

ALINE COSTA E SILVA

**POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ALERGÊNICO DO
LEITE HUMANO CRU E PASTEURIZADO SUPLEMENTADO
COM *Bifidobacterium breve* EM RATOS WISTAR**

Dissertação 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
Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE COSTA E SILVA

**POTENCIAL IMUNOMODULADOR E ALERGÊNICO DO
LEITE HUMANO CRU E PASTEURIZADO SUPLEMENTADO
COM *Bifidobacterium breve* EM RATOS WISTAR**

Dissertação 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
Magister Scientiae.

APROVADA: 10 de julho de 2008.

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta
(Co-orientador)

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Co-orientador)

Prof^a. Neuza Maria Brunoro Costa

Prof^a. Maria de Fátima Pícolo Barcelos

Prof. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

DEDICO

Aos meus pais Elder e Cór Mariae

Às minhas irmãs Débora e Laís

Às minhas avós Carmen e Tracy

Ao meu noivo Roberto

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

Aos meus pais Elder e Cór Mariae, pelo carinho e apoio incondicionais que me permitiram chegar até aqui. Eu amo muito vocês!

Às minhas irmãs Débora e Laís, pelo apoio e compreensão.

Às minhas avós Carmen e Iracy e minha madrinha Sônia, pelo carinho, pelos conselhos sábios e pela compreensão da minha ausência.

Aos meus avôs José (*in memoriam*) e João (*in memoriam*), pelo amor aos livros e valorização dos estudos que repassaram à nossa família.

Ao meu noivo Roberto, por estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando a cada passo com muito amor.

Aos meus sogros Roberto e Giovanina, pela família que se tornaram pra mim nesta caminhada.

A toda minha família pela torcida!

À Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Tecnologia de Alimentos que deram condições para o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira pela oportunidade de desenvolver esse belo trabalho, pelas palavras amigas nos momentos difíceis e pela compreensão neste longo caminho que me ajudou a trilhar.

Aos meus co-orientadores Sérgio da Matta e Sérgio de Paula e aos professores Izabel, Clóvis, Neuza e Maria de Fátima pela valiosa contribuição no aprimoramento deste trabalho.

Às minhas amigas Karina e Flávia, profissionais dedicadas que conquistaram meu respeito e minha amizade.

À Penha e Luciana pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Culturas Láticas e Laboratório de Biologia Estrutural pelas experiências trocadas.

Às minhas amigas Karol Gatti, Juana Rodrigues e Flávia Gotelip por tantas vezes terem me escutado e me aconselhado. Vocês são muito queridas!

Às minhas amigas Mayara, Nayana e Patrícia por compreenderem a minha ausência mostrando quão forte pode ser uma amizade.

Aos amigos que torceram e colaboraram para a realização deste trabalho!

BIOGRAFIA

ALINE COSTA E SILVA, filha de Elder Gomes da Silva e Cór Mariae Ferreira da Costa e Silva, nasceu em Ipatinga, MG, em 6 de julho de 1983.

Em outubro de 2006 concluiu a graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em março de 2007 iniciou o mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, MG, atuando na linha de pesquisa de Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. IMUNIDADE DA MUCOSA INTESTINAL	4
2.1.1. Defesa imunológica do recém-nascido	7
2.2. PROBIÓTICOS E SAÚDE.....	8
2.2.1. Microbiota intestinal e resposta imunológica	10
2.2.1.1. Influência dos probióticos nas reações alérgicas e inflamatórias.....	12
2.2.1.2 Probióticos e produção de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio	14
2.2.1.3. Probióticos e produção de IgA secretória	16
2.2.2. Bactérias bífidas e seus benefícios a saúde	17
2.3. A IMPORTÂNCIA DO LEITE HUMANO PARA A SAÚDE DO LACTENTE	19
2.3.1. Efeito protetor do leite humano	21
2.3.2. Papel do leite humano no desenvolvimento das bactérias bífidas intestinais	23
2.4. BANCO DE LEITE HUMANO.....	24
2.4.1 Efeitos da pasteurização nos componentes do leite humano	26
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. OBJETIVO GERAL	29
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO, ESTIRPES UTILIZADAS NO “POOL” DE BACTÉRIAS BÍFIDAS E SUPLEMENTAÇÃO DO LEITE COM AS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	30
5.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	30
5.3. OBTENÇÃO DO CÓLON	32
5.4. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	33
5.4.1. Quantificação de mastócitos	33
5.4.2. Quantificação de células produtoras de IgA (linfócito B)	33
5.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL (PEC).....	34
5.5.1. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos para quantificação dos mediadores imunológicos	34
5.6. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS	35
5.6.1. Obtenção dos sobrenadantes das células esplênicas	35
5.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT) - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS.....	35
5.8. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DO NITROGÊNIO E OXIGÊNIO	36
5.8.1. Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	36
5.8.2. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	37

5.9. DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, TNF- α , IL-4 E IFN- γ	37
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1. QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS GRANULADOS E DEGRANULADOS NA MUCOSA E SUBMUCOSA DO CÓLON DE RATOS WISTAR	39
6.2. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE IGA (LINFÓCITOS B) NA MUCOSA E SUBMUCOSA DO CÓLON DE RATOS WISTAR	42
6.3. TESTE DE VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS (MTT).....	47
6.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DO NITROGÊNIO E DO OXIGÊNIO EM CULTURA DE CÉLULAS PERITONIAIS DE RATOS WISTAR	48
6.4.1. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoniais...	49
6.4.2. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de macrófagos peritoneais	51
6.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURAS DE CÉLULAS PERITONIAIS E ESPLÊNICAS DE RATOS WISTAR	52
6.5.1. Concentração de interleucina-6 (IL-6) liberada em cultura de macrófagos peritoneais	53
6.5.2. Concentração do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) liberada em cultura de macrófagos peritoneais.....	55
6.5.3. Concentração de interleucina-4 (IL-4) liberada em cultura de células esplênicas	57
6.5.4. Concentração do interferon - gama (IFN- γ) liberada em cultura de células esplênicas	59
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLH** - Banco de Leite Humano
- BSA** - Albumina Bovina
- ConA** - Concanavalina A
- H₂O₂** - Peróxido de Hidrogênio
- IFN- γ** - Interferon-gamma
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgE** - Imunoglobulina E
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL-4** - Interleucina-4
- IL-6** - Interleucina-6
- LC** - Leite Cru
- LCB** - Leite Cru + Bifidobactérias
- LDL** - *Low density lipoprotein*
- LH** - Leite humano
- LHP** - Leite Humano Pasteurizado
- LP** - Leite Pasteurizado
- LPB** - Leite Pasteurizado + Bifidobactérias
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MALT** - *Mucosa associated lymphoid tissue*
- NK** - *Natural killer*
- nmoles** - nanomoles
- NO** - Óxido nítrico
- PBS** - Solução tampão salina-fosfato
- pg** - picogramas
- RN** - Recém-nascido
- RPMI-1640** - *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura - série 1640)
- TLR** - *Tool like receptor*
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral-alfa
- UFC** - Unidade formadora de colônia
- UTIN** - Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
- Zimosan A** - Parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*
- μ moles** – micromoles

RESUMO

SILVA, Aline Costa. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008.
Potencial imunomodulador e alergênico do leite humano cru e pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* em ratos Wistar. Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta e Sérgio Oliveira de Paula.

O objetivo deste estudo foi investigar, em ratos Wistar, o efeito imunomodulador e alergênico do leite humano cru e pasteurizado suplementado com um “pool” de *Bifidobacterium breve* isolados do trato digestório de recém-nascidos. O leite humano foi coletado de doadoras voluntárias seguindo os padrões do manual de rotina de Bancos de Leite Humano. Parte do leite coletado passou pelo processo de pasteurização lenta permitindo a obtenção de leite humano pasteurizado e outra parte não sofreu tratamento térmico sendo então denominado leite humano cru. As culturas de bifidobactérias isoladas das fezes de recém-nascidos saudáveis alimentados exclusivamente com leite humano e sem uso de antibiótico foram obtidas da Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC). Um *pool* de bifidobactérias previamente selecionadas foi preparado com sete culturas, concentrado a 10^{10} UFC mL⁻¹ e adicionado em metade da alíquota do leite humano cru e pasteurizado (0,1mL) no trabalho experimental. Os ratos Wistar fêmeas recém desmamados foram divididos em 5 grupos experimentais: C (controle), LC (leite humano cru), LCB (leite humano cru + bifidobactérias), LP (leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado + bifidobactérias). Após o período experimental os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o líquido peritoneal, o baço e o cólon foram retirados. Foi realizada a quantificação de mastócitos granulosos e degranulosos e linfócitos B na mucosa e submucosa do cólon dos animais experimentais. As citocinas IL-6 e TNF- α e os compostos intermediários do nitrogênio (NO) e oxigênio (H₂O₂) foram quantificados em cultura de macrófagos e as citocinas IL-4 e IFN- γ nas culturas de células esplênicas dos ratos. A razão mastócitos granulosos/degranulosos não diferiu estatisticamente entre os grupos de estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos na quantificação de mastócitos granulosos e degranulosos, indicando que o consumo de bactérias bífidas não promoveu resposta alérgica em ratos Wistar, visto que a degranulação de mastócitos não foi estimulada. A contagem de linfócitos B também não diferiu de

forma sigficativa entre os grupos experimentais. A quantificação de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio estimularam beneficemente o processo oxidativo. A modulação de citocinas variou entre os tratamentos e a suplementação com bifidobactérias não estimulou resposta inflamatória exacerbada no hospedeiro. Nesse estudo, a suplementação do leite humano pasteurizado com *B. breve* mostrou-se promissora por atuar beneficemente na modulação de indicadores imunológicos, permitindo aumentar informações sobre o aspecto de segurança das estirpes avaliadas.

ABSTRACT

SILVA, Aline Costa. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.
Immunomodulator and allergenic potential of raw and pasteurized human milk supplemented with *Bifidobacterium breve* in Wistar rats. Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta and Sérgio Oliveira de Paula.

The objective of this study was to investigate, in Wistar rats, the immunomodulator and allergenic effect of the raw and pasteurized human milk supplemented with an pool of *Bifidobacterium breve* isolated from newborn intestinal tract. The human milk was collected from voluntary donors following patterns from the routine manual of Human Milk Banks. Part of the collected milk went through a process of slow pasteurization allowing the obtention of pasteurized human milk and the other part did not suffer any thermal treatment and therefore was denominated raw human milk. Cultures of bifid bacteria isolated from the feces of healthy newborn fed exclusively with human milk and without the use of antibiotics were obtained from the Culture Collection of the Universidade Federal de Viçosa (UFVCC). A pool of previously selected bifid bacteria was prepared with seven cultures, concentrated to 10^{10} CFU mL⁻¹ and added in half of the aliquot of the raw and pasteurized human milk (0,1mL) in the experimental work. Female weaning rats were divided into five experimental groups: C (Control), LC (raw human milk), LCB (raw human milk + bifid bacteria), LP (pasteurized human milk) and LPB (pasteurized human milk + bifid bacteria). After the experimental period the animals were euthanized in CO₂ chamber and peritoneal liquid, spleen and colon were obtained. Quantification of granulated and degranulated mast cell and B lymphocytes in the mucous and submucous membrane of the colon of the experimental animals was carried out. The cytokines IL-6, TNF- α , the intermediary compounds of the nitrogen (NO) and oxygen (H₂O₂) were quantified in macrophage culture and IL-4, IFN- γ in spleen cells culture of the rats. The reason granulated/degranulated mast cells, as expected, didn't differ statistically among the study groups. There was not statistic difference among the groups in the quantification of granulated and degranulados mast cell, indicating that the consumption of bifid bacteria didn't promote allergic response in Wistar rats, because the mast cell degranulation was not stimulated. The counting of B lymphocytes didn't differ statistically among the experimental groups. The cytokines quantification and

intermediary compounds of the nitrogen and oxygen indicated that the ingestion of raw human milk, beneficially stimulated the oxidative burst. The cytokines modulation varied among the treatments and the supplementation with probiotic bacteria didn't stimulate exacerbated inflammatory response in the host. In this study, the supplementation of pasteurized human milk with *B. breve* was promising for beneficially modulate the immunological indicators, allowing to increase information about safety of the analysed strains.

1. INTRODUÇÃO

O leite humano é considerado o alimento ideal para recém-nascidos. Ele apresenta uma composição nutricional balanceada e é suficiente para suprir todas as suas necessidades nutricionais durante os primeiros seis meses de vida. Além disso, ele protege a criança contra diversas doenças agudas e crônicas (TOMA & MONTEIRO, 2001).

O leite humano é capaz de prover proteção passiva do recém nascido por meio da transmissão de anticorpos e células imunológicas, contém substâncias que estimulam o amadurecimento do sistema imune e apresenta efeito antiinflamatório (BERNT & WALKER, 1999; LAWRENCE & PANE, 2007). Dentre os fatores protetores do leite humano encontram-se anticorpos, antioxidantes, células do sistema imunológico, inibidores de protease, fator bífido, enzimas catalase e peroxidase, interferon, lisozima, lactoferrina e componentes lipídicos (BERNT & WALKER, 1999; EUCLYDES, 2000).

Apesar de todos os benefícios da amamentação, em situações em que a nutriz apresenta algum tipo de doença infecciosa transmissível pelo leite materno, está em processo de quimioterapia/radioterapia, faz uso de medicamento que contra-indique a amamentação ou mesmo nos casos em que há morte materna no pós-parto, adoção ou nascimento de recém-nascido prematuro incapaz de sugar o seio, o processo natural da amamentação fica impossibilitado (BRASIL, 2004). Nesses casos, o leite proveniente de Bancos de Leite Humano se torna a melhor alternativa para a alimentação infantil (ARNOLD & LARSON, 1993).

A riqueza de nutrientes do leite humano favorece a sua contaminação e, por isso, exige que parâmetros de segurança sejam seguidos para a garantia da sua qualidade. A pasteurização lenta (65°C/30 minutos) é um processo que faz parte da rotina dos Bancos de Leite Humano, mas que apesar de garantir a sua qualidade microbiológica, causa perda de alguns componentes nutricionais e imunológicos (ARNOLD & LARSON, 1993) e inibe o crescimento de bifidobactérias (BORBA *et al.*, 2003).

O leite humano contém substâncias bifidogênicas que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias bífidas no trato digestório do hospedeiro (EUCLYDES, 2000; KITAOKA *et al.*, 2005; NEWBURG *et al.*, 2005). Por sua vez, estas bactérias atuam inibindo o crescimento de patógenos e assim

protegendo o lactente contra doenças infecciosas (EUCLYDES, 2000; NEWBURG *et al.*, 2005).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidade adequada, promovem o equilíbrio do ecossistema digestivo, produzindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (OLIVEIRA & BATISTA, 2002; FERREIRA, 2003; SANDERS, 2003; OLIVEIRA & MIYOSHI, 2005; RASTALL *et al.*, 2005; SAAD, 2006). Eles são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva do hospedeiro como a permeabilidade intestinal (SAAD, 2006), a produção de IgA secretória, muco, citocinas (CEBRA, 1999; RASTALL *et al.*, 2005) e células imunocompetentes (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). A interação entre a microbiota entérica e a mucosa intestinal ao longo da vida mantém um estado fisiológico de ativação do sistema imune associado ao intestino (CEBRA, 1999; BRITTI *et al.*, 2006).

As bactérias bífidas, comumente utilizadas em produtos probióticos, geralmente não incluem espécies significativamente patogênicas e, por isto, são “Generally Recognised as Safe” (GRAS) (GOMES & MALCATA, 1999; PICARD *et al.*, 2005). Sua elevada taxa de sobrevivência no trato digestório potencializa seus efeitos fisiológicos, tornando notáveis os benefícios ao hospedeiro (PICARD *et al.*, 2005).

Os benefícios observados com o consumo de bifidobactérias incluem o combate da diarreia (MARTEAU *et al.*, 2002; MEANCE *et al.*, 2003), a produção de vitamina B (KRAUSE *et al.*, 1996; CRITTENDEN *et al.*, 2003) e ácidos graxos de cadeia curta (DUNCAN *et al.*, 2004), produção de substâncias antimicrobianas (LIEVIN *et al.*, 2000), estímulo dos mecanismos de resposta imunológica (BRANDTZAEG, 1995; YASUI *et al.*, 1995), redução da produção e/ou atividade de substâncias potencialmente carcinogênicas (GOLDIN, 1990; SAIKALI *et al.*, 2004) e proteção do hospedeiro contra a formação de criptas aberrantes e contra o câncer de cólon (ABDELALI *et al.*, 1995a; ABDELALI *et al.*, 1995b; CHALLA *et al.*, 1997). Estudos mostram também sua eficiência na melhora da evolução cíclica de doenças hepáticas e possivelmente na redução do processo de envelhecimento (MITSUOKA, 1990).

Considerando que a pasteurização do leite humano provoca depleção de componentes imunológicos (ARNOLD & LARSON, 1993), inibe o crescimento de

bifidobactérias (BORBA *et al.*, 2003) e que os mecanismos de defesa imunológica do recém-nascido estão imaturos no momento do nascimento (BERNT & WALKER, 1999), sugere-se a adição de bifidobactérias diretamente no leite pasteurizado em Bancos de Leite Humano (BORBA *et al.*, 2003). Acredita-se que a adição de bifidobactérias no leite humano atuaria compensando a inativação dos fatores bifidogênicos e promovendo a saúde do lactente por meio da reposição da microbiota intestinal benéfica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Imunidade da mucosa intestinal

A presença de substâncias estranhas ou patógenos como microrganismos, parasitas, proteínas e polissacarídeos pode provocar uma reação das células e tecidos do organismo conhecida como resposta imunológica (KIERSZENBAUM, 2004). A defesa contra microrganismos em indivíduos saudáveis pode ocorrer por diferentes mecanismos. Um destes mecanismos é a imunidade inata, mediada pelas barreiras físicas e químicas do organismo, como o epitélio intestinal e enzimas digestivas, proteínas sanguíneas, células fagocitárias e outros neutrófilos que possuem limitada capacidade de distinguir entre os diversos microrganismos, atuando basicamente da mesma forma contra a maioria dos agentes infecciosos. Um segundo mecanismo de defesa imunológica é a imunidade adaptativa, mediada por linfócitos e seus produtos, os anticorpos, que possuem capacidade de responder de forma distinta aos diversos tipos de microrganismos e de responder mais vigorosamente a um mesmo antígeno a cada exposição (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As células epiteliais representam a maior superfície de contato entre o organismo e o ambiente, sendo que a superfície mucosa de humanos corresponde a aproximadamente 200m² enquanto a pele cobre apenas cerca de 2m² da superfície do corpo de um indivíduo adulto (VAN DIJK, 1997; TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.*, 2004). Além de apresentarem maior área de exposição, as superfícies mucosas são também mais permeáveis à entrada de antígenos que a pele (PEDRUZZI, 2002). Devido a esta intensa exposição a substâncias antigênicas, diferente da imunidade sistêmica, na imunidade de mucosa pode-se observar maior supressão que ativação da resposta imunológica (NAGLER-ANDERSON & SHI, 2001; MAYER, 2003). Esta hiporresponsividade orgânica da mucosa intestinal na presença de antígenos é denominada tolerância oral (STROBEL & MOWAT, 1998).

O sistema imune intestinal deve, não só, proteger a mucosa contra patógenos, mas também evitar reações de hipersensibilidade a antígenos alimentares, microrganismos autóctones da flora intestinal e outras macromoléculas do ambiente. Para isto, dois mecanismos imunológicos diferentes atuam em conjunto na mucosa intestinal. O primeiro diz respeito a uma ativação da resposta imune mediada por linfócitos T e B, onde este último produz anticorpos (imunoglobulina A) que

removem antígenos da mucosa sem ativação da resposta inflamatória. Quando este mecanismo falha, ocorre a ativação do complemento mediada pela Imunoglobulina G (IgG), caracterizando a resposta inflamatória. Os linfócitos T, células efectoras, atuam regulando a resposta imune através da secreção de citocinas. O segundo mecanismo imunológico é a tolerância oral, induzida para evitar reações de hipersensibilidade contra substâncias inócuas (STROBEL & MOWAT, 1998). Este último processo pode se dar através da anergia, em que células apresentadoras de antígenos não-profissionais, como enterócitos ou células endoteliais, induzem a produção de linfócitos incapazes de reconhecer um antígeno específico, pela deleção clonal em tecidos linfóides periféricos, em que há morte apoptótica de células reativas a um antígeno específico ou pela supressão ativa da resposta imune mediada por citocinas, que induzem a geração de células T regulatórias (BRITTI *et al.*, 2006).

As células epiteliais intestinais podem agir como células apresentadoras de antígenos não-profissionais, visto que são capazes de apresentar antígenos luminais aos linfócitos T presentes na lâmina própria, promovendo uma ativação seletiva das células T CD8⁺ regulatórias que possuem atividade imunossupressora (HERSHBERG & MAYER, 2000).

A via de entrada usada pelo patógeno para ganhar acesso ao hospedeiro irá determinar o tipo de resposta que será dada pelo sistema imunológico, ou seja, patógenos invasivos produzem respostas mais agressivas enquanto microrganismos que colonizam o lúmen intestinal produzem uma resposta mais tolerante (MAYER, 2003).

A mucosa intestinal utiliza como mecanismos de defesa a barreira física, as enzimas luminais, as células T e a produção de imunoglobulina A secretora (IgAs) (MAYER, 2003). Os linfócitos do trato digestório são encontrados na camada epitelial e na lâmina própria, sendo que neste último podem apresentar-se espalhados ou em tecidos organizados conhecidos com placas de Peyer (KIERSZENBAUM, 2004; ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estas placas, que irão constituir o tecido linfóide associado à mucosa (MALT), são formadas por inúmeros folículos linfóides e células M especializadas, responsáveis pelo transporte de vários antígenos intestinais para a placa de Peyer (BRITTI *et al.*, 2006).

Os linfócitos B representam cerca de 70% dos linfócitos da placa de Peyer de um camundongo adulto e estão mais concentrados na área central do folículo linfóide

conhecida como centro germinativo. Na região interfolicular encontram-se especialmente os linfócitos T CD4⁺, representando 10 a 30% dos linfócitos da placa de Peyer, enquanto as células M podem ser encontradas revestindo a mesma (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os antígenos podem ganhar acesso ao organismo através dos enterócitos ou de sua via preferencial, as células M nas placas de Peyer. Dentro do folículo linfóide as macromoléculas são processadas por células apresentadoras de antígenos e apresentadas aos linfócitos T e B, através do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC da classe II). O linfócito B estimulado sai do folículo linfóide em direção a circulação sistêmica, onde entra em contato com outras estruturas mucosas e órgãos linfóides secundários. Ao retornar à mucosa intestinal, o linfócito B se diferencia em plasmócito secretor de IgA (PEDRUZZI, 2002).

Dentre as células do sistema imunológico presentes na mucosa intestinal destacam-se os macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B secretores de anticorpos (PEDRUZZI, 2002; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O muco produzido pelas células caliciformes intestinais forma uma barreira na superfície epitelial impedindo que microrganismos patogênicos e antígenos ganhem acesso à camada subepitelial. O muco também funciona como uma reserva de IgAs que age se ligando ao microrganismo e impedindo sua adesão ao epitélio. Assim como a IgAs, a imunoglobulina M também pode se ligar a um componente secretor e ganhar acesso ao lúmen intestinal (MAYER, 2003).

As subpopulações de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B têm como uma de suas funções a regulação da proliferação das células epiteliais e a preservação da estrutura epitelial. A ausência de alimentos ou bactérias comensais no lúmen intestinal leva a diminuição da população de linfócitos, seguida de aumento do tempo de migração celular da cripta para a vilosidade, diminuição da renovação celular e atrofia das vilosidades com conseqüente alteração na permeabilidade e perda da função de barreira (PEDRUZZI, 2002). Tal fato é evidenciado em estudos que relatam que animais *germ-free* são relativamente imunodeficientes (BEALMEAR *et al.*, 1983) e que a nutrição parenteral total pode levar a perda da função de barreira do epitélio intestinal, atrofia do tecido linfóide associado à mucosa e diminuição dos níveis de IgA intestinal (KEITH HANNA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002). Dessa

forma, o estímulo antigênico na luz intestinal favorece a manutenção da integridade da mucosa e o desenvolvimento do sistema imune da mucosa intestinal.

2.1.1. Defesa imunológica do recém-nascido

Os mecanismos de defesa imunológica, apesar de já estarem presentes no momento do nascimento, estão imaturos, não podendo exercer plenamente a proteção do hospedeiro (BERNT & WALKER, 1999). Tal fato torna os neonatos mais suscetíveis a doenças infecciosas como otite média, infecção no trato respiratório superior, gastroenterites e até mesmo meningite e sepse (LAWRENCE & PANE, 2007).

Nos recém-nascidos, a capacidade fagocitária e de quimiotaxia estão reduzidas, assim como as reservas da medula óssea para síntese de células mielóides e também o número de leucócitos. As vias clássica e alternativa do complemento e a secreção de citocinas por monócitos ativados estão prejudicadas. Tendo em vista que no ambiente intra-uterino não ocorre estimulação antigênica e que a produção de anticorpos específicos, células de memória e células T efectoras requerem um contato prévio com o antígeno, pode-se concluir que estes mecanismos também não colaboram para a defesa dos neonatos. Na submucosa, os linfócitos T são escassos e os linfócitos B produzem apenas imunoglobulinas M (IgM) enquanto as placas de Peyer do íleo possuem centros germinativos primários (BERNT & WALKER, 1999). A permeabilidade intestinal à macromoléculas está aumentada e a acidez estomacal, a taxa de peristaltismo, o conteúdo enzimático, de IgAs e lisozima estão reduzidos, permitindo que maior carga microbiana alcance os intestinos (GOLDMAN *et al.*, 1990). Durante os primeiros meses de vida, as células B, ainda que imaturas, são capazes de responder à estimulação antigênica pela produção de pequena quantidade de IgM. Nas últimas semanas de gestação ocorre ainda uma transferência de IgG materna para o feto, que promove uma imunização adicional do recém-nascido a termo. A imaturidade do sistema imunológico, no entanto, não é a única razão para a diminuição da resposta imune em neonatos, visto que durante o primeiro ano de vida as células T CD8⁺ exercem efeito supressor sobre os mecanismos de resposta imunológica (BERNT & WALKER, 1999).

Alguns estudos mostram ainda que o fato de algumas vias de resposta imunológica dos recém-nascidos não estarem completamente amadurecidas, pode

levar a uma sensibilização em lugar da supressão. Estudos com camundongos recém-nascidos demonstraram que os mesmos possuem a permeabilidade intestinal aumentada, permitindo a passagem de dieta e possíveis antígenos bacterianos através de sua lâmina própria rica em linfócitos, o que poderia contornar os mecanismos envolvidos na indução de tolerância e promover alguma forma de resposta imune ativa. O sistema IgAs também não está completamente amadurecido até os 4 anos de idade e, juntamente com a maior permeabilidade intestinal do neonato, podem permitir a elaboração de respostas imune a antígenos alimentares que não são observadas em crianças acima de 4 anos e adultos jovens (MAYER, 2003).

O fato de a microbiota intestinal ser formada após 24 horas do nascimento e a IgA secretora presente no leite humano promover uma imunidade passiva contra patógenos e auxiliar na função de barreira (MAYER, 2003), permite notar a importância do aleitamento materno nas primeiras horas de vida para a imunocompetência do neonato.

2.2. Probióticos e saúde

Os probióticos são microrganismos vivos oferecidos como suplemento alimentar que, quando ingeridos em quantidade adequada, promovem o equilíbrio do ecossistema digestivo, produzindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (OLIVEIRA & BATISTA, 2002; FERREIRA, 2003; SANDERS, 2003; OLIVEIRA & MIYOSHI, 2005; RASTALL *et al.*, 2005; SAAD, 2006).

As bactérias do ácido lático são as mais estudadas por suas propriedades probióticas (PENNA *et al.*, 2000; FERREIRA, 2003) e dentre estas, as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por serem isoladas das porções do trato digestório de humanos saudáveis, são as mais utilizadas como suplementos alimentares (BIELECKA *et al.*, 2002). Dentre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* usadas mais frequentemente como probióticos destacam-se, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*, respectivamente (COLLINS *et al.*, 1998).

Os probióticos podem ser comercializados como preparações farmacêuticas (cápsulas e sachês) ou alimentares (leites fermentados e iogurtes) e devem manter-se

viáveis nos produtos e em número adequado (igual ou maior que 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC)/g para lactobacilos e igual ou maior que 10^7 UFC/g para bifidobactérias) para que alcancem o ecossistema digestivo e possam exercer o efeito esperado. Para tal deve-se observar o efeito da acidez estomacal e toxidez dos sais biliares na taxa de sobrevivência específica para cada microrganismo. Para serem utilizados como suplementos alimentares probióticos estes microrganismos também devem seguir critérios de segurança (como por exemplo, a não patogenicidade), estabilidade genética e devem ter origem no intestino da espécie a que se destina o consumo (HOLZAPFEL *et al.*, 1998; SENOK *et al.*, 2005).

Três possíveis mecanismos de ação são sugeridos para explicar os efeitos benéficos do consumo de probióticos. O primeiro deles é a proteção ecológica que pode ocorrer por meio do antagonismo à patógenos, na competição por nutrientes, sítios de adesão e produção de substâncias tóxicas ou através da modulação de toxina, inibindo a ação patogênica. O segundo mecanismo é a imunomodulação, em que o estímulo à resposta imunológica do hospedeiro atua protegendo-o contra infecções e terceiro é o efeito trófico na mucosa intestinal, auxiliando na digestão dos dissacarídeos como a lactose (PENNA *et al.*, 2000; FERREIRA, 2003; SAAD, 2006). Tais efeitos benéficos à saúde do hospedeiro são essencialmente os mesmos atribuídos a uma microbiota intestinal normal. Desta forma, o objetivo de reforçar e/ou compensar a atividade do ecossistema microbiano autóctone do trato gastrointestinal, justifica o uso dos bioterápicos (PENNA *et al.*, 2000; FERREIRA, 2003). Este fato é reforçado quando observa-se que os resultados positivos do uso de probióticos são mais frequentes em ensaios clínicos com finalidade terapêutica do que com finalidade profilática (NAIDU *et al.*, 1999; FERREIRA, 2003).

Os benefícios à saúde humana trazidos pelo consumo de culturas probióticas são propostos desde 1908 (METCHNIKOFF, 1999) e incluem a recuperação da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, produção de vitaminas, alívio nos sintomas de intolerância à lactose, aumento da absorção de minerais (FERREIRA, 2003; SAAD, 2006), síntese de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição do colesterol LDL, efeito positivo no curso da diarreia e supressão de bactérias associadas a infecções vaginais (RABIU & GIBSON, 2002; SENOK *et al.*, 2005), dentre outros efeitos que precisam ser melhor elucidados.

Outros benefícios também são citados com frequência, como a manutenção

de um balanço microbiano favorável, colonização resistente da mucosa gastrointestinal impedindo a adesão de patógenos e atividade antimicrobiana pela produção de ácido acético, ácido láctico, peróxido de hidrogênio e outros compostos (RABIU & GIBSON, 2002; RASTALL *et al.*, 2005; SAAD, 2006). Vários estudos têm mostrado a atividade dos probióticos na estimulação do sistema imune sem associação com resposta inflamatória (HOLZAPFEL *et al.*, 1998; TANNOCK, 1998; SAARELA *et al.*, 2000; PERDIGÓN *et al.*, 2001; RASTALL *et al.*, 2005; SENOK *et al.*, 2005; SAAD, 2006).

Diante de tantas evidências torna-se difícil não reconhecer os aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica e de seu metabolismo na saúde do hospedeiro (MACKIE *et al.*, 1999). É importante lembrar, no entanto, que diferentes espécies probióticas são responsáveis por diferentes benefícios à saúde (FERREIRA, 2003; SENOK *et al.*, 2005).

2.2.1. Microbiota intestinal e resposta imunológica

A interação entre a microbiota entérica e a mucosa intestinal ao longo da vida mantém um estado fisiológico de ativação do sistema imune associado ao intestino (CEBRA, 1999; BRITTI *et al.*, 2006). Essa imunoestimulação, no entanto, não está associada a uma resposta pró-inflamatória (SAARELA *et al.*, 2000; PERDIGÓN *et al.*, 2001).

Os probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva do hospedeiro como a permeabilidade intestinal (GARCIA-LAFUENTE *et al.*, 2001; MANGELL *et al.*, 2002), a produção de IgAs, muco, citocinas (CEBRA, 1999; RASTALL *et al.*, 2005) e células imunocompetentes (HOLZAPFEL *et al.*, 1998), incluindo efeitos tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (BRITTI *et al.*, 2006).

O estímulo da resposta imune inata causada pelo consumo de produtos probióticos permite sugerir que as bactérias ácido lácticas poderiam ser úteis na aceleração dos mecanismos de defesa precoce contra infecções intestinais. Os probióticos atuam na resposta imune adaptativa regulando a produção de citocinas pró e antiinflamatórias, mas este mecanismo ainda não está completamente esclarecido. Vários estudos apontam para um papel das células epiteliais na modulação da expressão de citocinas após um estímulo por bactérias não

patogênicas. Sob condições fisiológicas, não ocorre a cascata pró-inflamatória, sugerindo mútua regulação entre resposta imune ativa e a tolerância oral. Esta hiporresponsividade do sistema imune pode estar relacionada à contínua exposição das células epiteliais às bactérias comensais (BRITTI *et al.*, 2006).

Mecanismos diversos agem em conjunto com o propósito de modular a resposta inflamatória. O aumento na liberação de IgAs no lúmen intestinal auxilia na sua função de barreira por meio da exclusão de antígenos. A maturação de células dendríticas carreando microrganismos comensais leva à produção de citocinas que estimulam a polarização das células T auxiliares e conseqüentemente a resposta imune adaptativa (MACPHERSON & UHR, 2004).

Ainda que o mecanismo de atuação dos probióticos na prevenção de alergias não esteja completamente esclarecida, estudos apontam para a possibilidade destes efeitos estarem associados à adesão ao muco intestinal e superfície mucosa (HE *et al.*, 2001).

A superfície do epitélio intestinal está coberta por receptores de reconhecimento. Os receptores *toll-like* (TLRs) tem um papel crucial na polarização da resposta imune para células Th1, Th2 ou células T regulatórias (KAPSENBERG, 2003). Eles reconhecem moléculas padrão específicas associadas à patógenos e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, microrganismos não patogênicos são capazes de degradar esta estrutura, impedindo o processo de diferenciação entre microrganismos comensais e patogênicos e prevenindo uma resposta imune inapropriada (ZHANG & GHOSH, 2001; SALMINEN & ISOLAURI, 2006).

O aumento da incidência de doenças inflamatórias intestinais em países desenvolvidos pode ser decorrente de uma exposição bacteriana insuficiente e desenvolvimento incompleto do sistema imune intestinal. Teorias para explicar as doenças inflamatórias intestinais e distúrbios alérgicos apontam para uma relação entre o baixo consumo de alimentos fermentados e imaturidade das células T regulatórias (CLAUD & WALKER, 2001).

Um estudo realizado com dez voluntários adultos saudáveis, que investigou o efeito da suplementação de quatro espécies probióticas por um período de oito semanas na imunidade inata, encontrou aumento significativo da atividade fagocitária tanto de monócitos quanto de neutrófilos quando comparado ao período

pré-tratamento (BERMAN *et al.*, 2006). Estes resultados apontam para uma possível estimulação da imunidade inata em adultos saudáveis por meio da suplementação com probióticos.

Okada e colaboradores (1994) observaram que bactérias filamentosas segmentadas, reconhecidas como microrganismos dominantes da microbiota intestinal de camundongos, quando introduzidas em animais *germ-free*, mostraram-se capazes de estimular o sistema imune de mucosa, tanto humoral quanto celular, de uma forma não-específica. A importância da microbiota intestinal na proteção do hospedeiro é reforçada ao observar-se que dose oral de *Listeria monocytogenes* requerida para matar um camundongo *germ-free* é $1-5 \times 10^2$ UFC (ZACHAR & SAVAGE, 1979), enquanto um camundongo convencional sobrevive a doses orais de $10^8 - 10^9$ UFC (YAMAMOTO *et al.*, 1993).

Em estudo realizado por Vinderola e colaboradores (2007) com a administração de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* R389 a camundongos por 2, 5 e 7 dias consecutivos, observou-se que o número de células produtoras de IgA (linfócitos B) do intestino delgado aumentou significativamente no sétimo dia de administração quando comparado com o controle.

2.2.1.1. Influência dos probióticos nas reações alérgicas e inflamatórias

Diversas experimentações apontam para um resultado positivo da suplementação com probióticos sobre as reações alérgicas (WESTON *et al.*, 2005; DANIEL *et al.*, 2006; KAWASE *et al.*, 2006; OGAWA *et al.*, 2006; HISBERGUES *et al.*, 2007; KUKKONEN *et al.*, 2007) e inflamatórias (THOMPSON-CHAGOYAN *et al.*, 2005; FRICK *et al.*, 2007; ROCHAT *et al.*, 2007).

A resposta inflamatória é a reação local inicial da imunidade inata, na qual linfócitos são ativados e recrutados para o local da infecção para combatê-la. A reação de inflamação em combate a microrganismos invasores é iniciada por citocinas, principalmente fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e quimiocinas, que agem ativando e recrutando leucócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A alergia é um tipo de resposta imune iniciada por mastócitos (MCCURDY *et al.*, 2003) que além do reconhecido papel nas reações alérgicas, participam dos processos inflamatórios crônicos e da defesa do organismo contra infecções

bacterianas (MALAVIYA *et al.*, 1996; MALAVIYA & ABRAHAM, 2001). Os mastócitos estão situados em vários tecidos corporais, locais de exposição inicial a antígenos e, muitas vezes, disponíveis ao acesso de microrganismos probióticos. Além disso, estas células expressam receptores de reconhecimento bacteriano que permitem que eles respondam diretamente aos probióticos (MCCURDY *et al.*, 2003).

A ativação dos mastócitos se dá pela ligação da imunoglobulina E (IgE) antígeno específica a um receptor de alta afinidade à IgE na sua superfície, promovendo a liberação de ampla quantidade de mediadores pró-inflamatórios (KOTOWICZ & CALLARD, 1993). Apesar da resposta dos mastócitos humanos aos receptores *toll like* (TLR) ser pouco conhecida, em roedores estas células produzem uma gama de citocinas, como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , como consequência da ativação por TLR (SUPAJATURA *et al.*, 2002).

A redução dos sintomas de dermatite atópica em crianças suplementadas com *Lactobacillus GG* e a diminuição do desenvolvimento de doenças atópicas em recém nascidos de mães que receberam este mesmo microrganismo probiótico durante a gestação e amamentação pode ser verificada em vários estudos (KALLIOMAKI *et al.*, 2001; KALLIOMAKI *et al.*, 2003). Um grupo de 230 crianças com eczema e dermatite atópica e suspeita de alergia ao leite de vaca receberam, em estudo duplo-cego randomizado, *Lactobacillus GG*, uma mistura de 4 cepas de microrganismos probióticos ou placebo (grupo controle), associado a uma dieta livre de leite de vaca, por quatro semanas. Após o tratamento, os níveis de IgA apresentaram uma tendência de aumento nos grupos que receberam probióticos quando comparado com o grupo controle, mostrando a capacidade destes microrganismos probióticos em modular a resposta imunológica adaptativa, protegendo o organismo hospedeiro contra infecções. Após um desafio em crianças com alergia ao leite de vaca associada à IgE, a produção de IgA fecal foi maior entre as crianças que receberam *L. GG* que entre as que receberam placebo e o TNF- α , que é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, sendo menor, porém não significativo, entre o grupo que recebeu *L. GG* que para os que receberam placebo (VILJANEN *et al.*, 2005). Tais dados mostram a importância dos probióticos no estímulo da resposta imunológica de defesa do organismo e inibição da resposta pró-inflamatória.

2.2.1.2 Probióticos e produção de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio

As citocinas são substâncias sinalizadoras que atuam na imunidade inata e adaptativa transportando informações entre células inflamatórias. Elas podem aumentar a síntese de células efetoras e proteínas que potencializam a resposta antimicrobiana (ABBAS & LICHTMAN, 2005). A interleucina-6 é uma citocina importante na cascata de resposta à infecção do hospedeiro. Ela ativa a resposta de fase aguda, estimula linfócitos T, induz a diferenciação terminal de linfócitos B e a produção de proteína C reativa pelos hepatócitos (PAPANICOLAOU *et al.*, 1998). Produzida por diversos tipos celulares, atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Ela é considerada um pirogênico endógeno, visto que é capaz de induzir a febre e a produção de proteínas de fase aguda que, semelhante à ação dos anticorpos, apresentam especificidade para moléculas de patógenos (JANEWAY & TRAVERS, 1997).

A interleucina-4 foi primeiramente conhecida como fator 1 de crescimento de células B por sua ação estimulante da proliferação deste grupo celular. Esta citocina, produzida pelas células Th2, possui efeito antiinflamatório e atua ainda estimulando a proliferação de macrófagos e monócitos (O’GARRA, 1989), tem efeito antitumoral, estimula a atividade de linfócitos T CD8 citotóxicos e inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos ativados, assim como do TNF- α , IL-1 e IL-6 (HARBER *et al.*, 2000). A interleucina-4 tem um importante papel no tratamento de doenças alérgicas e auto-imunes. Ela promove uma determinada “tolerância” por recrutar células B como células apresentadoras de antígeno não-profissionais, o que estimula o desenvolvimento da anergia em lugar da ativação (ROCKEN & SHEVACH, 1996).

O TNF- α é uma citocina multifuncional que possui atividades centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. O aumento exagerado da síntese de TNF- α está relacionado com a presença de doenças inflamatórias como artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (PALLADINO *et al.*, 2003). Dentre as diversas funções atribuídas ao TNF- α encontram-se o estímulo de linfócitos B produtores de IgA e linfócitos T produtores de IL-2, IFN- γ e outras citocinas, indução de produção de proteína C reativa pelos hepatócitos, supressão da atividade da lipase lipoprotéica e indução da febre e sono

(EIGLER *et al.*, 1997).

O IFN- γ , produzido pelas células Th1, é a principal citocina ativadora de macrófagos (ABBAS & LICHTMAN, 2005) e tem importante papel na defesa do organismo contra patógenos. As células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento de antígenos e ele aumenta a ação antimicrobiana de macrófagos pela estimulação da síntese de intermediários reativos do oxigênio e de óxido nítrico (GANTNER *et al.*, 1996). O IFN- γ possui a capacidade de inibir a IL-4 (VÍLCHEZ *et al.*, 2000).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora em numerosos eventos da fisiologia e patologia humana. Ele está envolvido na regulação do fluxo sanguíneo, motilidade e secreção do trato digestório, e em funções imunológicas apresentando uma relação íntima com o processo inflamatório (PERNER & RASK-MADSEN, 1999). Essa molécula faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo contra microrganismos e sua ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária está bem demonstrada (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). O NO ou seus produtos reativos possuem atividade antibacteriana, mas seu efeito tóxico também pode afetar as células do hospedeiro (LUNDBERG *et al.*, 1997). Existe um limite sutil entre a concentração de NO necessária para a ação microbicida e a não-toxicidade do organismo hospedeiro (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). A produção exagerada de NO está relacionada a várias doenças como choque séptico, doenças auto-imunes e cardiovasculares (KILBOUM & GRIFFITH, 1992; DINERMAN *et al.*, 1993; IALENTI *et al.*, 1993).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) possui uma série de funções no corpo humano. Atua como molécula sinalizadora e agente citotóxico no sistema de defesa imunológico, podendo também causar doenças (HALLIWELL *et al.*, 2000; FORMAN & TORRES, 2001). Apesar da produção de H₂O₂ ser um processo natural, sua formação em grande quantidade provoca a quebra da fita de DNA e/ou a desestabilização do citoesqueleto da membrana, levando à morte celular (RAMASARMA, 1990). Radicais do oxigênio podem atuar como importantes promotores de processos degenerativos que muitas vezes podem estar relacionados ao câncer, doenças cardíacas e envelhecimento (AMES, 1983). Espécies reativas do oxigênio podem ainda estar relacionadas a doenças humanas como artrite reumatóide, injúria de reperfusão, trauma cerebral e isquemia (HALLIWELL, 1987).

O H_2O_2 , assim como o ânion superóxido, são provenientes da explosão oxidativa mitocondrial dos macrófagos e desempenham papel fundamental na atividade bactericida destas células.

Diversos estudos têm investigado o papel dos probióticos na modulação da liberação de citocinas (GRIFFITHS *et al.*, 2004; BLUMER *et al.*, 2007; FRICK *et al.*, 2007; ROCHAT *et al.*, 2007).

Em estudo realizado com a administração de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* R389 à camundongos por 2, 5 e 7 dias consecutivos, observou-se aumento significativo do número de células produtoras de IL-2+, IL-6+ e IL-10+ nos animais que receberam leite fermentado, quando comparado com o grupo controle, em todos os tempos analisados (VINDEROLA *et al.*, 2007).

Ao observar o efeito do consumo de iogurte de soja fermentado por *L. jugurti* e *Enterococcus faecium* na produção de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio em ratos, Vendramini (2002) verificou um aumento significativo na liberação de IL-1, IL-6, IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , NO e H_2O_2 quando comparado com os animais que receberam placebo.

2.2.1.3. Probióticos e produção de IgA secretória

A resposta imune humoral é um tipo de reação a antígenos localizados fora da célula ou aderidos à sua superfície que é mediada por anticorpos (KIERSZENBAUM, 2004). Os anticorpos, glicoproteínas produzidas pelas células B, estão presentes nos fluidos biológicos, como plasma, secreções mucosas e líquido intersticial, e superfícies de alguns tipos de células que possuem receptores específicos para os mesmos, como células fagocitárias mononucleares, *natural killers* e mastócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As imunoglobulinas possuem as mesmas características estruturais básicas apresentando diferenças apenas na região de ligação aos antígenos. Sua estrutura básica é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas, formando uma molécula simétrica. As cadeias leves e pesadas possuem uma região aminoterminal variável, que participa do reconhecimento dos antígenos, e uma região constante carboxiterminal. A região constante das cadeias pesadas possuem função efetora interagindo com células e moléculas do sistema imunológico (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As imunoglobulinas A, sintetizadas pelos linfócitos B nas paredes dos tratos digestório e respiratório, representam dois terços de todo anticorpo produzido por um adulto saudável (ABBAS & LICHTMAN, 2005) e são o isotipo de anticorpo predominante no leite humano (GOLDMAN *et al.*, 1982; GOLDMAN, 2002).

As IgAs se ligam a microrganismos do trato digestório infantil e previnem sua translocação através da parede intestinal para o interior dos tecidos corporais (NEWMAN, 1995). Sua presença em maior escala no leite humano promove a redução da incidência de doenças entéricas em crianças amamentadas, quando comparada com crianças alimentadas com fórmula infantil (NEWBURG, 2001; VIAZIS *et al.*, 2007).

Fukushima e colaboradores (1998) avaliaram sete crianças japonesas, com idade entre 15 e 31 meses, que receberam uma fórmula infantil contendo bifidobactérias por 21 dias. No estudo que visava verificar a influência do consumo de probióticos na microbiota intestinal e imunidade local de crianças saudáveis, verificou-se que a contagem de bifidobactérias no conteúdo fecal apresentou leve aumento e que o nível de IgA fecal determinado durante a ingestão da fórmula foi significativamente maior do que antes da ingestão. Este aumento na secreção de IgA, associado à ingestão de fórmula contendo bactérias probióticas, pode aumentar a resistência da mucosa contra patógenos intestinais.

Em estudo duplo cego placebo-controlado, realizado com 96 crianças recém nascidas com história familiar de dermatite atópica, rinite alérgica ou asma que receberam placebo (controle) ou *Lactobacillus rhamnosus GG* durante 6 meses, constatou-se que o número de células produtoras de IgM, IgA e IgG, aos doze meses de idade, foi maior entre as crianças amamentadas exclusivamente até os três meses e suplementadas com probióticos quando comparado com crianças amamentadas que receberam placebo (RINNE *et al.*, 2005), mostrando a importância do *L. GG* na estimulação da resposta imune humoral.

2.2.2. Bactérias bífidas e seus benefícios a saúde

Os microrganismos colonizam todo o trato digestório humano, porém o pH próximo da neutralidade e o trânsito intestinal lento, característicos do intestino grosso, favorecem o crescimento microbiano permitindo contagens que chegam a 10^{12} UFC/ g de conteúdo colônico. Estima-se ainda a existência de mais de 500

diferentes espécies cultiváveis de bactérias no intestino grosso de um adulto saudável, sendo em sua maioria bactérias sacarolíticas. Em termos numéricos, predominam nesta região bastonetes gram-negativos anaeróbios do gênero *Bacteróides* (10^9 - 10^{12} UFC/g fezes), seguidos por eubactéria (10^{10} UFC/g fezes) e bifidobactéria (10^5 - 10^{10} UFC/g fezes) (RABIU & GIBSON, 2002).

O gênero *Bifidobacterium* foi isolado inicialmente por Tissier em 1899-1900 das fezes de crianças amamentadas, recebendo o nome de *Bacillus bifidus communis*. Posteriormente foi incluído no gênero *Lactobacillus* passando a ser denominado *Lactobacillus bifidus* e, finalmente, reconhecido como um gênero à parte. Este gênero é composto por bactérias gram-positivas, anaeróbias, asporogênicas, pleomorfas, sem motilidade, sensíveis a ambientes ácidos e geralmente catalase negativas (SGORBATI *et al.*, 1995). Se diferenciam das outras bactéria lácticas por apresentarem atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase, produzindo acetato e lactato na proporção 3:2, sem geração de dióxido de carbono (GOMES & MALCATA, 1999; FERREIRA, 2003). Apresentam temperatura ótima de crescimento na faixa de 37-41°C e o pH ótimo de crescimento está entre 6-7 (GOMES & MALCATA, 1999).

As bactérias bífidas, comumente utilizadas em produtos probióticos são consideradas GRAS (Generally Recognised as Safe) (GOMES & MALCATA, 1999; PICARD *et al.*, 2005). Sua elevada taxa de sobrevivência no trato digestório potencializa seus efeitos fisiológicos, tornando notáveis os benefícios ao hospedeiro (PICARD *et al.*, 2005).

A idade e a dieta do hospedeiro são os principais determinantes da taxa de prevalência das bifidobactérias no trato digestório e genitourinário humano. Logo após o nascimento, elas se estabelecem, dominando a microbiota intestinal infantil, e diminuem com a idade, passando a representar cerca de 25% da microbiota intestinal total de um adulto. Componentes dietéticos, como a κ -caseína do colostro humano, estimulam sua proliferação (FINEGOLD *et al.*, 1983; GOMES & MALCATA, 1999) e sua presença em grande quantidade nas fezes de recém nascidos amamentados permite inferir sua importância na proteção contra infecções (PICARD *et al.*, 2005).

Os benefícios observados com o consumo de bifidobactérias incluem o combate da diarreia (MARTEAU *et al.*, 2002; MEANCE *et al.*, 2003), a produção de vitaminas do complexo B (KRAUSE *et al.*, 1996; CRITTENDEN *et al.*, 2003) e

ácidos graxos de cadeia curta (DUNCAN *et al.*, 2004), produção de substâncias antimicrobianas (LIEVIN *et al.*, 2000), estímulo dos mecanismos de resposta imunológica (BRANDTZAEG, 1995; YASUI *et al.*, 1995), redução da produção e/ou atividade de substâncias potencialmente carcinogênicas (GOLDIN, 1990; SAIKALI *et al.*, 2004) e proteção do hospedeiro contra a formação de criptas aberrantes e contra o câncer de cólon (ABDELALI *et al.*, 1995a; ABDELALI *et al.*, 1995b; CHALLA *et al.*, 1997). Estudos mostram também sua eficiência no controle de doenças hepáticas e possivelmente na redução do processo de envelhecimento (MITSUOKA, 1990).

A utilização destas bactérias na promoção da saúde e controle de doenças em crianças e recém-nascidos tem mostrado resultados promissores. Os resultados de estudo realizado por Phuapradit e colaboradores (1999) suportam a hipótese de que crianças de 6 a 36 meses, que receberam fórmula infantil suplementada com bifidobactérias, podem estar protegidas contra uma infecção sintomática por rotavírus. Em outro estudo, a suplementação de recém-nascidos prematuros, internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal, com probióticos, promoveu modificação na microbiota intestinal, aumentando a contagem de bifidobactérias e reduzindo a contagem de enterobactérias e clostrídio, gêneros que incluem microrganismos potencialmente patogênicos (MOHAN *et al.*, 2006). A administração oral diária de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis* em recém nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal apresentou boa tolerância e diminuiu a incidência de enterocolite necrosante neonatal (HOYOS, 1999). O mesmo foi observado em experimentação com ratos recém-nascidos, em que a colonização intestinal com *Bifidobacterium infantis* reduziu significativamente o risco de incidência de enterocolite necrosante neonatal (CAPLAN *et al.*, 1999).

2.3. A importância do leite humano para a saúde do lactente

O leite materno é o melhor alimento para os lactentes, pois além de nutrir ele protege a criança contra diversas doenças agudas e crônicas (TOMA & MONTEIRO, 2001).

A ação dos diversos componentes protetores presentes no leite humano, o fornecimento de nutrientes em quantidade e qualidade adequadas e a baixa exposição aos contaminantes ambientais, levam a uma importante proteção do recém-

nascido amamentado contra doenças infecciosas e alergias. Outros benefícios da amamentação incluem a promoção do vínculo mãe-filho, do desenvolvimento cognitivo e da saúde bucal, visto que a sucção proporciona um intenso exercício mandibular que auxilia na prevenção da respiração bucal e de distúrbios nos órgãos fonoarticulatórios. Por ser rico em sabores que refletem a alimentação materna, o leite humano permite que o lactente tenha experiências quimiossensoriais que contribuem para melhor aceitação da alimentação complementar na fase de desmame (EUCLYDES, 2000).

A amamentação também trás benefícios para a nutriz, que tem melhor recuperação no pós-parto, diminui o risco de câncer de mama e ovário e evita os gastos com aleitamento artificial (EUCLYDES, 2000).

A promoção do aleitamento materno pode reduzir substancialmente a mortalidade infantil. Em estudo realizado por Escuder e colaboradores (2003), em 14 municípios da grande São Paulo, informações relativas à amamentação e mortalidade infantil coletadas por meio de entrevistas e dados oficiais, permitiram concluir que as principais causas de óbito neonatal poderiam ser significativamente reduzidas por meio do aleitamento materno.

Estudos diversos têm demonstrado a relação do aleitamento materno com a diminuição da incidência de enterocolite necrosante neonatal em recém-nascidos prematuros (BARLOW *et al.*, 1974; LUCAS & COLE, 1990; SCHANLER *et al.*, 1999b).

Lactentes amamentados possuem microbiota intestinal rica em bifidobactérias e lactobacilos e os alimentados com fórmulas lácteas apresentam mais coliformes e bacteróides (ROLFE, 2000).

O colostro humano contém microbiota rica em bactérias lácteas que poderiam atuar como uma fonte natural de probióticos transmitidos da mãe para o filho nos primeiros dias após o parto (NOVAK *et al.*, 2001). As fórmulas lácteas contém somente os componentes nutricionais do leite humano, não podendo ser encontrados os fatores protetores naturais, importantes para a imunocompetência dos neonatos (EUCLYDES, 2000; OLIVEIRA & MIYOSHI, 2005). Dessa forma, a ingestão de leite humano ou fórmula infantil irá influenciar não só o perfil de bactérias que irá colonizar o intestino de recém-nascidos prematuros, mas também a estrutura e função da sua mucosa intestinal (CLAUD & WALKER, 2001; CAICEDO *et al.*,

2005; SANGILD, 2006).

2.3.1. Efeito protetor do leite humano

Após sair do ambiente intra-uterino, a criança necessita de um período de adaptação aos riscos impostos pelo ambiente externo, fase em que o aleitamento materno terá extrema importância para sua proteção (EUCLYDES, 2000). O leite humano contém substâncias que agem como mediadores entre mãe e filho e estabelecem uma comunicação bioquímica ou fisiológica e, dessa forma, é considerado uma extensão parcial e temporária do ambiente intra-uterino (BERNT & WALKER, 1999). Além de prover proteção passiva, o leite humano contém substâncias que estimulam o amadurecimento do sistema imune, promovem imunomodulação e possuem efeito antiinflamatório (BERNT & WALKER, 1999; LAWRENCE & PANE, 2007).

Na década de 1950, o avanço no conhecimento sobre nutrição infantil juntamente com as observações de que crianças alimentadas com fórmulas artificiais ganhavam mais peso, sustentaram a hipótese de que seria viável a substituição do aleitamento materno pelo aleitamento artificial (KRAMER *et al.*, 2002). Entretanto, o aumento da morbidade e mortalidade de crianças alimentadas artificialmente devido a doenças infecciosas, despertou o interesse na identificação de possíveis fatores protetores presentes no leite humano (NEWBURG *et al.*, 2005).

Dentre os fatores protetores do leite humano encontram-se anticorpos, antioxidantes, células do sistema imunológico, inibidores de protease, fator bifido, enzimas catalase e peroxidase, interferon, lisozima, lactoferrina, componentes lipídicos dentre outros compostos (BERNT & WALKER, 1999; EUCLYDES, 2000).

As imunoglobulinas estão presentes em grande quantidade no colostro e, apesar de sofrerem importante redução durante os primeiros dias de lactação, representam parte significativa da proteína presente no leite humano. Embora outras imunoglobulinas, como IgM, IgG, IgD e IgE, também estejam presentes no leite materno, a IgA secretória representa 90% do total das mesmas e por apresentar boa resistência à acidez e atividade enzimática, alcança o trato digestório do recém-nascido na sua forma intacta, podendo assim exercer sua função. Como a transferência de IgG via placenta só ocorre no terceiro trimestre de gestação, a imunização passiva através do aleitamento materno tem fundamental importância

para RN prematuros (EUCLYDES, 2000).

No leite humano também são encontradas células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos que contribuem para a imunização do recém-nascido (EUCLYDES, 2000). Os macrófagos são responsáveis por engolfar enteropatógenos como *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*, formando fagolisossomos onde os mesmos serão destruídos (GOLDMAN, 2002). Estas células também têm mostrado atividade fagocitária contra *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Staphylococcus* e sua atividade ainda está relacionada com a ação protetora contra enterocolite necrosante (EUCLYDES, 2000). Estudos indicam que as células B produtoras de anticorpos podem ser transferidos da mãe para seus descendentes através da placenta (ZHOU *et al.*, 2000) ou da amamentação (ARVOLA *et al.*, 2000).

O leite humano contém substâncias que atuam favorecendo a colonização intestinal por bifidobactérias. Estas substâncias, consideradas bifidogênicas, são principalmente glicoproteínas e oligossacarídeos que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias bífidas, como *B. bifidum* e *B. infantis* (KITAOKA *et al.*, 2005; NEWBURG *et al.*, 2005). Por sua vez, estas bactérias atuam fermentando a lactose e produzindo ácido láctico e acético que irão reduzir o pH intestinal inibindo o crescimento de patógenos e assim protegendo o lactente contra doenças infecciosas (NEWBURG *et al.*, 2005).

A lisozima, por hidrolisar peptidoglicanos da parede celular de bactérias gram-positivas, apresenta atividade bacteriostática. Ela está presente em grande quantidade no leite e, diferente do que é observado para outros componentes imunológicos, a produção de lisozima pelas glândulas mamárias aumenta nos quatro primeiros meses de lactação (GOLDMAN, 2002). Acredita-se que a lisozima tenha importante papel na redução dos processos infecciosos em recém nascidos amamentados, enquanto a secreção de IgAs no trato digestório dos mesmos ainda é insuficiente (NEWBURG *et al.*, 2005).

A lactoferrina é uma proteína presente em alta concentração no leite humano que, por seqüestrar o ferro livre no meio, pode inibir o crescimento de microrganismos dependentes deste mineral (BERNT & WALKER, 1999). Ela atua não só contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mas também pode apresentar atividade contra fungos e vírus, entre eles enterobactérias, *Candida*

albicans, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (KOLB, 2001). A lactoferrina também pode estar relacionada com o aumento na absorção intestinal de ferro e estímulo à proliferação das células da mucosa intestinal (IVER & LONNERDAL, 1993).

A α -lactoalbumina e o ácido oléico presentes no leite humano, em ambiente ácido característico do estômago de crianças amamentadas, formam um complexo ácido oléico- α -lactoalbumina, denominado HAMLET, que parece ter ação inibitória sobre uma grande variedade de tumores por induzir um processo semelhante à apoptose (GUSTAFSSON *et al.*, 2005; NEWBURG *et al.*, 2005; MOK *et al.*, 2007).

Os lipídios do leite humano possuem atividade antimicrobiana, podendo atuar contra bactérias, protozoários (ISAACS *et al.*, 1990) e vírus como o do sarampo, herpes simples tipo I e citomegalovírus (FOMON, 1993). Essa propriedade se deve principalmente a ação dos ácidos graxos livres e monoacilgliceróis liberados após digestão dos triacilgliceróis do leite no trato digestório infantil (ISAACS, 2005).

Em recém nascidos prematuros, devido a elevada sensibilidade a reações inflamatórias e imaturidade do sistema imune, os fatores protetores do leite humano têm importância fundamental (SANGILD, 2006). O efeito da interação da amamentação e dos probióticos no número de células secretoras de imunoglobulinas sugere que a oferta de probióticos durante a amamentação pode influenciar positivamente a imunidade intestinal (RINNE *et al.*, 2005).

2.3.2. Papel do leite humano no desenvolvimento das bactérias bífidas intestinais

A amamentação promove efeito bifidogênico por favorecer o contato do lactente com a microbiota da pele da mãe e do leite materno. Além disso, os oligossacarídeos do leite humano agem favorecendo o crescimento de bifidobactérias no trato digestório infantil. (SALMINEN & ISOLAURI, 2006).

A falta de habilidade de crianças em digerir os oligossacarídeos do leite materno no trato digestório superior permite que grande parte destes alcance o intestino grosso, onde são utilizados como substrato para o metabolismo bacteriano (ENGFER *et al.*, 2000).

Os estudos sobre os fatores de crescimento para bifidobactérias no leite humano inicialmente sugeriram que este efeito seria dependente de carboidratos

associados ao nitrogênio presentes no leite, mas estudos posteriores verificaram que os resultados observados se deviam à linhagem específica utilizada nos experimentos, *B. bifidum var. pennsylvanicus*, que requer N-acetilglicosamina para crescimento (GYORGY *et al.*, 1954).

Trabalhos recentes verificam a proposta de que os oligossacarídeos do leite humano funcionam como prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento de bífidobactérias. Ward e colaboradores (2006) observaram que os oligossacarídeos do leite humano foram utilizados como fonte de carbono por *Bifidobacterium infantis* enquanto *Lactobacillus gasseri*, outra bactéria comensal, não foi capaz de fermentá-lo, sugerindo que estes oligossacarídeos promovem um aumento da população de bífidobactérias no intestino de crianças. Outras pesquisas sugerem que a estrutura do carboidrato estaria relacionada com a proteção contra patógenos específicos por interferir no sistema de adesão ao epitélio intestinal (PUCCIO *et al.*, 2007).

O leite humano, diferente do leite de vaca que possui a lactose como único carboidrato, contém uma gama de oligossacarídeos que chegam a alcançar concentrações de 8-12g/L de leite materno (KUNZ *et al.*, 2000), representando o terceiro componente mais abundante neste alimento (NEWBURG, 1997). Isto nos mostra a superioridade do leite humano frente ao leite de vaca como fonte de energia para as bactéria bífidas.

2.4. Banco de Leite Humano

Cuidados preventivos, como o estímulo ao aleitamento materno e orientação adequada da alimentação nos primeiros anos de vida, são elementos essenciais para a promoção de ótimas condições de saúde na infância e, dessa forma, a amamentação se transformou em uma das principais preocupações para os formuladores de políticas públicas em favor da saúde da criança (MONTEIRO *et al.*, 2000; RAMOS & ALMEIDA, 2003). No entanto, algumas situações podem impossibilitar a amamentação, como é o caso de recém-nascidos de alto risco que apresentam dificuldade em sugar o seio materno, crianças adotadas ou filhas de mães que morreram no parto. A amamentação também é contra-indicada em situações em que a nutriz possui alguma doença infecciosa, como no caso da contaminação pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus linfotrófico humano de células T (HTLV 1e 2), quando estão em quimioterapia/ radioterapia, se expõem a metais pesados

(chumbo, mercúrio, etc.) ou fazem uso de medicamentos ou drogas que contraindiquem a amamentação (EUCLYDES, 2000; BRASIL, 2004).

Conhecendo as situações em que a amamentação está impossibilitada e considerando que o aleitamento materno pode reduzir o índice de morbi-mortalidade infantil, os Bancos de Leite Humano (BLH) surgem como uma solução para evitar o desmame precoce (BRASIL, 1988).

O primeiro BLH do Brasil foi implantado em outubro de 1943 no Instituto Nacional de Puericultura, atualmente denominado Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz – IFF/FIOCRUZ (BARATA, 1960). A partir de 1985, impulsionado pelas falhas da teoria do desmame comerciogênico, houve um aumento considerável na implantação de novas unidades de bancos de leite (ALMEIDA & NOVAK, 2004).

Os BLH são centros especializados, obrigatoriamente vinculados a um hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do leite, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou nutricionista (BRASIL, 1988). Nessas unidades o leite processado e distribuído é produto da doação voluntária de nutrizes que tem produção excedente do leite materno (SERAFINI *et al.*, 2003) não podendo, dessa forma, ser comercializado (BRASIL, 1988).

No Brasil, os BLH têm como prioridade atender as mães de recém-nascidos (RN) prematuros, de baixo peso ou internados em UTIN (GIUGLIANI, 2002; MAIA *et al.*, 2004).

O leite humano (LH), devido a sua riqueza de nutrientes, contamina-se com grande facilidade podendo ser veículo de doenças e, por isso, deve seguir parâmetros de segurança que garantam sua qualidade. Dentre estes parâmetros encontram-se a seleção e classificação do leite humano ordenhado cru, seguido da pasteurização, congelamento e testes microbiológicos do leite humano pasteurizado. Apesar do tratamento térmico (65°C/30 minutos) do leite humano levar a uma perda de componentes nutricionais e imunológicos, tendo em vista os casos em que a amamentação está impossibilitada/desaconselhada, o leite proveniente de BLH se torna a melhor alternativa para a alimentação infantil (ARNOLD & LARSON, 1993).

Dessa forma, conhecendo o papel essencial do leite humano no desenvolvimento e qualidade de vida de recém nascidos, o BLH se destaca como um importante veículo para promoção do aleitamento materno.

2.4.1 Efeitos da pasteurização nos componentes do leite humano

O leite humano satisfaz de forma única às necessidades dos lactentes, visto que além de prover boa digestibilidade e rápido esvaziamento gástrico (SCHANLER & HURST, 1994), ele oferece nutrientes com uma ótima biodisponibilidade, assim como componentes bioativos imunes ou não que promovem proteção contra patógenos (SCHANLER *et al.*, 1999a). No entanto, em situações em que o leite da própria mãe não está disponível, a pasteurização do leite humano de doadoras em BLH promove algumas alterações em sua composição que devem ser levadas em consideração.

A pasteurização do LH elimina a preocupação com a contaminação bacteriana e transmissão de doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), citomegalovírus e vírus T linfotrófico humano, permitindo que os RNs tenham acesso a um alimento seguro e adequado às suas necessidades (HAMPRECHT *et al.*, 2004; ISRAEL-BALLARD *et al.*, 2005; TERPSTRA *et al.*, 2007). Apesar disto, diversos estudos mostram que o tratamento térmico pode afetar alguns componentes nutricionais e imunológicos do LH (WIGHT, 2001; ISRAEL-BALLARD *et al.*, 2005), tais como imunoglobulinas, enzimas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas e vitaminas sensíveis ao calor (BJORKSTEN *et al.*, 1980; LAWRENCE, 1999; TULLY *et al.*, 2001).

A pasteurização lenta (65°C por 30 minutos) é a técnica mais utilizada para tratamento térmico do LM. Segundo Bjorksten e colaboradores (1980) este processamento pode resultar em perdas de IgA (0-33%), IgG (33%), IgM (100%), lactoferrina (0-63%), lisozima (0-23%), linfócitos (100%), macrófagos (22%), lipase (100%) e fosfatase alcalina (100%). Em outro estudo, resultados semelhantes foram encontrados para as perdas de lisozima (23,7%), lactoferrina (56,8%) e IgG (34%), com destaque para nenhuma perda de IgA (EVANS *et al.*, 1978).

As enzimas, lipase estimulada por sais biliares e lipase de lipoproteína, são inativadas pela pasteurização do LH (HENDERSON *et al.*, 1998), diminuindo a absorção de lipídios e conseqüentemente levando a redução do ganho de peso de

recém-nascidos prematuros, que possuem baixa atividade da lipase endógena intraluminal (ANDERSSON *et al.*, 2007). Após submissão do LH à pasteurização e armazenamento a -20°C por até 90 dias, pesquisadores encontraram redução do conteúdo de gordura (6%) e L-lactato (7%) e aumento da quantidade de ácidos graxos livres, que dobrou após a pasteurização aumentando ainda mais após o armazenamento (LEPRI *et al.*, 1997). Outros pesquisadores observaram a perda de vitamina C (36%), ácido fólico (31%) e vitamina B6 (15%) após a pasteurização do LH (ZOEREN-GROBBEN *et al.*, 1987). Ao avaliar o efeito da pasteurização do LH sobre os níveis de alguns aminoácido sulfurados (metionina e cisteína) e aminoácidos livres (taurina, glutamina e ácido glutâmico), observou-se que a disponibilidade de aminoácidos sulfurados, taurina e ácido glutâmico não foi alterada após o tratamento térmico, enquanto os níveis de glutamina aumentaram em relação ao leite não pasteurizado (CARRATU *et al.*, 2005).

Ao avaliar o efeito da pasteurização do LH de doadoras com 10 a 30 dias pós parto sobre o crescimento *in vitro* de bifidobactérias isoladas do trato digestório de recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno, Borba e Ferreira (2003) constataram que o LH pasteurizado apresentou efeito inibidor sobre o crescimento das espécies de bifidobactérias em estudo, diferente do observado para o leite não pasteurizado, que estimulou o crescimento das mesmas. Este fato provavelmente está relacionado com a inativação de fatores bifidogênicos pela pasteurização.

Tendo em vista os benefícios da manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada para a saúde do recém-nascido (FERREIRA, 2003), a adição de bactérias probióticas após a pasteurização do leite em BLH surge como uma alternativa promissora, visto que acredita-se que a suplementação com um “pool” de *Bifidobacterium breve* não afetaria a segurança do processo, podendo inclusive trazer benefícios para a saúde dos lactentes.

3. JUSTIFICATIVA

O trabalho iniciou-se com a observação de que o leite humano pasteurizado nos Bancos de Leite inibem fatores bifidogênicos (BORBA, 2001) e com o isolamento de bactérias bífidas das fezes de recém-nascidos com a finalidade de suplementar o leite depositado nos BLH (TESHIMA *et al.*, 2005). Ainda na primeira fase do trabalho, a biodiversidade destes isolados foi avaliada (TESHIMA, 2001) assim como alguns aspectos funcionais e de segurança (CUNHA, 2006). Em uma segunda fase iniciou-se a avaliação de alguns fatores imunológicos (RAMOS, 2006) com colaboração da UNESP (Araraquara-SP), quando foram feitas as primeiras avaliações com os novos isolados de bactérias bífidas para verificar a modulação de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-6) e de compostos intermediários do oxigênio (H₂O₂) e do nitrogênio (NO) em animais tratados com leite humano cru e pasteurizado, suplementado ou não com bactérias bífidas. Na primeira parte desse trabalho de imunologia, as amostras foram coletadas para todos os grupos, mas somente os controles e os animais que receberam o leite pasteurizado suplementado ou não com a bactéria bífida foram avaliados (grupos C, LP e LPB). Na presente pesquisa foram analisados os dados da modulação da produção de citocinas, H₂O₂ e NO relativos aos cinco tratamentos [C, LP, LPB e ainda os animais que receberam o leite cru (LC) e leite cru suplementado com bactéria bífida (LCB)]. Foram quantificados ainda linfócitos B produtores de IgA e mastócitos granulados e degranulados na mucosa e submucosa do cólon desses animais. Na terceira e quarta fases desse projeto estão em andamento as avaliações histomorfométricas do cólon dos ratos, assim como a identificação inequívoca dos isolados, por meio de estudos genotípicos. Dessa forma, tem-se acumulado informações sobre os aspectos de segurança dessas bactérias (CUNHA, 2006) e seu potencial imunomodulador, o que irá contribuir para a disponibilidade de bactérias probióticas bem identificadas, com potencial de uso pediátrico bem definido.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito da suplementação do leite humano cru e pasteurizado com estirpes de *Bifidobacterium breve* isoladas de recém-nascidos, na produção de linfócitos B secretores de IgA, na degranulação de mastócitos e na modulação da liberação de citocinas e compostos intermediários do oxigênio e nitrogênio em ratos Wistar, verificando a segurança do uso destas bifidobactérias em Bancos de Leite Humano.

4.2. Objetivos Específicos

Quantificar em ratos fêmeas da raça Wistar tratados ou não com leite humano cru ou pasteurizado suplementado ou não com *Bifidobacterium breve*:

1) mastócitos e linfócitos B presentes no tecido linfóide associado à mucosa do cólon dos animais;

2) as citocinas IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α e compostos intermediários do Nitrogênio (NO) e do Oxigênio (H₂O₂).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho, aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (processo de nº 50702452817), foi realizado nos Laboratórios de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO); de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG); de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da UFV/Viçosa, Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, São Paulo.

5.1. Coleta das amostras de leite humano, estirpes utilizadas no “pool” de bactérias bífidas e suplementação do leite com as bactérias probióticas

As amostras de leite humano “in natura” ou cru (LHC), recém-ordenhado, foram obtidas de doadoras voluntárias e, após a coleta, misturado formando um *pool* de leite humano. Parte deste *pool* de leite humano foi submetido à pasteurização (65°C/30min) e adicionado ou não do concentrado das bactérias bífidas para a administração aos animais. As estirpes selecionadas (UFVCC 1083, UFVCC 1091, UFVCC 1099, UFVCC 1103, UFVCC 1105, UFVCC 1108, UFVCC 1111), após ativação e centrifugação, foram utilizadas para a suplementação do leite cru e pasteurizado. O *pool* das bifidobactérias na concentração de 10^{10} UFC g⁻¹ foi administrado diariamente por via oral (0,1mL/animal) aos grupos que receberam os leites suplementados (LCB e LPB). Esta parte da experimentação foi executada por Ramos (2006) e detalhes podem ser consultados na referida tese.

5.2. Grupos experimentais

Foram obtidos no Biotério da Universidade Federal de Viçosa (UFV), *Rattus norvegicus*, pertencentes à raça *Wistar*, e à variedade *Albinus*, fêmeas, recém desmamadas e com idade entre 21 e 23 dias. Os animais foram pesados e divididos em cinco grupos de forma que a média de peso fosse homogenia entre os diferentes grupos. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde/ UFV,

em gaiolas individuais sob ambiente com temperatura controlada à $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração Labina® (Purina) diariamente e a oferta de água foi *ad libitum*.

A experimentação animal foi feita em duas etapas. Na primeira foi determinado o efeito das bactérias probióticas na modulação de grupos microbianos no cólon e no ceco assim como seu efeito na morfologia da mucosa do cólon (RAMOS, 2006). As amostras das secções intestinais armazenadas nesta etapa foram utilizadas na análise de mastócitos e linfócitos B da presente experimentação. Na segunda etapa foi realizada análise de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio. O resumo dos grupos experimentais encontra-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Animais utilizados na análise de mastócitos e linfócitos B.

Tratamentos	Dieta (Labina)	Água destilada <i>ad libitum</i>	Concentrado de bifidobactérias	Leite Humano (0,1mL)	Água destilada (0,1mL)
Controle (C)	X	X	-	-	X
Leite Cru (LC)	X	X	-	X	-
Leite Cru + Bifidobactéria (LCB)	X	X	X	X	-
Leite Pasteurizado (LP)	X	X	-	X	-
Leite Pasteurizado + Bifidobactéria (LPB)	X	X	X	X	-

Número de animais por tratamento: 4;
Número de repetições: 2 (2 x 4 = 8 animais/tratamento)
Tempo total de experimentação: 21 dias
Coleta de cólon, contagem microbiana, preparo de lâminas para análises imunohistoquímica e histomorfométrica.

Após 21 dias de experimentação os animais foram pesados, submetidos a um jejum de 12 horas e eutanasiados em câmara de CO₂ seguido de retirada do cólon.

Tabela 2 - Animais utilizados na análise de citocinas, NO e H₂O₂.

Tratamentos	Dieta (Labina)	Água destilada <i>ad libitum</i>	Concentrado de bifidobactérias	Leite Humano (0,1mL)	Água destilada (0,1mL)
Controle (C)	X	X	-	-	X
Leite Cru (LC)	X	X	-	X	-
Leite Cru + Bifidobactéria (LCB)	X	X	X	X	-
Leite Pasteurizado (LP)	X	X	-	X	-
Leite Pasteurizado + Bifidobactéria (LPB)	X	X	X	X	-

Número de animais por tratamento: 12

Tempo total de experimentação: 30 dias

Obtenção da suspensão celular de macrófagos e células esplênicas para a realização da análise de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio

Após 7 dias de experimentação os animais foram transferidos para o Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara-SP, onde receberam o tratamento por mais 3 dias para aclimatização. No trigésimo dia os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ seguido de retirada do exsudato peritoneal e do baço para a realização das análises.

5.3. Obtenção do cólon

O cólon ascendente dos animais, medindo cerca de dois centímetros, foi retirado assepticamente por meio de uma incisão abdominal, pesados, lavados com solução salina (0,9%) estéril, fixados em Carnoy no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde/UFV e imediatamente transferidos para uma solução de álcool 80% em que foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral/UFV para inclusão em resina e parafina.

5.4. Análise histomorfométrica e imunohistoquímica

As secções do cólon foram incluídas em resina e parafina sob a forma de blocos para quantificação de mastócitos e linfócitos B produtores de IgA secretória respectivamente. Os blocos foram seccionados no micrótomo para obtenção de cortes com espessura pré-determinada em micrótomo rotativo.

5.4.1. Quantificação de mastócitos

Fragmentos do cólon foram fixados em Carnoy por 6 horas. Em seguida foram desidratados em solução de etanol 80%, incluídos em hidroxietil metacrilato e seccionados na espessura de 4µm em micrótomo rotativo. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%. Os mastócitos foram detectados por apresentarem metacromasia com a utilização desta técnica de coloração. Para cada animal foi confeccionada uma preparação histológica contendo 3 secções do cólon. Foram observados 30 campos microscópicos, por 3 observadores diferentes, totalizando 90 campos por animal, utilizando a objetiva de imersão. Foram contados mastócitos íntegros (granulados) e degranulados na mucosa e submucosa intestinal. Os resultados foram expressos em média de mastócitos granulados e degranulados bem como por índice obtido pela razão entre mastócitos granulados e degranulados.

5.4.2. Quantificação de células produtoras de IgA (linfócito B)

Para quantificação de linfócitos B na mucosa e submucosa do cólon dos animais foi realizado teste de imunofluorescência indireta seguindo a técnica descrita por Sainte-Marie (1962). O número de células produtoras de IgA foi determinado em preparações feitas a partir de cortes do cólon dos animais incluídos em parafina com 5µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinizados em concentrações seriadas de xilol e etanol e reidratados em solução tampão PBS. O teste de imunofluorescência utilizou o anticorpo primário de cabra anti-cadeia-α específica de IgA de rato na diluição 1:100 que foi adicionado sobre o tecido e incubado em câmara úmida por 1 hora. Após 3 lavagens com tampão PBS foi adicionado sobre o tecido na lâmina o anticorpo secundário de rato anti IgG de cabra marcado com isotiocianato fluorescente (FITC) (Sigma-Aldrich) na diluição 1:400 e incubado em

câmara úmida. Ao final de 1 hora a lâmina foi lavada 3 vezes com tampão PBS e examinadas em microscópio de luz fluorescente acoplado a uma câmara fotográfica. Para cada animal foi realizada a contagem do número de células produtoras de IgA em 10 campos microscópicos utilizando lente objetiva com aumento de 40 vezes e lente projetiva com aumento de 3,3 vezes, totalizando a contagem de 80 campos por tratamento. O resultado foi expresso em média de células com fluorescência positiva por campos microscópicos analisado em cada tratamento.

5.5. Obtenção de células do exsudato peritoneal (PEC)

Após 2 dias da inoculação de 10mL de tioglicolato de sódio (DIFCO), os animais foram anestesiados em câmara contendo clorofórmio e tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente. Após exposição de seus peritônios, estes foram inoculados com solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril. O líquido peritoneal resultante foi coletado com a mesma seringa, centrifugado e lavado três vezes com PBS. Após a última lavagem as células foram suspendidas em meio de cultura RPMI-1640 completo (RPMI-C) para a contagem de células. O número de células foi determinado utilizando 10 μ L da suspensão celular diluída em 90 μ L de líquido de Lázarus em câmara hemocitométrica de Neubauer e a suspensão celular ajustada à concentração desejada para cada teste.

5.5.1. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos para quantificação dos mediadores imunológicos

Para a determinação das citocinas IL-6, TNF- α e do óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), assim como a realização do teste MTT, as células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecido. A cada cavidade foi adicionada suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂. Após esta 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 RPMI-1640-C e acrescentado de Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) ou somente RPMI-1640-C como controle de células. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com

tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas. Após esta incubação as placas foram centrifugadas a 4°C a 2750 x g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados em tubos *ependorfs* e estocados em freezer a -80°C até o momento das análises das citocinas.

5.6. Obtenção das células esplênicas

Para a determinação de IFN- γ e IL-4 foram utilizadas culturas de células esplênicas. Os animais tiveram a pele da região abdominal retirada e o peritônio aberto para a extração do baço em câmara de fluxo laminar Classe 100. O baço foi retirado e transportado para uma placa de Petri estéril contendo BSS (Balanced Salt Solution), pH 7,2, gelado, onde foi macerado para liberação de células. Após este procedimento as suspensões celulares foram transferidas para um tubo cônico estéril e centrifugadas em PBS três vezes. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células viáveis foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL para a determinação de IFN- γ e IL-4.

5.6.1. Obtenção dos sobrenadantes das células esplênicas

A suspensão de células esplênicas ajustadas a 5×10^6 células/mL foram distribuídas em placas de cultura de tecidos e acrescentadas de meio de cultura RPMI-1640 e estimulador Concanavalina A (ConA) na concentração de 0,5 μ g/mL, ou somente meio de cultura RPMI-1640 como controle de células. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas. Após esta incubação as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliqüotados em tubos *ependorfs* e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação do IFN- γ e IL-4 liberado nos sobrenadantes.

5.7. Ensaio de citotoxicidade (MTT) - avaliação da viabilidade celular de macrófagos

Para determinação da viabilidade celular de macrófagos, foi utilizado 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 que possuem cor roxa característica (MOSMANN, 1983). Foram distribuídos em uma placa de microtitulação com 96 cavidades, as suspensões celulares dos animais dos cinco diferentes tratamentos ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C, adicionado de LPS. Para todos os tratamentos foram utilizados um controle de células contendo somente células em meio de cultura RPMI-1640 e um controle da reação contendo somente meio RPMI-1640 e LPS, sem as células. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂. Após esta incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de NO e as células aderentes tratadas com uma solução de MTT em RPMI-1640. As placas foram incubadas por mais três horas, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com isopropanol para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/Visível a 540 nm utilizando filtro de referência 620 nm. Cada animal estudado foi avaliado em duplicata no momento da execução do teste. Este teste foi realizado com o objetivo de eliminar a possibilidade de que alterações na liberação de citocina tenham ocorrido em função de morte celular.

5.8. Quantificação dos compostos intermediários do nitrogênio e oxigênio

5.8.1. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, 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 (GREEN, 1982). As suspensões de células do exsudato peritoneal na concentração de 5×10^6 células/mL de meio RPMI-1640 foram distribuídos 100 µL dessa suspensão celular em placas de microtitulação de 96 cavidades estéreis. Em algumas cavidades da placa foi adicionada solução de LPS como agente estimulante. Em outras cavidades foram adicionadas de meio RPMI-1640 à suspensão celular, sem LPS, como controle de células, que mostra a produção basal de citocinas. Como

controle dos reagentes foi utilizado somente meio de cultura RPMI-1640 e LPS, sem a suspensão celular. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ por 24 horas, seguido de transferência para outra placa de cultura de células e acrescidas de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/visível com filtro de 540nm. 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/5x10⁵ células.

5.8.2. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Alíquotas de suspensões de células do exsudato peritoneal na concentração de 2x10⁶ células/mL foram transferidas para microplacas de 96 cavidades. Em algumas cavidades da placa foram adicionados uma solução de Zimosan A (de *Saccharomyces cerevisiae*) e tampão vermelho de fenol. Em outras cavidades foram feitos controles de células contendo somente a suspensão celular em solução completa de vermelho de fenol (sem Zimosan A), mostrando a produção basal de citocinas. Em algumas cavidades, foram feitos controles dos reagentes, contendo somente solução de vermelho de fenol e Zimosan A (sem a suspensão celular). As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 5N (PICK & KEISARI, 1980; PICK *et al.*, 1981). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) UV/visível 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 H₂O₂/2x10⁵ células, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho de fenol.

5.9. 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 peritoniais, enquanto a IL-4 e IFN- γ foram determinadas em sobrenadantes de cultura de células esplênicas por meio do teste imunoenzimático

ELISA (VENDRAMINE, 2002). Foi utilizado o Kit Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de 96 cavidades foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti IL-6, anti-TNF- α , anti-IL-4 ou anti-IFN- γ de rato e incubadas por uma noite à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada contendo Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com BSA e lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa as citocinas padrão IL-6 e TNF- α (para construção da curva padrão) ou sobrenadantes das culturas de células peritoniais, que foram incubadas com e sem LPS. Da mesma forma, foram adicionados à placa as citocinas padrão IL-4 e IFN- γ ou sobrenadantes das culturas de células esplênicas, que foram incubadas com e sem Concanavalina A. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 4 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados anticorpo monoclonal de cabra anti IL-6, anti-TNF- α , anti-IL-4 ou anti-IFN- γ de rato marcado com biotina. Incubou-se à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionadas do conjugado streptavidina-peroxidase e incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂). A reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 2N. A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas. As concentrações de citocinas foram determinadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida a partir de quantidades conhecidas de citocina padrão. Os testes foram feitos em triplicata e o resultado expresso em picogramas/mL. Em todas as determinações de citocinas foram utilizados um controle de células contendo somente células em meio de cultura RPMI-1640 e um controle da reação contendo somente meio RPMI-1640 e LPS.

5.10. Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa SigmaStat Statistical Software versão 2.03. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e a análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Tukey sempre que observada diferença estatística. Foi adotado o nível de significância menor que 5% para todos os testes.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Quantificação de mastócitos granulados e degranulados na mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar

A Figura 1 mostra a fotografia de campos histológicos do cólon de ratos Wistar identificando o mastócito íntegro e degranulado.

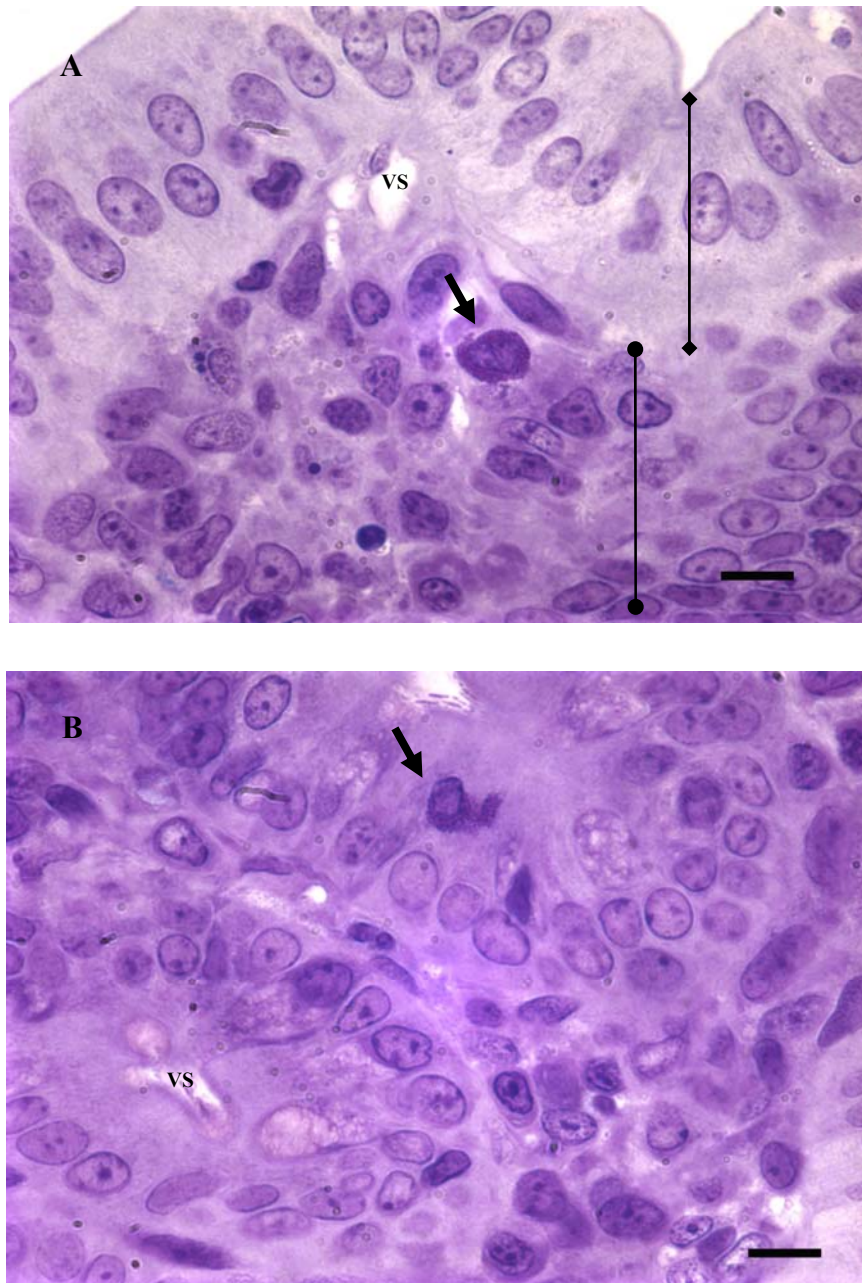


Figura 1. Fotomicrografia do cólon ascendente de ratos Wistar corado com azul de toluidina. Ponta da seta: (A) Mastócito Granulado; (B) Mastócito Degranulado. VS: vaso sanguíneo. (◊—◊): epitélio; (●—●): lâmina própria. Barra: 10µm.

A contagem média de mastócitos granulados e degranulados por campo histológico da mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar dos cinco tratamentos está representada na Figura 2.

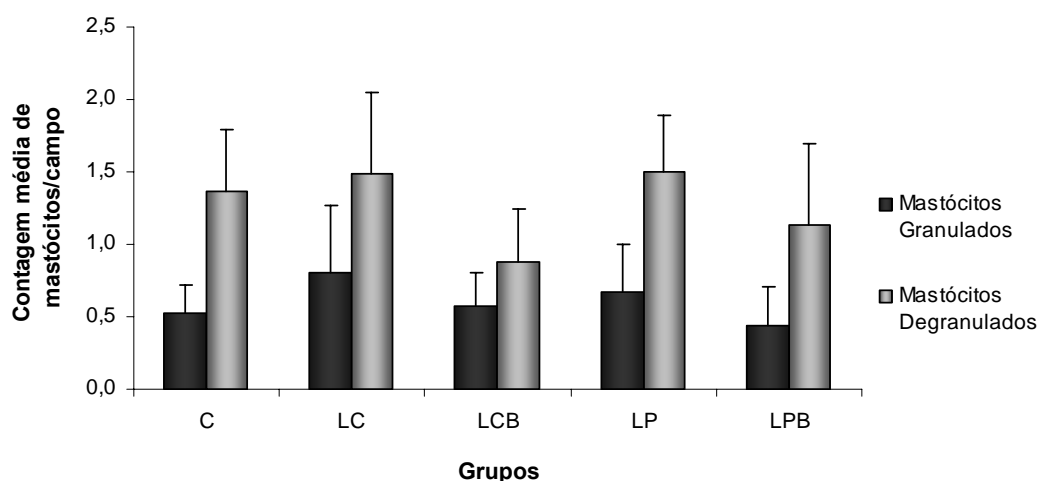


Figura 2. Contagem média de mastócitos granulados e degranulados na mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar. A análise quantitativa de mastócitos se deu em lâminas do cólon de ratos que receberam diariamente ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados indicaram que não houve diferença estatística na média de mastócitos granulados ($p=0,234$) e degranulados ($p=0,099$) contados por campo histológico nos diferentes grupos de estudo. Estes dados indicam que as bactérias probióticas não promoveram uma resposta alérgica em ratos e, dessa forma, sua suplementação no leite humano não afetaria a segurança do recém-nascido. Ainda que sem diferença estatística, nota-se que os animais que receberam leite humano cru ou pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB e LPB) apresentaram menor quantidade de mastócitos por campo histológico.

Os mastócitos têm papel de destaque na iniciação da resposta alérgica (MCCURDY *et al.*, 2003). Sua ativação ocorre quando a imunoglobulina E se liga à receptores específicos na sua superfície resultando na sua degranulação com conseqüente liberação de histamina, proteoglicanas e uma gama de mediadores pró-inflamatórios, entre outras substâncias (METCALFE *et al.*, 1997). Estudos diversos mostram o efeito positivo da ingestão de bactérias probióticas na prevenção e/ou

tratamento de doenças alérgicas (WESTON *et al.*, 2005; DANIEL *et al.*, 2006; KAWASE *et al.*, 2006; OGAWA *et al.*, 2006; HISBERGUES *et al.*, 2007; KUKKONEN *et al.*, 2007). Ao avaliar a influência da ingestão de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus casei* sobre a resposta alérgica de ratos com alergia induzida por ovoalbumina, observou-se que o percentual de mastócitos degranulados encontrados em ambos os grupos de animais que receberam bactérias probióticas foi menor ($p < 0,05$) que no grupo que recebeu apenas o desafio (KIM *et al.*, 2005), ficando claro o papel destas bactérias probióticas na redução da intensidade dos sintomas de alergia.

Outros estudos verificaram ainda a atividade de bactérias probióticas diretamente sobre os sintomas clínicos de alergia. Com o objetivo de avaliar o efeito da ingestão de *Lactobacillus fermentum* em crianças com idade entre 6 e 18 meses com dermatite atópica severa ou moderada, Weston e colaboradores (2005) verificaram, por meio do uso de um índice de severidade da dermatite atópica, que a suplementação com este probiótico melhorou a extensão e severidade da dermatite atópica em crianças. Da mesma forma, investigando o efeito da suplementação com *Bifidobacterium longum* no tratamento da alergia ao pólen do cedro japonês em voluntários adultos, pesquisadores encontraram resultados que sugerem a eficácia do consumo desta bactéria probiótica no alívio dos sintomas de alergia associado a um menor aumento dos níveis de IgE específica (XIAO *et al.*, 2006).

A Figura 3 apresenta o resultado da razão mastócitos granulados/degranulados por campo histológico da mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar avaliados no presente estudo.

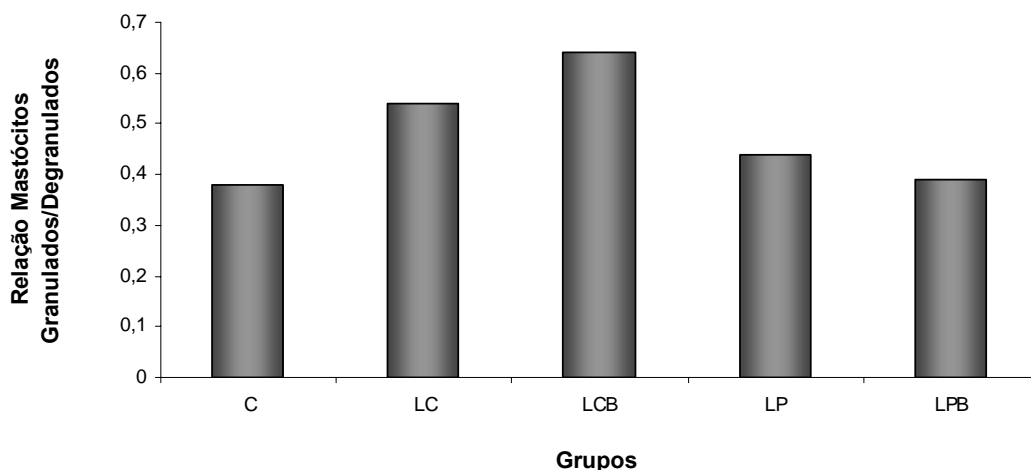


Figura 3. Relação entre mastócitos granulosos e degranulados quantificados na mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar. A análise quantitativa de mastócitos se deu em lâminas do cólon de ratos que receberam diariamente ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). As colunas do gráfico correspondem à razão mastócitos granulosos/mastócitos degranulados. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística na relação entre mastócitos granulosos e degranulados (Figura 3) dos diferentes grupos de estudo ($p = 0,078$) indicando que, independente da quantidade de mastócitos presentes na mucosa e submucosa intestinais, a proporção entre as células granulosas e degranuladas não variou entre os grupos, ou seja, o consumo de bactérias bífidas não promoveu resposta alérgica pelo estímulo da degranulação dos mastócitos e, por isso, a suplementação do leite humano é segura, com potencial de uso nos Bancos de Leite Humano.

6.2. Quantificação de células produtoras de IgA (linfócitos B) na mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar

A Figura 4 apresenta as imagens de um campo histológico indicando linfócitos B em amostras dos cinco tratamentos.

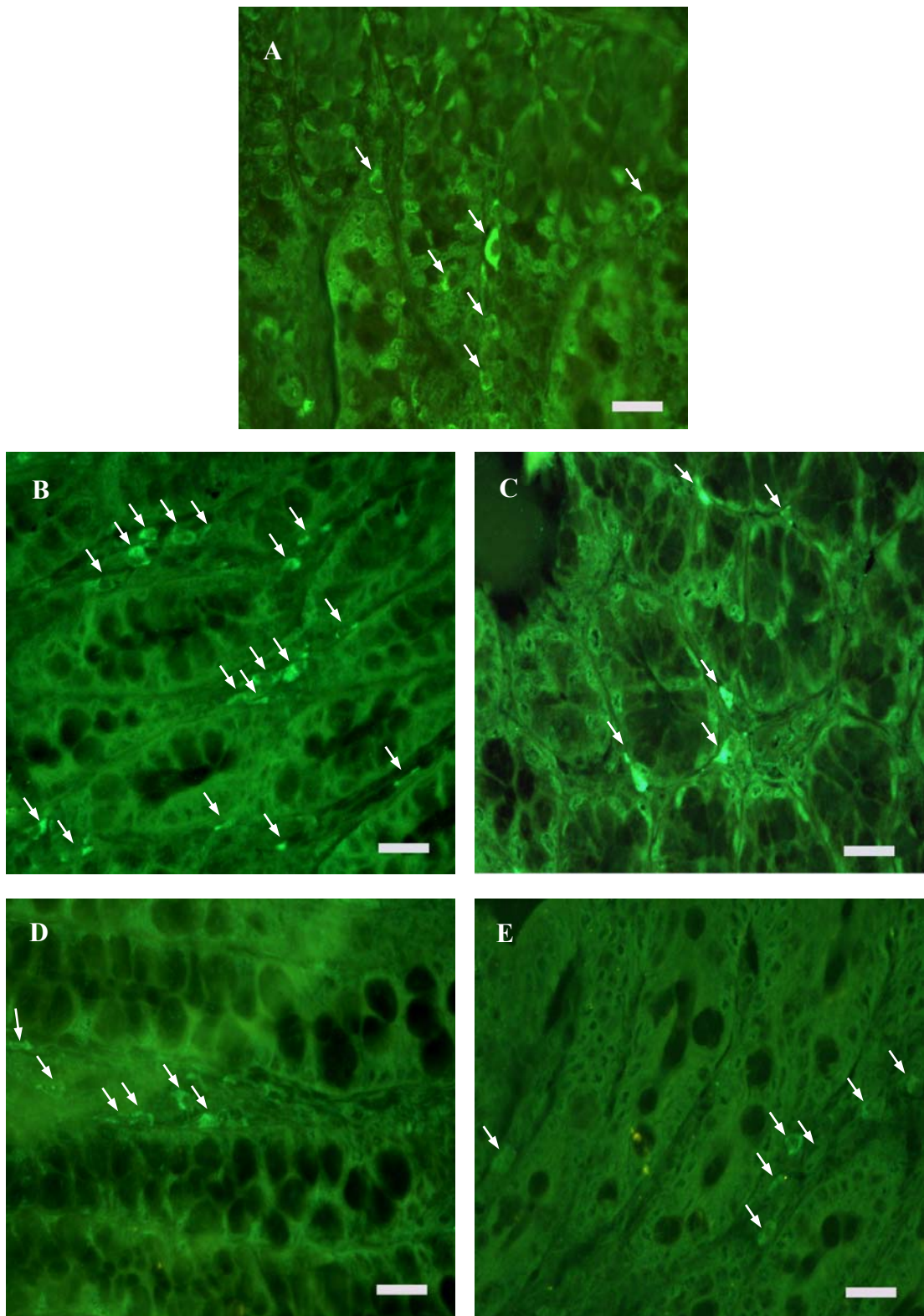


Figura 4. Fotomicrografia do cólon ascendente de ratos Wistar marcados com anticorpo anti-IgA. Grupos: (A) controle; (B) LC; (C) LCB; (D) LP; (E) LPB; Ponta da seta: linfócitos B. Barra: 20 μ m.

A Figura 5 indica a contagem média de linfócitos B por campo histológico da mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar dos diferentes grupos avaliados no presente estudo.

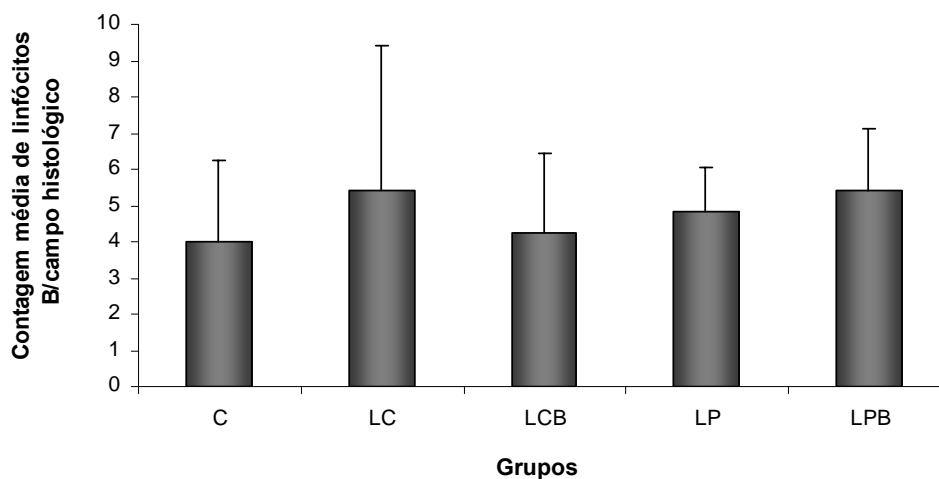


Figura 5. Contagem média de linfócitos B na mucosa e submucosa do cólon de ratos Wistar. A análise quantitativa de linfócitos se deu em lâminas do cólon de ratos que receberam diariamente ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados da presente experimentação (Figura 5) foram semelhantes ($p=0,602$) em todos os tratamentos, indicando que a suplementação do leite humano com um “pool” de *Bifidobacterium breve* não interfere de maneira adversa na produção de linfócitos B. Ainda que sem diferença estatística, a adição de bifidobactérias no leite humano pasteurizado produziu um ligeiro aumento na contagem média de linfócitos quando comparado com o grupo controle, mas este aumento não ultrapassou a contagem verificada no grupo de animais que recebeu leite cru.

Dados sobre o estímulo de linfócitos B por bactérias do ácido lático são divergentes na literatura. Alguns estudos demonstram que a ingestão de bactérias lácticas potencialmente probióticas podem promover aumento da contagem de linfócitos B produtores de IgA no tecido linfóide associado à mucosa intestinal, enquanto outros não corroboram este estímulo.

É importante lembrar que para ter uma boa estimulação do sistema imune intestinal, o número de células produtoras de IgA deve ser apenas ligeiramente maior

que o encontrado no grupo controle (BRANDTZAEG *et al.*, 1993). Uma elevada contagem de linfócitos B pode ter efeito nocivo para o hospedeiro e favorecer o aumento da permeabilidade intestinal (SARTOR, 1994). Os dados mostram ainda um elevado desvio-padrão no grupo LC, indicando que neste grupo foram visualizados campos histológicos com poucos e outros com muitos linfócitos. Essa contagem ligeiramente superior de células produtoras de IgA na mucosa intestinal dos animais do grupo LC, mesmo não sendo significativa, pode estar relacionada com a maior concentração de bactérias presentes no leite cru, quando comparada com aquela encontrada em leite pasteurizado.

Os linfócitos B produzem IgA, anticorpo que reconhece e remove os antígenos da mucosa, sem ativar a resposta inflamatória (BRANDTZAEG, 1995). Juntamente com a acidez estomacal, as enzimas digestivas e o muco, entre outros compostos, a IgA secretada no lúmen intestinal atua na função de barreira impedindo que os antígenos intestinais entrem em contato com o organismo hospedeiro (MACPHERSON *et al.*, 2001). Este fato torna a IgA ainda mais importante para a proteção de recém-nascidos, visto que seu sistema imunológico encontra-se imaturo no momento do nascimento e conseqüentemente incapaz de exercer plenamente a sua proteção (BERNT & WALKER, 1999).

Em estudo que investigou os possíveis mecanismos envolvidos na ativação do sistema imune de mucosa por bactérias do ácido lático quantificando células produtoras de IgA por meio de imunofluorescência direta, observou-se que *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* promoveram o aumento do número de linfócitos B na lâmina própria. Os pesquisadores verificaram ainda que o efeito observado era dependente da dose de microrganismo administrada (PERDIGÓN *et al.*, 1999). O resultado da administração de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* na imunidade de mucosa de camundongos foi avaliado, após diferentes períodos, por meio da quantificação de linfócitos B empregando-se a técnica de imunofluorescência direta observando-se um aumento do número destas células no tecido linfóide associado à mucosa e tecido bronquial. Ainda nessa experimentação, verificou-se que o aumento mais significativo ocorreu durante os primeiros dias de tratamento (MATAR *et al.*, 2001). A capacidade imunomodulatória de bifidobactérias e lactobacilos endógenos e exógenos sobre a mucosa intestinal de

camundongos Balb/c foi avaliada e constatou-se que estirpes de *Bifidobacterium* não foram capazes de aumentar o número de linfócitos B no intestino delgado de camundongos enquanto uma estirpe exógena de *B. bifidum* aumentou significativamente o número destas células no intestino grosso quando comparado com animais do grupo controle (VINDEROLA *et al.*, 2004). Ao verificar o efeito da suplementação oral de camundongos Balb/c recém-nascidos com *Bifidobacterium bifidum* e *B. infantis* sobre a imunidade de mucosa intestinal, observou-se que estas bactérias não foram capazes de aumentar de forma significativa o número de linfócitos B produtores de IgA na mucosa quando comparadas com o grupo controle (GRIFFITHS *et al.*, 2004). Médici e colaboradores (2004) avaliaram a influência da ingestão de queijo contendo *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* e *L. paracasei* na imunomodulação de camundongos Balb/c e notaram aumento significativo no número de células produtoras de IgA no intestino delgado, após 2 e 5 dias de tratamento, enquanto no intestino grosso o efeito foi verificado apenas com 5 dias de tratamento. Nos dois sítios intestinais, o número de linfócitos B reduziu com 7 dias de tratamento.

A redução da contagem de linfócitos observada por Matar e colaboradores (2001) e Médice e colaboradores (2004) com o avançar do tratamento pode ter ocorrido devido a um processo de auto-regulação que geralmente acontece quando a resposta máxima é alcançada. Este fenômeno evitaria uma resposta inflamatória decorrente da superestimulação da mucosa intestinal. Na presente experimentação a quantificação de linfócitos B se deu após 21 dias de tratamento e as observações feitas podem ter sido resultado de uma auto-regulação imunológica.

6.3. Teste de viabilidade de macrófagos peritoneais (MTT)

A Figura 6 indica a viabilidade celular de macrófagos nos diferentes tratamentos desta experimentação.

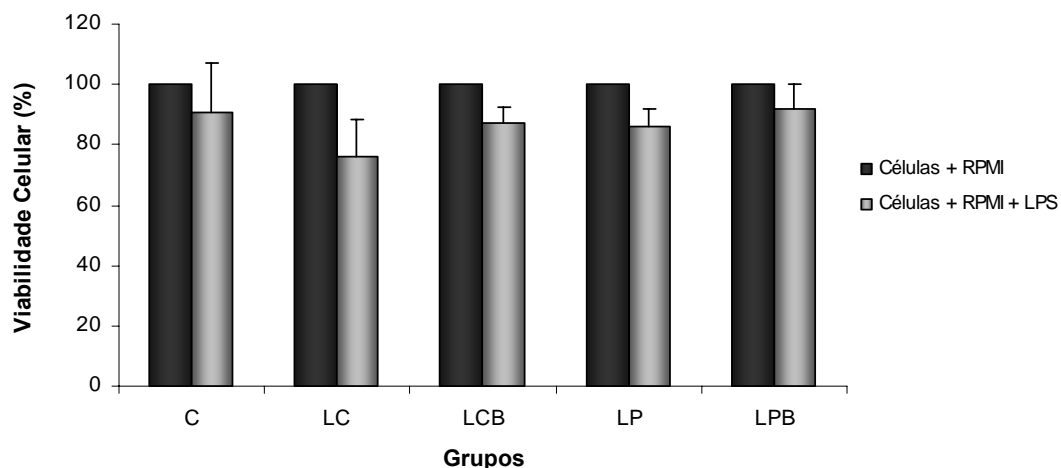


Figura 6. Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais. Foram usadas suspensões de células do exudato peritoneal de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). As células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C) foram utilizadas como controle de células, equivalendo a 100% de viabilidade. Em todos os grupos utilizou-se LPS para controle do efeito na viabilidade celular. As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não houve diferença na viabilidade celular de macrófagos ($p > 0,05$) dos diferentes tratamentos, como observado nos dados referentes às células tratadas com o lipopolissacarídeo de bactérias Gram negativas (LPS). O LPS é um potente sinalizador de citocinas (CAVAILLON, 1994), no entanto, a sua presença pode afetar a viabilidade de macrófagos interferindo na quantificação das mesmas. Esse efeito pode ser observado nos dados de macrófagos tratados com o LPS (Figura 6), em que todos os resultados foram ligeiramente inferiores em relação ao controle (somente RPMI, 100% de viabilidade). O teste de viabilidade de macrófagos peritoneais é realizado como um procedimento padrão com o objetivo de eliminar a possibilidade de que a morte celular possa interferir nos resultados obtidos para a liberação de citocinas. No entanto, o efeito na viabilidade celular foi o mesmo nos diferentes tratamentos, indicando que os macrófagos utilizados na quantificação de

citocinas e intermediários da resposta inflamatória estavam viáveis o suficiente e, desta forma, não interferiram na quantificação destes compostos.

6.4. Avaliação da produção de compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio em cultura de células peritoniais de ratos Wistar

Nas análises de NO e H₂O₂, o controle da reação realizado apenas com o meio de cultura RPMI-1640 e o agente estimulante (LPS ou ZimosanA) mostrou que a interação entre os reagentes não interferiu nos resultados da presente experimentação. Os dados referentes ao controle de células (células + RPMI) representam apenas a produção basal de NO e H₂O₂, na ausência de estímulo com LPS/Zimosan A, e podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8.

6.4.1. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoniais

A produção de NO em cultura de macrófagos peritoniais nos cinco tratamentos dessa experimentação está indicado na Figura 7.

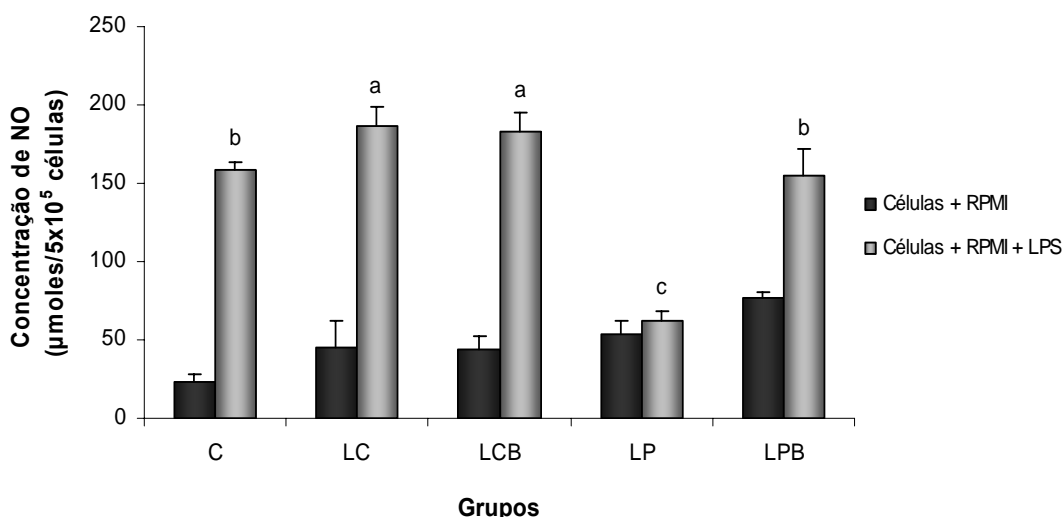


Figura 7. Produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoniais. A quantificação de NO foi realizada por determinação espectrofotométrica de nitrito em suspensão de macrófagos peritoniais de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). O LPS foi utilizado como agente estimulante da produção de NO. Em todos os grupos foi utilizado um controle de células contendo apenas células cultivadas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA).^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os animais que receberam leite humano cru e leite humano cru suplementado com as bactérias bífidas apresentaram maior liberação de NO ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo controle e com os animais que receberam o leite pasteurizado suplementado ou não com um “pool” de *Bifidobacterium breve*. Essa maior concentração de NO nos grupos que consumiram o leite cru pode estar refletindo uma resposta à microbiota desse leite que, comparada à do leite pasteurizado, é mais elevada. Observa-se também que os animais do grupo que recebeu o leite pasteurizado sem a suplementação de *B. breve* apresentaram a menor concentração de NO ($p < 0,05$). No entanto, o grupo que recebeu o leite pasteurizado com a suplementação de bactérias bífidas apresentou uma liberação de NO igual à

verificada para o grupo controle e menor ($p < 0,05$) que a apresentada pelo grupo tratado com leite cru, sinalizando um efeito positivo para essa suplementação. Os dados mostram ainda que a suplementação do leite cru, que já contém uma microbiota própria, não resultou em aumento da produção de NO, indicando que a suplementação em si, não resultou em produção exacerbada desse composto pró-inflamatório.

Outras experimentações que utilizaram metodologias semelhantes encontraram aumento na liberação de óxido nítrico por macrófagos quando estimulados por bactérias lácticas. Ao avaliar camundongos com ingestão diária de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti*, verificou-se que uma maior concentração de NO foi produzida pelos animais que receberam o produto fermentado do que os animais que receberam placebo (VENDRAMINI, 2002). Park e colaboradores (1999), avaliando diversas estirpes de *Bifidobacterium* detectaram maior produção de NO dentre os animais que receberam as bactérias probióticas e o aumento na concentração de NO foi proporcional à concentração bacteriana consumida. Os vários resultados de diferentes pesquisadores sugerem que a resposta à produção de óxido nítrico é estirpe dependente. Desta forma, torna-se importante avaliar esta variável quando uma nova estirpe está em processo de seleção para uso como probiótico.

Sabe-se que níveis elevados de NO estão relacionados a várias doenças como choque séptico, doenças auto-imunes e cardiovasculares (KILBOUM & GRIFFITH, 1992; DINERMAN *et al.*, 1993; IALENTI *et al.*, 1993). Por outro lado, o NO ou seus produtos reativos possuem atividade antibacteriana, mas seu efeito tóxico também pode afetar as células do hospedeiro (LUNDBERG *et al.*, 1997). Existe, porém, um limite sutil entre a concentração de NO necessária para essa ação microbicida e seu efeito tóxico para o hospedeiro (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Na presente experimentação, verificou-se que a suplementação com as bactérias probióticas resultou em uma produção de NO que pode ser considerada dentro desse limite seguro, uma vez que não ultrapassou a concentração produzida pelos animais que receberam o leite humano não suplementado.

6.4.2. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cultura de macrófagos peritoneais

A Figura 8 apresenta o resultado da produção de peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos peritoneais realizada para os cinco grupos experimentais.

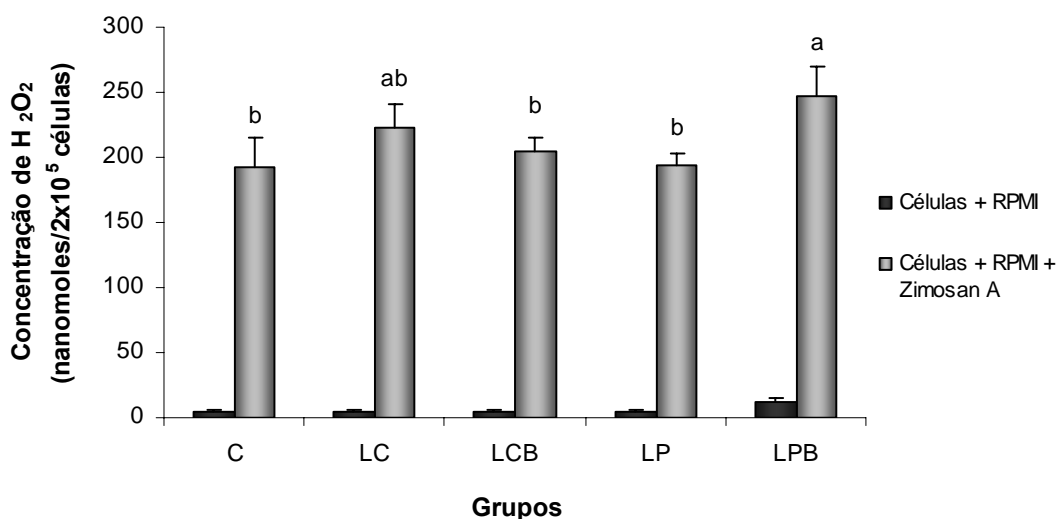


Figura 8. Produção de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos peritoneais. A quantificação de H₂O₂ foi realizada a partir macrófagos peritoneais de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). O Zimosan A (*S. cerevisiae*) foi utilizado como agente estimulante da produção de H₂O₂. Em todos os grupos foi utilizado um controle de células contendo células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA).^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Os animais que receberam leite humano pasteurizado suplementado com bifidobactérias apresentaram produção de peróxido de hidrogênio maior (p<0,05) que do grupo controle, mas igual (p>0,05) à verificada no grupo que recebeu leite cru. O consumo de leite humano cru, extraído do seio materno e diretamente administrado ao recém-nascido, tem sido incentivado em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, ambiente onde os cuidados com a saúde do neonato são reforçados (VIEIRA *et al.*, 2004). Observa-se ainda que a suplementação do leite cru, que já apresenta uma microbiota endógena, não resultou em aumento da produção de H₂O₂, reforçando o fato de que a adição de um “pool” de *B. breve* no leite não promoveu uma liberação acentuada deste mediador pró-inflamatório. Estes

dados indicam que a utilização destas bactérias probióticas em Bancos de Leite Humano é segura para a saúde do recém-nascido.

Ainda que não significativo, o grupo de animais que recebeu leite humano pasteurizado suplementado com bifidobactérias apresentou um aumento sutil na liberação de H_2O_2 , mas se por um lado a liberação excessiva de peróxido de hidrogênio pode causar danos à saúde do hospedeiro, por outro este composto tem importante papel na atividade bactericida de macrófagos, e por isso o aumento da produção de H_2O_2 nem sempre é nocivo ao organismo.

Utilizando metodologias semelhantes, outros estudos evidenciaram um aumento na liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos quando estimulados por bactérias lácticas. Estudando o efeito da ingestão de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* sobre a produção de H_2O_2 em camundongos, Vendramini (2002), que utilizou metodologia semelhante a aplicada em nossa experimentação, encontrou aumento significativo da liberação do mesmo, quando comparado com os animais do grupo controle. Ao avaliar o efeito de diferentes estirpes de *Bifidobacterium* sobre a produção de H_2O_2 em modelo murino utilizando uma metodologia fluorimétrica, Park e colaboradores (1999) observaram que diversas estirpes foram capazes de estimular a liberação de H_2O_2 , mas que este efeito era estirpe e dose-dependente. No presente estudo, a produção de H_2O_2 em resposta ao estímulo por bifidobactérias não foi diferente da verificada para o grupo controle.

6.5. Avaliação da produção de citocinas em culturas de células peritoniais e esplênicas de ratos Wistar

Nas análises de citocinas, o controle da reação realizado com meio de cultura RPMI-1640 e LPS ou ConcanavalinaA (sem macrófagos ou células esplênicas) certificou que a interação entre os reagentes não interferiu nos resultados da presente experimentação. Nas Figuras 9, 10, 11 e 12 os dados referentes ao controle de células (células + RPMI-1640) representam apenas a produção basal de citocinas, na ausência de estímulo com LPS ou ConcanavalinaA.

6.5.1. Concentração de interleucina-6 (IL-6) liberada em cultura de macrófagos peritoneais

A Figura 9 apresenta a quantificação de interleucina-6.

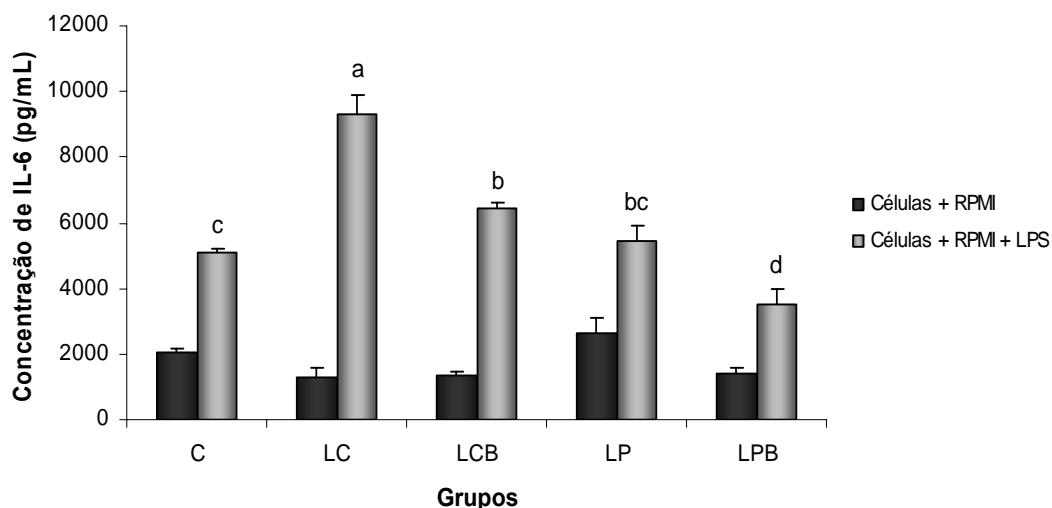


Figura 9. Concentração de Interleucina-6 liberada em cultura de macrófagos peritoneais. O teste imunoenzimático (ELISA) para determinação de IL-6 foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de macrófagos peritoneais de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). O LPS foi utilizado como agente estimulante da produção de IL-6. Em todos os grupos foi utilizado um controle de células contendo células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). ^{a,b,c,d} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os animais que receberam leite humano pasteurizado adicionado de bifidobactérias apresentaram produção de IL-6 menor ($p < 0,05$) que do grupo controle e do grupo tratado com leite humano cru. O aumento significativo na produção de IL-6 nos grupos que consumiram leite humano cru (LC e LCB) quando comparado com o grupo controle pode estar relacionado com a alta contagem microbiana encontrada nas amostras de leite sem tratamento térmico. É importante notar ainda que a suplementação do leite humano cru com o “pool” de *B. breve* provocou redução significativa na produção de IL-6 quando comparado com o grupo que recebeu leite cru sem bifidobactérias. O mesmo foi observado quando se comparou o grupo que recebeu leite pasteurizado com e sem a adição das bactérias probióticas. Estes dados sugerem que o “pool” de bifidobactérias pode atuar inibindo

a produção de IL-6 e, conhecendo-se a atividade pró-inflamatória desta citocina, a suplementação do leite humano com *B. breve* pode ter efeito benéfico no controle de doenças inflamatórias intestinais como a enterocolite necrosante, enfermidade tão comum em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (PATOLE, 2007).

Assim como observado no presente estudo, ao avaliar a capacidade imunomodulatória de bifidobactérias e lactobacilos endógenos e exógenos sobre a mucosa intestinal de camundongos Balb/c, pesquisadores realizaram uma contagem de células produtoras de IL-6 e verificaram que estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus fermentum* isoladas de queijo e do intestino de camundongos, foram capazes de reduzir significativamente a contagem de células produtoras de IL-6 no intestino delgado destes animais quando comparado com animais que receberam ração e água. Os autores concluíram ainda que a capacidade imunomodulatória da bactéria probiótica é dependente da estirpe bacteriana e independente da especificidade do hospedeiro, mas que no entanto, é necessária uma dose significativamente maior da bactéria exógena para se observar o efeito probiótico, visto que as bactéria endógenas foram administradas em concentração de 10^4 UFC/dia enquanto as bactérias exógenas em concentração de 10^7 UFC/dia (VINDEROLA *et al.*, 2004). Ao examinar o efeito da suplementação oral de camundongos Balb/c recém-nascidos com *Bifidobacterium bifidum* e *B. infantis* sobre a imunidade de mucosa intestinal, pesquisadores observaram que estas bactérias não foram capazes de induzir a produção de IL-6 quando comparadas com o grupo controle (GRIFFITHS *et al.*, 2004).

Por outro lado, Vendramini (2002) observou que o produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* estimulou aumento ($p < 0,05$) da produção de IL-6 quando comparado com os grupos controle. Park e colaboradores (1999) também verificaram que estirpes de *Bifidobacterium*, nas concentrações de 10 a 250 $\mu\text{g/mL}$, foram capazes de estimular a liberação de IL-6.

6.5.2. Concentração do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) liberada em cultura de macrófagos peritoneais

A produção de fator de necrose tumoral- α em cultura de macrófagos peritoneais dos cinco grupos experimentais está indicado na Figura 10.

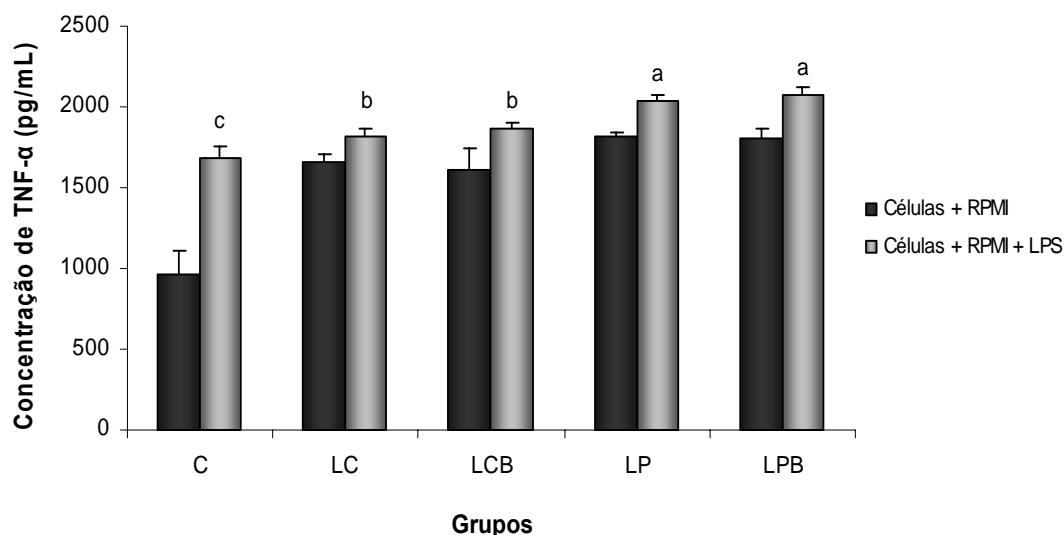


Figura 10. Concentração de TNF- α liberada em culturas de macrófagos peritoneais. O teste imunoenzimático (ELISA) para determinação de TNF- α foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de macrófagos peritoneais de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). O LPS foi utilizado como agente estimulante da produção de TNF- α . Para todos os grupos de estudo foram utilizados um controle de células contendo células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA).^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os animais que receberam leite humano pasteurizado ou não e adicionado ou não de *B. breve*, apresentaram produção TNF- α maior ($p < 0,05$) que dos animais do grupo controle. Nota-se ainda que dentre os animais que receberam leite pasteurizado adicionado ou não de bifidobactérias a liberação de TNF- α foi ainda maior que a encontrada para os animais que receberam leite cru (LC e LCB). No entanto, a adição do “pool” de *Bifidobacterium breve* no leite humano não parece ter influenciado a liberação de fator de necrose tumoral- α , visto que não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo de animais que recebeu o mesmo tratamento térmico sem a adição das bactérias.

Assim como no presente estudo, a experimentação que avaliou o efeito da ingestão diária de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* sobre a resposta imune de camundongos pela mesma metodologia utilizada neste trabalho, encontrou-se um aumento significativo na liberação de TNF- α quando comparado com os grupos controle (VENDRAMINI, 2002). Ao estudar o efeito de diversas estirpes de *Bifidobacterium* sobre a produção de TNF- α em modelo murino, pesquisadores verificaram que a capacidade de estimular a liberação de fator de necrose tumoral- α diferiu de forma significativa entre as estirpes (PARK *et al.*, 1999). Viljanen e colaboradores (2005) realizaram um estudo envolvendo 230 crianças com idade entre 1,4 e 11,9 meses, portadoras de dermatite/eczema atópica e com suspeita de alergia ao leite de vaca, objetivando verificar a influência do consumo de probióticos na produção de marcadores inflamatórios. Após a suspensão do consumo de leite de vaca, as crianças foram divididas em 3 grupos que receberam por 4 semanas *Lactobacillus* GG, uma mistura de 3 bactéria (*Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium breve* e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii*) ou placebo. Ao final do experimento, as crianças que receberam L.GG apresentaram menor dosagem de TNF- α quando comparada com o grupo controle, mas não significativa.

Por outro lado, em pesquisa que visou analisar o efeito imunomodulatório de *Bifidobacterium bifidum* no controle da doença inflamatória intestinal quantificando citocinas em cultura de células mononucleares do baço e do cólon, verificou-se que o grupo de animais que recebeu a cultura bacteriana apresentou redução ($p < 0,05$) na liberação de TNF- α quando comparado com o grupo de animais que não recebeu a mesma (KIM *et al.*, 2007).

Na presente experimentação, o aumento da liberação de TNF- α entre os animais tratados com leite pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* e seu efeito na saúde de recém-nascidos deve ser melhor investigado, mas é importante lembrar que se por um lado a produção exagerada de TNF- α está relacionado a processos inflamatórios agudos, por outro lado a diminuição da produção desta citocina pode provocar um aumento na suscetibilidade à infecções (GANTNER *et al.*, 1996).

6.5.3. Concentração de interleucina-4 (IL-4) liberada em cultura de células esplênicas

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos na determinação da produção de IL-4 pelas células esplênicas dos animais dos diferentes tratamentos.

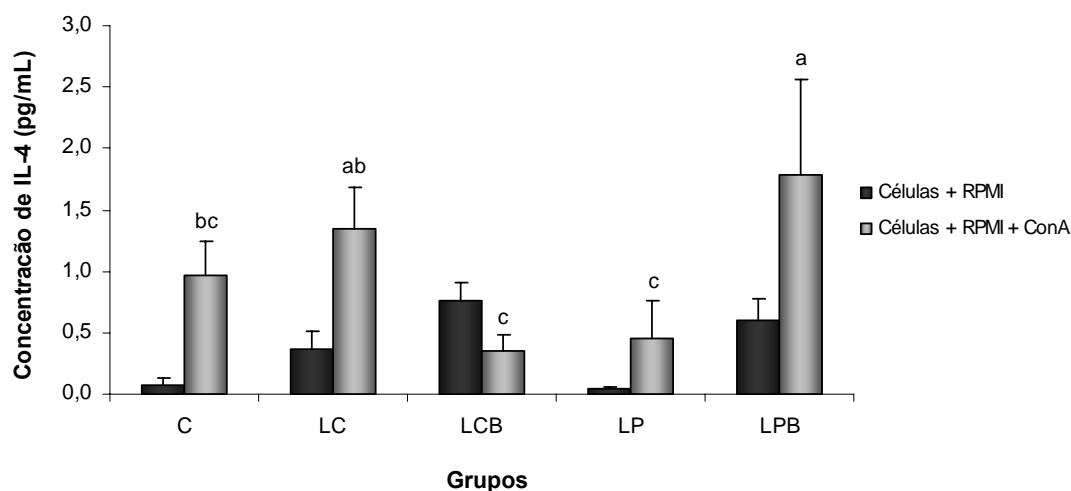


Figura 11. Concentração de IL-4 liberada em culturas de células esplênicas. O teste imunoenzimático (ELISA) para determinação de IL-4 foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de células esplênicas de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). A Concanavalina A (ConA) foi utilizada como agente estimulante da produção de IL-4. Para todos os grupos de estudo foram utilizados um controle de células contendo células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). ^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O grupo de animais que recebeu leite humano pasteurizado adicionado de *B. breve* apresentou produção de IL-4 maior ($p < 0,05$) que a observada dentre os animais do grupo controle, mas igual ($p > 0,05$) à verificada dentre os animais do grupo LC. Nota-se ainda que a elevada média de produção de IL-4 dentre os animais do grupo LPB foi acompanhada de um elevado desvio-padrão, sugerindo falta de homogeneidade dentre os animais do grupo, na resposta para essa citocina. O papel das bifidobactérias no estímulo da produção de IL-4 deve ser analisado cuidadosamente, visto que o mesmo comportamento não foi observado quando o “pool” de bifidobactérias foi adicionado no leite humano cru. O aumento da produção desta citocina está relacionado com a tolerância neonatal a antígenos

específicos por estimular a maturação de células Th2 em lugar das células Th1 e prevenir a maturação de linfócitos T citotóxicos (GAO *et al.*, 1996) regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que neste estudo se apresentou aumentada. Dessa forma, o aumento da liberação de IL-4 entre os animais tratados com leite humano pasteurizado suplementado com *B. breve* pode ter um importante papel na modulação da resposta imunológica de recém-nascidos.

Em estudo que verificou o efeito antigênico de diversas bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) no sistema imune intestinal, observou-se que estas bactérias foram capazes de induzir aumento significativo de IL-4 em camundongos Balb/c e que este efeito foi dose-dependente (PERDIGÓN *et al.*, 2002).

Por outro lado, vários estudos não encontraram associação entre a suplementação com bactérias probióticas e a produção de IL-4. Com a proposta de avaliar o efeito antiinflamatório da suplementação com *Lactobacillus* GG e *L. reuteri*, foi determinada a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de crianças de 1 a 13 anos de idade com dermatite atópica. Após seis semanas de suplementação não foi encontrada alteração significativa na produção de IL-4, porém observou-se uma correlação positiva entre o nível de IL-4 e a melhora clínica do paciente (ROSENFELDT *et al.*, 2003). Ao verificar o efeito imunomodulatório de *Bifidobacterium bifidum* no controle de doenças inflamatórias intestinais quantificando citocinas em culturas de células mononucleares do baço e do cólon, Kim e colaboradores (2007) verificaram que não houve diferença estatística na liberação de IL-4 e outras interleucinas do tipo Th2 entre os animais que receberam a bifidobactéria e os animais do grupo controle. Estudo que verificou o efeito da suplementação materna perinatal de camundongos fêmeas Balb/c com *Lactobacillus* GG no desenvolvimento de doenças alérgicas na sua prole, não encontrou alteração nos níveis de IL-4 quando comparado com os filhotes de animais que receberam placebo (BLUMER *et al.*, 2007).

Os resultados verificados na presente análise assim como os dados disponíveis na literatura são conflitantes e não deixaram clara a atividade das bactérias probióticas na expressão de IL-4. Outros estudos que investiguem os mecanismos de ação destas bactérias devem ser realizados a fim de explicar a relação entre as mesmas e a produção de citocinas antiinflamatórias.

6.5.4. Concentração do interferon - gama (IFN- γ) liberada em cultura de células esplênicas

A produção interferon-gama em cultura de células esplênicas realizada para os grupos avaliados no presente estudo está indicada na Figura 12.

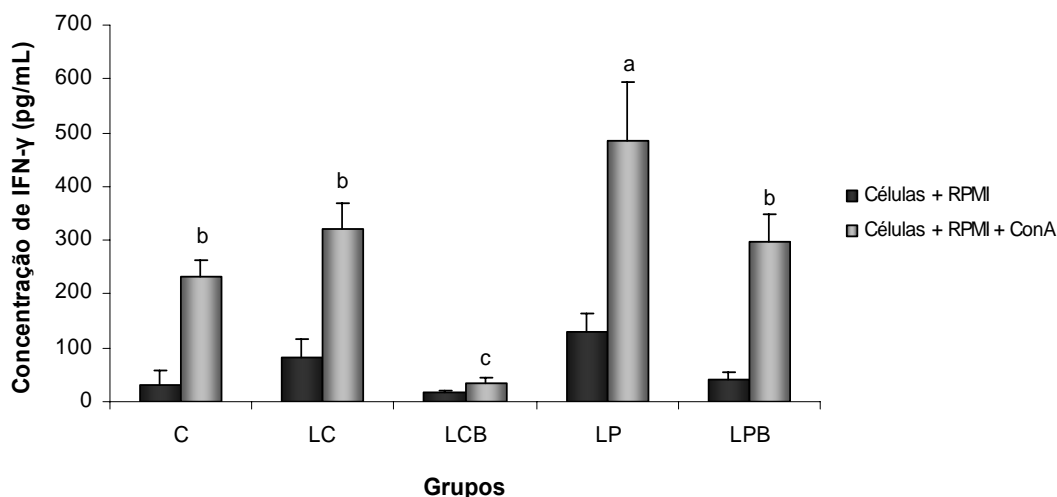


Figura 12. Concentração de IFN- γ liberada em culturas de células esplênicas. O teste imunoenzimático (ELISA) para determinação de IFN- γ foi realizado com os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de células esplênicas de ratos Wistar que receberam ração (C), leite humano cru (LC), leite humano cru suplementado com *Bifidobacterium breve* (LCB), leite humano pasteurizado (LP) ou leite humano pasteurizado suplementado com *Bifidobacterium breve* (LPB). A Concanavalina A (ConA) foi utilizada como agente estimulante da produção de IFN- γ . Para todos os grupos de estudo foi realizado um controle de células contendo células cultivadas apenas em meio de cultura (RPMI-1640-C). As colunas do gráfico correspondem à média e as barras de erro representam o desvio-padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). ^{a,b,c} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os animais que receberam leite humano pasteurizado suplementado com *B. breve* apresentaram níveis de produção de IFN- γ iguais ($p > 0,05$) aos encontrados nos grupos controle e LC. A produção de interferon-gama foi estatisticamente menor entre os animais tratados com leite cru suplementado com bifidobactérias quando comparado com os animais que receberam leite humano cru. Da mesma forma, a adição de *B. breve* no leite pasteurizado reduziu de forma estatisticamente significativa a produção de IFN- γ quando comparado com o grupo LP, o que sugere um papel inibitório das bifidobactérias sobre a liberação desta citocina.

Assim como na presente experimentação, outros estudos corroboram este resultado. Ao examinar o efeito da suplementação oral de camundongos Balb/c

recém-nascidos com *Bifidobacterium bifidum* e *B. infantis* sobre a imunidade de mucosa intestinal, pesquisados não encontraram diferença na produção de IFN- γ quando comparada com o grupo controle (GRIFFITHS *et al.*, 2004). Da mesma forma, ao verificar o efeito antiinflamatório da suplementação com *Lactobacillus* GG e *L. reuteri*, não foram encontradas alterações na produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico de crianças com dermatite atópica, após seis semanas de suplementação e quando comparado com o grupo controle (ROSENFELDT *et al.*, 2003).

Por outro lado, estudos diversos mostram que o consumo de probióticos pode atuar em alguns momentos estimulando ou inibindo a produção de IFN- γ . Avaliando o efeito antigênico de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* no sistema imune intestinal, pesquisadores quantificaram IFN- γ em células aderentes da placa de Peyer do intestino delgado de camundongos Balb/c e observaram que, após 7 dias de consumo, os níveis de IFN- γ estavam aumentados para *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (PERDIGÓN *et al.*, 2002). Kim e colaboradores (2007), verificando o efeito imunomodulatório de *Bifidobacterium bifidum* no controle de doenças inflamatórias intestinais através da quantificação de citocinas em culturas de células mononucleares do baço e do cólon, verificaram que os animais que receberam a bifidobactéria mostraram uma redução significativa nos níveis de IFN- γ em comparação com os animais que receberam placebo. Um estudo que verificou o efeito da suplementação materna perinatal de camundongos fêmeas Balb/c com *Lactobacillus* GG no desenvolvimento de doenças alérgicas na sua prole, encontrou uma redução significativa dos níveis de IFN- γ quando comparado com os filhotes de animais que receberam placebo (BLUMER *et al.*, 2007).

A indução simultânea de algumas citocinas regulatórias e pró-inflamatórias pode ser benéfica para a manutenção de uma resposta imunológica intestinal crônica fisiológica que pode ser chamada de inflamação fisiológica (CEBRA *et al.*, 2005). Em nosso estudo verificamos que a adição de *Bifidobacterium breve* em leite humano pasteurizado produziu estimulação de TNF- α quando comparado com o grupo controle e LC assim como da IL-4 quando comparado com o grupo controle.

Ao se analisar os resultados encontrados em revisão de literatura, observa-se que a dose e a estirpe bacteriana utilizadas nas experimentações têm grande

influência sobre o efeito observado na resposta imune, mas que em geral, a suplementação com bactérias probióticas apresenta efeito positivo no quadro clínico do indivíduo suplementado. Vale a pena lembrar que quando se realiza experimentações *in vivo*, as condições ambientais podem interferir no resultado observado. No presente estudo, os dados indicam que a suplementação do leite humano com bifidobactérias apresentou boa tolerância pelos animais e não promoveu uma estimulação exacerbada da resposta inflamatória, mostrando potencial para utilização segura em Bancos de Leite Humano.

7. CONCLUSÕES

A suplementação do leite humano com um “pool” de *Bifidobacterium breve* não promoveu resposta alérgica em ratos e teve efeito positivo na modulação de linfócitos B, mostrando-se promissora a proposta de suplementação do leite humano pasteurizado dos Bancos de Leite com esses isolados. A adição de um “pool” de *B. breve* no leite humano pasteurizado modulou benéficamente a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio em ratos Wistar. A análise de citocinas mostrou o efeito modulador do concentrado de bactérias bífidas suplementadas no leite humano pela estimulação da produção de TNF- α e inibição da produção de IL-6 e IFN- γ .

Os dados acumulados com essa experimentação sinalizam de maneira positiva para a alternativa de contornar os efeitos da pasteurização do leite humano depositado nos bancos de leite, suplementando-se este leite com um “pool” de estirpes de *Bifidobacterium breve*. A suplementação do leite humano pasteurizado mostrou-se promissora na proposta de repor a microbiota intestinal benéfica de recém-nascidos que estejam utilizando o leite proveniente de Banco de Leite Humano sem comprometer a segurança do produto. Investigações semelhantes às do presente estudo são importantes para garantir a disponibilização de estirpes de bactérias probióticas bem identificadas, selecionadas e seguras para uso alternativo da clínica pediátrica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Células e tecidos do sistema imunológico. In: **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier. 5ª ed. pp.17-40 (580p.), 2005.

ABDELALI, H.; CASSAND, P.; SOUSSOTTE, V.; DAUBEZE, M.; BOULEY, C.; NARBONNE, J.F. Effect of Dairy-Products on Initiation of Precursor Lesions of Colon-Cancer in Rats. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 24, p. 121-132, 1995a.

ABDELALI, H.; CASSAND, P.; SOUSSOTTE, V.; KOCHBOCABEILLE, B.; NARBONNE, J.F. Antimutagenicity of Components of Dairy-Products. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 331, p. 133-141, 1995b.

ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F.R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria** v. 80, p. 119-125, 2004.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.

ANDERSSON, Y.; SAVMAN, K.; BLACKBERG, L.; HERNELL, O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. **Acta Paediatrica**, v. 96, p. 1445-1449, 2007.

ARNOLD, L.D.W.; LARSON, E. Immunological Benefits of Breast-Milk in Relation to Human-Milk Banking. **American Journal of Infection Control**, v. 21, p. 235-242, 1993.

ARVOLA, M.; GUSTAFSSON, E.; SVENSSON, L.; JANSSON, L.; HOLMDAHL, R.; HEYMAN, B.; OKABE, M.; MATTSSON, R. Immunoglobulin-secreting cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1817-1824, 2000.

BARATA, J. O Banco de Leite Humano em 15 anos. **Anais do Instituto Fernandes Figueira**, v. 1, p. 41-52, 1960.

BARLOW, B.; SANTULLI, T.V.; HEIRD, W.C.; PITT, J.; BLANC, W.A.; SCHULLIN, J.N. Experimental Study of Acute Neonatal Enterocolitis - Importance of Breast-Milk. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 9, p. 587-595, 1974.

BEALMEAR, P.; MIRAND, E.; HOLTERMANN, O. Miscellaneous immune defects in gnotobiotic and SPF mice. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 132, p. 423-432, 1983.

BERMAN, S.H.; EICHELSDOERFER, P.; YIM, D.; ELMER, G.W.; WENNER, C.A. Daily ingestion of a nutritional probiotic supplement enhances innate immune function in healthy adults. **Nutrition Research**, v. 26, p. 454-459, 2006.

BERNT, K.M.; WALKER, W.A. Human milk as a carrier of biochemical messages. **Acta Paediatrica Suppl** v. 430, p. 27-41, 1999.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, p. 125-131, 2002.

BJORKSTEN, B.; BURMAN, L.; DECHATEAU, P.; FREDRIKZON, B.; GOTHEFORS, L.; HERNELL, O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? **British Medical Journal**, v. 281, p. 765-769, 1980.

BLUMER, N.; SEL, S.; VIRNA, S.; PATRASCAN, C.C.; ZIMMERMANN, S.; HERZ, U.; RENZ, H.; GARN, H. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 348-357, 2007.

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

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

BORBA, L.M.; FERREIRA, C.L.L.F. Probióticos em Bancos de Leite Humano. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora. 1ª ed. 2003.

BRANDTZAEG, P. Molecular and Cellular Aspects of the Secretory Immunoglobulin System. **Apmis**, v. 103, p. 1-19, 1995.

BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, T.; HVATUM, M.; KVALE, D.; SCOTT, H. The serological and mucosal immunologic basis of celiac disease. In: WALKER, A.; HARMATZ, P.; WERSHIL, B. **Immunophysiology of the gut**. New York, NY: Academic Press. ed. 1993.

BRASIL Normas Federais sobre Leite Humano. 1988

BRASIL Manual Normativo para profissionais de Saúde de Maternidades - Referência para mulheres que não podem amamentar. Brasília, Ministério da Saúde. 2004

BRITTI, M.S.; ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; MERENDINO, N.; MENGHERI, E. Regulation of immune response at intestinal and peripheral sites by probiotics. **Biologia**, v. 61, p. 735-740, 2006.

CAICEDO, R.A.; SCHANLER, R.J.; LI, N.; NEU, J. The developing intestinal ecosystem: Implications for the neonate. **Pediatric Research**, v. 58, p. 625-628, 2005.

CAPLAN, M.S.; MILLER-CATCHPOLE, R.; KAUP, S.; RUSSELL, T.;

LICKERMAN, M.; AMER, M.; XIAO, Y.; THOMSON, R. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. **Gastroenterology**, v. 117, p. 577-583, 1999.

CARRATU, B.; AMBRUZZI, A.; FEDELE, E.; SANZINI, E. Human milk banking: Influence of different pasteurization temperatures on levels of protein sulfur amino acids and some free amino acids. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 373-375 2005.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 48, p. 445-453, 1994.

CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1046S-1051S, 1999.

CEBRA, J.J.; JIANG, H.Q.; BOIKO, N.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. The role of mucosal microbiota in the development, maintenance and pathologies of the mucosal immune system. In: MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE, J.R.; MAYER, L. **Mucosal Immunology**. New York: Academic Press. 3^a ed. pp.335-368, 2005.

CHALLA, A.; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; SHACKELFORD, L. Bifidobacterium longum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 517-521, 1997.

CLAUD, E.C.; WALKER, W.A. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. **Faseb Journal**, v. 15, p. 1398-1403, 2001.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

CRITTENDEN, R.G.; MARTINEZ, N.R.; PLAYNE, M.J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 217-222, 2003.

CROSS, M.L.; GILL, H.S. Can Immunoregulatory Lactic Acid Bacteria Be Used as Dietary Supplements to Limit Allergies? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 125, p. 112- 119, 2001.

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 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

DANIEL, C.; REPA, A.; WILD, C.; POLLAK, A.; POT, B.; BREITENEDER, H.; WIEDERMANN, U.; MERCENIER, A. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. **Allergy**, v. 61, p. 812-819, 2006.

DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; D'ELIOS, M. Allergen exposure induces the

activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 1445-1449, 1993.

DINERMAN, J.L.; LOWENSTEIN, C.J.; SNYDER, S.H. Molecular mechanisms of nitric oxide production. Potential relevance for cardiovascular disease. **Circulation Res.**, v. 73, p. 217-222, 1993.

DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; FLINT, H.J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5810-5817, 2004.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today**, v. 18, p. 487-492, 1997.

ENGFER, M.B.; STAHL, B.; FINKE, B.; SAWATZKI, G.; DANIEL, H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1589-1596, 2000.

ESCUDE, M.M.L.; VENÂNCIO, S.I.; PEREIRA, J.C.R. Estimativa de impacto da amamentação sobre a mortalidade infantil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 319-325, 2003.

EUCLYDES, M.P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora. 2ª ed. 259-339p., 2000.

EVANS, T.; RYLEY, H.; NEALE, L.; DODGE, J.; LEWARNE, V. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. **Archives of Disease in Childhood**, v. 53, p. 239-241, 1978.

FERREIRA, C.L.L.F. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa-MG: Suprema Gráfica e Editora. 1ª ed. pp.35-60 (206p.), 2003.

FINEGOLD, S.M.; SUTTER, V.L.; MATHISEN, G.E. Normal Indigenous Intestinal Flora. In: HENTGES, D.J. **Human Intestinal Microfora in Health and Disease**. New York: Academic Press. 2 ed. pp.3-31, 1983.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Oxido Nítrico: o simples mensageiro perfazendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FOMON, S.J. Human milk and breast milk. In: FOMON, S.J. **Nutrition of Normal Infants**. St. Louis: Mosby. ed. pp.409-423, 1993.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 189-216, 2001.

FRICK, J.S.; FINK, K.; NIEMIEC, K.M.J.; QUITADAMO, M.; SCHENK, K.;

AUTENRIETH, I.B. Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: Implications for the development of probiotics. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3490-3497, 2007.

FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, H.; TERADA, A.; MITSUOKA, T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 39-44, 1998.

GANTNER, F.; LEIST, M.; KUSTERS, S.; VOGT, K.; VOLK, H.D.; TIEGS, G. T cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. **Experimental Cell Research**, v. 229, p. 137-146, 1996.

GAO, Q.; CHEN, N.; ROUSE, T.M.; FIELD, E.H. The role of interleukin-4 in the induction phase of allogeneic neonatal tolerance. **Transplantation**, v. 62, p. 1847-1854, 1996.

GARCIA-LAFUENTE, A.; ANTOLIN, M.; GUARNER, F.; CRESPO, E.; MALAGELADA, J.R. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. **Gut**, v. 48, p. 503-507, 2001.

GIUGLIANI, E.R.J. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: tecnologia para exportar. **Jornal de Pediatria** v. 78, p. 83-84, 2002.

GOLDIN, B.R. Intestinal Microflora - Metabolism of Drugs and Carcinogens. **Annals of Medicine**, v. 22, p. 43-48, 1990.

GOLDMAN, A.S. Evolution of the mammary gland defense system and the ontogeny of the immune system. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p. 277-289, 2002.

GOLDMAN, A.S.; GARZA, C.; JOHNSON, C.A.; NICHOLS, B.L.; GOLDBLUM, R.M. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. **Journal of Pediatric**, v. 100, p. 563-567, 1982.

GOLDMAN, A.S.; GARZA, C.; SCHANLER, R.J.; GOLDBLUM, R.M. Molecular forms of lactoferrin in the stool and urine from infants fed human milk. **Pediatric Research**, v. 27, p. 252-255, 1990.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

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

GRIFFITHS, E.A.; DUFFY, L.C.; SCHANBACHER, F.L.; QIAO, H.; DRYJA, D.; LEAVENS, A.; ROSSMAN, J.; RICH, G.; DIRIENZO, D.; OGRA, P.L. In vivo effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration

and mucosal immunity in Balb/c mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, p. 579-589, 2004.

GUSTAFSSON, L.; HALLGREN, O.; MOSSBERG, A.K.; PETTERSSON, J.; FISCHER, W.; ARONSSON, A.; SVANBORG, C. HAMLET kills tumor cells by apoptosis: Structure, cellular mechanisms, and therapy. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1299-1303, 2005.

GYORGY, P.; ROSE, C.S.; SPRINGER, G.F. Enzymatic Inactivation of Bifidus Factor and Blood Group Substances. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 43, p. 543-552, 1954.

HALLIWELL, B. Oxidants and human diseases: some new concepts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **Federation of European Biochemical Societies Letter.**, v. 486, p. 10-13, 2000.

HAMPRECHT, K.; MASCHMANN, J.; MULLER, D.; DIETZ, K.; BESENTHAL, I.; GOELZ, R.; MIDDELDORP, J.M.; SPEER, C.P.; JAHN, G. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. **Pediatric Research**, v. 56, p. 529-535, 2004.

HARBER, M.; SUNDSTEDT, A.; WRAITH, D. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 2, p. 1-20, 2000.

HE, F.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E.; HOSODA, M.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. **Current Microbiology**, v. 43, p. 351-354, 2001.

HENDERSON, T.R.; FAY, T.N.; HAMOSH, M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. **Journal of Pediatrics**, v. 132, p. 876-878, 1998.

HERSHBERG, R.M.; MAYER, L.F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. **Immunology Today**, v. 21, p. 123-128, 2000.

HISBERGUES, M.; MAGI, M.; RIGAUX, P.; STEUVE, J.; GARCIA, L.; GOUDERCOURT, D.; POT, B.; PESTEL, J.; JACQUET, A. In vivo and in vitro immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 1286-1295, 2007.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOYOS, A.B. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to

neonates in an intensive care unit **International Journal of Infectious Diseases** v. 3, p. 197-202 1999.

IALENTI, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 701-706, 1993.

ISAACS, C.E. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1286-1288, 2005.

ISAACS, C.E.; KASHYAP, S.; HEIRD, W.C.; THORMAR, H. Antiviral and Antibacterial Lipids in Human-Milk and Infant Formula Feeds. **Archives of Disease in Childhood**, v. 65, p. 861-864, 1990.

ISRAEL-BALLARD, K.; CHANTRY, C.; DEWEY, K.; LONNERDAL, B.; SHEPPARD, H.; DONOVAN, R.; CARLSON, J.; SAGE, A.; ABRAMS, B. Viral, Nutritional, and Bacterial Safety of Flash-Heated and Pretoria-Pasteurized Breast Milk to Prevent Mother-to-Child Transmission of HIV in Resource-Poor Countries. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 40, p. 175-181, 2005.

IVER, S.; LONNERDAL, B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, p. 232-241, 1993.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. New York: Garland Publ. 3^a ed. 1997.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; KOSKINEN, P.; ISOLAURI, E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 357, p. 1076-1079, 2001.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 1869-1871, 2003.

KAPSENBERG, M.L. Dendritic cell control of pathogen driven T-cell polarization. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, p. 984-993, 2003.

KAWASE, M.; HE, F.; KUBOTA, A.; HATA, J.Y.; KOBAYAKAWA, S.I.; HIRAMATSU, M. Inhibitory effect of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 and *Lactobacillus GG* on enhanced vascular permeability of nasal mucosa in experimental allergic rhinitis of rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 3025-3030, 2006.

KEITH HANNA, M.; ZARZUR JR., B.L.; FUKATSU, K.; CHANCE DEWITT, R.; RENEGAR, K.B.; SHERRELL, C.; WU, Y.; KUDSK, K.A. Individual neuropeptides regulate gut-associated lymphoid tissue integrity, intestinal immunoglobulin A levels, and respiratory antibacterial immunity. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 24, p. 261-268, 2000.

KIERSZENBAUM, A.L. Sistema Imunológico. In: **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 1^a ed. pp.285-320

(654p), 2004.

KILBOUM, R.G.; GRIFFITH, O.W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 84, p. 827-831, 1992.

KIM, H.; KWACK, K.; KIM, D.Y.; JI, G.E. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 45, p. 259-267, 2005.

KIM, N.; KUNISAWA, J.; KWEON, M.-N.; JI, G.E.; KIYONO, H. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4⁺ CD45RB^{high} T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. **Clinical Immunology** v. 123, p. 30-39, 2007.

KITAOKA, M.; TIAN, J.; NISHIMOTO, M. Novel Putative Galactose Operon Involving Lacto-N-Biose Phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3158-3162, 2005.

KOLB, A.F. The prospects of modifying the antimicrobial properties of milk. **Biotechnology Advances** v. 19, p. 299-316, 2001.

KOTOWICZ, K.; CALLARD, R.E. Human-Immunoglobulin Class and Igg Subclass Regulation - Dual-Action of Interleukin-4. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 2250-2256, 1993.

KRAMER, M.S.; GUO, T.; PLATT, R.W.; SHAPIRO, S.; COLLET, J.P.; CHALMERS, B.; HODNETT, E.; SEVKOVSKAYA, Z.; DZIKOVICH, I.; VANILOVICH, I. Breastfeeding and infant growth: Biology or bias? **Pediatrics**, v. 110, p. 343-347, 2002.

KRAUSE, L.J.; FORSBERG, C.W.; OCONNOR, D.L. Feeding human milk to rats increases *Bifidobacterium* in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1505-1511, 1996.

KUKKONEN, K.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KORPELA, R.; POUSSA, T.; TUURE, T.; KUITUNEN, M. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 192-198, 2007.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAIER, W.; KLEIN, N.; STROBEL, S. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 699-722, 2000.

LAWRENCE, R.A. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. **Acta Paediatrica**, v. 88, p. 14-18, 1999.

LAWRENCE, R.M.; PANE, C.A. Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 37, p. 7-36, 2007.

LEPRI, L.; BUBBA, M.D.; MAGGINI, R.; DONZELLI, G.P.; GALVAN, P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 1-10, 1997.

LIBLAU, R.; SINGER, S.; MCDEVITT, H. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunology Today**, v. 16, p. 34-38, 1995.

LIEVIN, V.; PEIFFER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut**, v. 47, p. 646-652, 2000.

LUCAS, A.; COLE, T.J. Breast-Milk and Neonatal Necrotizing Enterocolitis. **Lancet**, v. 336, p. 1519-1523, 1990.

LUNDBERG, J.O.; LUNDBERG, J.M.; ALVING, K.; WEITZBERG, E. Nitric oxide and inflammation: the answer is blowing in the wind. **Nature Medicine**, v. 3, p. 30-31, 1997.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1035S-1045S, 1999.

MACPHERSON, A.J.; HUNZIKER, L.; MCCOY, K.; LAMARRE, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1021-1035, 2001.

MACPHERSON, A.J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, v. 303, p. 1662-1665, 2004.

MAIA, P.R.S.; NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; SILVA, D.A. Bases conceituais para uma estratégia de gestão: o caso da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 1700-1708, 2004.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S.N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. **Immunological Reviews**, v. 179, p. 16-24, 2001.

MALAVIYA, R.; IKEDA, T.; ROSS, E.; ABRAHAM, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. **Nature**, v. 381, p. 77-80, 1996.

MANGELL, P.; NEJDFORS, P.; WANG, M.; AHRNE, S.; WESTROM, B.; THORLACIUS, H.; JEPPSSON, B. Lactobacillus plantarum 299v inhibits Escherichia coli-induced intestinal permeability. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, p. 511-516, 2002.

MARTEAU, P.; CUIILLERIER, E.; MEANCE, S.; GERHARDT, M.F.; MYARA, A.; BOUVIER, M.; BOULEY, C.; TONDU, F.; BOMMELAER, G.; GRIMAUD, J.C. Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 587-593, 2002.

MATAR, C.; VALDEZ, J.C.; MEDINA, M.; RACHID, M.; PERDIGON, G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 601-609, 2001.

MAYER, L. Mucosal immunity. **Pediatrics**, v. 111, p. 1595-1600, 2003.

MCCURDY, J.D.; OLYNYCH, T.J.; MAHER, L.H.; MARSHALL, J.S. Cutting edge: Distinct toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 1625-1629, 2003.

MEANCE, S.; CAYUELA, C.; RAIMONDI, A.; TURCHET, P.; LUCAS, C.; ANTOINE, J. Recent advances in the use of functional foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 15, p. 15-22, 2003.

MÉDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 611-618, 2004.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-1064, 1997.

METCHNIKOFF, E. Prolongation of Life. In: ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRAETE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. **The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)**. New York: International Journal of Food Microbiology. ed. pp.71-79, 1999.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-267, 1990.

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J.; SCHMIDT, S.; MUELLER, M.; POSSNER, M.; RADKE, M.; BLAUT, M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4025-4031, 2006.

MOK, K.H.; PETTERSSON, J.; ORRENIUS, S.; SVANBORG, C. HAMLET, protein folding, and tumor cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, p. 1-7, 2007.

MONTEIRO, C.A.; FRANCA JR., I.; CONDE, W.L. Evolução da assistência materno-infantil na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 19-25, 2000.

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

NAGLER-ANDERSON, C.; SHI, H.N. Peripheral nonresponsiveness to orally

administered soluble protein antigens. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, p. 121-131, 2001.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 13-126, 1999.

NEWBURG, D.S. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? **Journal of Nutrition**, v. 127, p. S980-S984, 1997.

NEWBURG, D.S. Bioactive components of human milk - Evolution, efficiency, and protection. In: **Bioactive Components of Human Milk**. ed. pp.3-10, 2001.

NEWBURG, D.S.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; MORROW, A.L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 25, p. 37-58, 2005.

NEWMAN, J. How breast-milk protects newborns. **Scientific American**, v. 273, p. 76-79, 1995.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; VIEIRA, G.O.; BORBA, L.M. Colostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 265-270, 2001.

O'GARRA, A. Interleukins and the immune system. **Lancet**, v. 1, p. 943-947, 1989.

OGAWA, T.; HASHIKAWA, S.; ASAI, Y.; SAKAMOTO, H.; YASUDA, K.; MAKIMURA, Y. A new synbiotic, *Lactobacillus casei subsp casei* together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 400-409, 2006.

OKADA, Y.; SETOYAMA, H.; MATSUMOTO, S.; IMAOKA, A.; NANNO, M.; KAWAGUCHI, M.; UMESAKI, Y. Effects of fecal microorganisms acid their chloroform-resistant variants derived from mice, rats, and humans on immunological and physiological-characteristics of the intestines of ex-germ-free mice. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5442-5446, 1994.

OLIVEIRA, L.T.; BATISTA, S.M.M. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. **Nutrição em Pauta**, v. 6, p. 15-21, 2002.

OLIVEIRA, N.D.; MIYOSHI, M.H. Avanços em enterocolite necrosante. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 16-22, 2005.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti TNF- α therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 736-746, 2003.

PAPANICOLAOU, D.A.; WILDER, R.L.; MANOLAGAS, S.C.; CHROUSOS, G.P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.

Ann Intern Med, v. 128, p. 127-137, 1998.

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

PATOLE, S. Prevention and treatment of necrotising enterocolitis in preterm neonates. **Early Human Development**, v. 83, p. 635-642, 2007.

PEDRUZZI, M.M.B. Imunologia da Mucosa Intestinal. **Nutrição em Pauta**, v. 6, p. 36-41, 2002.

PENNA, F.J.; FILHO, L.A.P.; CALÇADO, A.C.; JUNIOR, H.R.; NICOLI, J.R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria** v. 76, p. 209-217, 2000.

PERDIGÓN, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System. **Current Issues of Intestinal Microbiology**, v. 2, p. 27-42, 2001.

PERDIGÓN, G.; MALDONADO GALDEANO, C.; VALDEZ, J.; MÉDICI, M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **European Journal of Clinical Nutrition** v. 56, p. 21-26, 2002.

PERDIGÓN, G.; VINTINI, E.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1108-1114, 1999.

PERNER, A.; RASK-MADSEN, J. The potential role of nitric oxide in chronic inflammatory bowel disorders. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, p. 135-144, 1999.

PHUAPRADIT, P.; VARAVITHYA, W.; VATHANOPHAS, K.; SANGCHAI, R.; PODHIPAK, A.; SUTHUTVORAVUT, U.; NOPCHINDA, S.; CHANTRARUKSA, V.; HASCHKE, F. Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula. **Journal of Medical Association of Thailand**, v. 82, p. 43-48, 1999.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 495-512, 2005.

PICK, E.; CHARON, J.; MIXEL, D. A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages. **Journal of Reticuloendothelial Society**, v. 30, p. 581-593, 1981.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunology Methods**,

v. 38, p. 161-170, 1980.

PUCCIO, G.; CAJOZZO, C.; MELI, F.; ROCHAT, F.; GRATHWOHL, D.; STEENHOUT, P. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. **Nutrition**, v. 23, p. 1-8, 2007.

RABIU, B.A.; GIBSON, G.R. Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon. **Biological Reviews**, v. 77, p. 443-453, 2002.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**, v. 27, p. 269-274, 1990.

RAMOS, C.V.; ALMEIDA, J.A.G. Aleitamento materno: como é vivenciado por mulheres assistidas em uma unidade de saúde de referência na atenção materno-infantil em Teresina, Piauí. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, p. 315-321, 2003.

RAMOS, M.P.P. **Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carregada 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**. 2006. 110 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, H.S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **Fems Microbiology Ecology**, v. 52, p. 145-152, 2005.

RINNE, M.; KALLIOMAKI, M.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, F. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. **Journal of Pediatrics**, v. 147, p. 186-191, 2005.

ROCHAT, T.; BERMUDEZ-HUMARAN, L.; GRATADOUX, J.J.; FOURAGE, C.; HOEBLER, C.; CORTHER, G.; LANGELLA, P. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 2007.

ROCKEN, M.; SHEVACH, E.M. Immune deviation-the third dimension of nondeletional T cell tolerance. **Immunology Reviews**, v. 149, p. 175-194, 1996.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

ROSENFELDT, V.; BENFELDT, E.; NIELSEN, S.D.; MICHAELSEN, K.F.; JEPPESEN, D.L.; VALERIUS, N.H.; PAERREGAARD, A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 111, p. 389-395, 2003.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira**

de Ciências Farmacêuticas, v. 42, p. 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAIKALI, J.; PICARD, C.; FREITAS, M.; HOLT, P.R. Fermented milks, probiotic cultures, and colon cancer. **Nutrition and Cancer: an International Journal**, v. 49, p. 14-24, 2004.

SAINTE-MARIE, G.A. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 10, p. 250-256, 1962.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatrics**, v. 149, p. S115-S120, 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: Considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, p. 91-99, 2003.

SANGILD, P.T. Gut responses to enteral nutrition in preterm infants and animals. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 1695-1711, 2006.

SARTOR, R.B. Cytokines in intestinal inflammation - Pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-539, 1994.

SCHANLER, R.J.; HURST, N.M. Human-Milk for the Hospitalized Preterm Infant. **Seminars in Perinatology**, v. 18, p. 476-484, 1994.

SCHANLER, R.J.; HURST, N.M.; LAU, C. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. **Clinics in Perinatology**, v. 26, p. 379-398, 1999a.

SCHANLER, R.J.; SHULMAN, R.J.; LAU, C. Feeding strategies for premature infants: Beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. **Pediatrics**, v. 103, p. 1150-1157, 1999b.

SEKOK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; BOTTA, G.A. Probiotics: facts and myths. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 958-966, 2005.

SERAFINI, A.B.; ANDRE, M.; RODRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBE, T.F.N. Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 775-779, 2003.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.E.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. **The lactic acid bacteria**. Londres: Blackie Academic. 2 ed. pp.279-306, 1995.

STROBEL, S.; MOWAT, A.M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunology Today**, v. 19, p. 173-181, 1998.

SUPAJATURA, V.; USHIO, H.; NAKAO, A.; AKIRA, S.; OKUMURA, K.; RA, C.; OGAWA, H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1351-1359, 2002.

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

TERPSTRA, F.G.; RECHTMAN, D.J.; LEE, M.L.; HOEIJ, K.V.; BERG, H.; ENGELENBERG, F.A.C.V.; WOUT, A.B.V.T. Antimicrobial and Antiviral Effect of High-Temperature Short-Time (HTST) Pasteurization Applied to Human Milk. **Breastfeeding Medicine**, v. 2, p. 27-33, 2007.

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

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: I Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição - A Ciência por um Brasil sem Fome, **Anais**. p. 2005.

THOMPSON-CHAGOYAN, O.C.; MALDONADO, J.; GIL, A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 339-352, 2005.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; TUCKOVA, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVA-ZADNIKOVA, R.; KOZAKOVA, H.; ROSSMANN, P.; BARTOVA, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D.P.; BOROVSKA, D.; REHAKOVA, Z.; SINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P.; KOKESOVA, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 93, p. 97-108, 2004.

TOMA, T.S.; MONTEIRO, C.A. Avaliação da promoção do aleitamento materno nas maternidades públicas e privadas do Município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 409-414, 2001.

TULLY, D.; JONES, F.; TULLY, M. Donor milk: what's in it and what's not. **J Hum Lact** v. 17, p. 152-155, 2001.

VAN DIJK, J. Morphology of the gut barrier. **European Journal of Gastroenterology**, v. 2, p. 23-27, 1997.

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 p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2002.

VIAZIS, S.; FARKAS, B.E.; ALLEN, J.C. Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. **Journal of**

Human Lactation, v. 23, p. 253-261, 2007.

VIEIRA, A.A.; MOREIRA, M.E.L.; ROCHA, A.D.; PIMENTA, H.P.; LUCENA, S.L. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 490-494, 2004.

VÍLCHEZ, R.M.; ADRIÁN, T.R.; RUIZ, A.; HEREDIA, W.; ATENCIO, R.; TABORDA, J.L. Interleucina 4 en el suero de embarazadas normales y preeclámpticas. **Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela**, v. 60, p. 77-80, 2000.

VILJANEN, M.; KUITUNEN, M.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KORPELA, R.; SAVILAHTI, E. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 16, p. 65-71, 2005.

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

VINDEROLA, G.; MATAR, C.; PALACIOS, J.; PERDIGON, G. Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 180-186, 2007.

WARD, R.E.; NINONUEVO, M.; MILLS, D.A.; LEBRILLA, C.B.; GERMAN, J.B. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4497-4499, 2006.

WESTON, S.; HALBERT, A.; RICHMOND, P.; PRESCOTT, S.L. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. **Archives of Disease in Childhood**, v. 90, p. 892-897, 2005.

WIGHT, N. Donor human milk for preterm infants. **Journal of Perinatology**, v. 21, p. 249-254, 2001.

XIAO, J.-Z.; KONDO, S.; YANAGISAWA, N.; TAKAHASHI, N.; ODAMAKI, T.; IWABUCHI, N.; MIYAJI, K.; IWATSUKI, K.; TOGASHI, H.; ENOMOTO, K.; ENOMOTO, T. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 1425-1435, 2006.

YAMAMOTO, S.; RUSS, F.; TEIXEIRA, H.C.; CONRADT, P.; KAUFMANN, S.H.E. *Listeria-Monocytogenes*-Induced Gamma-Interferon Secretion by Intestinal Intraepithelial Gamma-Delta T-Lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 2154-2161, 1993.

YANG, H.; KIRISTIOGLU, I.; FAN, Y.; FORBUSH, B.; BISHOP, D.K.; ANTONY, P.A.; ZHOU, H.; TEITELBAUM, D.H. Interferon-gamma

expression by intraepithelial lymphocytes results in a loss of epithelial barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. **Annals of Surgery** v. 236 p. 226-234, 2002.

YASUI, H.; KIYOSHIMA, J.; USHIJIMA, H. Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea of Mouse Pups Born to and Nursed by Dams Fed Bifidobacterium Breve Yit4064. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 403-409, 1995.

ZACHAR, Z.; SAVAGE, D.C. Microbial Interference and Colonization of the Murine Gastrointestinal-Tract by *Listeria-Monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 23, p. 168-174, 1979.

ZHANG, G.L.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappa B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 13-19, 2001.

ZHOU, L.; YOSHIMURA, Y.; HUANG, Y.Y.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; OKABE, M.; SHIMAMURA, M. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. **Immunology**, v. 101, p. 570-580, 2000.

ZOEREN-GROBBEN, D.V.; SCHRIJVER, J.; BERG, H.V.D.; BERGER, H. Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. **Archives of Disease in Childhood**, v. 62, p. 161-165, 1987.

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](#)