIVOS

Verificar a presença de mediadores da resposta imunológica (citocinas IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2) em culturas de células obtidas a partir do exsudato peritonial e do baço de ratos fêmeas da raça Wistar, através da ingestão de leite materno pasteurizado adicionado ou não de *Bifidobacterium breve.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (nº do processo 50702452817).

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da UFV e no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista UNESP/Araraquara, São Paulo.

3.1. Origem e manutenção das bactérias bífidas

Nesta pesquisa foi utilizado um *pool* de bactérias bífidas, obtido a partir de sete culturas isoladas de recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno e sem uso de antibióticos (TESHIMA, 2005), pertencentes ao Banco de Culturas Láticas da Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC), DTA/UFV. Os isolados foram mantidos congelados a -80 ^{o}C, em LDR 12% (leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não-gordurosos adicionados de solução de glicerol 20% (v/v). Antes das experimentações, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e repicadas (1%) por três vezes consecutivas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) DIFCO®, esterilizado, e incubadas a 37 ^{o}C/18 h, em anaerobiose utilizando-se mistura anaeróbica (hidrogênio 10%, dióxido de carbono 5% e nitrogênio 85%), em câmara de anaerobiose (Anaerobic Workstation, Leeds, UK). Para confirmação da identidade, as culturas foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase, ao perfil de fermentação de carboidratos Kit API CH 50 (BioMerieux/ França); Em experimentações anteriores Teshima (2001), fez determinação da diversidade genética que foi realizada por meio de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (RIORDAN; FITZGERALD, 1997); e também a confirmação do gênero *Bifidobacterium* foi feita pelo teste da presença da enzima frutose-6-fosfatofosfocetolase, sendo um teste colorimétrico e qualitativo (SCARDOVI, 1994). De acordo com Cunha (2006), as sete bactérias bífidas que compuseram o *pool* utilizado neste trabalho apresentaram maior sensibilidade diante dos quatorze antibióticos testados e mais comumente usados em unidade neonatal de terapia intensiva (BAWER, 1967); maior resistência aos sais biliares e ao suco gástrico (NEUMANN; FERREIRA, 1995); exerceram antagonismo a cinco patógenos, não apresentaram toxicidade oral indireta e não promoveram translocação do tratogastrointestinal para o fígado, rins, coração e baço.

3.2. Preparo do concentrado celular das bactérias bífidas a ser adicionado no leite pasteurizado

As culturas de bactérias bífidas selecionadas pertencentes ao Banco de Culturas (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108 e UFVCC 1111) foram ativadas três vezes em caldo MRS

modificado, sendo a última ativação feita em 420 mL do caldo em frasco erlenmeyer com tampa rosqueável e incubadas a 37 ^{o}C/24 h em anaerobiose. Nas duas primeiras repicagens foi utilizado 10% (v/v) de inóculo e na terceira, 2% (v/v), em relação ao volume final. Após o crescimento celular, o material (*pool*) foi distribuído em tubos esterilizados de centrífuga Nalgene de polipropileno estéreis, com tampas rosqueáveis, seguindo-se centrifugação a 2750 xg por 10 minutos a 4 ^{o}C, em centrífuga Beckman GS-6R. Após descarte do sobrenadante, o concentrado celular foi ressuspendido em 100 mL de tampão fosfato estéril, pH 7,2, e dividido (volumes iguais) em dois tubos de centrífuga. Seguiu-se nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas, e foram respectivamente ressuspendidos em leite materno cru e leite pasteurizado, constituindo-se assim de um concentrado de células contendo valores médios de 10^{10} UFC/mL. Uma alíquota de 1,0 mL de cada concentrado foi retirada, para contagem de células viáveis de bifidobactéria. O plaqueamento *pour plate* foi feito nas diluições 10^{8} e 10^{9} a 37 ºC/48 h em jarras de anaerobiose. O concentrado celular foi produzido em quantidade suficiente para três dias de alimentação, dividido em volumes diários e acondicionado em tubos de 5 mL previamente esterilizados e mantidos congelados a -20 ºC até o momento da administração aos animais.

3.3. Coleta e preparo dos *pools* de leite humano

A cada três dias foram obtidas amostras de leite humano recém-ordenhado de oito doadoras voluntárias saudáveis, com idade gestacional a termo e parto normal ou cesárea, com tempo de lactação compreendido entre 10 e 30 dias e que não estivam fazendo uso de antibióticos ou de outro medicamento. As coletas e manutenção seguiram os padrões descritos no Manual de Rotina para Bancos de Leite Humano (BRASIL, 1994). Seguiu-se pasteurização (65 ^{o}C/30 min), resfriamento a 5 ^{o}C e adição ou não do concentrado celular de *Bifidobacterium breve*.

4. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos da raça Wistar fêmeas com 21 dias de idade recém-desmamados, pesando entre 50 e 52 g, no momento de chegada ao

Laboratório de Nutrição/UFV, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram pesados e divididos em grupos de 12, de maneira que a média de peso inicial entre os grupos fosse homogênea. Os animais foram alocados em gaiolas individuais e a temperatura foi controlada para 25 ºC +/-5, mantendo-se ciclos de claro e escuro de 12 horas, eles foram mantidos com 12 g na primeira semana, 15 g na segunda semana e 18 g na terceira e quarta semanas de ração (Labina®, S.P.) por dia e água *ad libitum* durante os 30 dias da experimentação e submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo Controle (D): constituído de 12 animais, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de água destilada diariamente, administrado via oral, e água destilada *ad libitum*.

Grupo Teste Leite Pasteurizado (LP): constituído de 12 animais, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de leite materno pasteurizado diariamente, administrado via oral, e água destilada *ad libitum*.

Grupo Teste Leite Materno Pasteurizado + bacterias bífidas (LPB): Constituído de 12 animais, que receberam a dieta (ração), 0,1 mL de leite materno pasteurizado + bactérias bífidas, diariamente administrados via oral, e água destilada *ad libitum*. No trigésimo dia, após inalação com clorofórmio, foram retirados dos animais: exsudato peritonial e células esplênicas para a realização das análises.

4.1. Obtenção de células do exsudato peritonial (PEC)

Após três dias da inoculação intraperitonial de 10 mL de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%, os animais foram sacrificados e tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (VECO, Campinas, Brasil). Seguiu-se a exposição dos peritônios de cada animal e inoculação de 5,0 mL de solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril, pH 7,2. Procedeu-se à centrifugação, coleta e contagem de macrófagos. O líquido peritonial resultante foi coletado, centrifugado a 200 x g durante cinco minutos (Fanem, Brasil) e lavado com 3,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS). Após lavagem, as células foram ressuspendidas

em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) contendo 2β mercaptoetanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) ($2x10^{-5}$M), penicilina 100 U/mL, estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (100 U/mL), L-glutamina (SIGMA Chemical Co., St. Louis, EUA) (2 mM) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab, Campinas, Brasil), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-C), para contagem de células. O número de células foi determinado em 10 μL da suspensão celular, diluída em 90 μL de líquido de Lázarus em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha). A suspensão celular foi ajustada à concentração desejada, para cada teste em meio RPMI-1640-C.

4.1.1. Ajuste de células peritoniais

O ajuste de células peritoniais foi feito para a determinação dos mediadores imunológicos: citocinas IL-6, TNF-α e dos compostos intermediários do nitrogênio, o óxido nítrico (NO), e do oxigênio (H_2O_2) bem como para a realização do teste de citotoxicidade MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (Usb, EUA)]. As células peritoniais foram ajustadas à concentração de $5x10^6$ células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecido de 24 cavidades (Corning, Inc., EUA). A cada cavidade foi adicionado 1,0 mL de suspensão celular, e as placas foram incubadas a 37 ºC por 60 minutos, em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific, EUA). Após essa incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C. Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e, ainda, acrescentados 100 μL de LPS (lipopolissacarídeo de *E.coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) na concentração de 10 μg/mL como controle positivo, ou somente RPMI-1640-C (controle de células). Essas placas foram novamente incubadas a 37 ºC em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientifc, EUA) /24horas. Após essa incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 4 ºC durante 10 minutos a 7.000 x g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados em tubos *eppendorfs* e estocados em freezer a -80 ºC, até o momento das análises.

4.2. Obtenção das células esplênicas

Na determinação de IFN-γ e IL-4 foram usadas culturas de células esplênicas e seus sobrenadantes. Animais dos três tratamentos foram sacrificados e, em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco, Campinas, Brasil), tiveram a pele da região abdominal retirada e o peritônio exposto, para extração do baço que foi transportado para uma placa de Petri estéril (Corning, Inc., EUA) contendo 3,0 mL de BSS [(Balanced Salt Solution) Sigma, St Louis, EUA], pH 7,2, gelado, onde foi macerado para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado várias vezes, para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Após esse procedimento, as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, Inc., EUA) de 15,0 mL e centrifugadas em BSS três vezes a 200 x g por 15 minutos (Fanem, Piracicaba, Brasil). As células sedimentadas foram ressuspendidas em 1,0 mL de meio RPMI-1640-C; a contagem do número de células viáveis foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha), pela técnica de exclusão com Azul de Trypan a 0,04%. Após contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de $5x10^6$ células/mL, para determinação de IFN-γ e IL-4 e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc., EUA), acrescentando-se de 34 μL de Concanavalina A, (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) na concentração de 0,5 μg/mL, usada como controle positivo, ou somente meio de cultura, nos controles de células. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) e aliquotados em tubos *eppendorfs* e estocados em freezer a -80 ºC até o momento da determinação do IFN-γ e IL-4 liberados nos sobrenadantes.

4.2.1. Ajuste das células esplênicas

As suspensões de células esplênicas ajustadas a $5x10^6$ células/mL, obtidas como descrito no item acima 4.2, foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc), acrescentando-se de 34 μL do estímulo Concanavalina A, Sigma (ConA) na concentração de 0,5 μg/mL, usada como controle positivo, ou somente meio de cultura, nos controles de células. As placas foram incubadas a 37 ºC em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) por 24 horas. Após essa incubação, as placas

foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (HETTICH, Inc.) a 4 ºC durante 10 minutos, a 4.000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e aliquotados em tubos *eppendorfs* e estocados em freezer a -80 ºC até o momento da determinação do IFN-γ e IL-4 liberados nos sobrenadantes.

4.3. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos (IC_{50})

Para determinação da viabilidade celular de macrófagos, utilizou-se o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983). Foram distribuídos, em uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.), o volume de 100 μL por cavidade das suspensões celulares dos animais dos três diferentes tratamentos e ajustadas à concentração de $5x10^6$ células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C, 100 μL em presença de LPS e somente meio de cultura RPMI-1640-C. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 ºC em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific). Após essa incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de NO e as células aderentes tratadas com 100 μL de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (MTT) (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. As placas foram incubadas por mais três horas nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μL de isopropanol (Mallinckrodt), para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/Visível (*Multiskan Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) a 540 nm, utilizando filtro de referência 620 nm.

4.4. Quantificação dos compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio

4.4.1. Determinação da produção de óxido nítrico

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito, que é um produto estável resultante da degradação do NO no sobrenadante

da cultura de células através da reação de diazotação com o reagente de Griess, composto de 1 g de sulfanilamida (Merk), 0,1 g de dicloroN (1-naftil) etilenodiamina (Merk), 2,5 de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p.100 mL (GREEN et al., 1982).

Das suspensões de células do exsudato peritonial, obtidas como descrito acima no item 4.1.1. e ajustadas na concentração de $5x10^6$ células/mL em meio RPMI-1640, foram distribuídos 100 μL dessa suspensão celular em placas de microtitulação de 96 cavidades estéreis de fundo plano (Corning, Inc.). Em algumas cavidades da placa foram adicionados 100 μL da solução de LPS a 10 μL/mL de meio, como agente estimulante (controle positivo). Em outras cavidades foram adicionados 100 μL de meio RPMI-1640 à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). Como controle dos reagentes, foi utilizado somente meio de cultura RPMI-1640 e LPS, sem a suspensão celular. As placas foram incubadas a 37 ºC em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) por 24 horas. Após esse período de incubação, foram retiradas alíquotas de 50 µL de cada amostra e transferidas para outra placa de cultura de células contendo 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.), acrescidas de igual volume, ou seja, de 50 μL de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/visível (*Multiskan Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) com filtro de 540 nm. As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva-padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram feitos em triplicatas e os valores expressos em micromoles de NO/$5x10^5$ células.

4.4.2. Determinação de liberação de peróxido de hidrogênio

A produção de H_2O_2 foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel (1981). As suspensões de células do exsudato peritonial, obtidas como descrito no item 4.1.1, foram ajustadas à concentração de $2x10^6$ células/mL, ressuspensas ao volume original em solução completa de Vermelho de Fenol constituída de 140 mM de NaCL, 10 mM

de tampão, fosfato de potássio, pH7,0, adicionado de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de Vermelho de Fenol e 0,01 mg/mL de peroxidase (SIGMA). Alíquotas de 100 μL foram transferidas para microplacas de 96 cavidades. Em algumas cavidades da placa foram adicionados 50 μL de uma solução a 5 mg/mL de Zimosan A (de *Saccharomyces cerevisae*, SIGMA Chem. Co., St. Louis,MO) em tampão Vermelho de Fenol. Em outras cavidades foram feitos controles de células (controle negativo), contendo somente a suspensão celular em solução completa de Vermelho de Fenol; em algumas cavidades, foram feitos controles dos reagentes (contendo somente solução de Vermelho de Fenol e Zimosan). As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37 ºC, com 5% de CO_2. Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 50 μL/cavidade de NAOH 5N (SIGMA). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/visível (*Multiskan Ascent*, Labsystems Research Tech.Div., Helsinki, Finland) com filtro de 620 nm, sendo o branco constituído de solução de Vermelho de Fenol e NAOH 5N. Os testes foram feitos em triplicatas e os resultados expressos em nanomoles de H_2O_2/2x10^5 células, a partir de uma curva-padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão Vermelho de Fenol.

4.5. Determinação das citocinas IL-6, TNF-α, IL-4 e IFN-γ

As citocinas IL-6 e TNF-α foram determinadas em sobrenadantes de culturas de macrófagos, enquanto a IL-4 e IFN-γ foram determinadas em sobrenadantes de culturas de células esplênicas, através do teste imunoenzimático ELISA (VENDRAMINI, 2002). Foi utilizado o kit Pharmingen, de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti IL-6, anti-TNF-α, anti-IL-4 ou anti-IFN-γ de rato purificado a 4 μg/mL (100 μL/cavidade) em tampão PBS e incubadas *overnight* à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS), contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com 300 μL de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por

60 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa 100 μL de cada citocina-padrão ou sobrenadantes das culturas de células peritoniais ou esplênicas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas quatro vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μL/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra anti - IL-6, anti-TNF-α, anti-IL-4 ou anti-IFN-γ de rato marcado com biotina, na concentração de 400 ng/mL, em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas três vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μL do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA, e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 100 μL do substrato (10 mM de tampão citrtato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina [SIGMA] e 1,2 mM de H_2O_2) foram adicionados em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μL de H_2SO_4 2N. A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados foi feita por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o nível de 5% de significância, seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico GraphPad Instat versão 3.05 CA, E.U.A., 2000.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Número de células viáveis no concentrado celular de *Bifidobacterium breve*

A contagem média dos nove *pools* utilizados durante esta experimentação apresentou média de $1,33 \times 10^{10}$ UFC/mL o que conferiu concentrações apropriadas do probiótico durante a experimentação.

6.2. Viabilidade de macrófagos peritoniais (MTT)

O resultado da viabilidade de macrófagos (MTT) encontra-se na Tabela 1 e Figura 1. Não houve diferença (p>0,05) entre os grupos de animais controle (C), que receberam (dieta), os que receberam leite pasteurizado (LP) e os que receberam leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 1 - Valores médios da viabilidade de macrófagos encontrados nos três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	90,55 **a**
Leite pasteurizado (LP)	86,10 **a**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	91,92 **a**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

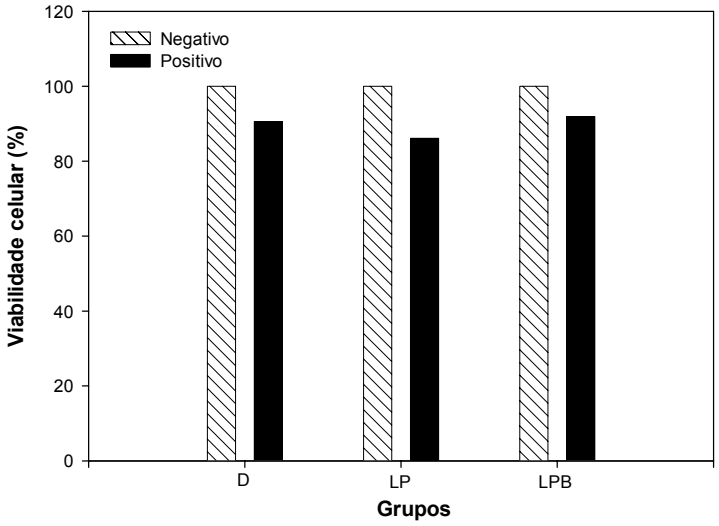

Figura 1 - Teste de citotoxicidade MTT – viabilidade de macrófagos peritoniais nos diferentes grupos de estudo.

As células do exsudato peritonial dos animais foram cultivadas em presença de LPS. Adicionou-se à placa de microtitulação uma solução de MTT (sal de tetrazólio) em cada cavidade, para formação dos cristais de formazama. Após incubação de três horas, adicionou-se álcool isopropílico para solubilizar as células viáveis. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm/620 nm. Cada animal foi avaliado em duplicata no momento da execução do teste. Os resultados foram expressos em percentual (%) como a média ± desvio-padrão de 12 animais, nos três grupos experimentais.

6.3. Liberação de Interleucina- 6(IL-6)

Os resultados da liberação de IL-6 (Tabela 2 e Figura 2) expressos em picogramas/mL indicaram diferença ($p<0,05$) entre os três tratamentos: grupo dos animais Controle, que receberam dieta (C), os que receberam dieta e leite pasteurizado (LP) e os que receberam dieta e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 2 - Valores médios de IL-6 encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	5.099,98 **a**
Leite pasteurizado (LP)	5.434,64 **a**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	3.492,52 **b**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

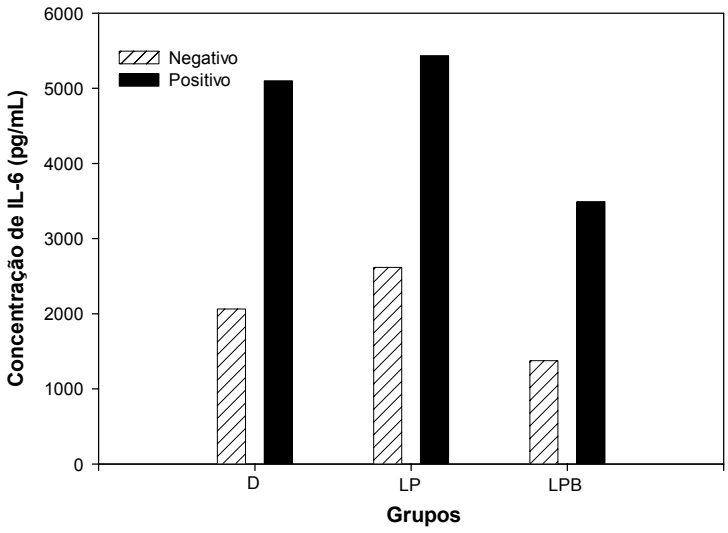

Figura 2 - Concentração de interleucina 6 (IL-6) liberada em culturas de células peritoniais.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de macrófagos peritoniais ($5x10^6$ células/mL) de ratos fêmeas Wistar que receberam oralmente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo as células em meio RPMI-1640. A análise estatística foi realizada comparando-se as amostras das células estimuladas com LPS, havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos como a média ±SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

6.4. Liberação de TNF-α

Houve diferença ($p<0,05$) na liberação de TNF-α (Tabela 3 e Figura 3) entre os grupos de animais que além da ração receberam água (controle) leite pasteurizado (LP) e os que receberam leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 3 - Valores médios de TNF-α encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	1.683,27 **b**
Leite pasteurizado (LP)	2.037,45 **a**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	2.073,82 **a**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

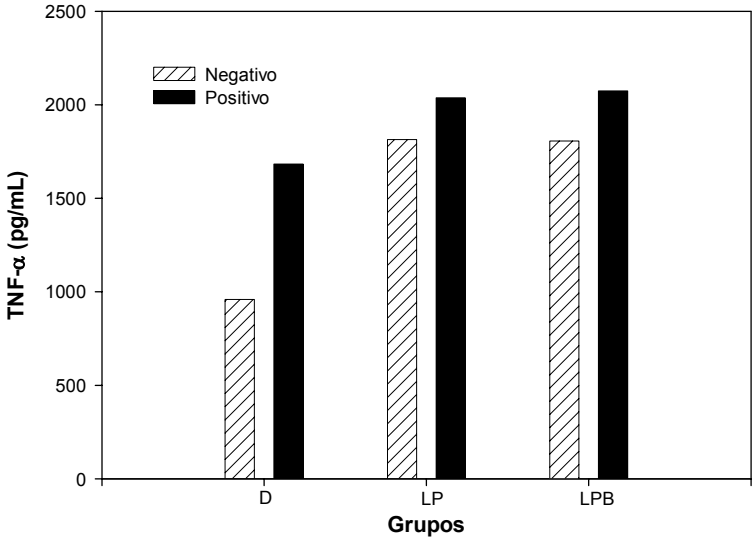

Figura 3 - Concentração de TNF-α liberada em culturas de macrófagos peritoniais.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de macrófagos peritoniais ($5x10^6$ células/mL) de ratos fêmeas Wistar que receberam oralmente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo as células em meio RPMI-1640. A análise estatística foi realizada comparando-se as amostras das células estimuladas com LPS, havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos como a média ± SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

6.5. Liberação de H_2O_2

Houve diferença na liberação de H_2O_2 (Tabela 4 e Figura 4) expresso em nanomoles/2x10^5 células entre os animais dos grupos que receberam além da ração, água (C), leite pasteurizado (LP) e os que receberam leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 4 - Valores médios de H_2O_2 encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	192,81 **b**
Leite pasteurizado (LP)	194,02 **b**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	246,99 **a**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

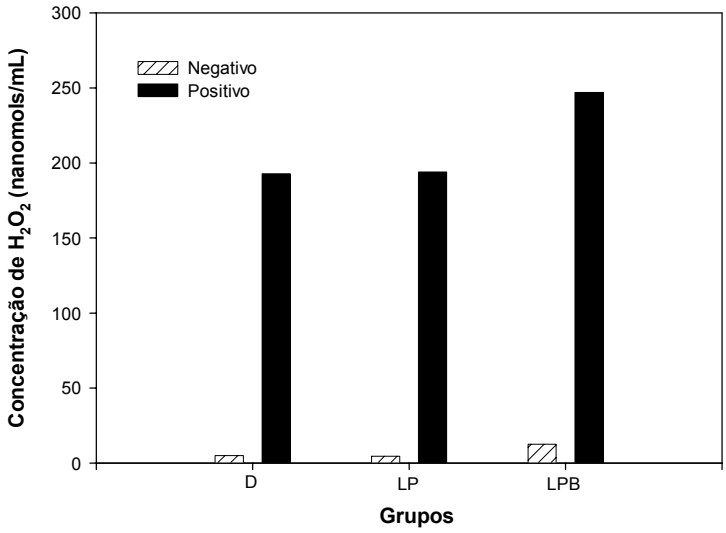

Figura 4 - Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em culturas de macrófagos peritoniais (PEC).

O teste realizado foi o ensaio biológico para determinação de H_2O_2 a partir de cultura de macrófagos peritoniais (2x10^6 células/mL) de ratos Wistar que receberam diariamente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo somente as células em tampão Vermelho de Fenol. Foram comparados os resultados entre as amostras controle de células e as células estimuladas com Zimosan A (*S. cerevisae)*, a 250 µg/cavidade. Os resultados foram expressos como a média ± SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

6.6. Liberação de Óxido Nítrico (NO)

Encontram-se na Tabela 5 e Figura 5 os resultados da liberação de NO expresso em micromoles/ 5x10 ^{5} células. Comparando os resultados obtidos, observa-se diferença significativa entre os grupos de animais controle, que receberam dieta (C), os que receberam leite pasteurizado (LP) e os que receberam leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 5 - Valores médios de óxido nítrico (NO) encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	159,08 **a**
Leite pasteurizado (LP)	62,57 **b**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	154,65 **a**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

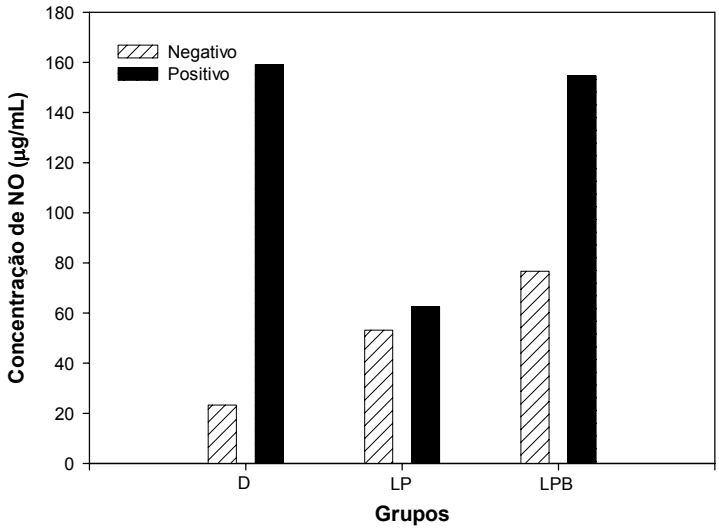

Figura 5 - Produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoniais (PEC).

O teste realizado foi o ensaio biológico, para determinação de óxido nítrico a partir de cultura de macrófagos peritoniais (2x10^{6} células/mL) de ratos Wistar que receberam diariamente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo as células em meio RPMI-1640. A um volume de 50 µL do sobrenadante de macrófagos adicionou-se o mesmo volume do reagente de Griess; após 10 minutos, a placa foi lida em espectrofotômetro UV/visível a 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida através de uma reta-padrão com quantidades conhecidas de $NaNO_2$. A análise estatística foi realizada comparando-se as amostras das células estimuladas com LPS. Os resultados foram expressos como a média ± SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

6.7. Liberação de Interleucina-4 (IL-4)

Na Tabela 6 e Figura 6 encontram-se os resultados da liberação de IL-4, valores médios expressos em picogramas/mL. A comparação dos resultados indica diferença ($p<0,05$) entre os animais dos grupos controle, que receberam dieta (C), os que receberam leite pasteurizado (LP) e os que receberam leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 6 - Valores médios de IL-4 encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	0,96 **b**
Leite pasteurizado (LP)	0,45 **b**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	1,79 **a**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

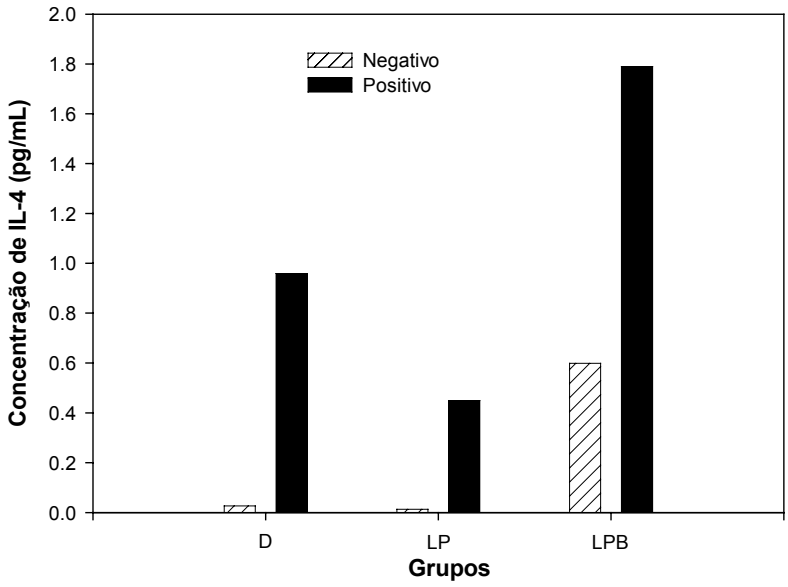

Figura 6 - Concentração de interleucina 4 (IL-4) liberada em culturas de células esplênicas.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de células esplênicas ($5x10^6$ células/mL) de ratos fêmeas Wistar que receberam diariamente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo as células em meio RPMI-1640. A análise estatística foi realizada comparando-se as amostras das células estimuladas com ConA, havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos como a média ± SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

6.8. Liberação de IFN-γ

A liberação de IFN-γ, resultados médios expressos em picogramas/mL encontra-se na Tabela 7 e Figura 7. Os dados indicam diferença ($p<0,05$) entre os grupos de animais controle, que receberam dieta (C), leite pasteurizado (LP) e os que receberam Leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB).

Tabela 7 - Valores médios de IFN-γ encontrados para os três diferentes grupos de estudo

Grupo Testado	Valor Médio
Controle (dieta)	233,53 **c**
Leite pasteurizado (LP)	485,64 **a**
Leite pasteurizado + bactérias bífidas (LPB)	295,64 **b**

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

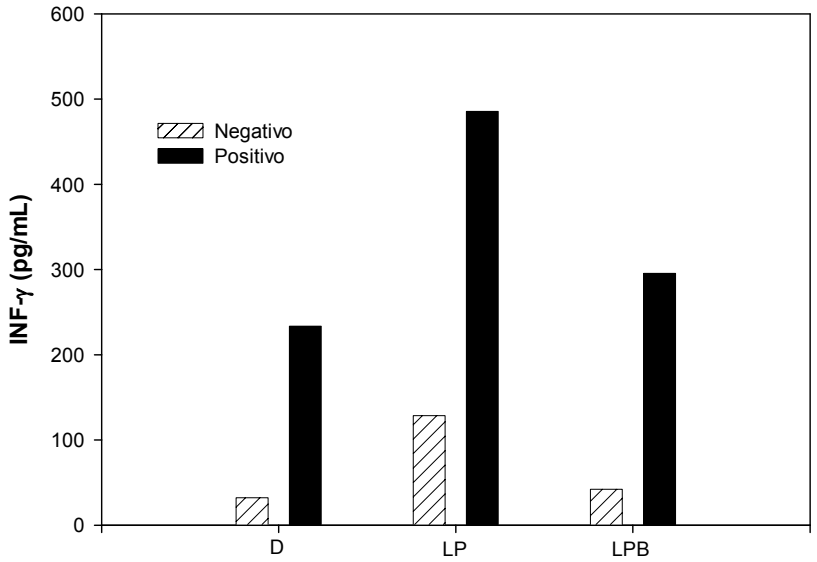

Figura 7 - Concentração de IFN-γ liberado em cultura de células esplênicas.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de células esplênicas ($5x10^6$ células/mL) de ratos fêmeas Wistar que receberam oralmente os três diferentes tratamentos: controle (dieta), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias bífidas (LPB). Foram feitos controles de células contendo as células em meio RPMI-1640. A análise estatística foi realizada comparando-se as amostras das células estimuladas com Con-A, havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos como a média ± SD de duplicatas de 12 animais por grupo.

No presente estudo administrou-se aos animais do grupo que recebeu bactérias bífidas (LPB) concentrações na faixa de 10^9 UFC/mL o que garante efeito probiótico por ser superior a 10^7 UFC/mL (GONZALES, 1990).

Os diferentes tratamentos não resultaram em diferenças ($p>0,05$) na viabilidade das células macrofágicas da cavidade peritonial dos ratos (Tabela 1), demonstrando que as bactérias bífidas veiculadas não apresentaram risco de citotoxicidade aos animais testados. Os macrófagos constituem a segunda maior concentração celular do sistema imunológico e participam tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (JANEWAY; TRAVERS 2000). A citotoxicidade constitui um parâmetro de importância na avaliação do efeito do consumo de bactéria probiótica no sistema imune do hospedeiro. Nesta experimentação o *pool* de bactérias bífidas avaliado não comprometeu de maneira adversa a população macrofágica dos animais testados.

Houve diferença ($p<0,05$) na liberação de IL-6 (Tabela 2) entre os animais dos grupos que receberam o probiótico (LPB) sendo essa diferença cerca de 1,5 menor neste grupo do que nos animais que não receberam o microrganismo. As células T helper murinas são principalmente classificadas em duas categorias de acordo com o padrão de citocinas que produzem: células helper Tipo 1 (Th1) que estimulam o aumento de IFN-γ, IL-2 e TNF-β, e as células do tipo 2(Th2) envolvidas com o aumento de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. As citocinas Th1, respondem pelo aumento da imunidade celular ao passo que as Th-2, pelo aumento da imunidade humoral. A homeostasia é mantida no hospedeiro por meio do balanço das populaçoes dos dois tipos de células e um desequilíbrio leva a vários distúrbios imunológicos como alergias e infecções. (MOSMANN et al., 1986).

IL-6 é sinal co-estimulador da ativação de células T, produzidas por determinadas células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas e tem papel fundamental na diferenciação das células B em células produtoras de anticorpos (PARKER, 1993). É uma interleucina com caráter multifuncional uma vez que atua regulando a resposta imune, a hematopoiese, proteínas de fase aguda, entre outras funções, indicando um papel central nos mecanismos inflamatórios. Os níveis fisiológicos de IL-6 são geralmente muito baixos elevando-se rapidamente em resposta a diferentes estímulos como nas infecções bacterianas ou virais, danos teciduais induzidos

pelas inflamações e em diferentes tipos de traumas. A sua ação, no entanto, é interativa e depende da interação com outros mediadores liberados (KISHIOMOTO, 1989). Devido a estas características, o significado dos valores da IL-6 só pode ser feito á luz do conhecimento da interação dos diferentes mediadores liberados numa determinada situação. Na presente experimentação, os animais que receberam Leite pasteurizado (LP) e os do grupo controle (C) foram mais efetivos no estímulo da resposta imune humoral representada pela IL-6. O efeito de bactérias probióticas no estímulo da liberação de diferentes interleucinas é variável. A determinação de IL-6 em três grupos de animais: que receberam um produto fermentado de soja com bactérias probióticas (*E. faecium* e *L. helveticus*), grupo placebo (produto não fermentado) e o que recebeu água, demonstrou que o produto fermentado induziu maior liberação desta citocina do que o placebo e esse por sua vez maior que o grupo controle (VENDRAMINI, 2002). Camundongos Balb/c alimentados com *Lactobacillus casei* Shirota inativados induziram aumento na produção de citocinas associadas a Th1 (IFN-γ e IL-2) ao passo que a liberação das citocinas associadas ao tipo Th2 ((IL-4, IL-5 e IL-6), foi menor do que no grupo controle, que não recebeu o lactobacilo (MATSUZAKI ; CHIN, 2000). A presente experimentação também evidenciou que o consumo de *Bifidobacterium breve* induziu menor resposta na liberação de IL-6.

O estímulo à produção de IFN-γ no presente estudo seguiu a seguinte ordem: LP>LPB>C, tendo o grupo que recebeu o microrganismo probiótico produzido 1,2 vez mais IFN-γ do que o controle. A resposta imunológica é ativada em forma de uma rede, em que um mediador irá atuar sobre uma célula e esta, agora ativada, libera ao meio externo outro mediador, e assim sucessivamente. Nessa rede de mediadores, o IFN-γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções essenciais na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células (IHLE, 2001). O IFN-γ é a citocina que produz o meio pelo qual os linfócitos T e as células NK ativam o macrófago no processo de destruição dos microrganismos fagocitados aumentando a ação microbicida desses macrófagos pela estimulação da síntese de intermediários reativos do oxigênio e do óxido nítrico tendo uma atividade central no combate a microrganismos intracelulares (PARKER, 1993).

A resposta do estímulo de bactérias probióticas aos mediadores relacionados a Th1 e Th2 é variável. *Lactobacillus casei Shirota* administrado na forma inativa a camundongos Balb-c induziu o aumento da liberação de IFN-γ (MATSUZAKI ; CHIN, 2000). Os dados da presente experimentação indicam que o *pool* de *Bifidobacterium breve* não constitui potente estimulador de células esplênicas na liberação de IFN-γ. De acordo com Ihle (2001) níveis elevados de IL-4 antagonizam os efeitos ativadores do IFN-γ sobre os macrófagos e, assim, inibem reações mediadas por células. A menor secreção de IFN-γ observada no grupo controle (C) e no que recebeu bactérias bífidas (LPB) pode ter sido desencadeada pelo mecanismo antagonista mediado pela maior secreção de IL-4 nesses grupos (Tabela 6), que de alguma forma diminuiu a secreção de IFN-γ pelas células esplênicas.

O estímulo à liberação de TNF-α foi observado nos grupos experimentais do presente estudo, na seguinte ordem: LPB>LP>C (Tabela 3). Os animais que receberam o leite pasteurizado com ou sem o microorganismo probiótico estimularam igualmente de maneira significativa ($P<0,05$) essa produção em relação ao controle. O TNF-α é uma citocina que tem demonstrado papel importante no processo inflamatório (POBER, 1988), no choque (TRACEY et al., 1986), na esclerose múltipla (VASSALI et al., 1992) e na malária (GRAU, 1987), assim como em desordens metabólicas, como caquexia e diabetes melitus não insulina-dependente (SPIEGELMAN; HOTAMISLIGIL, 1993). Essa citocina atua também como estimuladora de macrófagos para a produção de NO, juntamente com o IFN-γ (BOGDAN et al., 1991).

A formação endógena do TNF-α tem sido destacada pelo papel que exerce nos processos fisiológicos e patológicos. Pode atuar como imunomodulador, capaz de aumentar a expressão e amplificação da resposta imunológica, promovendo maior expressão de antígenos de ativação em macrófagos e células endoteliais, aumentando a citotoxicidade a fungos por leucócitos, induzindo a liberação de IL-1 de células endoteliais e monócitos e estimulando a formação de radicais superóxidos em neutrófilos. Tanto o IFN-γ, como o TNF-α atuam sinergisticamente na indução da liberação de óxido nítrico (NO) (KIM et al., 1999). Em leitões desafiados com o virus influenza e que receberam *Lactobacillus casei* var. *shirota* observou-se o estímulo da

resposta imune celular com aumento das concentrações de IFN-γ, TNF-α e IL-12, e concomitante redução nos títulos das partículas vírais (HORI et al., 2002).

Dentre os numerosos produtos secretados pelos macrófagos, encontram-se dois grupos de compostos inorgânicos com alto grau de reatividade química: os reativos intermediários do oxigênio (ROI), que incluem o H_2O_2, íons superóxido, e os reativos intermediários do nitrogênio (RNI), representados pelo óxido nítrico, nitritos e dióxido de nitrogênio. No presente estudo, a liberação de H_2O_2 por macrófagos peritoniais (Tabela 4) pelo grupo de animais que recebeu o microrganismo probiótico foi 1,2 vez maior do que a liberação observada nos outros dois grupos indicando que o *pool* de *B. breve* utilizado nesta experimentação estimulou a produção de H_2O_2 pelos macrófagos e dessa forma a dieta com LPB foi mais eficaz em iniciar o burst oxidativo e desenvolvimento inicial da resposta imune.

O estímulo da liberação do óxido nítrico (NO) (Tabela 5) pelos animais nos diferentes tratamentos da presente experimentação ocorreu na seguinte ordem: C>LPB>LP. Tanto o grupo controle quanto o que recebeu o probiótico estimularam 2,5 vezes mais a produção de NO, não havendo diferença entre estes grupos ($p>0,05$). O NO, radical livre gerado a partir do aminoácido L-arginina pelas enzimas óxido nítrico sintetases, exerce importante papel na regulação de uma variedade de funções fisiológicas, incluindo as do sistema imunológico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; MONCADA et al., 1991; KIECHLE; MALINSKI, 1993; KELLY et al., 1996). Faz parte do processo de morte ou inibição da proliferação de microrganismos, da destruição de células tumorais por macrófagos ativados e da defesa inata do hospedeiro (STUEHR; NATHAN, 1989; HIBBS et al., 1987). Atenção tem sido dada à sua formação endógena pela importância que tem nos processos fisiológicos e patológicos Estudos recentes demonstraram que macrófagos murinos estimulados com TNF-α produziram NO via expressão da indução do gene da óxido nítrico sintase, e foi enfatizado o papel desse intermediário nas atividades tumoricida e microbicida (XIE et al., 1992; LORSBACH et al, 1993). Essa molécula também faz parte da primeira linha de defesa do organismo com poder microbicida. O IFN-γ e o TNF- α, atuam sinergicamente na liberação de NO (KIM et al., 1999). A produção moderada de citocinas, H_2O_2 e NO induzida por

bactérias láticas utilizadas na dieta pode apresentar efeito benéfico na manutenção do balanço imunológico e aumento da resistência a infecções, sem a indução de efeitos secundários como os que ocorrem em tratamentos terapêuticos com citocinas (PARK et al., 1999). No entanto os autores enfatizam que, concentrações elevadas de TNF-α, H_2O_2 e NO causam caquexia, agressão tecidual e coagulação intravascular disseminada sendo portanto importante o controle desses mediadores *in vivo* o que pode ser efetivado avaliando-se as bactérias probióticas quanto ás suas capacidades na modulação dos diferentes moduladores imunológicos.

A liberação de IL-4 a partir de cultura de células esplênicas (Tabela 6) nos animais dos diferentes tratamentos ocorreu na seguinte ordem: LPB>C>LP. A presença de bactérias bífidas na dieta resultou numa indução de IL-4 pelas células TH2 praticamente 4 vezes maior do que a dieta controle. De acordo com Ihle (2001) níveis elevados de IL-4 antagonizam os efeitos ativadores do IFN-γ sobre os macrófagos e, assim, inibem reações mediadas por células. A menor secreção de IFN-γ observada na presente experimentação no grupo controle(C) e no que recebeu bactérias bífidas (LPB) pode ter sido desencadeada pelo mecanismo antagonista mediado pela maior secreção de IL-4 nesses animais (Figura 7), que de alguma forma diminuiu a secreção de IFN-γ pelas células esplênicas. Comundongos Balb/c alimentados com *Lactobacillus casei* Shirota inativados induziram aumento na produção de citocinas associadas a Th1, mas a liberação das citocinas associadas ao tipo Th2 onde está incluída a IL-4 foi menor do que no grupo controle que não recebeu o lactobacilo (MATSUZAKI ; CHIN, 2000).

Os resultados do presente estudo corroboram a afirmativa de que o estímulo aos diferentes mediadores do sistema imune varia com o microrganismo probiótico utilizado. Permitem ainda concluir que o tratamento dos animais com as bifidobactérias (LPB) proporcionou ao organismo hospedeiro capacidade de participar nos estágios iniciais da resposta imunológica, atuando sobre os fagócitos, capacitando-os ao “burst” oxidativo (H_2O_2) e maior capacidade microbicida (NO) com concomitante liberação da citocina TNF-α, que desencadeia a resposta imunológica. A maior produção de IL-4 inferida pela dieta contendo *B. breve* (LPB) sugere a participação das estirpes

utilizadas neste estudo na resposta adaptativa, ou seja, induzindo a produção de anticorpos. Estas estirpes, no entanto, não exerceram efeito na liberação de IL-6 e IFN-γ indicando capacidade variada no estímulo tanto de mediadores do tipo Th1 quanto nos do tipo Th2. As evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos, promotores de crescimento e imunomoduladores. Até o momento, o acúmulo de informações indica que a administração de bactérias probióticas na dieta influencia o sistema imunológico e a capacidade que estes microrganismos têm na modulação de mediadores tipo Th1 e Th2 promovendo seu balanço, os indica como potenciais no melhoramento do sistema imunológico do hospedeiro (MATSUZAKI; CHIN, 2000). Embora não se conheça as diferentes interações e sinergismos relacionados aos diferentes imunomoduladores aqui estudados, a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado dos bancos de leite humano tem o potencial de favorecer o hospedeiro no estabelecimento de uma microbiota desejável e modulando favoravelmente as respostas imunológicas inata e adaptativa. Estudos são necessários para a definição das melhores estirpes de bactérias bífidas responsáveis pelo estímulo dos diferentes mediadores da resposta imunológica, para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos assim como para a definição das concentrações mínimas necessárias ao estimulo dos diferentes mediadores.

CONCLUSÕES

Todas as amostras de leite humano cru ordenhado (LHC) apresentaram uma microbiota inicial inadequada, contudo, com relação ao leite pasteurizado (LHP), em 100% das amostras foi detectado ausência de coliformes totais e *Staphylococcus aureus*. Medidas rigorosas de monitoramento da qualidade do leite humano são imprescindíveis, no sentido de garantir um alimento seguro para os recém-nascidos. Apesar da eficiência do processo de pasteurização para patógenos verificado neste estudo, torna-se urgente a necessidade de conscientização por parte das doadoras no que se refere aos métodos de obtenção de coleta e ordenha domiciliar do leite materno. A adição de bactérias bífidas no leite materno (LPB) não apresentou riscos de alteração da histomorfometria do cólon ascendente quanto ao parâmetro avaliado em um modelo murino e esta informação fundamenta que a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado nos bancos de leite humano não interferiu na integridade do epitélio e tem potencial de beneficiar as crianças que precisam fazer uso desta alternativa. Conclui-se que a adição de bactérias bífidas probióticas ao leite pasteurizado alterou beneficamente a microbiota intestinal dos animais diminuindo a concentração de bactérias do grupo coliforme. Portanto, a adição de bactérias bífidas ao leite pasteurizado nos bancos de leite humano tem potencial de atuar beneficamente melhorando o perfil microbiológico intestinal de crianças que tenham necessidade de usá-lo. O tratamento dos animais com as bifidobactérias (LPB) proporcionou ao organismo hospedeiro capacidade de

participar nos estágios iniciais da resposta imunológica, atuando sobre os fagócitos, capacitando-os ao “burst” oxidativo (H_2O_2) e maior capacidade microbicida (NO) com concomitante liberação da citocina TNF-α, que desencadeou a resposta imunológica. A maior produção de IL-4 inferida pela dieta contendo *Bifidobacterium breve* (LPB) sugere a participação das estirpes utilizadas neste estudo na resposta adaptativa, ou seja, induzindo a produção de anticorpos. Estas estirpes probióticas, no entanto, não exerceram efeito na liberação de IL-6 e IFN-γ indicando capacidade variada no estímulo tanto de mediadores do tipo Th1 quanto nos do tipo Th2. Finalmente, as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos nesta experimentação justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos e imunomoduladores.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005. 580 p.

ACHESON, D. W. K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 384-404, 2004.

AKRÊ, J. (Ed.) **Alimentação Infantil:** Bases fisiológicas. São Paulo: IBFAN/ Instituto de Saúde de São Paulo, 1994. 97p.

ALLANDER, M.; SAKOTARI, R.; SAXELIN, M.; VILPONNEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T., von WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consuption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 351-354, 1999.

ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação:** Um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1999.

ALMEIDA, J. A. G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite humano**. 1986. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F.R.; ALMEIDA, C. H. G.; SERVA, V. B. Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, p. 13-6, 1989.

ALMEIDA, J. A. G; NOVAK, F. R.; SILVA. I. S. Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano odenhado. In*:* CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1., 1998, Brasília. **Anais...** Brasília: 1998. p. 10.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium for methods for the icrobiological examination of foods**. Washington. D.C.: 2001. 1219 p.

ALTMAN, G. G. Morphological observations on muçus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. **Am. J. Anat.**, v. 167, p. 95-117, 1983.

AMROUCHE, T.; BOUTIN, Y.; PRIOULT,G.; FLISS, I. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Agricultural Immunology** , v.17, p, 29-42, 2006.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; REMLEY, D. T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p .525-535, 1999.

ASAHARA, T.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. Probiotic bifidobactéria protect mice from lethal IFN-γ ection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. **Infect Immunology**, v. 72, p. 2240-2247, 2004.

ÁVILA, F. A. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 5, p. 505-511, 1998.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and pratice of histological techniques**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766 p.

BAWER, A. W.; KIRLY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Phatoloy**, v. 45, p. 493-493, 1966.

BRADLEY, G. L.; SAVAGE, T. F.; TIMM, K. I. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. **Poultry Science**, v. 73, p. 1766-1770, 1994.

BELLINGAN, G. J.; COLDWELL, H.; HOWIE, S. E. M.; DRAUSFIEL, I.; HASLETT, C. *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammatory. **Journal Immunology**, v. 157, p. 2577-2585, 1996.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in microbiology**, v. 3, p. 149-154, 1995.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Adv. Exp. Méd. Biol**., v. 473, p. 11-30, 1999.

BERG, R. D. The Indigenous Gastrointestinal Microflora. **Trends Microbiology**, v. 4, p. 430-435,1996.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrphage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1549-1555, 1991.

BORBA, L. M. **Efeito do processo de pasteurização do leite humano no crecimento de *Bifidobacterium* spp. "*in vitro*"**. 2001. 93 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

BORBA, L. M.; CASTRO, L. C. V.; FANCESCHINE, S. C. C.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição do leite humano e microbiota predominantemente bífida de lactente em aleitamento materno exclusivo. **Nutrire**, v. 25, n. 1, p. 135-154, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de banco de leite humano**. Normas Gerais para Bancos de Leite Humano. 2.ed. Brasília: 1993. 20 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição-INAN. Secretaria de Programas Especiais-SPE. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno-PNIAM. **Manual de rotinas em bancos de leite humano**. Brasília: 1994. 93 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília (DF), 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de banco de leite humano**. Normas Gerais para Bancos de Leite Humano. 2.ed. Brasília: 1993. 20 p.

CALIL, V. M. L. T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos adequados e pequenos para a idade gestacional. **Pediatria**, v. 14, n. 1, p. 9-13, 1992.

CARLOS, I. Z.; ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; MACHADO, C. O.; CYRILLO, R. N. S.; PERAZZO, F. F.; VALDEZ, G. F. Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. **Rev. Ci. Farm.**, v. 21, n. 1, p. 103-113, 2000.

CARROLL, L.; DAVIES, D. P.; OSMAN, M.; MCNEISH, A. Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. **Lancet**, v. 2, p. 732-733, 1979.

COCNIER, M. H.; BERNET, M. F.; CHAUVIERE, G.; SERVIN, A. L. Adherin heat-killed human Lactobacillus acidophilus, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **Journal of Diarrhoeal Disease Research**, v. 11 p. 235-242, 1993.

COLAÇO, W.; SERVA, V. B.; LIRA., C. S. Perfil microbiológico do leite humano ordenhado, distribuído no banco de leite humano do IMIP, no período de julho/95 a dezembro/99. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTA DE ALIMENTOS, 12., 2001, Maceió. **Resumos...** Maceió: 2001. p. 213.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

CUMMINGHAM, A. S.; JELLIFE, D. B. E. F. P. Breast-feeding and health in the 1980s: a global epidemiologic review. **J. Pediatr.**, n. 118, p. 659-666, 1991.

CUNHA, L. R. **Parâmetros de segurança e funcionalidade de bactérias bífidas isoladas de recém-nascidos com indicação de uso como probióticos em bancos de leite humano**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DAÍ, D.; WALKER, W. A. Protective nutrients and bacterial colonization in immature human gut. **Adv. Pediatr**., v. 46, p. 353-382, 1999.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial Modulation of innate defense: goblet cells and the Intestinal Mucus Layer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1131s-1141s, 2001. Suppl.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSELL, J. B. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. **Microbiology**, v. 143, p. 1175-1180, 1997.

DINOTO, A.; SUKSOMCHEEP, A.; ISHIZUKA, S.; KIMURA, H.; HANADA, S.; ASANO, K.; TOMITA, F., YOKOTA, A. Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated *Bifidobacterium breve*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 784-792, 2006.

DOGI, C. A.; PERDIGON, G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. **J. Dairy Res.**, v. 73, p. 357-366, 2006.

DUFFY, L. C. Interactions mediating translocation in the immature intestine. **Symposium: Bioactivity in Milk and Bacterial Interactions in the Developing Immature Intestine**. 2001. p. 432s-436s

EIDELMAN A. I.; SZILAGYI, G. Patterns of bacterial colonization of human milk. **Obstetrics & Gynecology**, v. 53, p. 550-552, 1979.

ELASS, E.; MASSON, M.; MAZURIER, J.; LEGRAND, D. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8in human endothelia cells. **Infect Immun.**, v. 70, p. 1860-1866, 2002.

ERICKSON, K. L.; HUBBARD, N. E. Probiotic immunomodulation in helth and disease. **J. Nutr.**, v. 130, p. 403-s409s, 2000.

FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we Know and Need to Know from gnotobiology? **Microbiol. Mol. Biol. Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1157-1170, 1998.

FALLOT, M. E.; BOYD, J. L.; OSKI, F. Breast-feeding reduces incidence of hospital admissions for IFN-□ ection in Infants. **Pediatrics**, v. 65, p. 1121-1124, 1980.

FERNÁNDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotics properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p, 449-455, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebioticos e probióticos:** atualização e prospecção. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora. 1.ed. 2003.

FERREIRA, C. L. L. F.; THESIMA, E. Prebióticos: Estratégia dietética para uma Microbiota Saudável. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 15, p. 22-25, 2000.

FONTAINE, N.; MESLIN, J.; C.; LORY, S.; ANDIREUX, C. Intestinal Mucin distribuition in the Germ-free rat and the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: Effect of inulin in the diet. **Br. J. Nutr.**, v. 75, p. 881-892, 1996.

FORCHIELLI, M. L.; WALKER, W. A. The Role of gut-associated Lymphoid tissues and Mucosal Defense. **Br. J. Nutr.**, v. 93, n. 1, p. 41-48, 2005. Suppl.

FORD, J. E.; LAW, B. A.; MARSHALL, V. M. E.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some its protective constituents. **J. Pediat.**, v. 90, p. 29-35, 1977.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GAGNON, M.; KHEADR, E.E.; BLAY, G.L.; FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 69-78, 2004.

GEBRE-MEDHIN, M.; VAHLQUIST, A.; HOFVANDER, Y.; UPPSALL, L.; VAHLQUIST, B. B. Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 29, p. 441-451,1976.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, p. 412-420, 1994.

GIBSON, G. R.; WILLIANS, C. M. Gut fermentation and health advantages: myth or reality? **Br. J. Nutr.**, v. 81, p. 83-84, 1999.

GILL. H. S.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; GOPAL P. K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). **Br. J.Nutr**., v. 83, p. 167-176, 2000.

GIULIANI, E.R.J. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: Tecnologia para Exportar. **Jornal de Pediatria** v.78, n 3, 2002.

GOES, R. M.; TABOGA, S. R. Células Caliciformes. In: **Células:** uma abordagem multidisciplinar. Organizadores: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. Barueri, S.P.: Manole, 2005. cap.14.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical propertirs relevant for use as probiotics. **Tren. Food Sci. Tech.**, v. 10, p. 139-157,1999.

GOPAL, P. K..; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H. S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 207-216, 2001.

GRAU, G. B.; FAJARDO, L. F.; PIGUET, P. F.; ALLET, B.; LAMBERT, P. H.; VASSALI, P. Tumor necrosis factor is an essential mediator in murine cerebral malaria. **Science**, v. 237, p. 1210-1212, 1987.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOCK, J. S.; TANNEBAUN, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRUMACH, A. S.; CARMONA, R. C.; LAZAROTTI D. Immunological factors in milk from brazilian mothers delivering small-for-date term neonates. **Acta Paediatr.**, v. 82, p. 284-290, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HALPERN, G. M.; VRUWINK, K.; van de WALTER, J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Influence of long term yoghurt consumption in young adults. **International Journal of Immunotherapy**, v. 2, p. 205-210, 1991.

HAMOSH, M., SALEM Jr., N. Long-chain polyunsaturated fatty acids. **Biol Neonate**, v. 74, p. 106-120, 1998.

HANSON, L. A. Protective effects of breastfeeding against urinary tract IFN-γ ection. **Acta Paediatr.**, v. 93, p. 154-156, 2002.

HARSHARNJIT, S. G. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 3, n. 2, p. 120-128, 2003.

HAVENAAR, R.; HUIS IN VELD, J. H. J. Probiotics: a general view. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). **The lactic acid bacteria –** the lactic acid bacteria in health and disease. London: Chapman & Hall, v.1. 1992. p. 151-170.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.

HORI, T. et al. Augmentation of cellular immunity and reduction of IFN-γ luenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 105-108, 2002.

HOSKINS, L. C.; AUGUSTINES, M.; McKEE, W. B.; BOUDING, E. T.; KRIARIS, M.; NIEDERMEYER, G. Mucin degratation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade AB blood group antigens and oligossaccharides from mucin glycoproteins. **J. Clin. Invest.**, v. 75, p. 944-953, 1985.

HOWIE, P. W.; FORSYTH, J. S.; OGSTON A, S. Protective effect of breastfeeding against infection. **BMJ**, v. 300, p. 11-16, 1990.

IBNOU-ZEKRI, N.; BLUM, S.; SCHIFFRIN, E. J.; Von Der WEID, T. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 428-436, 2003.

IHLE, J. N. The Stat family in cytokine signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 211-217, 2001.

ISHIKAWA, K.; SATOH, Y.; OOMORI, Y.; YAMANO, M.; MATSUDA, M.; ONO, K. Influence of conventionalization on cecal wall structure of germ-free wistars rats: Quantitative ligh and qualitative electron microscopic observations. **Anat. Embryol.**, n. 180, p. 191-198, 1989.

ISOLAURI, E. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 444-450, 2001.

ISOLAURI, E.; ARVOLA, T.; SUTAS, Y.; MOILANEN, E.; SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clinical and experimental Allergy**, v. 30, p. 1604-1610, 2000.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Probiotics, gut inflammation and barrier function. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 34, p. 437-450, 2005.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotcs. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P. **Immunobiology the system in health and desease**. 3.ed. New York: Garland Publ., 2000.

KANDORI, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEDA, M.; DOI, K. Histochemical, lectinhistochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. **Exp Anim.**, v. 45, p. 155-160, 1996.

KARAM, S. M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 286-298, 1999.

KATAYMA, T.; FUJITA, K.; YAMAMOTO, K. Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 457-465, 2005.

KRINKE, G. **The laboratory rat**. The handbook of experimental animals. Slovenia: Academic Press, 2000. 756 p.

KATO, I.; YOKOBURA, T.; MUTAI, M. Macrophage activation by Lactobacillus casei in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 27, p. 611-618, 1983.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in healt and nutrition. **J. Biosc**., n. 27, p. 703-714 2002.

KELLY, R. A.; BALLINAND, J. L.; SMITH, T. W. Nitric oxide and cardiac function. **Cir. Res.**, v. 79, p. 363-380,1996.

KLEESSEN. B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. **Br. J. Nutr**., n. 89, p. 597-606, 2003.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clin Chem.**, v. 100, p. 567-573, 1993.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histolologia e biologia celular:** uma introdução à patologia. Trad. Nádia Vieira Rangel e Rodrigues Azevedo. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 654 p.

KIM, H. M. M.; OH, D. I.; CHUNG, C. K. Production of nitric oxide in mouse peritoneal macrophages. **J. Ethnopharmacol**., v. 66, p. 311-317, 1999.

KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B. et al. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. **Clin. Perinatol.**, v. 26, p. 307-333, 1999.

KUNZ, C.; RUDLOFF, W.; BAIER, N.; KLEIN, S.; STROBET. Oligosaccharides in Human Milk:Structural, Functional and Metabolic Aspects. **Annu. Rev. Nutri.**, v. 20, p. 699-732, 2003.

LAWRENCE, R. A. Lower breastfeeding rates among supplemental nutrition program for women, infants, and children participants: a call for action. **Pediatrics**, v. 4, p. 1432-1433, 2006.

LAWRENCE, R. M.; LAWRENCE, R. A. Breast milk and infection. **Clin. Perinatol.**, v. 3, p. 501-528, 2004.

LESUFFLEUR, T.; BARBAT, A.; DUSSUAULX, E.; ZWEIBAUM, A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells associated with their ability to differentiate into columnar absortive and mucus-secreting cells. **Cancer Research**, v. 50, p. 6334-6343, 1990.

LILLY, D. M.; STILLWEL, R. H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LINK, H.; PAHUD, J. J. Process for producing immunostimulants. **U.S. Pattent**, n. 5, v. 185, p. 3212, 1990.

LINK-AMSTER, H.; ROCHAT, F.; SAUDAN, K. Y.; MIGNOT, O.; AESCHLIMANN, J. M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 10, p .55-64, 1994.

LONNERDAL, B. Breast milk: a truly functional food. **Nutrition**, v. 16, ns. 7/8, 2000.

LONNERDAL, B. Effect of nutrition on microbial flora in IFN-□ antis: the role of lactoferrin, iron and nucleotides. **Nestlé Nutrition Workshop**, v. 42, 1999.

LONNERDAL, B. O. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, n. 6, p. 1537S-1543S, 2003.

LONNERDAL, B.; FORSUN, E. Casein content in human milk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 41, p. 113-120, 1985.

LONNERDAL, B.; HOFFMAN, B.; HURLEY, L. S. Zinc and copper binding proteins in human milk. **Am. Journal Clinical Nutr.**, v. 36, p. 1170-1176, 1982.

LOOIJESTEIJN, P. J.; TRAPT, L.; VRIES, E.; ABEE, T.; HUGENHOLTZ, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *L. lactis.* **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 28, p. 71-80, 2001.

LORSBACH, R. B.; MURPHY, W. J.; LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H.; RUSSELL, S. W. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 1908-1913, 1993.

LÜLLMANN-RAUCH, R. **Histologia:** entenda, aprenda, consulte. Trad. André Hinsberger et al. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. 354 p.

LUNDEQUIST, B.; NORD, C. E.; WINBERG, J. The composition of the faecal flora in breastfed and botlle fed IFN-□ ants from birth to eight weeks. **Acta Paediatr. Scand.,** v. 74, p. 45-51, 1985.

MAASSEN, C. B. M.; HOLTEN-NEELEN, C. V.; BALK, F.; GLASHOUWER, M. J. H. B.; LEER, R. J.; LAMAN, J. D.; BOERSMA, W. J. A.; CLAASSEN, E. Strain dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered lactobacillus strains. **Vaccine**, v. 18, p. 2613-2623, 2000.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics, infection and immunity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 501-506, 2002.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinalet tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1035s-1045s, 1999. Suppl.

MADARA, J. L. The chameleon within: improving antigen delivery. **Science**, v. 277, p. 910-911, 1997.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; VESIKARI, T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 20, p. 333-338, 1995.

MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

MARANGONI, C.; AGOSTONI, A. M.; LAMMARDO, M.; GIOVANNINI, C.; GALLI, E.; RIVA. Polyunsaturated fatty acid concentrations in human hindmilk are stable throughout 12-months of lactation and provide a sustained intake to the infant during exclusive breastfeeding: an Italian study. **Br. J. Nutr.**, v. 84, p. 103-109, 2000.

MARANGONI, F.; AGOSTONI, C.; LAMMARDO, A. M.; BONVISSUTO, M.; GIOVANNINI, M.; GALLI, C.; RIVA, E. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 66, n. 5/6, p. 535-40, 2002.

MARIN, M. L.; LEE, J. H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. **J. Dairy. Sci.**, v. 80, p. 2713-2720, 1997.

MARKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v. 59, p. 571-579, 1998.

MATSUO K.; OTA, H.; AKAMATSU, T.; SUGIYAMA, A.; KATSUYAMA T. Histochemistry of the surface mucous Gel Layer of the Human Colon. **GUT**, v. 40, p. 782-789, 1997.

MIETTINEN, M.; VARKILA, J. V.; VARKILA, K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5403-5405, 1996.

MISLIVEC, P. B.; BEUCHAT, L. R.; COUSIN, M. A. **Yeasts and molds**. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington (DC): American Public Health Association, 1992. p. 239-249.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their Role in Human Health. **J. Ind. Microbiol.**, v. 6, p. 263-268, 1990.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. Asia Pacific. **J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 1, p. 2-9. 1996.

MITSUOKA, T. **Microbes in the intestine** – our lifelong partners. Tokyo: Yakult Honsha, 1989. 104 p.

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORROW, L. A.; RANGEL, J. M. Human milk: protection against IFN-γ ectious diarrhea: Implications for prevention and clinical care. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 221-228, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTTET, C.; MICHETTI, P. Probiotics: wanted dead or alive. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, p. 3-6, 2005.

MULLIE, C.; YAZOURH, A.; PARSER-ANDRADA, A.; ROMOND, M. B.; ROMOND, C. H. Intestinal bacterial colonisation and translocation in C3H/HeJ conventional mice fed a unique dose of live or dead *Bifidobacterium breve* C50. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 62, p. 421-427, 2004.

NDUATI, R.; JOHN, G.; MBORI-NGACHA, D. et al. Effect of breastfeeding and formula-feeding on transmission of HIV-1 – a randomized clinical trial. ***JAMA***, n. 283, p. 1167-74, 2000.

NEWBURG, D. S. Innate Immunity and human milk. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p.1308-1316, 2005.

NEUMANN, E.; FERREIRA, C. L. L. F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct "in vitro" susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozime and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, v. 26, p. 59-65, 1995.

NICAISE, P.; GLEIZES, A.; FORESTIER, F.; QUERO, A. M.; LABARRE C. Influence of intestinal bactéria flora on cytokine production by mouse peritoneal macrophages. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 4, p.133-138, 1993.

NIKODEMUZ, I. Microflora in human milk sample. **Nahrung**, v. 30, p. 901-906, 1986.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ALMEIDA, C. H. G. Detecção e identificação de coliformes em leite humano ordenhado. **R. Inst. Mat. Inf.**, v. 3, p. 17-19, 1989.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 43-52, 1999.

OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E.; HE, F. Differences in *bifidobacterium* flora composition in allergic and health infantis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 108, p. 144-145, 2001.

PARK, S. Y.; JI, .E.; KO, Y. T.; JUNG, H. K.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide and cytokine prodution in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of Bifidobacterium. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 46, p. 231-241, 1999.

PARKER, D. C. T cell-dependent B cell activation. **Ann Rev. Immunol.**, v. 11, p. 331-360, 1993.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte climentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v. 98, p. 125-134, 2003.

PELLETIER, C.; BOULEY, C. C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1725-1731, 1997.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 141-147, 2005.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factores influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, p. 215-236, 1997.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; NADER de MACIAS, M. E.; ROUX, M. E.; PESCE de RUIZ HOLGADO. The oral administration of lactic acid bactéria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. **J. Food Protection**, v. 53, p. 404-410, 1990.

PERDIGON, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic acid bactéria and their effect on the immune system. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 2, p. 27-42, 2001.

PERDIGON, G.; NADER de MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; PESCE de RUIZ HOLGADO. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 404-410, 1986.

PEREIRA, M. L.; SANTOS, E. J.; SELLOS, I.; BERGDOLL, M. *Staphylococc*i in breast milk from women without mastites. **Rev Microbiol.**, v. 26, p. 117-120, 1995.

PESTKA, J. J. Food, diet and gastrointestinal immune function. In: KINSELLA, J. E. (Ed.). **Advances in food nutrition research**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 37, cap.1, p. 1-66.

PICCIANO, M. F. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. **Biol Neonate**, v. 74, p. 84-93, 1998.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, p. 61-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid, microassay of measurement of superoxide and hydrogen producties. **J. Immunol. Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

POBER, J. S. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. **Am. J. Pathol.**, v. 133, p. 426-433, 1988.

RAMOS, M. P. P.; CUNHA, L. R.; ALVES, F. F.; CHAVES, K. S.; FREITAS, E. R.; RODRIGUES, V. C.; TEIXEIRA, M. B.; VIANA,N.L.; FERREIRA, C. L. L. F. Grupos microbianos presentes no leite materno e sua importância em bancos de leite humano. In: REGINA C. S. M. et al. (Ed.). **Simpósio mineiro de microbiologia**, Viçosa, MG: UFV, 2005. 333 p.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Bifidobacteria and their role**. Basel: Birklhäuser Verlag, 1983. 295 p.

RASTALL, A. R.; GIBSON, G. R.; HARSHARNJIT, S. G.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, R. T.; POT, B.; ROWLAND, R. I.; SANDERS, M. E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 2, p. 145-152, 2005.

RIBEIRO Jr., J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 2001. 301 p.

RINNE, M. M.; GUEIMONDE, M.; KALLIOMAKI, M.; HOPPU, U.; SALMINEN, J. S.; ISOLAURI, E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 59-65, 2005.

RINNE, M. M.; KALLIOMAKI, M.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Effect of Probiotic and Breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* Microbiota and Humoral Immune Responses. **The Journal of Pediatrics**, v. 47, n. 2, p. 186-191, 2005.

RIORDAN, J. The biologic specificity of breastmilk. In: RIORDAN, J., AUERBACH, K. G. **Breastfeeding and human lactation**. 2.ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1998. p. 121-161.

RIORDAN, K. O.; FITZGERALD, G. F. Determination of genetic diversity within the genus Bifidobacterium and estimation of chromosomal size. **FEMS Microbial. Lett.**, v. 156, p. 259-264, 1997.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 4.ed. London: Grower Medical Publ., 1999.

ROLF, R. D. Sequential development of the human intestinal microbial flora. In: Van Der WAAIJ, D. et al. (Eds.). **Microbial ecology of the human digestive tract**. Herborn, Germany: Institute for Microecology, 1990. p. 48-60.

ROSSI, E. A. **Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto probiótico de soja**. 2000. 154 f. Tese (Livre Docente em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

RUBALTELLI, F. F.; BIADAIOLI, R.; PECILE, P.; NICOLETTI, P. Intestinal flora in breast-and bottle-fed infants. **J. Perinat. Med.**, v. 26, p. 186-191, 1998.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; LAHTEENMAKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods – the European prespective. Int. **Journal Food Microbiology**, v. 78, p. 99-117, 2002.

SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W. M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S. E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 44, p. 93-106, 1998.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VOS, W. M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 1-8, 2005.

SCAGLIA, F.; LONGO, N. Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism. **Semin Perinatol**, n. 23, p. 152-161, 1999.

SCARDOVI, V. Genus bifidobacterium. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. v.2. 1994. p. 1418-1434.

SERAFINI, Á. B.; ANDRÉ, M. C. D. P.; RODRIGUES, M. A. V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O; CAMPOS, M. R. H.; MONTEIRO, É. C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T. F. N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Revista de Saúde Pública**, v.37 , n.6 p. 775-779, 2003.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B. E.; PALENZONA, D. The genus bifidobacterium. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.). **The lactic acid bacteria**. v. 2. Londres, RU: Blackie Academic, 1995. p. 279-306.

SHU, Q.; GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157: H7 Infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 59-64, 2002.

SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of Bifidobacterium longum Ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 29-37, 2004.

SOBEL, J. D. Biotherapeutic agents as therapy for vaginitis. **Humnan Press**. p. 221-224, 1999.

SPECK, L. M. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2.ed. Washington, DC: American Public Health Association., 1984.

SPIEGELMAN, B. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Through thick and thin: wasting, obesity and TNF-alfa. **Cell**, v. 73, p. 625-631, 1993.

STEVENSON, D. K.; YANG, C.; KERNER Jr., J. A.; YEAGER, A. S. Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. **Clinical Pediatrics**, v. 24, p. 338-341, 1985.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 1543-1545, 1989.

SZOLLOSY, E.; MARJAI, E.; LANATOS, J. Bacterial contamination and sparing heat treatment of mother's milk. **Acta Microbiol Acad Sci Hungarian**, v. 21, p. 319-325, 1974.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 527-533, 1998.

TANNOCK. G. W. **Probiotics** – a critical review. England: Horizon Scientific Press. 1999. p. 5-14.

TANRIVERDI, H. A.; ACUN, C.; USTUNDAG, G.; BARUT, A.; TEKIN, I. O.; USTUNDAG, Y. Investigation of human colostrum *Helicobacter pylori* IgA content in lactanting women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 124, n. 1, p. 58-60, 2006.

TEJADA-SIMON, M. V.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 162-169, 1999.

TESHIMA, E.; BORBA, L.; RAMOS, M. P. P.; CUNHA, L. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Bactérias bífidas endógenas probióticas para uso em bancos de leite humano. In: CONGRESSO MINEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO – A Ciência por um Brasil Sem Fome, 2005, Ouro Preto. **Resumos...** Ouro Preto: UFOP/UFMG, 2005.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal murina por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico**. 2001. 113p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. M. S. C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v. 1, Brasil: Nestlé Ltda., p. 3-11, 2000.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J; WOLPE, S. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v. 234, p. 470-474, 1986.

TRAPP, C.; CHANG, C. C.; HALPERN, G. G. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. The influence of long term yoghurt consumption in populations of young and elderly adults. **Intern. Journal of Immunotherapy**, v. 9, p. 53-64, 1993.

VALDÉS, V.; SÁNCHES A. P.; LABBOK, M. **Manejo clínico da lactação:** assistência à nutriz e ao lactente. Rio de Janeiro: Revinter, 1996.

Van BEEK, R. H. T.; CARNIELLI V. P.; SAUER, P. J. J. Nutrition in the neonate. **Curr Opin Pediatr.**, v. 7, p. 146-151,1995.

VASSALI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 411-452, 1992.

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**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

VINDEROLA, C. G.; MEDICI, M.; PERDIGON. G. Relationship between interaction sites in trhe gut, hidrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous and exogenous bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 230-243, 2004.

VITINI, E. et al. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. **Biocell**, v. 24, n. 3, p. 223-232, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Collaborative Study Team on the role of Breastfeeding on the prevention of IFN-γ ant mortality. Effect of breastfeeding on IFN-γ ant and child mortality due to infectious disease in less developed countries: a pooled ananlysis. **Lancet**, v. 355, p. 451-455, 2000.

XANTHOU M. Immune protection of human milk. **Biol Neonate**, v. 74, p. 121-133, 1998.

XIE, O. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v. 256, p. 225-228, 1992.

YASUI, H. et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 383-389, 1999.

ZARZAUR, B. L.; KUDSK, K. A. The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function and derangements. **Shock**, v. 15, n. 6, p. 411-420, 2001.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo