

JULIANA COSTA LIBOREDO

Efeito dos probióticos *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12 e *Saccharomyces boulardii* na prevenção de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA COSTA LIBOREDO

Efeito dos probióticos *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12 e *Saccharomyces boulardii* na prevenção de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Professora Maria Isabel Toulson Davisson Correia

Co-orientador: Professor Jacques Robert Nicoli

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

L696e Liboredo, Juliana Costa.
Efeito dos probióticos *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb 12 e *Saccharomyces boulardii* na prevenção de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos / Juliana Costa Liboredo. – 2009.
xiii, 70f. : il.

Orientadora: Profa. Maria Isabel Toulson Davisson Correia.

Co-Orientador: Prof. Jacques Robert Nicoli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Câncer – Prevenção – Teses. 2. Lactobacilo – Teses. 3. Microbiologia – Teses. 3. Microorganismos – Uso Terapêutico – Teses. I. Título. II. Correia, Maria Isabel Toulson Davisson. III. Nicoli, Jacques Robert. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 576.163

Dedico este trabalho a meus pais, minha irmã e meu namorado, que estiveram comigo em todos os momentos deste trabalho, me apoiando e incentivando.

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Isabel Toulson Davisson Correia, por ter me recebido em seu grupo, pela confiança, orientação e principalmente por ter acreditado neste trabalho apesar das dificuldades, sempre incentivando e colaborando para que ele ocorresse.

Ao meu co-orientador Jacques Robert Nicoli, pela receptividade no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, pelos conselhos e essencial ajuda prestada durante todos os momentos deste trabalho.

À Maria Adelaide Fernandes, veterinária responsável pelo Biotério da Faculdade de Farmácia e José Batista Viturino, funcionário do mesmo, por toda a ajuda ao longo deste trabalho, pela disponibilidade de sempre, por compartilharem as angústias e as alegrias decorrentes deste estudo e pela agradável companhia.

À Denise Carmona Cara Machado pela ajuda na obtenção das imagens dos focos de criptas aberrantes.

À professora Jacqueline Isaura Alvarez Leite pela ajuda no manuseio da droga utilizada.

À Maria do Carmo Gouveia Pelúzio pelas importantes contribuições para este trabalho.

À Lucilene Rezende Anastácio e Leonardo Vidal Mattos pela valiosa ajuda no manuseio dos animais e pela amizade.

À Flávia Xavier e Luisa Penido que fizeram a análise das criptas aberrantes.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos. Em especial, à Tássia Costa Souza e à Ariane dos Santos Martins pela essencial ajuda, paciência e companheirismo.

Ao Bernardo Barbosa, pelo indispensável auxílio técnico.

Aos meus pais, Zeno Geraldo Silva Liboredo e Rosemari de Fátima Costa Liboredo, por sempre acreditarem e incentivarem as minhas conquistas, pela presença constante em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Ana Flávia Costa Liboredo, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao meu namorado Bruno César Cunha Liboreiro pela paciência, incentivo, amor e compreensão em todos os momentos.

À minha família, pela acolhida em Belo Horizonte.

Aos meus amigos e colegas de curso.

E a Deus, por me guiar sempre.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 CÂNCER COLORRETAL	20
3.1.1 Epidemiologia.....	20
3.1.2 Fatores de risco.....	21
3.1.3 Carcinogênese.....	21
3.1.4 Focos de criptas aberrantes	22
3.2 MICROBIOTA INDÍGENA.....	24
3.3 PROBIÓTICOS	26
3.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos.....	27
3.3.2 Mecanismos de ação dos probióticos.....	28
3.3.3 <i>Saccharomyces boulardii</i>	29
3.3.4 <i>Lactobacillus</i>	30
3.3.5 <i>Bifidobacterium</i>	31
3.4 PROBIÓTICOS E CÂNCER DE CÓLON.....	34
3.4.1 Mecanismos de ação dos probióticos na inibição do câncer de cólon	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ANIMAIS	41
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.3 MICRORGANISMOS	43
4.4 PREPARO DA ÁGUA	44
4.5 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS	44
4.6 MORTALIDADE.....	45
4.7 TRANSLOCAÇÃO DOS PROBIÓTICOS	45
4.8 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	46
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	49
5.1 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS	50
5.2 MORTALIDADE.....	50
5.3 TRANSLOCAÇÃO DOS PROBIÓTICOS	52
5.4 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	53
5.4.1 Características dos focos de criptas aberrantes.....	55
5.4.1.1 Focos com três ou menos criptas aberrantes.....	55

5.4.1.2 Focos com mais de três criptas aberrantes	56
5.4.1.3 Focos de criptas aberrantes por região do cólon	58
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

- 1 Resumo dos tratamentos recebidos pelos grupos estudados
- 2 Efeito dos tratamentos sobre o peso corporal
- 3 Número total de focos de criptas aberrantes
- 4 Focos com três ou menos criptas aberrantes
- 5 Focos com mais de três criptas aberrantes
- 6 Focos de criptas aberrantes por região do cólon

LISTA DE FIGURAS

- 1 Organograma do número de animais utilizados
- 2 Delineamento experimental
- 3 Preparo do intestino para análise das criptas aberrantes
- 4 Sobrevida de camundongos dos grupos Cont, Cont/DMH, Lacto, Lacto/DMH, Bifido, Bifido/DMH, Lacto/Bifido, Lacto/Bifido/DMH, Sb e Sb/DMH
- 5 Translocação microbiana para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado dos camundongos dos grupos Cont, Cont/DMH, Lacto, Lacto/DMH, Bifido, Bifido/DMH, Sb e Sb/DMH dois dias após a primeira administração de DMH ou solução salina
- 6 Foco com duas criptas aberrantes
- 7 Percentual de redução dos focos de criptas aberrantes
- 8 Percentual de redução dos focos com três ou menos criptas aberrantes
- 9 Percentual de redução dos focos com mais de três criptas aberrantes

LISTA DE SIGLAS

BAL	- Bactérias do ácido láctico
CARS	- síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
CO ₂	- Dióxido de carbono
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DMH	- Dimetilhidrazina
DP	- Desvio padrão
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetracético
FAO/WHO	- <i>Food and Agricultural Organization / World Health Organization</i>
FCA	- Focos de criptas aberrantes
F6PPK	- Frutose-6-fosfatofosfoquetolase
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IgA	- Imunoglobulina A
IL-8	- Interleucina- 8
IL-10	- Interleucina- 10
IL-12	- Interleucina- 12
LM	- Linfonodos mesentéricos
MRS	- De Man Rogosa e Sharpe
N ₂	- Nitrogênio
NFκB	- Nuclear Factor Kb (Fator nuclear de transcrição)
NK	- <i>Natural Killer</i>
ODC	- Ornitina descarboxilase
O ₂	- Oxigênio
PBS	- <i>Phosphate-Buffered Saline</i> – Salina tamponada com fosfato
PPAR-gamma	- <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma</i>
TNF	- Fator de necrose tumoral
Th-1	- T helper 1
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	- Universidade Federal de Viçosa
YPG	- Yeast Peptone Glucose

RESUMO

A incidência de câncer vem aumentando progressivamente. Em decorrência disso, é extremamente importante a implementação de estratégias para evitar novos casos. Vários estudos têm mostrado que a ingestão de certas cepas probióticas reduz o risco de câncer de cólon. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos probióticos *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12 e *Saccharomyces boulardii* na prevenção de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos *Swiss*. Após período de adaptação de sete dias à suplementação com probióticos, os camundongos foram submetidos a seis injeções de 1,2- dimetilhidrazina, com manutenção concomitante dos probióticos ao longo de todo o período experimental. O uso de DMH induziu translocação dos probióticos e maior mortalidade dos animais suplementados com lactobacilo e bifidobacteria, entre 48 e 72 horas após a primeira aplicação da droga. Treze semanas após a injeção inicial de DMH, os camundongos suplementados com os probióticos apresentaram redução do número total de focos de criptas aberrantes (lactobacilo 45% e bifidobactéria 55%). Focos contendo uma a três criptas aberrantes encontraram-se significativamente diminuídos naqueles animais tratados com lactobacilo. Esses dados indicam que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *B. animalis* var. *lactis* Bb12 exercem efeito protetor no processo de carcinogênese colônica.

Palavras-chave: *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20; *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12; *Saccharomyces boulardii*; carcinogênese; 1,2-dimetilhidrazina; probióticos; focos de criptas aberrantes.

ABSTRACT

The incidence of cancer is increasing worldwide. Therefore, it is extremely important to implement strategies in order to prevent new cases. Several studies have shown that ingestion of certain probiotic strains reduces the risk of colon cancer. The aim of the present study was to determine the effect of *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12 and *Saccharomyces boulardii* in the prevention of preneoplastic lesions in mice colon. After a seven day period adaptation to the probiotic supplementation, the mice were submitted to six injections of 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 25 mg/kg/week, s.c.) while maintained on probiotics throughout the whole experimental period. The use of DMH resulted in probiotic translocation and also higher mortality among animals supplemented with lactobacilli and bifidobacteria among 48 and 72 hours after drug utilization. Thirteen weeks after the initial DMH injection, mice supplemented with probiotics presented with reduction of the total number of aberrant crypt foci (lactobacilli 45% and bifidobacteria 55%). Also, Foci containing one to three aberrant crypts were significantly decreased in those animals treated with lactobacilli. These data indicate that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 and *B. animalis* var. *lactis* Bb12 exert protective effect on the process of colon carcinogenesis.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20; *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12; *Saccharomyces boulardii*; carcinogenesis; 1,2-dimethylhydrazine; probiotics; aberrant crypt foci.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo progressivo acúmulo de mutações no genoma de uma célula que provocam alterações na expressão ou função de genes importantes para a manutenção da homeostase (BELTRÃO-BRAGA et al., 2006). Essa doença é uma das principais causas de morte no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde. Na maior parte dos países desenvolvidos é a segunda maior causa após as doenças cardiovasculares. Nos países em desenvolvimento, também existe tendência à elevação do número de mortes por câncer e nesses ocorrem mais de 50% de todos os casos da doença. A incidência do câncer vem crescendo de maneira alarmante nos últimos anos, sendo que o número global de mortes está projetado para aumentar cerca de 45% entre 2007 e 2030. De sorte que, a existência de estratégias baseadas em evidências para detecção inicial, tratamento e, principalmente, para prevenção da doença são extremamente importantes diante desta realidade. Estima-se que 40% dos novos casos de câncer que ocorrem anualmente poderiam ser prevenidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Nesse sentido, a administração de probióticos tem sido foco de especial interesse na prevenção do câncer de cólon. Alguns estudos indicam que a ingestão de certos microrganismos ou de seus produtos fermentados reduz tanto o risco de aparecimento de certos tipos de câncer como o crescimento tumoral. De acordo com esses resultados, a interação entre o hospedeiro e os probióticos em relação à carcinogênese parece ser benéfica. Entretanto, existem ainda muitas questões a serem respondidas antes que os probióticos sejam usados rotineiramente na profilaxia e na terapia. Ainda é necessário provar a eficácia das diferentes espécies, as condições para seu uso, a rota ótima de administração e a formulação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da suplementação dos probióticos *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* Bb12 e *Saccharomyces boulardii* na inibição de lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos *Swiss*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o efeito dos probióticos sobre o número total de focos de criptas aberrantes (FCA), de focos com número menor ou igual a três e maior do que três criptas aberrantes;
- verificar a distribuição dos FCA nas distintas regiões do cólon;
- avaliar o consumo de dieta e o ganho de peso dos animais;
- avaliar a mortalidade nos grupos estudados.
- verificar a ocorrência de translocação dos microrganismos administrados para o baço, o fígado e os linfonodos mesentéricos

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER COLORRETAL

3.1.1 Epidemiologia

O câncer é definido como enfermidade crônica de múltiplas causas, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células. Os primeiros registros de mortes causadas por essa doença surgiram na Europa a partir do século XVIII. Desde então, observou-se o aumento constante nas taxas de mortalidade por câncer, que parecem estar incrementadas após o século XIX, com a chegada da industrialização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). Nos últimos anos, a doença tem também contribuído para o aumento da mortalidade mundial. Entre 1960 e 2000, as taxas de mortalidade por câncer passaram de 15% para 25% nos países desenvolvidos. Já nos países em desenvolvimento, observaram-se taxas menores, porém crescentes, alcançando 6% em 1985 e 9% em 1997 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Em 2005, foram registradas 58 milhões de mortes em todo o mundo, sendo 7,6 milhões (13%) causadas pelo câncer. Mais de 70% das mortes decorrentes desta doença ocorrem em países com baixa e média renda, onde os recursos disponíveis para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento da enfermidade são limitados ou inexistentes. Para os próximos anos, está previsto um aumento de mortes por câncer de até aproximadamente nove milhões em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Segundo PARKIN et al. (2001), esse aumento ocorre em maior parte, devido à redução da mortalidade por algumas outras causas, especialmente as doenças infecciosas e, também, devido à crescente proporção da população idosa.

Um dos tipos mais freqüentes de câncer é o colorretal, que vem contribuindo significativamente para o aumento da mortalidade. Mundialmente, este é o terceiro tipo mais comum em ambos os sexos. No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais freqüente na região Sudeste (19/100.000) e quarto nas regiões Sul (21/100.000) e Centro-Oeste (10/100.000). Nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000), ocupa a quinta e a sexta posição, respectivamente. Nas mulheres, é o segundo mais freqüente na região Sudeste (21/100.000), o terceiro nas regiões Sul (22/100.000), Centro-Oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000) e o quinto mais freqüente na região Norte (4/100.000) (BRASIL, 2007).

A estimativa do Ministério da Saúde para o ano de 2009 é de 466.730 novos casos de câncer. Destes, os tumores de cólon e reto devem atingir 12.490 homens e 14.500 mulheres. Esses valores correspondem a risco estimado de 13 casos novos deste tipo de câncer a cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2007).

3.1.2 Fatores de risco

Entre os fatores de risco para o câncer de cólon estão a história familiar de câncer de cólon e reto e a predisposição genética para o desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como a polipose adenomatosa). A dieta rica em gorduras animais e, reduzida em frutas, vegetais e cereais, o consumo excessivo de álcool, o tabagismo e o sedentarismo também contribuem para a ocorrência da doença. Além desses, a idade é considerada fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam com a mesma. O câncer de cólon é uma doença predominante na população idosa, que vem aumentando paulatinamente e que deve aumentar ainda mais, frente à maior expectativa de vida (COBURN et al., 1994).

3.1.3 Carcinogênese

O câncer é caracterizado por mutações no genoma de uma célula, que provocam alterações na expressão ou na função de genes que mantém a homeostase. Tais alterações genéticas podem fazer com que a célula deixe de responder aos sinais de controle da proliferação, da diferenciação e da morte celular (BELTRÃO-BRAGA et al., 2006).

O processo de carcinogênese ocorre em três estágios distintos com diferenças moleculares e biológicas definidas. O primeiro, chamado de iniciação, é caracterizado por alteração no DNA, causado por erros durante o processo de replicação ou por ação de mutagênicos endógenos e exógenos (agentes físicos, biológicos e químicos) (PITOT, 1993; BELTRÃO-BRAGA et al., 2006). As mutações podem ocorrer em qualquer parte do genoma, porém, o efeito deletério só contribuirá para o desenvolvimento do câncer se atingir genes específicos, como: proto-oncogenes (participam do controle da proliferação, da diferenciação, da migração e da morte celular); genes supressores de tumor (codificam proteínas que impedem o acúmulo de mutações no genoma da célula ou controlam a progressão da célula no ciclo celular) e

genes de reparo de DNA. Além disso, são necessárias varias mutações em seqüência, não letais para a célula, para que haja degeneração cancerígena (BELTRÃO-BRAGA et al., 2006). Na fase inicial, as células se encontram geneticamente alteradas, mas não é possível ainda a detecção clínica do tumor (HARRIS, 1991). No segundo estágio, denominado promoção, ocorre expansão clonal das células alteradas, acarretando mudanças morfológicas e/ou fenotípicas (BIRD, 1995). As células geneticamente alteradas no estágio de iniciação originam focos de proliferação celular (FARBER & SARMA, 1987). No terceiro e último estágio, chamado progressão, ocorre instabilidade progressiva do cariótipo e, multiplicação descontrolada autonômica e irreversível das células alteradas (PITOT, 1993). Os focos de proliferação resultam em neoplasias malignas com capacidade invasiva e metastática, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (FARBER & SARMA, 1987).

Um agente carcinogênico não é necessariamente um agente genotóxico (que danifica o material genético). Sua atuação pode ser por diversos mecanismos. A promoção da proliferação celular desregulada causa dano tecidual persistente associado à criação de microambiente pró-inflamatório, e a indução do estresse oxidativo provoca o acúmulo de espécies reativas de oxigênio com potencial genotóxico. O câncer ocorrerá se as células forem expostas primeiramente a um agente iniciador e seqüencialmente a um promotor ou se forem expostas a agentes mutagênicos. Estes últimos podem eventualmente desencadear tanto o processo de iniciação quanto o de promoção tumoral (carcinógenos completos) (BELTRÃO-BRAGA et al., 2006).

3.1.4 Focos de criptas aberrantes

MCLELLAN & BIRD (1988) definiram como criptas aberrantes aquelas que: são maiores do que as criptas normais; têm espaço pericriptal aumentado que as separa das normais; têm camada grossa de células epiteliais que, muitas vezes, apresenta manchas escuras, e geralmente têm abertura oval em vez de circular. Estas criptas exibem alterações morfológicas como displasias, proliferação anormal e mutações de oncogenes envolvidos na indução do câncer de cólon. Elas podem ser observadas como uma única cripta alterada ou como um grupo, de modo a formar uma única unidade ou um foco, respectivamente (BIRD & GOOD, 2000).

A primeira descrição dos focos de criptas aberrantes (FCA) foi feita por BIRD em 1987 ao analisar a mucosa intacta do cólon de camundongos e ratos tratados com o

carcinógeno azoximetano (BIRD, 1987). Desde então, vários estudos têm documentado a ocorrência dessas lesões nos segmentos da mucosa de uma variedade de espécies como seres humanos, hamsters e cães (SUGIYAMA et al., 1997). A identificação dos FCA, tanto em roedores submetidos a aplicações de carcinógenos como no cólon humano, torna possível o estudo do câncer colorretal nas fases pré-cancerígenas. O crescimento e as características morfológicas e moleculares dos FCA apóiam a afirmação de que estas são lesões pré-neoplásicas (CHENG & LAI, 2003). Visto isso, os modelos experimentais têm tido grande importância no conhecimento dos aspectos morfológicos e da patogênese do câncer, contribuindo para o aperfeiçoamento da prevenção, do diagnóstico e do tratamento da doença.

A contagem das criptas aberrantes é feita microscopicamente após a coloração da mucosa com azul de metileno e o resultado é tido como indicador da carcinogênese do cólon (BIRD & GOOD, 2000). Os FCA têm sido observados em roedores após duas semanas de uma única dose de substâncias como azoximetano (MCLELLAN & BIRD, 1988) ou 1,2-dimetilhidrazina (MCLELLAN et al., 1991) e a sua frequência é dose-dependente (TUDEK et al., 1989). A média do número de criptas por foco, em ratos, aumenta com o número de semanas após uma dose do agente carcinogênico. Em duas a três semanas após o tratamento, a maioria dos FCA é composta por uma ou duas criptas e em 36 a 41 semanas aproximadamente 50% dos animais têm quatro ou mais criptas (MCLELLAN et al., 1991). Este aumento do número de criptas em um foco, e/ou a área ocupada pelo foco em função do tempo, sugere que estas lesões são crescentes. Os FCA são encontrados em maior número nas regiões distais do cólon, onde a maioria dos tumores se desenvolve (RONCUCCI et al., 1998).

O carcinógeno dimetilhidrazina (DMH) possui alto grau de especificidade para o cólon de roedores. Provoca aumento na proliferação celular com elevação do número total de criptas, aumento do número de células marcadas por timidina e aumento do índice mitótico (razão entre o número de células marcadas e o número total de células) (REDDY et al., 1975; ROGERS & NAUSS, 1985). Estudos com ratos tratados com DMH mostraram grande quantidade de FCA, com posterior desenvolvimento de tumores colônicos em número significativo desses animais. Esses processos patológicos progressivos decorrentes da administração de DMH mostram que os FCA são bons marcadores de lesões pré-neoplásicas no cólon (OKADA et al., 1996). Por isso, tais lesões têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores para identificar substâncias que aumentam ou suprimem o desenvolvimento do câncer de cólon (MORI et al., 2004).

3.2 MICROBIOTA INDÍGENA

Muitos microrganismos estão normalmente presentes no organismo humano e dos animais. São encontrados nas superfícies corporais expostas ao ambiente externo, como a pele, o trato respiratório, o sistema geniturinário e o tubo digestivo (SOUZA & SCARCELLI, 2000; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004). A colonização microbiana começa logo após o nascimento, quando as bactérias da mãe e do meio ambiente passam a colonizar o recém-nascido (ISOLAURI, 2001).

A microbiota do trato gastrointestinal humano é o ecossistema mais complexo do corpo, contendo aproximadamente entre 700 e 1000 espécies bacterianas (QUERA et al., 2005). O número e a composição variam consideravelmente nas diferentes regiões anatômicas (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004). No conteúdo gástrico, a contagem bacteriana total é geralmente abaixo de $10^3/g$ devido ao pH ácido do lúmen. No intestino delgado, os números variam de aproximadamente $10^4/g$ a $10^6/g$ no duodeno para $10^7/g$ na região ileocecal, sendo o trânsito rápido e a secreção de bile e de suco pancreático os principais fatores limitantes do crescimento microbiano nessa porção do intestino. Já no intestino grosso humano estão geralmente presentes centenas de espécies, totalizando números de $10^{11}/g$ a $10^{12}/g$ de conteúdo (SALMINEN et al., 1998). Toda essa comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkühn, na superfície do epitélio intestinal ou incluída na camada de muco (SAVAGE, 1987).

A colonização das bactérias intestinais depende da sua capacidade de adesão em receptores presentes na mucosa intestinal. As espécies com essa característica tendem a colonizar de forma permanente o trato gastrointestinal, sem necessidade de administração periódica. Constituem a denominada microbiota autóctone, que tende a ser estável quanto às espécies bacterianas e ao número de células ao longo do tempo, acompanhando o indivíduo durante toda a vida. Já as espécies alóctones são aquelas externas ao ecossistema intestinal que não possuem capacidade adequada de colonizar e por isso são transitórias (MACKIE et al., 1999). A microbiota indígena é composta por espécies, às vezes, prejudiciais ao hospedeiro que são denominadas anfibiônicas. Essas são capazes de produzir toxinas, invadir a mucosa ou ativar carcinógenos e respostas inflamatórias. Fazem parte dessas espécies, os coliformes e os enterococos. Além desses microrganismos, a microbiota contém cepas com propriedades promotoras da saúde. Trata-se da microbiota saudável que promove o

bem-estar e previne doenças. Estas incluem principalmente as bifidobactérias e os lactobacilos (ISOLAURI, 2001; SAAD, 2006).

A comunidade microbiana nunca é estática. Varia qualitativamente, quantitativamente e metabolicamente, dependendo do local colonizado, da espécie e da idade do hospedeiro. Em um mesmo indivíduo, existem vários fatores endógenos e exógenos que podem influenciar a composição da microbiota intestinal. O hospedeiro tem no seu genótipo fatores que determinam o padrão de colonização pela especificidade de ligação dos sítios de adesão da mucosa (TOIVANEN et al., 2001), assim como um sistema imunológico intestinal atuando por meio da imunoglobulina A secretória (SUSUKI et al., 2004). Entre os fatores relacionados às bactérias, destaca-se o processo denominado *quorum sensing*, no qual os sítios de adesão específicos dos microrganismos, determinados geneticamente, podem sofrer adaptações e/ou alterações. Essa ação bacteriana, em geral, é benéfica para a bactéria que produz o sinal e desfavorável para outras populações bacterianas (SMITH et al., 2000). Dentre os fatores externos, por exemplo, o tipo de parto exerce influência na composição microbiana inicial. A criança que nasce de parto normal, inicialmente, possui a microbiota composta de microrganismos provenientes da mãe (presentes no canal do parto) e, mais tarde, é colonizada pelas bactérias do alimento e do meio ambiente. Já no parto cesáreo, apenas o ambiente é fonte de colonização (MACKIE et al., 1999). O desenvolvimento da microbiota intestinal nos recém-nascidos também está relacionado à alimentação. A amamentação incentiva o crescimento quase exclusivo de bifidobactérias no intestino, enquanto crianças alimentadas com fórmulas infantis têm microbiota mais complexa contendo bifidobactérias, bacteróides, clostrídios e estreptococos. Após o desmame, o tipo de dieta determina a distribuição relativa da espécie bacteriana e a composição da microbiota assemelha-se à do adulto (ISOLAURI, 2001). De todos os fatores citados, os antibióticos são os responsáveis pelas mudanças mais rápidas e drásticas no padrão de colonização da microbiota (NICOLI, 1995). O principal efeito observado inclui a supressão relevante das bactérias anaeróbias, com exceção de *Clostridium* spp. que permanecem em níveis detectáveis. A influência do uso de antimicrobianos no padrão da microbiota intestinal é transitória, podendo persistir por algum período após o término do uso (FANARO et al., 2003).

A microbiota indígena possui muitas propriedades importantes para o hospedeiro, como: desconjugação e desidroxilação de ácidos biliares (MIDTVEDT, 1974); síntese das vitaminas K, ácido pantotênico, biotina, piridoxina e outras que não são absorvidas no cólon como as vitaminas B₁₂, a niacina, a riboflavina e a tiamina;

resistência à colonização por patógenos e por microrganismos oportunistas; modulação do sistema imunológico e; renovação das células epiteliais do cólon (MCFARLAND, 2000).

3.3 PROBIÓTICOS

O uso de microrganismos benéficos na alimentação é relatado desde a versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), onde Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo. Em 76 a.C., Plínio, um historiador romano, recomendou o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001).

O primeiro microbiologista a sugerir que o uso de bactérias poderia beneficiar a microbiota do trato gastrointestinal e prolongar a vida foi Elie Metchnikoff. Em 1907, ele sugeriu a “Teoria da longevidade sem envelhecimento” que atribuiu o maior tempo de vida de alguns habitantes da região rural da Bulgária ao consumo regular de iogurte. A justificativa para tal ocorrência seria a supressão da atividade putrefativa de bactérias intestinais pela atividade das bactérias benéficas do iogurte. A partir disso, ele sugeriu que certos microrganismos eram importantes para a saúde humana e passou a defender o uso de iogurtes e leites fermentados (BROWN & VALIERE, 2004).

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse pelo uso de microrganismos benéficos para melhorar a saúde do hospedeiro e prevenir ou tratar doenças (GIBSON & FULLER, 2000; QUERA et al., 2005; SAAD, 2006). Esses microrganismos recebem o nome de probióticos, termo que deriva do grego e significa “pró-vida” (COPPOLA & TURNES, 2004). Esta terminologia foi originalmente proposta por LILLY & STILLWELL (1965) como aquele que favorece o crescimento de microrganismos, em oposição ao termo antibiótico. Em 1989, Fuller definiu probiótico como “suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal” (REID, 2000). Atualmente, a definição mais usada é aquela proposta pela *Food and Agricultural Organization/ World Health Organization* (FAO/WHO), que diz que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; SANDERS, 2003).

Para ser considerado um probiótico, o microrganismo deve possuir algumas características importantes, tais como: apresentar baixa ou ausência de virulência; ser resistente à bile e ao suco gástrico; sobreviver no trato digestivo e interferir no crescimento de patógenos; possuir capacidade de aderir à mucosa intestinal; produzir bacteriocinas ou outras substâncias antimicrobianas; ser geneticamente estável; e ser apenas intrinsecamente resistente a antibióticos. Além disso, deve possuir capacidade de modular de modo positivo as funções imunológicas e as atividades metabólicas, ser seguro, eficaz e facilmente administrável (MOMBELLI & GISMONDO, 2000; CASTRO & ROVETTO, 2006). Entre os principais probióticos estão as bactérias do ácido láctico (BAL), que incluem *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*, além das bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. lactis*), *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Escherichia coli* cepa Nissle, *Propionibacterium freudenreichii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL et al., 2001).

Os probióticos podem ser usados como medicamentos ou suplementos alimentares na dieta de seres humanos e animais, além de estarem presentes em leites fermentados. Estes produtos são, em geral, constituídos por um único microrganismo ou pela combinação de vários deles (NICOLI & VIEIRA, 2003). Além da suplementação direta de probióticos, outra maneira de se modular a microbiota intestinal é pelo consumo de prebióticos, definidos como ingredientes alimentares não digeríveis ou pouco digeríveis que beneficiam o organismo estimulando seletivamente o crescimento ou a atividade de número limitado de bactérias benéficas no cólon (MANNING & GIBSON, 2004). Exemplos de prebióticos são inulina e frutooligossacarídeos (MACFARLANE et al., 2006). Já um produto referido como simbiótico é aquele no qual um probiótico e um prebiótico se encontram combinados (SAAD, 2006).

3.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos

A microbiota intestinal possui muitas propriedades importantes para o hospedeiro. Entre elas, pode-se citar: ação sobre determinados nutrientes permitindo melhor aproveitamento intestinal (EDWARDS & PARRET, 2002); prevenção da

colonização por bactérias patogênicas promovendo o equilíbrio a favor da microbiota benéfica (PERDIGÓN et al., 1998; EDENS et al., 1997; LIÉVIN et al., 2000; CALDER & KEW, 2002; GUARNER & MALAGELADA, 2003; COMMANE et al., 2005); prevenção, tratamento e/ou recuperação de gastroenterites em crianças (MARTEAU, 2001; CHERMESH & ELIAKIM, 2006); restauração da homeostase microbiana e regulação da inflamação melhorando as doenças inflamatórias intestinais (GUSLANDI et al., 2000; SHANAHAN, 2000; TUOHY et al., 2003; CUMMINGS et al., 2003; BAI & OUYANG, 2006); melhora na digestão da lactose e eliminação dos sintomas de intolerância (VRESE et al., 2001); redução dos níveis de colesterol sérico (GILLILAND, 1990; TARANTO et al., 1998; MACHADO et al., 2003); alívio da constipação intestinal (GOLDIN, 1998) e modulação da resposta imunológica (MCFARLAND, 2000).

Para exercer o efeito benéfico, o microrganismo probiótico precisa permanecer viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal e deve estar presente em quantidade suficientemente elevada para ter impacto no local onde se espera que desenvolva a sua função. Considera-se que essa ação ocorre somente quando a população é igual ou superior a 10^7 células viáveis/g do conteúdo (NICOLI & VIEIRA, 2003). Segundo CASTRO & ROVETTO (2006), o efeito benéfico dos probióticos para a saúde do hospedeiro é dependente das cepas administradas, da dose, da forma de administração e das características inerentes ao hospedeiro. O mecanismo de ação envolvido é provavelmente multifatorial e de acordo com as evidências existentes, parece ser cepa-específico (ÖTLES et al., 2003). Além disso, uma cepa probiótica pode não ser efetiva para todos os indivíduos ou para um mesmo indivíduo em diferentes fases da doença (SHANAHAN, 2002).

3.3.2 Mecanismos de ação dos probióticos

Os efeitos benéficos dos probióticos podem ser explicados por vários mecanismos de ação. Essas bactérias competem por sítios de adesão da mucosa e por nutrientes disponíveis (CALDER & KEW, 2002; GUARNER & MALAGELADA, 2003), impedindo a colonização e a invasão da mucosa por microrganismos patogênicos. Também produzem substâncias antimicrobianas, como ácido lático e outros ácidos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, que reduzem o número de patógenos viáveis e afetam a ação e/ou a produção de suas toxinas (ROLFE, 2000; COMMANE et al., 2005). Além disso, vários estudos sugerem que os probióticos podem modular tanto a resposta imunológica não-específica quanto específica. Esses

efeitos podem ser mediados por ativação dos macrófagos, pelo aumento nos níveis de citocinas, pela atividade das células destruidoras naturais (NK – “natural killer”) e/ou pelos níveis de imunoglobulinas (ISOLAURI et al., 2001; CALDER & KEW, 2002; REID et al., 2003).

3.3.3 *Saccharomyces boulardii*

A maioria dos microrganismos probióticos utilizados é composta de bactérias. Apenas duas leveduras são usadas, *S. boulardii* na Medicina humana e *S. cerevisiae* na Medicina veterinária (BLEHAUT et al., 1989).

S. boulardii foi isolada na Indochina em meados de 1920, quando o microbiologista francês Henri Boulard a encontrou na casca de uma fruta local, a lichia. É uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce a 37°C) e resistente à acidez e às proteases gastrointestinais. Consegue sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal atingindo rapidamente altas concentrações no cólon (BODDY et al., 1991). Porém, não se implanta no tubo digestivo, devendo ser administrada de maneira repetida e regular (FULLER, 1992). Após a descontinuação do uso, é eliminada no período de dois a cinco dias, comprovado pela ausência da levedura nas fezes (BLEHAUT et al., 1989). *S. boulardii* é considerada uma variedade de *S. cerevisiae*, mas difere desta em várias características genéticas e metabólicas (MALLIÉ et al., 2001).

S. boulardii é um microrganismo muito utilizado na Medicina humana. Em 1950, começaram a ser comercializadas preparações liofilizadas, e desde então seu uso como medicamento para combate às diarreias tem aumentado em todo o mundo. É amplamente comercializada na Europa, Ásia, África e Américas do Sul e do Norte (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993; BILLOO et al., 2006). Sua eficácia tem sido demonstrada na prevenção e no tratamento de várias desordens intestinais, tais como diarreia associada a antibióticos (SURAWICZ, 2003), infecção pelo *Clostridium difficile* (ELMER & MCFARLAND, 2001), diarreia em pacientes infectados por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (BORN et al., 1993) ou alimentados por cateteres (BLEICHNER et al., 1997), diarreia dos viajantes (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995), recorrência de doença de Crohn e colite ulcerativa (GUSLANDI et al., 2003).

A levedura parece exercer ainda atividade antiinflamatória, observada em estudos pelo aumento da expressão de PPAR-gama (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma*). Esse regula a inflamação no epitélio intestinal (LEE et al., 2005) por:

inibição da produção de óxido nítrico (GIRARD et al., 2003) via secreção de fatores solúveis que bloqueiam a ativação de NF-Kb e a expressão de IL-8 (SOUGIOULTZIS et al., 2006); por limitação da infiltração de células Th1 no cólon inflamado e; pela amplificação da inflamação induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias (DALMASSO et al., 2006). *S. boulardii* neutraliza certas toxinas bacterianas (BRANDÃO et al., 1998), estimula enzimas da borda em escova como lactase, sacarase e maltase e secreta poliaminas (principalmente espermina e espermidina, que regulam a expressão gênica e a síntese protéica) (BUTS & KEYSER, 2006). Além disso, vários trabalhos mostram a ação de *S. boulardii* no sistema imunológico, havendo aumento dos níveis de IgA após a administração do probiótico (BUTS et al., 1990; QAMAR et al., 2001; RODRIGUES et al., 2000).

O microrganismo não é afetado pelo uso de antibacterianos, o que permite a associação na terapia para infecções gastrointestinais (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993; CZERUCKA et al., 2007). Outras vantagens são a possibilidade de liofilização e a rápida eliminação após interrupção da terapia. O uso de *S. boulardii* tem sido considerado seguro e os relatos de complicações são raros. Contudo, alguns casos de fungemia provocados por essa levedura já foram descritos (VIGGIANO et al., 1995; RIJNDERS et al., 2000; LHERM et al., 2002; RIQUELME et al., 2003; CASSONE et al., 2003; LESTIN et al., 2003). A maioria dos casos ocorreu em pacientes imunossuprimidos ou muito debilitados, e por isso o uso da levedura não é recomendado nessas situações (CESARO et al., 2000).

3.3.4 *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* foi descrito pela primeira vez em 1900 por um cientista chamado Moro, que identificou os microrganismos nas fezes de lactentes amamentados ao seio. As bactérias receberam o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (KULP & RETTGER, 1924). As espécies do gênero *Lactobacillus* são bastonetes Gram-positivos, catalase negativos, imóveis, não formadores de esporos e microaerófilos. Possuem necessidade nutricional complexa, pois a sua capacidade de síntese é extremamente limitada. O metabolismo é estritamente fermentativo e o ácido láctico é o principal produto do metabolismo de carboidratos. Outra característica importante é a tolerância a ácidos, o que permite a sobrevivência à passagem pelo estômago e a chegada às porções mais distais do trato gastrointestinal. Podem ser encontrados em toda a extensão do trato gastrointestinal

de suínos e de roedores, e nos humanos, habitam a cavidade oral, o trato intestinal e o trato urogenital feminino (BERGEY'S MANUAL, 1994).

Os lactobacilos são largamente utilizados na preparação de uma variedade de alimentos como culturas iniciais de queijos e de outros laticínios, e usados também nas carnes e nos vegetais fermentados (BOTTAZZI, 1988; TANNOCK, 2004).

A estirpe *L. delbrueckii* UFV-H2b20, anteriormente denominada *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20, é de origem humana e foi isolada de fezes de recém-nascido, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em 1988, AGOSTINHO observou em estudo *in vitro* que essa linhagem foi capaz de se manter viável em condições estressantes como as do trato gastrointestinal, na presença de pH ácido, de sais biliares, de lisozima e de antibióticos. NEUMANN et al. (1998) observaram que a bactéria também foi capaz de resistir a condições estressantes no trato gastrointestinal de camundongos, mantendo-se viável em todas as porções que o compõem. Além disso, estimulou mecanismos de defesa, ativou o sistema fagocitário mononuclear e induziu a produção de IL-12, TNF- α e óxido nítrico por células murinas. O *L. delbrueckii* UFV-H2b20 confere também efeito protetor contra *Salmonella* sorovar Typhimurium em camundongos convencionais e isentos de germes (MOURA et al., 2001).

3.3.5 Bifidobacterium

As bifidobactérias foram descritas em 1899, quando Henry Tissier isolou uma bactéria anaeróbia a partir de fezes de criança amamentada ao seio. A bactéria foi denominada *Bacillus bifidus* devido à sua morfologia ramificada. *Bifido* em latim significa dividido em duas partes. Em 1924, Orla-Jensen, microbiologista dinamarquês, propôs que a *B. bifidus* deveria ser classificada como espécie separada, membro do gênero *Bifidobacterium*. Ele a considerou como gênero distinto, possivelmente formando uma conexão entre bactérias lácticas e bactérias do ácido propiônico. No entanto, durante grande parte do século XX, foi classificada como membro do gênero *Lactobacillus*, devido à sua forma em haste, às suas características fermentativas obrigatórias e principalmente pela indisponibilidade de métodos completos de identificação de organismos na época (MITSUOKA & KANEUCHI, 1977). Somente após muitos estudos usando hibridização do DNA e avaliando a capacidade metabólica, em 1960, foi aceita como gênero independente e classificada como *Bifidobacterium* (ISHIBASHI et al., 1997).

Este é um grupo de bactérias Gram positivas, imóveis, não esporuladas, não produtoras de gás, anaeróbias (embora algumas espécies possam tolerar o oxigênio), apresentando forma de bastonetes curvos, caracterizadas freqüentemente por bifurcação em forma de Y ou V. Crescem à temperatura ótima entre 37°C e 41°C e pH ótimo entre 6 e 7 (LAROIA & MARTIN, 1990). As bifidobactérias não são bactérias do ácido láctico “verdadeiras”, como *Lactobacillus* ou *Streptococcus*. Produzem ácido acético e ácido láctico por uma via incomum do metabolismo da glicose e, pequenas quantidades de ácido fórmico e de etanol são também freqüentemente produzidas. Possuem a enzima frutose-6-fosfatofosfoquetolase (F6PPK) que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e a eritrose-4- fosfato (HUGHES & HOOVER, 1991).

Aproximadamente 30 espécies de *Bifidobacterium* são conhecidas. Aquelas que habitam naturalmente o trato gastrointestinal dos seres humanos são diferentes das existentes no intestino de animais (MITSUOKA, 1984). *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* e *B. pseudocatenulatum* são espécies de origem humana e *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* e *B. animalis* são de origem animal (ISHIBASHI et al., 1997).

As bifidobactérias começam a colonizar o intestino do neonato na primeira semana após o nascimento e se tornam as principais bactérias da microbiota, constituindo 95% da população bacteriana intestinal, especialmente em crianças alimentadas ao seio (FAVIER et al., 2002). Após o desmame, o número de microrganismos desse gênero diminui gradualmente e outras bactérias passam a predominar no local (MITSUOKA & KANEUCHI, 1977). A população de *Bifidobacterium* no humano adulto corresponde entre 3% e 6% da biota fecal e é relativamente estável. Em idosos, os níveis dos microrganismos desse gênero parecem declinar (HOPKINS et al., 2001). A presença de bifidobactérias no intestino é associada a grandes benefícios à saúde do hospedeiro. Vários estudos já observaram importante efeito na prevenção e/ou tratamento de diarreias (MARTEAU, 2001; ISOLAURI, 2003) provocadas por rotavírus (BAE et al., 2002), pelo uso de antibióticos (ORRHAGE et al., 1994), pela infecção por *Clostridium difficile* (BEAUGERIE & PETIT 2004) e na diarreia dos viajantes (CHERMESH & ELIAKIM, 2006). As bifidobactérias também protegem contra *Salmonella typhimurium* (SILVA et al. 1999, 2004), *Escherichia coli* O157:H7 (ASAHARA et al., 2004), *Listeria monocytogenes* (TOURÉ et al., 2003) e *Campylobacter jejuni* (FOOKS & GIBSON, 2003). Atuam também no tratamento de doença inflamatória intestinal (LEAHY et al., 2005), no alívio da intolerância à lactose (JIANG et al., 1996), na constipação intestinal (KLEESSEN et al., 1997) e na

estimulação do sistema imunológico (PERDIGÓN et al., 2003; LEE et al., 2004; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2004).

Nos últimos 20 anos, tem ocorrido grande aumento do interesse comercial e científico pelas bifidobactérias. Esses microrganismos são amplamente utilizados em alimentos (iogurtes, leites fermentados, queijos e sorvetes) e em medicamentos. Os microrganismos são ingeridos na forma viável para regular a microbiota intestinal, contribuindo para a saúde do intestino, prevenindo ou melhorando doenças do trato gastrointestinal. A utilização das bifidobactérias nos produtos alimentares ocorre há bastante tempo, e no Japão, começou ativamente no início de 1980 (ISHIBASHI & SHIMAMURA, 1993). Mais tarde, se espalhou pela Europa e é agora consumida mundialmente (TAMIME et al., 1995). A aplicação mais representativa de bifidobactéria nos alimentos é o iogurte.

Para garantir os efeitos benéficos deste probiótico, as bactérias devem estar viáveis e em grande número no momento do consumo, para que consigam chegar vivas no intestino (ADHIKARI et al., 2000). O produto deve conter no mínimo 10^6 UFC/mL e ser consumido em quantidade superior a 100 mL/dia (GOMES & MALCATA, 1998). A escolha de uma bactéria para utilização comercial em leites fermentados deve considerar as características do microrganismo, como o rápido crescimento e a tolerância à acidez e ao oxigênio (RASIC & KUNNAN, 1983; BERRADA et al., 1991). Em alguns estudos, observou-se que a maioria das marcas comerciais de iogurte analisadas apresentou número muito baixo dessas bactérias. Segundo CHARTERIS et al. (1997), durante o período de armazenamento, a maioria dos produtos contendo *Bifidobacterium* apresenta declínio constante no número de células viáveis. Isso, porque o baixo pH de leites fermentados e as condições aeróbias de produção e de embalagem não são propícios à sua sobrevivência (DINAKAR & MISTRY, 1994).

A presença de quantidades adequadas desses probióticos nos alimentos é importante, mas seus efeitos terapêuticos ocorrerão somente se conseguirem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal. As bifidobactérias, em geral, conseguem sobreviver, comprovado pelos altos níveis desses organismos encontrados nas fezes (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Entretanto, grandes variações de resistência foram observadas entre as espécies de bifidobactérias (BERRADA et al., 1991; SHAHIDI et al., 2008). O consumo dos produtos contendo esses microrganismos deve ocorrer de maneira regular, já que os mesmos desaparecem do intestino dentro de poucos dias após a última dose.

Alguns produtos que contêm bifidobactérias e lactobacilos têm história de utilização muito longa. Esse fato, associado ao crescente conhecimento sobre a taxonomia e a fisiologia das bifidobactérias, serve como base para a segurança de seu uso. Os casos de infecção por lactobacilos e bifidobactérias são extremamente raros e estima-se que representam entre 0,05% e 0,4% dos casos de endocardite infecciosa e bacteremia (SAXELIN et al., 1996). A maior parte dos casos raros de infecção por lactobacilos ocorre em pacientes com condições subjacentes predominantemente de natureza grave (HUSNI et al., 1997). Entretanto, não há evidências publicadas mostrando que o consumo de lactobacilos e bifidobactérias aumente o risco de infecção oportunista entre esses indivíduos (BORRIELLO et al., 2003).

3.4 PROBIÓTICOS E CÂNCER DE CÓLON

Em muitos estudos realizados com humanos e animais, pesquisadores têm analisado como dietas e outros tratamentos afetam os fatores predisponentes ao câncer de cólon. Fatores como aumento da atividade de enzimas que ativam carcinógenos, aumento de substâncias pró-carcinogênicas dentro do cólon ou alteração de determinadas populações de gêneros ou espécies bacterianas têm sido estudados.

As atividades metabólicas da microbiota intestinal podem gerar efeitos benéficos e adversos à saúde do hospedeiro (ROWLAND, 1999). Várias evidências sugerem o envolvimento desses microrganismos na etiologia do câncer, tais como: a presença de substâncias genotóxicas de origem bacteriana nas fezes (VENTURI et al., 1997), a produção de substâncias com atividade genotóxica, carcinogênica e promotora do tumor pela microbiota a partir de componentes da dieta (ROWLAND, 1999) e a ativação de procarcinógenos. Além disso, estudos mostram resultados diferentes em animais isentos de germes e convencionais. REDDY et al. (1975) observaram que ratos livres de germes tratados com o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina tiveram menor incidência de tumores colônicos do que os ratos convencionais submetidos ao mesmo tratamento. Outro estudo mostrou também que ratos livres de germe alimentados com dieta humana apresentaram menores níveis de DNA alterados do que os animais convencionais (RUMNEY et al., 1993). Esses resultados sugerem que a microbiota do hospedeiro tem participação no processo de carcinogênese. Em decorrência disso, os

probióticos podem ser usados para modificar a composição da microbiota intestinal, com o objetivo de interferir nesse processo (BURNS & ROWLAND, 2000). Vários estudos têm mostrado que os fatores predisponentes ao câncer podem ser alterados favoravelmente pelo consumo de alguns desses microrganismos (BRADY et al., 2000). Há indicação de que a ingestão de certas culturas lácticas como os lactobacilos e bifidobactérias ou seus produtos fermentados reduzem o risco de alguns tipos câncer (PARK et al., 2007), diminuem o crescimento do tumor (MITSUOKA, 1990; SINGH et al., 1997) e contribuem para a regressão (GOLDIN & GORBACH, 1984). KULKARNI & REDDY (1994) observaram inibição de 53% na formação de FCA e também na multiplicidade das criptas em ratos que receberam *B. longum* na dieta (1.5% e 3% de cultura liofilizada com 2×10^{10} UFC/g) e injeções de azoximetano. Em 1997, CHALLA et al. observaram redução de 23% nos FCA e de 28% no total de criptas nos ratos que receberam dieta com 0.5% *B. longum* (1×10^8 UFC/g) e aplicações de azoximetano, quando comparados ao grupo controle. PARK et al. (2007) analisaram ratos alimentados com dieta rica em gordura e pobre em fibras, submetidos a aplicações de 1,2 dimetilhidrazina. Em concordância com os outros estudos, foi observado que o grupo suplementado com o probiótico (*B. polyfermenticus*; 3.1×10^8 UFC/dia) apresentou menor número de criptas aberrantes do que aqueles tratados somente com a dieta. Quando analisados quanto ao efeito sobre os tumores, os probióticos estudados também mostraram efeitos positivos. Ratos tratados com dieta suplementada com *B. longum* e submetidos a aplicações de azoximetano, mostraram significativa supressão da incidência e da multiplicidade, além do volume reduzido do tumor colônico (SINGH et al., 1997). GOLDIN & GORBACH (1980) analisaram o efeito de *L. acidophilus* na incidência do tumor em ratos submetidos a aplicações de DMH. A redução na incidência foi observada após 20 semanas de tratamento nos animais que receberam o probiótico (40% no grupo suplementado com *L. acidophilus* e 77% no grupo controle). Porém, não houve diferença após 36 semanas, sugerindo que a atuação desse microrganismo é no aumento do período de latência ou no tempo de indução dos tumores. TAKAGI et al. (1999) também observaram efeito positivo da dieta contendo *L. casei* Shirota (0,05%) em animais que receberam aplicações do carcinógeno 3-methylcholanthrene. Foi observada redução significativa de tumores no grupo suplementado em relação ao controle. BRADY et al. (2000) analisaram os estudos publicados entre 1990 e 2000 que relacionaram o consumo de prebióticos e probióticos e o desenvolvimento do câncer de cólon. Foi observado efeito inibidor sobre o desenvolvimento de criptas aberrantes e de tumores nos modelos animais. Porém, em

alguns estudos, o efeito não é totalmente consistente e é pequeno, o que pode ser devido à dose ou ao tempo utilizado.

Em humanos, também existem estudos relacionando o consumo de probióticos e o risco de câncer colorretal. Um estudo epidemiológico realizado na Finlândia demonstrou que, apesar da alta ingestão de gordura, a incidência de câncer foi menor do que em outros países devido ao alto consumo de leite, iogurte e outros produtos lácteos. Estudos caso-controle também demonstraram relação inversa entre o consumo de iogurte e outros produtos lácteos fermentados e câncer de cólon (YOUNG & WOLF, 1988; PETERS et al., 1992; BOUTRON et al., 1996). Em contraste, dois estudos prospectivos americanos (*Nurses' Health Study* de 1980-1988 e *Health Professionals* de 1986-1990) não observaram associação entre a ingestão de produtos lácteos e a diminuição do risco de câncer de cólon (KAMPMAN et al., 1994a). Resultado semelhante foi observado em estudo de coorte feito na Holanda que não encontrou associação significativa entre os fatores analisados (KAMPMAN et al., 1994b). Os estudos de intervenção em humanos para avaliar o efeito dos probióticos no câncer, em grande parte, têm utilizado biomarcadores para a avaliação de risco (BURNS & ROWLAND, 2000). HAYATSU & HAYATSU (1993) demonstraram efeito supressor na excreção de mutágenos urinários decorrentes da ingestão de carne moída frita após a administração de *L. casei*. Também foi observada a redução da excreção mutagênica urinária e fecal após o consumo de *L. acidophilus* em estudo feito por LIDBECK et al. (1992).

3.4.1 Mecanismos de ação dos probióticos na inibição do câncer de cólon

Os mecanismos pelos quais os probióticos podem inibir o câncer de cólon ainda são pouco entendidos (RAFTER, 2004), mas várias hipóteses são levantadas, como:

Alteração das atividades metabólicas da microbiota intestinal. Muitos componentes exógenos são detoxificados pela formação de glucuronídeos no fígado. Devido à especificidade ao substrato, a enzima bacteriana β -glucuronidase tem a habilidade de hidrolisar muitos glucuronídeos e pode liberar agliconas carcinogênicas no lúmen intestinal (ROWLAND et al., 1998). As bactérias probióticas são capazes de reduzir o nível dessa enzima pró-carcinogênica, além de outras, tais como a nitroreductase e a azoreductase (GOLDIN & GORBACH, 1984; ROBERFROID, 2000).

Alterações quantitativas e qualitativas da microbiota intestinal. Como descrito anteriormente, os probióticos podem alterar a microbiota promovendo balanço

favorável às bactérias benéficas em relação às patogênicas. Este é um efeito importante, uma vez que os microrganismos prejudiciais estão possivelmente envolvidos na gênese de promotores do tumor e de pré-carcinogênicos (RAFTER, 2003). Além disso, a microbiota residente fermenta os substratos luminiais produzindo variedade de metabólitos, em particular os ácidos graxos de cadeia curta, primariamente acetato, butirato e propionato. As bactérias probióticas competem com outras bactérias, no lúmen colônico, pela fermentação de substratos, sendo o acetoacetato, o acetato e o lactato metabólitos primários de bactérias ácido-láticas. O acetato pode ser absorvido e utilizado por tecidos periféricos (POMARE et al., 1985). O lactato e acetoacetato podem servir de substratos para outros membros da microbiota e serem degradados a outros ácidos graxos de cadeia curta. Entre estes, alguns como o butirato são potenciais agentes anticarcinogênicos do intestino (SAKATA et al., 2003). O butirato é a fonte de energia preferencial dos colonócitos e foi implicado no controle do maquinário regulador da apoptose e da diferenciação celular (ZORAN et al., 1997). Não é produzido diretamente pelas bactérias ácido-láticas, mas as mesmas podem favorecer a população ou a atividade das produtoras deste ácido graxo de cadeia curta no cólon (COMMANE et al., 2005).

Alteração de condições físico-químicas no cólon. A presença de ácido láctico e de ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelos probióticos acidifica o cólon e, esta redução do pH é associada à menor incidência de câncer (GOLDIN & GORBACH, 1984). Ratos que receberam dieta contendo inulina com ou sem *B. longum* apresentaram decréscimo no pH cecal. O consumo do probiótico foi associado a alterações potencialmente benéficas na fisiologia cecal e na atividade metabólica bacteriana. Essas são relacionadas ao risco de tumor e à incidência de lesões pré-neoplásicas putativas, indicando efetividade na redução das lesões colônicas (ROWLAND et al., 1998).

Atividade antígenotóxica. POOL-ZOBEL et al. (1993) demonstraram a habilidade de *L. casei* Shirota de inibir os danos ao DNA no cólon de ratos expostos ao mutágeno N-metil-nitro-N-nitrosoguanidina. Este efeito também foi confirmado em estudos subseqüentes em ratos recebendo o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina e com suplementação de diferentes espécies de lactobacilos, mostrando atividade antígenotóxica espécie-específica (POOL-ZOBEL et al., 1996). Resultado semelhante foi encontrado também em estudo *in vitro* por NERSESYAN (2001). O autor observou que *L. acidophilus* incubado com células de cólon de rato em conjunto com o potente carcinógeno N-metil-nitro-N-nitrosoguanidina levou a decréscimo significativo na

extensão de migração do DNA (dano ao DNA) prevenindo a ação genotóxica dessa substância.

Estimulação da resposta imunológica. A inibição do desenvolvimento de tumores provocada pelo consumo regular destes microrganismos pode estar associada ao seu papel modulador da imunidade (COMMANE et al., 2005). Em estudo feito por KATO et al. (1994) para determinar se a resposta imunológica estava envolvida na função anticarcinogênica dos probióticos, o efeito do consumo de *L. casei* no crescimento de tumores secundários foi investigado após a remoção cirúrgica de tumores primários. Como resultado desta experiência, o tumor cresceu gradualmente no grupo controle enquanto o crescimento do tumor no grupo tratado com lactobacilos foi inibido significativamente. Os resultados indicaram que a administração oral do *L. casei* aumenta a imunidade específica ao tumor. LE BLANC & PERDIGÓN (2004) observaram inibição do desenvolvimento de carcinoma colorretal induzido por 1,2 dimetilhidrazina em camundongos alimentados com dieta suplementada com iogurte. Este efeito protetor foi acompanhado por decréscimo da resposta imunológica inflamatória mediada pelo aumento de IgA, indução de apoptose e de IL-10. Em estudo feito com camundongos *knock-out* para IL-10, a modificação da microbiota entérica pelo probiótico *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, exerceu efeitos tais como a atenuação da inflamação e redução das lesões neoplásticas (O'MAHONI et al., 2001). Em ratos alimentados com *L. casei* Shirota, observou-se incidência reduzida de tumores assim como atraso no início das lesões induzidas por 3-metilclorantreno. Nesse estudo, o número e a citotoxicidade das células NK foram significativamente maiores no grupo estudo do que no grupo controle. Além disso, em modelo de camundongo geneticamente modificado deficiente em células NK, os lactobacilos não suprimiram a tumorigênese sugerindo que o aumento da citotoxicidade das NK por esses microrganismos atrasa o início do tumor (TAKAGI et al., 2001).

Supressão da atividade da ornitina descarboxilase. A enzima ornitina descarboxilase (ODC) é crucial na via biossintética de poliaminas. Estas estão relacionadas à proliferação e diferenciação celular e à síntese de macromoléculas. Vários estudos mostraram elevada taxa de atividade da ODC em pacientes com câncer, desempenhando esta importante função no crescimento do tumor (REDDY, 1999). REDDY & RIVENSON (1993) observaram que a propriedade inibitória do tumor de cólon por culturas liofilizadas de *B. longum* foi associada com a inibição da proliferação celular da mucosa e com a supressão da atividade de ODC na mucosa colônica. Resultados semelhantes foram encontrados por SINGH et al. (1997) que

verificaram inibição da atividade da ODC e da proliferação de células induzidas por azoximetano em ratos alimentados com *B. longum*.

O uso de probióticos no câncer é atrativo, porém mais trabalhos precisam ser feitos para identificar as estirpes específicas, as características responsáveis pelos efeitos antitumorais e os mecanismos pelos quais esses acontecem. No entanto, mesmo com a informação limitada disponível, o uso de probióticos na supressão do câncer parece ser importante. Em humanos, é extremamente difícil a condução de estudos clínicos randomizados para avaliar tal suplementação. Porém, sua utilização potencial certamente merece mais credibilidade, se mais estudos experimentais reforçarem a teoria (RAFTER, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos *Swiss* machos com oito semanas de idade, obtidos do Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente e ciclo claro-escuro de 12 horas, acomodados em gaiolas grandes de polietileno com grades metálicas, contendo no máximo 10 animais em cada uma delas. Todos receberam ração comercial e água *ad libitum* durante todo experimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob o protocolo nº189/07.

Os animais foram divididos em 10 grupos submetidos aos seguintes tratamentos: Cont – não recebeu nenhum tratamento; Cont/DMH – tratado apenas com DMH; Lacto – tratado apenas com lactobacilo; Lacto/DMH – tratado com lactobacilo e DMH; Bifido – tratado apenas com bifidobactéria; Bifido/DMH – tratado com bifidobactéria e DMH; Lacto/Bifido – tratado com lactobacilo e bifidobactéria; Lacto/Bifido/DMH - tratado com lactobacilo, bifidobactéria e DMH; Sb – tratado apenas com levedura; Sb/DMH – tratado com levedura e DMH. Os tratamentos estão resumidos na tabela 1. Em seguida, a figura 1 mostra o número de animais utilizados em cada grupo durante todo o estudo.

Tabela 1- Resumo dos tratamentos recebidos pelos animais dos diferentes grupos estudados.

Cont			
Cont/DMH			X
Lacto	X		
Lacto/DMH	X		X
Bifido		X	
Bifido/DMH		X	X
Lacto/Bifido	X	X	
Lacto/Bifido/DMH	X	X	X
Sb			X
Sb/DMH			X

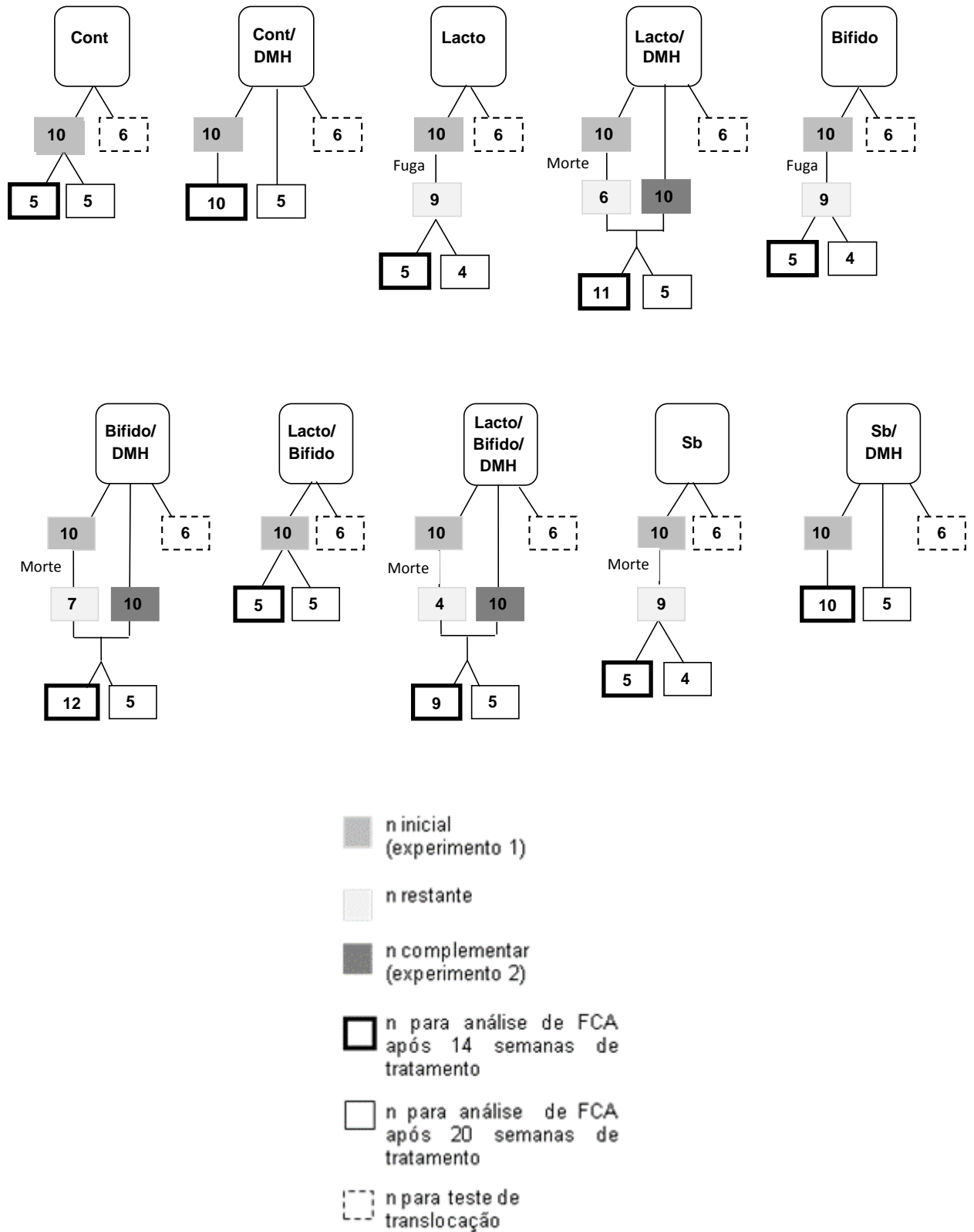


Figura 1- Organograma do número de animais utilizados (n= número)

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A partir do dia 0 (T0), os animais dos grupos Lacto/DMH, Lacto, Bifido/DMH, Bifido, Lacto/Bifido/DMH, Lacto/Bifido, Sb/DMH e Sb receberam água *ad libitum* contendo os probióticos correspondentes, enquanto os grupos Cont/DMH e Cont receberam apenas água. Esse tratamento foi feito diariamente durante todo o estudo. A partir do sétimo dia, os animais receberam aplicações do carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina (DMH) (Sigma, Saint Louis, USA) (25 mg/kg e 37 mg/100 mL de EDTA em solução salina num volume total de 100 μ L). A droga foi administrada a cada sete dias por via subcutânea durante seis semanas. Os grupos não tratados com DMH receberam apenas solução salina com o veículo (EDTA).

Os animais foram monitorados diariamente quanto à saúde geral. O peso corporal e o consumo de ração foram anotados semanalmente durante todo o estudo. Na décima quarta semana de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para análise. O delineamento experimental está resumido na figura 2.



Figura 2 - Delineamento experimental.

4.3 MICRORGANISMOS

Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 foi isolado de fezes de recém-nascido na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. A bactéria foi mantida a -18°C em

caldo De Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA), adicionado de 10% de glicerol esterilizado.

Bifidobacterium animalis var. *lactis* Bb12 foi cedido pela Christian Hansen Lab. (Horsholm, Dinamarca) na forma liofilizada e foi mantido em anaerobiose.

Saccharomyces boulardii foi cedido pela Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e mantido a 4°C em caldo YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) em concentração de 10^9 UFC/mL, quantificada por plaqueamento em ágar Sabouraud (Difco, Sparks, EUA).

4.4 PREPARO DA ÁGUA

Saccharomyces boulardii foi cultivado em 20 mL de caldo YPG e mantido a 37°C por 24 horas. Já as bactérias foram cultivadas em 10 mL de caldo MRS sob as mesmas condições de temperatura e tempo, sendo a bifidobactéria mantida em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marietta, EUA, contendo 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂). Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 5000rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com 5 mL de água e centrifugadas novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e, as células suspensas em 100 mL de água que foram colocados nos bebedouros. Este procedimento foi feito diariamente durante todo o estudo.

A concentração dos probióticos na água foi de 10^8 UFC/mL, com exceção do grupo tratado com a mistura de lactobacilo e bifidobactéria cuja água continha 10^8 UFC/mL de cada bactéria.

4.5 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS

A ingestão de ração e o peso dos animais foram monitorados semanalmente usando balança digital da marca Filizola (São Paulo, Brasil).

4.6 MORTALIDADE

No estudo piloto, observou-se grande mortalidade nos grupos tratados com DMH e certos probióticos. Para verificar se os tratamentos contribuíram para este fato, durante todo o experimento, os animais foram monitorados para a análise da mortalidade acumulada, sendo registrado quantos morreram por grupo. A data do óbito de cada camundongo foi registrada e estes pontos foram inseridos em gráfico de curva de sobrevivência.

4.7 TRANSLOCAÇÃO DOS PROBIÓTICOS

No intuito de verificar se a aplicação do carcinógeno promoveu a passagem dos probióticos para outros tecidos, foi realizada a determinação da translocação microbiana para os linfonodos mesentéricos (LM), baço e fígado.

Para essa análise, foram utilizados outros 48 animais divididos em oito grupos, submetidos aos mesmos tratamentos explicitados anteriormente: Lacto, Lacto/DMH, Bifido, Bifido/DMH, Sb, Sb/DMH, Cont e Cont/DMH). Lacto/Bifido e Lacto/Bifido/DMH não fizeram parte desse teste. A análise foi feita em três animais de cada grupo em duplicata (n=6) 48 horas após a primeira aplicação de DMH. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para coleta do baço, do fígado e dos LM. Os órgãos foram imediatamente pesados, triturados em maceradores e submetidos a diluições decimais em PBS (solução salina tamponada com fosfato). Alíquotas de 100 µL das diluições adequadas foram incorporadas em ágar Sabouraud (Difco, Sparks, EUA) para os grupos tratados com a levedura e ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) para aqueles tratados com as bactérias. Os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em capela de fluxo laminar (VECCO, Campinas, SP) e todo o material foi esterilizado previamente. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para a enumeração e, a translocação dos probióticos foi confirmada pelo método de coloração de Gram. Para os grupos tratados com a bifidobactéria, todos os procedimentos, após a pesagem, foram feitos em câmara de anaerobiose.

4.8 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

O impacto dos diferentes tipos de probióticos na inibição da carcinogênese foi avaliado por meio da análise dos focos de criptas aberrantes na mucosa colônica dos animais. Logo após o sacrifício, o intestino grosso foi coletado desde o ceco até o ânus, tendo sido lavado em solução salina e aberto longitudinalmente pela borda anti-mesentérica. Em seguida, foi colocado em parafina com a mucosa voltada para cima e, preso com alfinetes para fixação em formol por 24 horas (Figura 3). Após esse período, cada intestino foi medido e dividido em três fragmentos iguais, denominados de proximal, medial e distal, em relação ao ceco. Esses fragmentos foram corados com solução de azul de metileno a 0,1% por dois minutos e lavados em PBS. A identificação das criptas aberrantes foi feita segundo a técnica de BIRD (1987) com auxílio de microscópio ótico de luz com aumento de 40 vezes. A contagem foi feita em toda a superfície mucosa do intestino grosso (do cólon ao reto) por dois observadores treinados que não sabiam a que grupos os animais pertenciam e que realizaram contagens independentes. Como não houve diferença significativa entre as avaliações dos observadores ($p < 0,05$), a média das duas contagens foi utilizada para as demais análises. O número total de FCA, sua distribuição ao longo do cólon e a multiplicidade das criptas foram analisados. A distribuição foi avaliada entre as regiões proximal, medial e distal do intestino grosso e a multiplicidade foi observada por categorização dos focos, dividindo-os em focos contendo três ou menos criptas aberrantes e contendo mais de três criptas aberrantes. O percentual de redução dos FCA foi obtido por regra de três. Considerou-se a média do grupo Cont/DMH como 100% e calculou-se o percentual de FCA nos grupos Lacto/DMH, Bifido/DMH, Lacto/Bifido/DMH e Sb/DMH. A partir disso, o valor calculado foi subtraído de 100% para obter o percentual de redução.

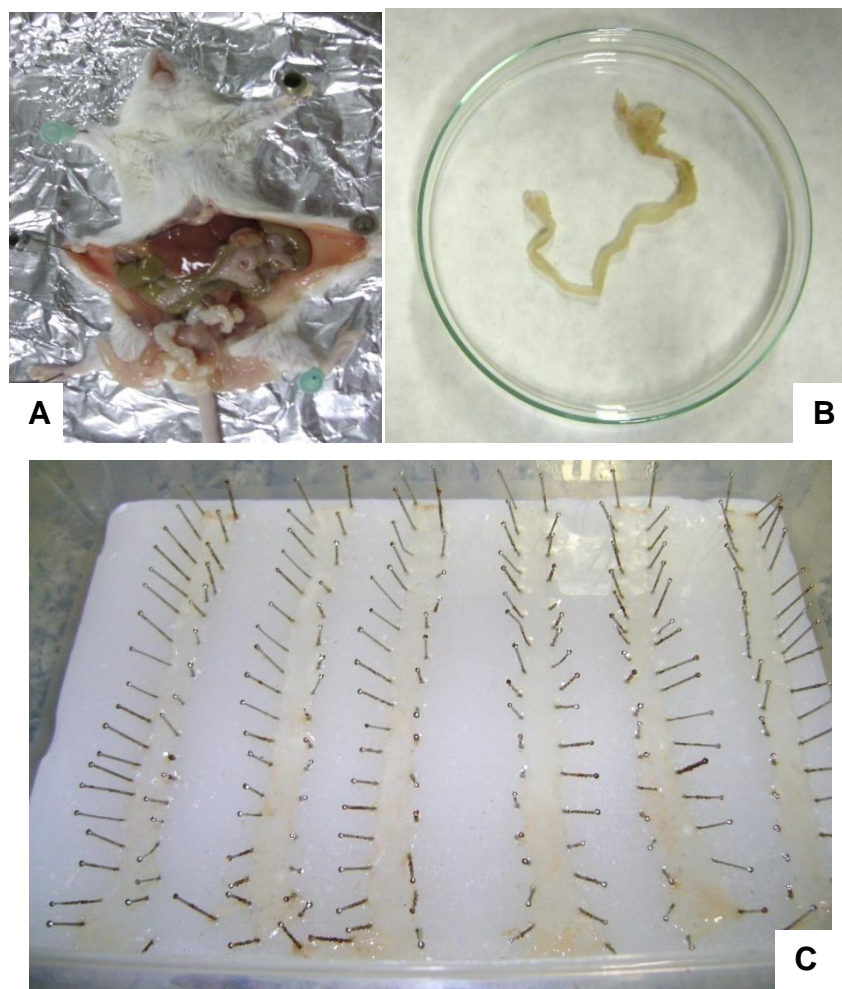


Figura 3 – Preparo do intestino para análise das criptas aberrantes. A - Remoção do intestino grosso; B - Lavagem; e C - Abertura em parafina.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaPlot na versão 11.0. O peso corporal e o consumo de ração foram avaliados entre os grupos tratados simultaneamente com probiótico e DMH e seus respectivos controles (grupo tratado com o mesmo probiótico, Cont/DMH e Cont). Os testes utilizados foram Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn's. A curva de sobrevivida foi estimada pelo teste de Kaplan-Meier e pelo teste de comparação de curvas de log-rank. O teste T de Student foi utilizado para a comparação entre as contagens dos FCA feitas pelos dois observadores e também para as demais análises das criptas aberrantes (comparação entre os grupos tratados simultaneamente com probiótico e DMH versus grupo

Cont/DMH). A análise dos FCA nas três regiões do cólon (proximal, medial e distal) foi feita por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. O valor de p foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO DOS ANIMAIS

No tempo zero (T0), não houve diferença significativa entre os pesos dos animais dos grupos estudados. Ao final do estudo, verificou-se que as aplicações de DMH, em geral, induziram aumento de peso corporal (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos sobre o peso corporal

	n	Mediana	Média ± DP	
Cont	10	43,50	43,05	3,18
Cont/DMH	15	48,50*	48,60	4,80
Lacto	9	44,50 [†]	44,28	5,52
Lacto/DMH	16	50,00*	50,16	3,82
Bifido	9	48,50	48,61	2,47
Bifido/DMH	17	49,00*	48,85	2,43
Lacto/Bifido	10	48,25	48,30	2,26
Lacto/Bifido/DMH	14	45,00	46,50	5,56
Sb	9	43,00	44,75	7,41
Sb/DMH	15	46,00	45,60	2,33

n= número de animais por grupo; DP= desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn's.

* p <0,05 comparado ao grupo Cont.

[†] p <0,05 comparado ao seu grupo experimental (probiótico+DMH).

O consumo de ração diferiu apenas entre os grupos Lacto/DMH e Lacto, sendo maior no primeiro grupo (p<0,05).

5.2 MORTALIDADE

Nenhum animal dos grupos Cont/DMH e Sb/DMH morreu durante o experimento. Nos grupos Lacto/DMH, Bifido/DMH e Lacto/Bifido/DMH a mortalidade foi de 40%, 30% e 60% respectivamente. Entre os não tratados com a droga, apenas um

animal do grupo Sb morreu (10%), enquanto os animais dos outros grupos (Cont, Lacto, Bifido e Lacto/Bifido) sobreviveram até o fim do estudo.

A Figura 4 mostra a mortalidade acumulada dos camundongos durante os 91 dias do período experimental. Foi encontrada diferença significativa entre as curvas dos grupos que não apresentaram mortalidade (Cont, Lacto, Bifido, Lacto/Bifido, Cont/DMH e Sb/DMH) e os grupos Lacto/DMH e Lacto/Bifido/DMH ($p < 0,05$). O grupo Sb também diferiu de Lacto/Bifido/DMH ($p < 0,05$). A maior parte dos animais morreu entre o nono e décimo dia do estudo, ou seja, de 48 a 72 horas após a primeira aplicação de DMH.

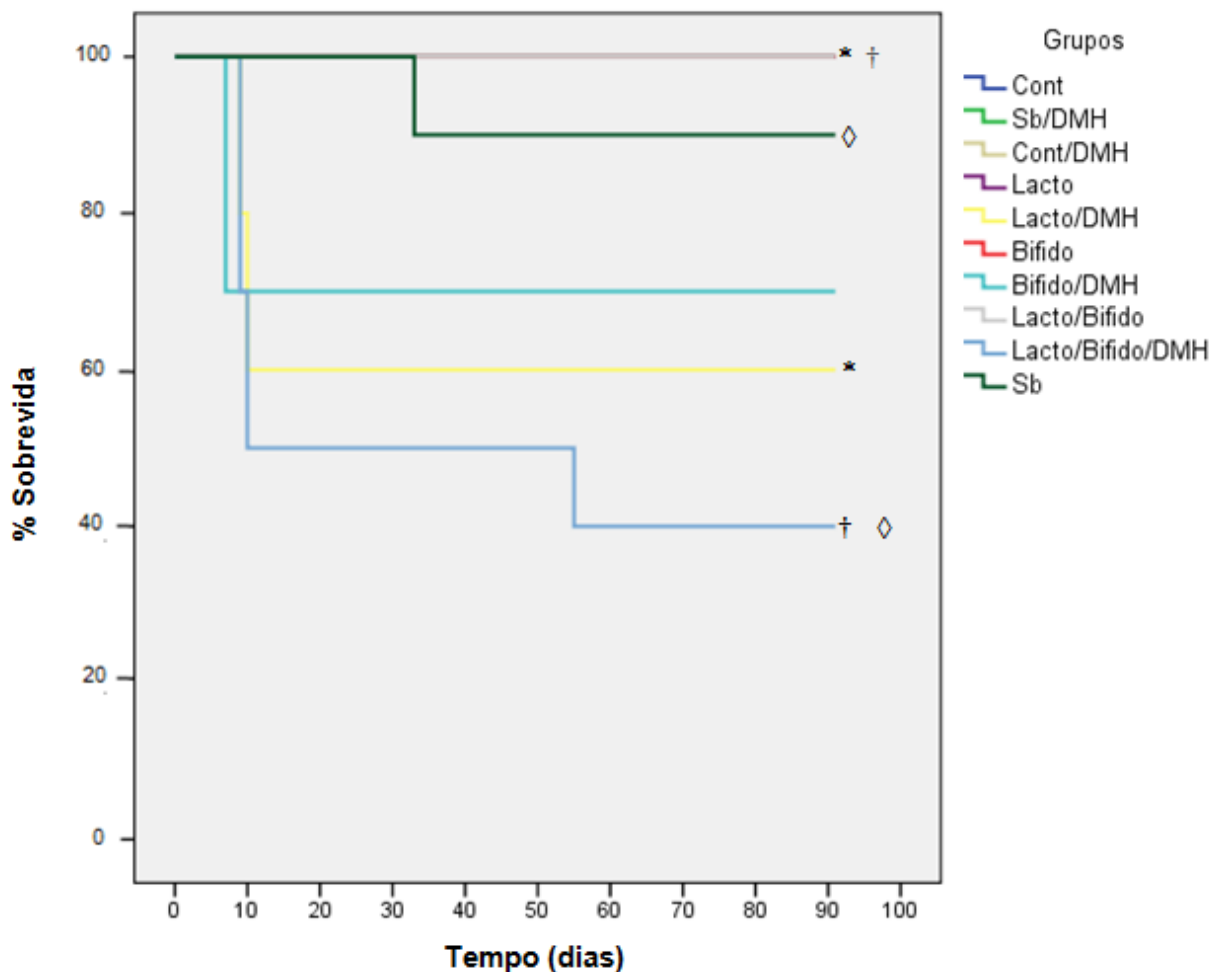


Figura 4 - Sobrevivência de camundongos dos grupos Cont, Cont/DMH, Lacto, Lacto/DMH, Bifido, Bifido/DMH, Lacto/Bifido, Lacto/Bifido/DMH, Sb e Sb/DMH. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparação das curvas por log-rank ($p < 0,05$). Símbolos iguais indicam diferença significativa. As cores que não aparecem no gráfico correspondem aos grupos que não apresentaram mortalidade e estão representados pela linha cinza.

5.3 TRANSLOCAÇÃO DOS PROBIÓTICOS

A Figura 5 mostra a translocação microbiana para os linfonodos mesentéricos (LM), baço e fígado dos animais de cada grupo. No grupo Cont, não foram detectados microrganismos em nenhum dos órgãos avaliados. Já no grupo Cont/DMH, ocorreu translocação para os LM de três animais (10^4 UFC/g de órgão) e para o baço e o fígado de um animal (10^1 UFC/g de órgão).

Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 foi encontrado apenas nos LM de um animal (10^2 UFC/g de órgão) do grupo Lacto, enquanto no grupo Lacto/DMH foi observada translocação para os LM de cinco dos seis animais (10^5 UFC/g de órgão) e para o baço (10^5 UFC/g de órgão) e fígado (10^3 UFC/g de órgão) de dois deles.

B. animalis var. *lactis* Bb12 translocou para os LM de quatro dos seis animais (10^4 UFC/g de órgão) e para o fígado de um animal (10^3 UFC/g de órgão) do grupo Bifido. No grupo tratado com a bifidobactéria e o DMH, a bactéria foi detectada nos LM de todos os animais em nível elevado (10^6 UFC/g de órgão) e também no baço (10^3 UFC/g de órgão; quatro dos seis animais) e no fígado (10^3 UFC/g de órgão; cinco dos seis animais).

No grupo Sb, *S. boulardii* foi detectada apenas nos LM de um animal (10^2 UFC/g de órgão). No Sb/DMH, a levedura foi encontrada em níveis baixos nos LM de dois animais (10^3 UFC/g de órgão) e no fígado (10^2 UFC/g de órgão) e no baço de um dos seis animais analisados (10^2 UFC/g de órgão).

No momento da análise de translocação, nenhum animal encontrou-se visivelmente debilitado como aqueles que morreram durante o estudo (pouca mobilidade; respiração difícil; cauda, orelhas e focinho arroxeados).

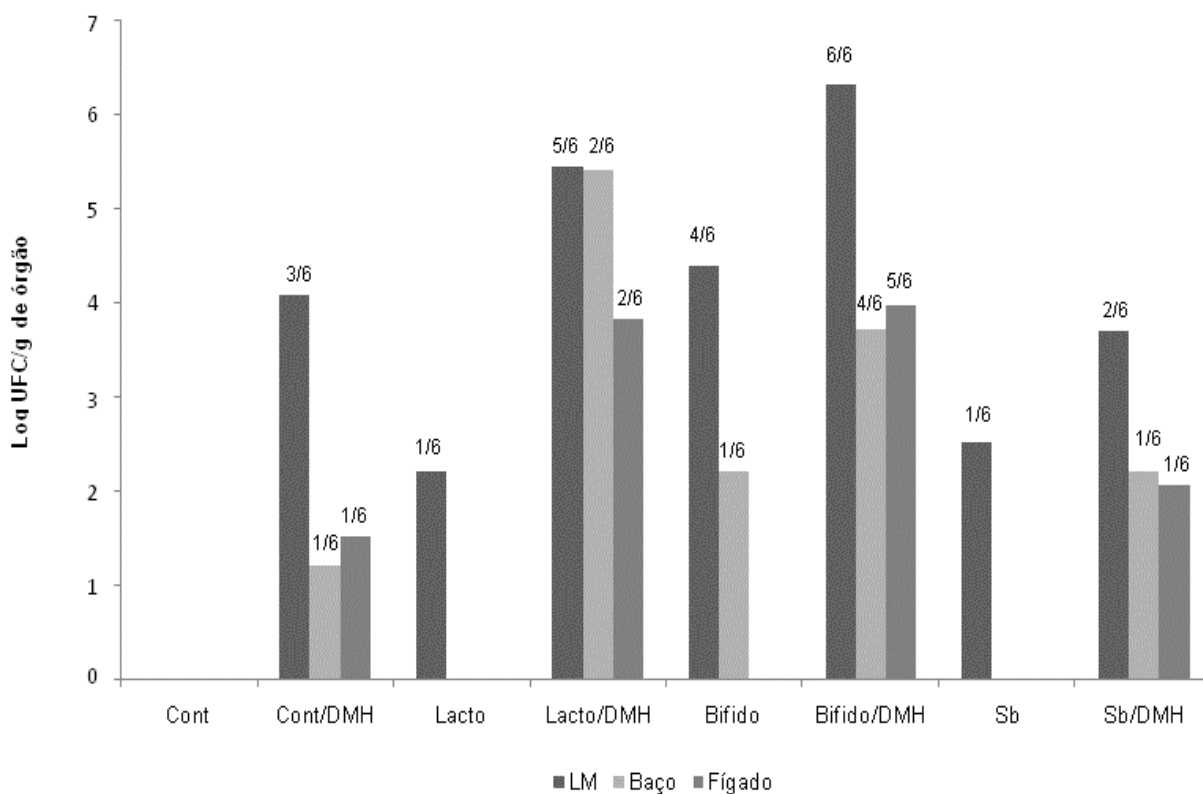


Figura 5- Translocação microbiana para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado dos camundongos dos grupos Cont, Cont/DMH, Lacto, Lacto/DMH, Bifido, Bifido/DMH, Sb e Sb/DMH dois dias após a primeira administração de DMH ou solução salina. Os resultados são expressos como intensidade (média dos níveis populacionais microbianos/g de órgão) e frequência (número de animais positivos para a presença de bactérias nos órgãos/número total de animais) da translocação.

5.4 ANÁLISE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

A tabela 3 mostra o número total de FCA obtido pela média dos números encontrados pelos observadores. Todos os animais tratados com DMH apresentaram focos de criptas aberrantes (Figura 6). Entretanto, alguns focos também foram encontrados nos grupos não tratados com a droga. Porém, foi observada diferença significativa entre os grupos Cont/DMH e Cont ($p < 0,05$). Entre os tratados com a droga, Lacto/DMH e Bifido/DMH apresentaram número menor de FCA do que o grupo Cont/DMH ($p < 0,05$). Já o consumo das bactérias associadas (Lacto/Bifido/DMH) e da levedura (Sb/DMH) não provocou diferença significativa no número total de FCA em relação ao grupo Cont/DMH.

Tabela 3 - Número total de focos de criptas aberrantes

	N	Média ± DP	
Cont	5	3,07*	0,52
Cont/DMH	10	62,00	7,94
Lacto	5	4,66	1,24
Lacto/DMH	11	27,43*	4,50
Bifido	5	0,39	0,42
Bifido/DMH	12	34,04*	7,77
Lacto/Bifido	5	2,12	1,19
Lacto/Bifido/DMH	9	81,04	24,93
Sb	5	0,75	0,74
Sb/DMH	10	58,2	4,47

n= número de animais por grupo; DP=desvio padrão.
Teste t de Student. * p<0,05 comparado ao grupo Cont/DMH.

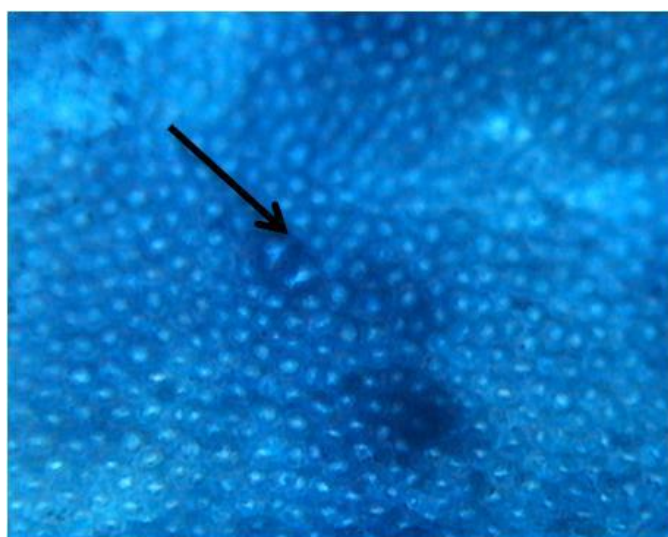


Figura 6- Foco com duas criptas aberrantes.

O percentual de redução dos FCA foi de 55,75% no grupo Lacto/DMH, 45,09% no Bifido/DMH e 6,12% no Sb/DMH. O grupo Lacto/Bifido/DMH não apresentou redução dos FCA (Figura 7).

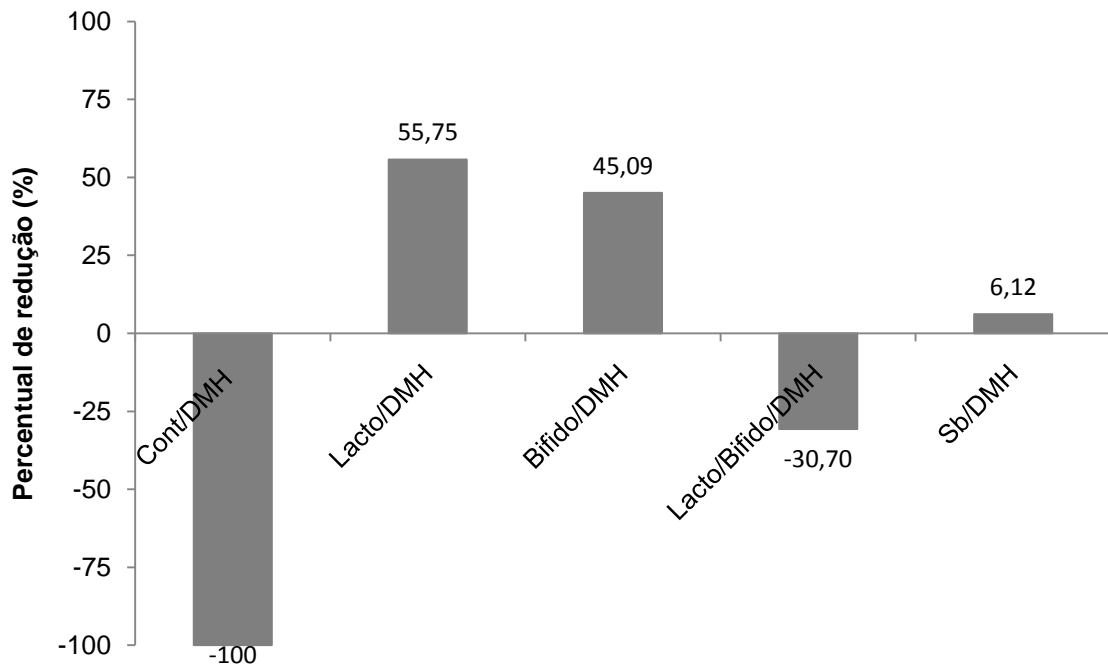


Figura 7- Percentual de redução dos focos de criptas aberrantes.

5.4.1 Características dos focos de criptas aberrantes

5.4.1.1 Focos com três ou menos criptas aberrantes

Apenas o grupo tratado com o lactobacilo e o carcinógeno (Lacto/DMH) apresentou número menor de focos contendo três ou menos criptas aberrantes quando comparado ao grupo Cont/DMH, conforme mostrado na tabela 4.

Tabela 4 - Focos com três ou menos criptas aberrantes

	N	Média ± DP	
Cont/DMH	10	58,63	4,01
Lacto/DMH	11	28,01*	6,04
Bifido/DMH	12	56,71	8,92
Lacto/Bifido/DMH	9	79,61	27,4
Sb/DMH	10	58,13	7,87

n= número de animais por grupo; DP= desvio padrão. Teste t de Student. * p <0,05 comparado ao Cont/DMH.

O percentual de redução de focos com três ou menos criptas foi de 52,22% no grupo Lacto/DMH, 3,27% no grupo Bifido/DMH e 0,85% no grupo Sb/DMH. Lacto/Bifido/DMH não apresentou efeito positivo (Figura 8).

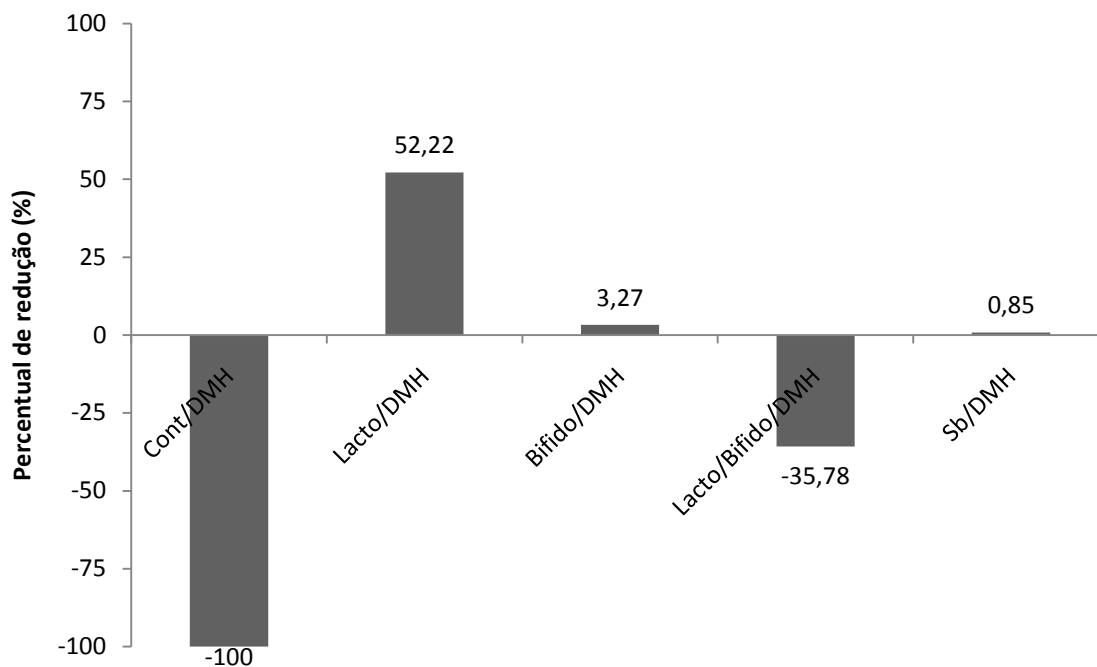


Figura 8 - Percentual de redução dos focos com três ou menos criptas aberrantes.

5.4.1.2 Focos com mais de três criptas aberrantes

Todos os grupos apresentaram maior número de focos contendo três ou menos criptas aberrantes ($p < 0.05$). Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com probióticos e DMH e o grupo Cont/DMH (Tabela 5).

Tabela 5 - Focos mais de três criptas aberrantes

	n	Média ± DP	
Cont/DMH	10	2,23	1,64
Lacto/DMH	11	1,75	0,76
Bifido/DMH	12	0,58	0,48
Lacto/Bifido/DMH	9	2,10	0,96
Sb/DMH	10	1,76	0,66

n= número de animais por grupo; DP= desvio padrão. Teste t de Student. * p<0,05 comparado ao grupo Cont/DMH.

Houve redução de 21,52% dos focos com mais de três criptas aberrantes no grupo Lacto/DMH, 73,99% no Bifido/DMH, 5,80% no Lacto/Bifido/DMH e 21,07% no Sb/DMH (Figura 9).

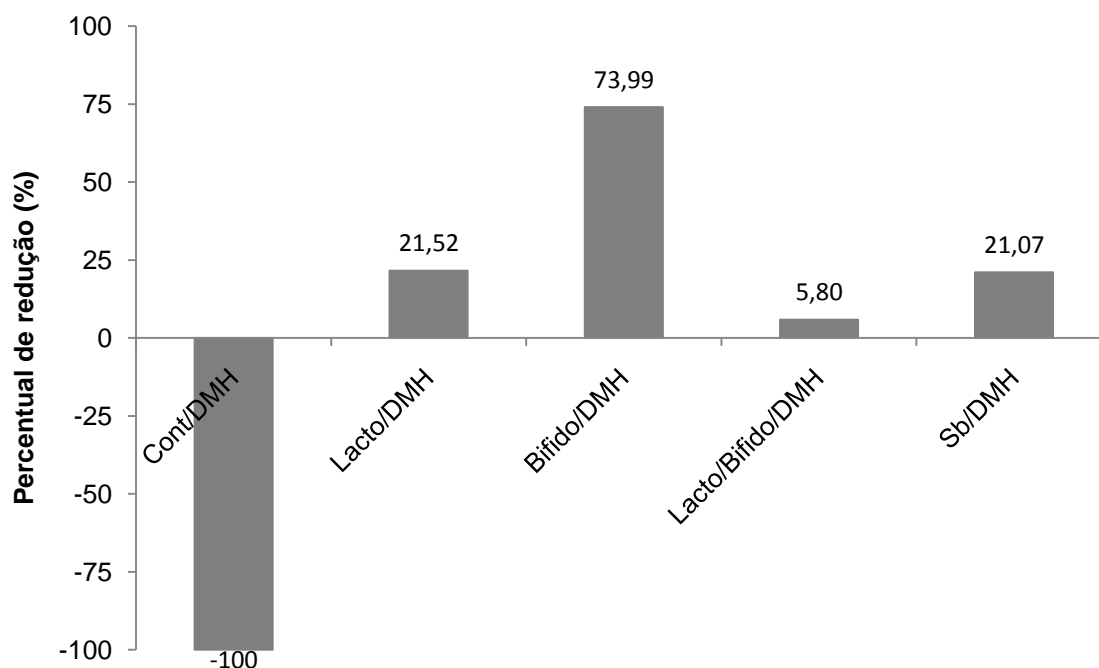


Figura 9 - Percentual de redução dos focos com mais de três criptas aberrantes.

5.4.1.3 Focos de criptas aberrantes por região do cólon

No grupo Cont/DMH, foi observado maior número de FCA na regiões medial e distal. Os grupos Lacto/DMH e Sb/DMH apresentaram números maiores na região proximal e medial, enquanto que no grupo lacto/bifido/DMH houve predominância na região distal. Por outro lado, no grupo Bifido/DMH a distribuição das criptas aberrantes foi idêntica em todas as regiões do cólon (Tabela 6).

Tabela 6 - Focos de criptas aberrantes por região do cólon

		Cont/ DMH	Lacto/ DMH	Bifido/ DMH	Lacto/ Bifido DMH	Sb/ DMH
P	Média	10,5*	12,1	16,4	19,24	26,24
	DP	1,13	0,62	0,79	8,31	3,62
M	Média	21,7	10,1	18,14	22,14	15,05
	DP	3,74	1,25	3,05	0,66	1,22
D	Média	24,9	5,08*	16,47	30,65*	15,06*
	DP	3,4	3,25	5,4	1,37	1,28

P= proximal; M= medial; D= distal; DP= desvio padrão. ANOVA one way e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.

* p<0,05 comparada às outras regiões do intestino grosso.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou como limitação o período de tratamento relativamente longo, necessário para o modelo experimental de câncer de cólon, o que inviabilizou a administração dos probióticos por gavagem. Por esse motivo os microrganismos foram administrados na água, e consequentemente, isso impossibilitou a quantificação exata dos níveis ingeridos. Além disso, outra limitação importante foi a grande mortalidade ocorrida após a primeira dose de DMH, o que interferiria no tamanho da amostra e impactaria nas análises estatísticas. Assim, após algumas repetições do experimento, a persistência desse fato levou à necessidade de utilizar maior número de animais nos grupos afetados (experimento 1 e 2), proporcionando a quantidade suficiente para essas análises. Entretanto, no experimento 2 não houve mortalidade, o que ocorreu provavelmente devido à impossibilidade de administração dos probióticos nesses animais no dia da primeira aplicação da droga, como consequência de impedimento por condições meteorológicas. Por esse motivo, apenas os dados de mortalidade do experimento 1 (que foram semelhantes ao estudo piloto) foram considerados para a análise.

Os grupos que apresentaram mortalidade foram os tratados simultaneamente com o carcinógeno e os probióticos *L. delbrueckii* UFV-H2B20 e *B. animalis* var. *lactis* Bb12. A sobrevivência dos animais dos outros grupos sugere que provavelmente a causa do óbito tenha sido consequente à associação daqueles probióticos com a droga. Porém, outros trabalhos experimentais que usaram substância química indutora de câncer de cólon e probióticos não descreveram qualquer taxa de mortalidade após a primeira dose de DMH (CHALLA et al., 1997; OHKAWARA et al., 2005; SIVIERI et al., 2008). Assim, com o intuito de avaliar a possibilidade de infecção pelos probióticos associados ao uso de DMH como a causa do óbito, a translocação microbiana foi avaliada. O termo translocação é definido como a passagem de microrganismos viáveis do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais ou tecidos (WOLOCHOW et al., 1966). Para BERG (1995), a translocação bacteriana ocorre em três estágios: no primeiro, a bactéria transpõe a mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos (LM); no segundo, a bactéria migra dos LM para outros órgãos como fígado, baço, pulmões e rins; e no terceiro e último estágio, a bactéria se dissemina pela cavidade peritoneal e sangue, provocando sepse. Nossos resultados mostraram que o grupo que não recebeu nenhum tratamento (Cont) não apresentou translocação. Em camundongos saudáveis, a microbiota fisiológica transloca continuamente em baixas taxas através da mucosa intestinal, porém é morta pelas defesas imunológicas do hospedeiro durante seu trânsito pela lâmina própria intestinal e *in situ* nos órgãos

reticuloendoteliais, como linfonodos mesentéricos (BERG, 1999). Em todos os grupos suplementados com probióticos não submetidos a aplicações de DMH, a translocação ocorreu em poucos animais, em pequena quantidade e principalmente para os LM. Segundo BERG (1999), lactobacilos normalmente povoam o trato gastrointestinal em níveis altos (10^7 a 10^9 /g de conteúdo intestinal) e translocam “espontaneamente”. As bactérias anaeróbias obrigatórias indígenas são detectadas raramente nos linfonodos mesentéricos de camundongos saudáveis, apesar de se encontrarem em níveis muito altos como 10^{10} a 10^{11} /g de conteúdo intestinal. Assume-se que anaeróbios obrigatórios cruzam a barreira intestinal como as bactérias facultativas, mas são provavelmente mortos mais facilmente nos sítios extra-intestinais devido à sensibilidade ao oxigênio. Porém *B. animalis* var. *lactis* Bb12 tolera o oxigênio por algum tempo. SILVA (2002) detectou a mesma bactéria nos LM de cinco dos cinco camundongos gnotobióticos monoassociados por 10 dias, na concentração de 10^3 UFC/g de órgão. Já a levedura *S. boulardii* não translocou para os LM, fígado, rins, pulmões e coração em camundongos que a receberam na água de beber durante 70 dias (BLEHAUT et al., 1989). Segundo MCFARLAND E BERNASCONI (1993), tem possibilidade praticamente inexistente de translocação em condições normais, uma vez que a levedura não coloniza o cólon.

Para um probiótico e para os componentes da microbiota indígena, é importante que ocorra leve translocação (10^1 até 10^3 UFC/g), de preferência para os LM, para que haja contato entre o microrganismo e o sistema imunológico do hospedeiro, sem o qual não haveria efeito imunomodulador (FILHO, 1996). Porém, acima de 10^4 UFC/g de órgão e quando atinge o fígado e o baço, a translocação não é mais fisiológica e passa a ser patológica. Segundo BERG (1992), a translocação patológica pode ocorrer por três motivos: quando a população de certas bactérias intestinais alcança níveis anormalmente elevados, quando o sistema imunológico se encontra de alguma maneira comprometido, e quando a mucosa intestinal, que funciona como barreira, está fisicamente alterada. Além destes, fatores ambientais como dieta, estresse e outros podem alterar o balanço microbiano no trato gastrointestinal, promovendo também a translocação. Em nosso estudo, foi observado que a administração de DMH aumentou a translocação dos microrganismos para os LM, baço e fígado. Isso pode ter ocorrido devido à resposta orgânica ao estresse provocado pela droga, um agente agressor da homeostase do animal. O organismo responde liberando mediadores inflamatórios (por exemplo, TNF- α , IL -1 e IL m-6) que liberam substratos para impedir a invasão de patógenos. Concomitantemente, há a resposta anti-inflamatória compensatória

(CARS). Os dois fenômenos impactam na imunidade, influenciando o processo infeccioso secundário. Além disso, o estado hipermetabólico da resposta ao estresse causa perda da integridade da barreira da mucosa (MANNICK et al., 2001). Visto isso, pode-se sugerir que o aumento da translocação ocorreu devido à supressão da resposta imunológica e ao aumento da permeabilidade da mucosa provocados pela aplicação da droga. Ademais, os altos níveis microbianos presentes no intestino, decorrentes da suplementação dos probióticos, podem ter contribuído também para este evento. Os níveis mais elevados de microrganismos nos tecidos extra-intestinais foram observados nos grupos tratados com lactobacilo e bifidobactéria, que foram também aqueles que apresentaram mortalidade. Quando a microbiota intestinal, suas toxinas e/ou seus produtos ultrapassam a barreira intestinal e não são eliminadas pelo sistema imunológico, ocorre a liberação de moléculas mediadoras da resposta inflamatória (citocinas, hormônios, fatores de crescimento e quimiotáticos). Essas produzem cascata de eventos que progressivamente, em determinadas situações clínicas, poderão levar a sepse, insuficiência múltipla de órgãos e sistemas e, morte (MACFIE et al., 1999). O grupo tratado simultaneamente com *S. boulardii* e DMH teve menores níveis de translocação e menos animais afetados quando comparado aos grupos tratados com as bactérias e a droga. Uma explicação para isso pode ser o tamanho da levedura que é superior ao das bactérias (KRASILCHIK et al., 2001), o que dificulta a passagem da mesma para tecidos extra-intestinais.

A determinação da translocação dos grupos Lacto/Bifido e Lacto/Bifido/DMH não foi realizada devido à dificuldade de separação das bactérias administradas. Isso porque nas amostras dos órgãos incorporadas em ágar e mantidas em aerobiose, cresceria somente o lactobacilo. Já naquelas mantidas em anaerobiose, cresceria tanto a bifidobactéria, que é anaeróbia, quanto o lactobacilo, que é microaerófilo. Apesar disso, conforme foi visto nos grupos Lacto/DMH e Bifido/DMH, provavelmente o grupo Lacto/Bifido/DMH também apresentou translocação das bactéria para o fígado e o baço. Isso pode ter ocorrido principalmente pelo fato de que os animais desse grupo receberam o dobro da quantidade de bactérias administradas aos outros animais que as receberam separadamente (Lacto/DMH e Bifido/DMH). Esse fato explicaria a maior mortalidade ocorrida no grupo Lacto/Bifido/DMH em comparação aos que receberam apenas um tipo de bactéria. Não há na literatura trabalhos que investigaram a translocação dos probióticos após a aplicação do DMH.

É importante salientar que no momento do teste de translocação, nenhum dos animais utilizados se apresentou debilitado como os outros que morreram durante o

estudo. É possível que nesses animais que não sobreviveram, níveis ainda maiores de bactérias tenham atingido os tecidos extra-intestinais (níveis letais são geralmente em torno de 10^7 UFC/g). Outro fato importante é que a translocação para o baço e o fígado não ocorreu em todos os animais analisados e atingiu níveis diferentes entre os animais do mesmo grupo. Os camundongos *Swiss* não são isogênicos e portanto, alguns podem ser mais resistentes do que os outros. Isso pode ser uma justificativa para o óbito de apenas parte dos animais que receberam o mesmo tratamento.

Além da translocação, as aplicações de DMH também parecem ter influenciado o aumento de peso dos animais. Em conformidade com os nossos resultados, LEE & LEE (2000) observaram que os animais tratados com azoximetano encontraram-se mais pesados do que os controles, porém a diferença não foi significativa. O maior peso dos animais submetidos a essa droga pode ser também uma consequência da resposta orgânica ao estresse. Após a fase de catabolismo, é iniciado o anabolismo com recuperação da ingestão alimentar e consequente ganho de peso.

Na análise da mucosa intestinal, a presença de maior número de FCA nos grupos submetidos a aplicações de DMH foi observada, comprovando a eficácia do modelo de carcinogênese. No entanto, esses também foram encontrados em pequeno número em alguns animais dos grupos submetidos a droga. Esse resultado contrasta com outros trabalhos da literatura que não observaram nenhum FCA nos grupos controle (ROWLAND et al., 1998; BOLOGNANI et al., 2001; PARK et al., 2007; SIVIERI, et al., 2008). Como o grupo Cont também apresentou FCA, pode-se assumir que os microrganismos utilizados não foram o fator indutor da formação de criptas aberrantes. É importante considerar que a análise foi realizada por observadores treinados, porém a contagem pode ter sido superestimada já que esta é uma análise subjetiva. Além disso, segundo OLIVEIRA et al. (2001), os animais raramente desenvolvem o câncer espontaneamente.

Entre os diferentes tratamentos com probióticos, apenas a suplementação com *L. delbrueckii* UFV-H2B20 e com *B. animalis* var. *lactis* Bb12 reduziu a formação de FCA. Resultado semelhante de proteção contra a carcinogênese pelo consumo de bifidobactéria foi observado por ABDELALI et al. (1995). Esses autores verificaram que ratos tratados com DMH e dieta contendo *B. longum* apresentaram 63% de redução do número total de criptas aberrantes por cólon. Efeito positivo também ocorreu com a suplementação de *L. casei* Shirota que diminuiu o número de FCA e de tumores em animais tratados com azoximetano (YAMAZAKI et al., 2000). Já foi demonstrado que a ingestão de bactérias do ácido láctico reduz o dano ao DNA induzido por substâncias

químicas (POOL-ZOBEL et al., 1996). Segundo ROWLAND et al. (1998), essas bactérias influenciam o processo de carcinogênese em vários pontos, o que aumenta o potencial e a efetividade na prevenção do câncer. O lactobacilo inibiu consideravelmente o número total de FCA e aqueles contendo três ou menos criptas. Já a bifidobactéria induziu inibição apenas do número total de FCA, embora tenha havido redução de 70% daqueles contendo mais de três criptas aberrantes. Contudo, a diferença em relação ao grupo Cont/DMH não foi significativa. Segundo PRETLOW et al. (1991), FCA são lesões pré-neoplásicas detectáveis precocemente no desenvolvimento do câncer de cólon. As características, como o número de criptas, auxiliam na identificação das alterações celulares e moleculares geradoras do tumor e a quantificar a evolução das alterações que ocorrem com o tempo na carcinogênese. Os focos com múltiplas criptas parecem ser mais resistentes à morte celular por apoptose quando comparados aos focos menores (com três ou menos criptas) (BIRD, 1995) e as evidências sugerem que FCA maiores (com quatro ou mais criptas) são mais preditivos de incidência tumoral. No presente estudo, todos os grupos analisados apresentaram maior número de focos com três ou menos criptas aberrantes. Isso ocorreu devido ao período de tempo utilizado, que foi de 14 semanas. Já foi demonstrado que a multiplicidade das criptas, ou seja, o número de criptas por foco, aumenta com o tempo (BIRD, 1987; ROWLAND, 1998). Em decorrência disso, estudo adicional está sendo feito para verificar o efeito desses probióticos após 20 semanas de tratamento.

Ao contrário de outros trabalhos que mostraram inibição da carcinogênese pelo consumo da mistura de lactobacilo e bifidobactéria (MCINTOSH et al., 1999; LEE & LEE, 2000), no presente estudo não foi observado efeito positivo da combinação de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 e *B. animalis* var. *lactis* Bb12. Os estudos citados utilizaram 10^9 UFC/mL da mistura das bactérias. Nesses, houve efeito benéfico, porém, o resultado não foi melhor do que observado com o uso das bactérias isoladas. Diferente desse estudo, nós utilizamos na mistura 10^8 UFC/mL de cada bactéria para verificar se o consumo de quantidade maior exerceria melhores efeitos do que o uso isolado e, melhores do que a mistura em pequena quantidade. Como não houve efeito positivo, pode-se sugerir que a combinação dos probióticos não inibiu as lesões pré-neoplásicas em decorrência da dose utilizada neste estudo.

O tratamento com *S. boulardii* também não reduziu significativamente a formação de focos de criptas aberrantes. Níveis baixos de translocação da levedura podem estar relacionados a esse resultado. Como foi citado anteriormente, alguma

passagem do microrganismo para tecidos extra-intestinais é importante para estimular a resposta imunológica. Estímulo esse que é um dos possíveis mecanismos envolvidos na inibição da carcinogênese pelos probióticos. Além disso, a dose também pode ter influenciado esse resultado. FILHO (1996) observou que dose menor de *S.bouardii* exerceu melhor efeito na translocação bacteriana e no tempo de sobrevivência de camundongos tratados com ciclofosfamida em relação a animais tratados com doses maiores. Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliaram o efeito anti-carcinogênico da levedura.

A localização dos FCA também é uma característica importante. No nosso estudo, foram observados números maiores de FCA na região distal apenas nos grupos Cont/DMH e Lacto/Bifido/DMH. De acordo com a literatura, tanto no cólon humano quanto no cólon animal, os FCA são mais frequentemente localizados nas partes distais do que nas proximais, o que está em conformidade com o que ocorre no câncer colorretal (KOO & RAO, 1991; SHPITZ et al., 1998; JACKSON et al., 1999; REDDY, 1999; RODRIGUES et al., 2002)

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pôde-se concluir que:

- *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e de *B. animalis* var. *lactis* Bb12 quando utilizados isoladamente tiveram efeito positivo na inibição de lesões pré-neoplásicas no cólon. O total de FCA foi reduzido em ambos os tratamentos, porém o número de focos com três ou menos criptas foi menor apenas no grupo que recebeu o lactobacilo. Em todos os grupos submetidos à droga, três ou menos criptas aberrantes foram observadas em maior quantidade. Apenas os grupos Cont/DMH e Lacto/Bifido/DMH apresentaram a maior parte dos FCA na região distal;
- a administração de DMH favoreceu o aumento de peso dos animais, mas não o consumo de ração;
- grupos submetidos a injeções de DMH e administração dos probióticos *L. delbrueckii* UFV-H2B20 e *B. animalis* var. *lactis* Bb12 apresentaram maior mortalidade.
- a administração de DMH favoreceu a translocação dos microrganismos para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado. Essa ocorreu em níveis mais elevados e em maior número de animais nos grupos submetidos a aplicações de DMH e a administração dos probióticos *L. delbrueckii* UFV- H2B20 e *B. animalis* var. *lactis* Bb12;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELALI, H.; CASSAND, P.; SOUSSOTTE, V.; DAUBEZE, M.; BOULEY, C.; NARBONNE, J. Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*, v. 24, p. 121–132, 1995.
- ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRUN, I.U. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* V. 83, p. 1946-1951, 2000.
- AGOSTINHO, S.M.M. Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo in vitro e efeito de métodos de preservação em sua atividade. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 1988. (Dissertação, Mestrado).
- ASAHARA, T.; SHIMIZU, T.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Imm.*, v. 72, p. 2240-2247, 2004.
- BAE, E.A.; MYUNG, J.H.; SONG, M.J.; KIM, D.H. Purification of rotavirus infection-inhibitory protein from *Bifidobacterium breve* K-110. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 12, p. 553-556, 2002.
- BAI, A.P.; OUYANG, Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgrad. Med. J.*, v. 82, p. 376-382, 2006.
- BEAUGERIE, L.; PETIT, J.C. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 18, p. 337-352, 2004.
- BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; TEIXEIRA, V.R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D. L. *Dieta, nutrição e câncer*. São Paulo: Atheneu, 2006, 79-87 p.
- BERG, R.D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman e Hall, 1992, 55-85 p.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.*, v. 3, p. 149-154, 1995.
- BERG, R.D. Translocation of microbes from the intestinal tract. In: Tannock, G.W. Medical importance of the normal microflora. London: Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 338-370.
- BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 566 p.
- BERRADA, N.; LEMELAND, J.F.; LAROCHE, G.; THOUVENOT, P.; PIAIA, M. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 409-413, 1991.
- BILLOO, A.G.; MEMON, M.A.; KHASKHELI, S.A.; MURTAZA, G.; IQBAL, K.; SHEKHANI, M.S.; SIDDIQI, A.Q. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in

- management and prevention of 70âncer7070. *World J. Gastroenterol.*, v. 12, p. 4557-4560, 2006.
- BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters*, v. 37, p.147-151, 1987.
- BIRD, R.P.; Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon 70cancer. *Cancer Letters*, v. 93, p. 55-71, 1995.
- BIRD, R. P.; GOOD, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol. Lett.*, v. 112-113, p. 395-402, 2000.
- BLEHAUT, H.; MASSOT, J.; ELMER, G.W.; LEVY, R.H. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm. Drug Dispos.*, v. 10, p. 353-64, 1989.
- BLEICHNER, G.; BLEHAUT, H.; MENTEC, H.; MOYSE, D. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intensive Care Med.*, v. 23, p. 517-523, 1997.
- BODDY, A.V.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; LEVY, R.H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm. Res.*, v. 8, p. 796-800, 1991.
- BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C.J.; POOL-ZOBEL, B.L.; ROWLAND, I.R. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. *Eur. J. Nutr.*, v. 40, p. 293-300, 2001.
- BORN, P.; LERSCH, C.; ZIMMERHACKL, B.; CLAASSEN, M. The *Saccharomyces boulardii* therapy of HIV-associated diarrhea. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v. 118, p. 765, 1993.
- BORRIELLO, S. P.; HAMMES, W.P.; HOLZAPFEL, W.; MARTEAU, P.; SCHREZENMEIR, J.; VAARA, M.; VALTONEN, V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, p. 775-780, 2003.
- BOTTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. *Biochimie*, v. 70, p. 303-315, 1988.
- BOUTRON, M.C.; FAIVRE, MARTEAU, P.; COUILLAULT, C.; SENESSE, P.; QUIPOURT, V. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *Br. J. Cancer.*, v. 74, p. 145-151, 1996.
- BRADY, L.J.; GALLAHER, D.D.; BUSTA, F.F. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J. Nutr.*, v. 130, p. 410S-414S, 2000.
- BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 564-568, 1998.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=7>. Acesso em: 10 out. 2007.
- BROWN, A.C.; VALIERE, A. Probiotics and Medical Nutrition Therapy. *Nutr. Clin. Care*, v. 7, p. 56-68, 2004.
- BURNS, A.J.; ROWLAND, I.R. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v. 1, p. 13-24, 2000.
- BUTS, J.P.; BERNASCONI, P.; VAERMAN, J.P.; DIVE, C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig. Dis. Sci.*, v. 35, p. 251-6, 1990.
- BUTS, J.P.; KEYSER, N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig. Dis. Sci.*, v. 51, p. 1485-1492, 2006.
- CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? *Br. J. Nutr.*, v. 88, p. S165-S176, 2002.
- CASSONE, M.; SERRA, P.; MONDELLO, F.; GIROLAMO, A.; SCAFETTI, S.; PISTELLA, E.; VENDITTI, M. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, 5340-5343, 2003.
- CASTRO, L.A.; ROVETTO, C. Probióticos: utilidade clínica. *Colombia Médica*, v. 37, p. 308-314, 2006.
- CESARO, S.; CHINELLO, P.; ROSSI, L.; ZANESCO, L. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Support, Care Cancer*, v. 8, p. 504-505, 2000.
- CHALLA, A.; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; SHACKLEFORD, L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 517-521, 1997.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Intern. J. Food Microbiol.*, v. 35, p. 1-27, 1997.
- CHENG, L.; LAI, M.-D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, v. 9, p. 2642-2649, 2003.
- CHERMESH, I.; ELIAKIM, R. Probiotics and the gastrointestinal tract: Where are we in 2005? *World J. Gastroenterol.*, v.12, p. 853-857, 2006.

- COBURN, M.C.; PRICOLO, V.E.; SODERBERG, C.H. Factors affecting prognosis and management of carcinoma of the colon and rectum in patients more than eighty years of age. *J. Am. Coll. Surg.*, v. 179, p. 65-69, 1994.
- COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat. Res.*, v. 591, p. 276-289, 2005.
- COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. *Ciênc. Rur.*, v. 34, 2004.
- CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Curr Issues Intest. Microbiol.*, v. 4, p. 9-20, 2003.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 26, p. 767-778, 2007.
- DALMASSO, G.; COTTREZ, F.; IMBERT, V.; LAGADEC, P.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D.; GROUX, H.; FOUSSAT, A.; BRUN, V. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC- infected T84 cells. *Res. Microbiol.*, v.157, p. 456-465, 2006.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p. 2854-2864, 1994.
- EDENS, F.W.; PARKHURST, C.R.; CASAS, I.A.; DOBROGOSZ, W.J. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poultry Sci.*, v. 76, p. 179-196, 1997.
- EDWARDS, C.A.; PARRET, A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br. J. Nutr.*, v. 88, p. S11-S18, 2002.
- ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, v. 30, p. 837-854, 2001.
- FANARO, S.; CHIERICI, R.; GUERRINI, P.; VIGI, V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.*, v. 441, p. 48-55, 2003.
- FAO/WHO Expert Consultation: "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food" London, Ontario (Canada), 2002.
- FARBER, E.; SARMA, D.S.R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Lab. Invest.*, v. 56, p. 4-22, 1987.
- FAVIER, C.F.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, 219-226, 2002.
- FILHO, L.A.P. Efeito da administração oral de diferentes doses do *Saccharomyces boulardii* a camundongos convencionais tratados com ciclofosfamida, em relação à sobrevivência, perda de peso, translocação bacteriana e alterações histológicas no íleo

- terminal, fígado e baço. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG. 1996. P. 131. (Tese, Doutorado em Medicina).
- FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, v. 9, p. 231-242, 2003.
- FULLER, R. Probiotics- *The Scientific Basis*. New York: Chapman & Hall, 1992. P. 1-8.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Critical review. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Amer. Inst. Nutr.*, p. 1401-1412, 1995.
- GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.*, v.130, p.391S-394S, 2000.
- GILLILAND, S.E.; WALKER, D.K.. Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effect in Humans. *J Dairy Sci*, v. 73, p. 905-911, 1990.
- GIRARD, P.; PANSART, Y.; LORENTE, I.; GILLARDIN, J.M. Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats. *Dig. Dis. Sci.*, v. 48, p. 770-774, 2003.
- GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 64, p. 263-265, 1980.
- GOLDIN, B.R; GORBACH, S.L. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.39, p. 756-611, 1984.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.*, v. 80, p. S203–S207, 1998.
- GOMES, A.M.P., F.X. MALCATA. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 1492-1507, 1998.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v. 360, p.512-518, 2003.
- GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGI, M.; TESTONI, P.A. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, v. 45, p. 1462-1464, 2000.
- GUSLANDI, M.; GIOLLO, P.; TESTONI, P.A. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 15, p. 697-698, 2003.
- HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res.*, v. 18, p. 5023-5044, 1991.

- HAYATSU, H.; HAYATSU, T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett.*, v. 73, p. 173-179, 1993.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 365S–373S, 2001.
- HOPKINS, M.J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G.T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture , 16S Rrna abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, v. 48, p. 198-205, 2001.
- HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. *Food Technol.*, v. 45, p. 74-83, 1991.
- HUSNI, R.N.; GORDON, S.M.; WASHINGTON, J.A.; LONGWORTH, D.L. *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 1048-1055, 1997.
- ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. *Bifidobacterium*: research and development in Japan. *Food technol.*, p. 126-135, 1993.
- ISHIBASHI, N.; YAESHIMA, T.; HAYASAWA, H. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Mal. J. Nutr.*, v. 3, p. 149-159, 1997.
- ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. *Clin. Nutr.*, v. 73, p. 1142S-1146S, 2001.
- ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 444S-450S, 2001.
- ISOLAURI, E. Probiotics for infectious diarrhea. *Gut*, v.52, p. 436-437, 2003.
- JACKSON, P.E; COOPER, D.P.; O'CONNOR, P.J.; POVEY, A.C. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis*, v. 20, p. 509–513, 1999.
- JIANG, T.; MUSTAPHA, A.; SAVAIANO, D. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.*, v. 79, p. 750-757, 1996.
- KAMPMAN, E.; GIOVANNUCCI, E.; VEER, P.V.; RIMM, E.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; KOK, F.J.; WILLETT, W.C. Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am. J. Epidemiem.*, v. 139, p. 16-29, 1994 a.
- KAMPMAN, E.; GOLDBOHM, R.A.; VANDEN BRANDT, P.A.; VAN'T VEER, P. Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Res.*, v. 54, p. 3186-3190, 1994 b.

- KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor response induced by tumor resection in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 16, p. 29-36, 1994.
- KLEESSEN, B.; SYKURA, B.; ZUNFT, H.-J.; BLAUT, M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 65, p. 1397-1402, 1997.
- KOO, M.; RAO, AV. Long-term effect of Bifidobacteria and Neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CF1 mice. *Nutr. Cancer*, v. 16, p. 249-257, 1991.
- KRASILCHIK, M.; RAW, I; MENUCCI, L. A biologia e o homem. São Paulo: EdUSP, 2001. 408p.
- KULKARNI, N.; REDDY, B.S. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 207, p. 278-283, 1994.
- KULP, W.L.; RETTGER, L.F. Comparative study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, v. 9, p. 357-395, 1924.
- LAROIA, S.; MARTIN, H. Bifidobacterium as possible dietary adjuncts in cultured dairy products- a review. *Cult. Dairy Prod. J.*, v. 25, p. 18-22, 1990.
- LE BLANC, A.M.; PERDIGÓN, G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer . *Med. Sci. Monit.*, v. 10, p. 96-104, 2004.
- LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.*, v. 98, p. 1303-1315, 2005.
- LEE, S.-M.; LEE, W.K. Inhibitory effects of lactic acid bacteria (lab) on the azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions. *J. Microbiol.*, v. 38, p.169-175, 2000.
- LEE, J.W.; SHIN, G.J.; KIM, E.H.; KANG, H.E.; YIM, I.B.; KIM, J.Y.; JOO, H.G.; WOO, H.J. Immunomodulatory and antitumor effects *in vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J. Vet. Sci.*, v. 5, p. 41-48, 2004.
- LEE, S.K.; KIM, H.J.; CHI, S.G.; JANG, J.Y.; NAM, K.D.; KIM, N.H.; JOO K.R.; DONG, S.H.; KIM, B.H.; CHANG, Y.W.; LEE, J.I.; CHANG, R. *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells. *Korean J. Gastroenterol.*, v. 45, p. 328-334, 2005.
- LESTIN, F.; PERTSCHY, A.; RIMEK, D. Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple comorbidities. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v. 128, p. 2531-2533, 2003.
- LHERM, T. ; MONET, C. ; NOUGIÈRE, B. ; SOULIER, M. ; LARBI, D. ; LE GALL, C. ; CAEN, D. ; MALBRUNOT, C. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Med.*, v. 28, p. 797-801, 2002.

- LIDBECK, A., NORD, C.E.; GUSTAFSSON, J.-A.; RAFTER, J. Lactobacilli anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur. J. Cancer*, v. 1, p. 341-353, 1992.
- LIÉVIN, 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.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.
- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 24, p. 701-714, 2006.
- MACFIE, J.; O'BOYLE, C.; MITCHELL, C.J.; BUCKLEY, P.M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, v. 45, p. 223-228, 1999.
- MACHADO, D.O.; FERREIRA, C.L. L. F.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, T.T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 2, p. 270-275, 2003.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 69, p. S35- S45, 1999.
- MALLIÉ, M.; NGUYEN VAN, P.; BERTOUT, S.; VAILLANT, C.; BASTIDE, J.-M. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. *J. Mycol. Med.*, v. 11, p. 19-25, 2001.
- MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L.; LEDERER, J.A. The immunologic response to injury. *J. Am. Coll. Surg.*, v. 193, p. 237-244, 2001.
- MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 18, p. 287-298, 2004.
- MARTEAU, P.R. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. S430-S436, 2001.
- MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 6, p. 157-171, 1993.
- MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 12, p. 193-207, 2000.
- MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; PLAYNE, M.J. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague Dawley rats. *Nutr. Cancer*, v. 35, p. 153-159, 1999.

- MCLELLAN, E.A.; BIRD, R.P. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.*, v. 48, p. 6187-6192, 1988.
- MCLELLAN, E. A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. P. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.*, v. 51, p. 5270-5274, 1991.
- MIDTVEDT, T. Microbial bile acid transformation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 27, p.1341–1347, 1974.
- MITSUOKA, T.; KANEUCHI, C. Ecology of the bifidobacteria. *Amer. J. Clin. Nutr.*, v. 30, p. 1799-1810, 1977.
- MITSUOKA, T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, v. 3, p. 11-28, 1984.
- MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, v. 6, 1990.
- MOMBELLI, B.; GISMONDO, M.R. The use of probiotics in medical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 16, p. 531–536, 2000.
- MORI, H.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HIROSE, Y. Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v. 566, p.191-208, 2004.
- MOURA, L.N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-h2b20 against experimental oral infection with *Salmonella 77âncer77* subsp. *77âncer77* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. *Braz. J. Microbiol.*, v. 32, p.66-69, 2001.
- NERSESYAN, A.K. Antigenotoxic action of “narine” lactobacilli in rat colon cells *in vitro*. *Experim. Oncol.*, v. 23, p. 297-298, 2001.
- NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 31, p.1565-1573, 1998.
- NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. *Enferm. Infec. Microbiol.*, v. 15, p. 183-190, 1995.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos y simbióticos: Moduladores Del sistema digestivo. *Ciência Hoy*, v. 13, p. 38-43, 2003.
- OHKAWARA, S.; FURUYA, H.; NAGASHIMA, K.; ASANUMA, N.; HINO, T. Oral administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J. Nutr.*, v. 135, p. 2878-2883, 2005.

- OKADA, H.; MIZUNO, M.; IKEDA, N.; TOMADA, J.; TSUJI, T. Epithelial cell proliferation during colonic chemical carcinogenesis in the rat. *J. Gastroenterol Hepatol.*, v. 11, p. 686-691, 1996.
- OLIVEIRA, E.C.; LEITE, M.S.B.; MIRANDA, J.A.R.; ANDRADE, A.L.S.S.; GARCIA, S.B.; LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, H. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis*, v. 22, p. 737-740, 2001.
- O'MAHONY, L.; FEENEY, M.; O'HALLORAN, S.; MURPHY, L.; KIELY, B.; FITZGIBBON, J.; LEE, G.; O'SULLIVAN, G.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 15, p. 1219-1225, 2001.
- ORRHAGE, K.; BRISMAR, B.; NORD, C.E. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v. 7, p. 17-25, 1994.
- ÖTLES, S.; ÇAGINDI, O.; AKÇIÇEK, E. Probiotics and health. *Asian Pacific. J. Cancer Prev*, v. 4, p. 369-372, 2003.
- PARK, E.; JEON, G.-I.; PARK, J.-S.; PAIK, H.-D. A Probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces dmh induced precancerous lesions in f344 male rat. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 30, p. 569-574, 2007.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer*, v.37, p. S4-S66, 2001.
- PERDIGÓN, G.; VALDEZ, J.C.; RACHID, M. Antitumour activity of yogurt: study of possible immune mechanisms. *J. Dairy Res.*, v. 65, p. 129-138, 1998.
- PERDIGÓN, G.; LOCASCIO, M.; MEDICI, M.; HOLGADO, A.P.R.; OLIVER, G.O. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function *Biocell.*, v. 27, p. 1-9, 2003.
- PETERS, R.K.; PIKE, M.C.; GARABRANT, D.; MACK, T.M. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control*, v. 3, p. 457-473, 1992.
- PITOT, H.C. The molecular biology carcinogenesis. *Cancer*, v. 72, p. 962-970, 1993.
- POMARE, E.W.; BRANCH, W.J.; CUMMINGS, J.H. Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J. Clin. Invest.*, v. 75, p. 1448-1454, 1985.
- POOL-ZOBEL, B.L.; BERTRAM, B.; KNOLL, M.; LAMBERTZ, R.; NEUDECKER, C.; SCHILLINGER, U.; SCHMEZER, P. ; HOLZAPFEL, W. H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastrointestinal tract of rats. *Nutr. Cancer*, v. 20, p. 271-282, 1993.
- POOL-ZOBEL, B.L.; NEUDECKER, C.; DOMIZLAFF, I.; Ji, S.; Schillinger, U.; Rumney, C.; Moretti, M.; Vilarini, I.; Scassellati, S. R. : Rowland, I. *Lactobacillus*- and

- Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer*, v. 26, p.365-380, 1996.
- PRETLOW, T.P.; BARROW, B.J.; ASHTON, W.S.; O'RIORDAN, M.A.; PRETLOW, T.G.; JURCISEK, J.A.; STELLATO, T.A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.*, v. 51, p. 1564-1567,1991.
- QAMAR, A.; ABOUDOLA, S.; WARNY, M.; MICHETTI, P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J.T.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 2762-2765, 2001.
- QUERA, R.; QUIGLEY, E.; MADRID, A.M.S.; El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos ver gastroenterología. *Gastr. Latinoam.*, v. 16, p. 218-228, 2005.
- RAFTER, J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br. J. Nutr.*, v. 88, p. S89-S94, 2002.
- RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 17, p. 849-859, 2003.
- RAFTER, J. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr. Res. Rev.*, v. 17, p. 277-284, 2004.
- RASIC, J.; KUNNAN, J. *Bifidobacteria and their role*. Basel, Boston, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1983, 295 p.
- REDDY, B.S.; NARISAWA, T.; WRIGHT, P.; VUKUSICH, D.; WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.*, v. 35, p.287-290, 1975.
- REDDY, B.S.; RIVENSON, A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.*, v. 53, p. 3914-3418. 1993.
- REDDY, B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.*, v. 129, p. 1478S-1482S, 1999.
- REID, G. Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art of science. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v.2, p. 518-522, 2000.
- REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M.T.; MCCORMICK, J.K. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 16, p. 658- 672, 2003.
- RIJNDERS, B.J.; VAN, W.E.; VERWAEST, C.; PEETERMANS, W.E. *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med.*, v. 26, p. 825, 2000.
- RIQUELME, A.J.; CALVO, M.A.; GUZMAN, A.M.; DEPIX, M.S.; GARCIA, P.; PEREZ, C.; ARRESE, M.; LABARCA, J.A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J. Clin. Gastroenterol.*, v. 36, p. 41-43, 2003.

- ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 71, p. 1682S–1687S, 2000.
- RODRIGUES, A.C.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIERIA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiot mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 1-12, 2000.
- RODRIGUES, M.A.M.; SILVA, L.A.G.; SALVADORI, D.M.F.; CAMARGO, J.L.V.; MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 351-355, 2002.
- ROGERS, A.E; NAUSS, K.M. Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig. Dis. Sci.*, v. 30, p. 87S-102S, 1985.
- ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.*, v. 130, p. 396S-402S, 2000.
- RONCUCCI, L.; MODICA, S.; PEDRONI, M.; TAMASSIA, M.G.; GHIDONI, M.; LOSI, L.; FANTE, R.; DI GREGORIO, C.; MANENTI, A.; GAFA, L.; PONZ DE LEON, M. Aberrant crypt foci in patients with colorectal 80âncer. *Br. J. Cancer*, v. 77, p. 2343-2348, 1998.
- ROWLAND, I.R.; RUMNEY, C.J.; COUTTS, J.T.; LIEVENSE, L.C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 281-285, 1998.
- ROWLAND, I. Probiotics and benefits to human health – the evidence in favour. *Environ. Microbiol.*, v. 1, p. 375-382, 1999.
- RUMNEY, C.J.; ROWLAND, I.R.; COUTTS, T.M.; RANDEATH, K.; REDDY, R.; SHAH, A.B.; ELLUL, A.; O'NEILL, I.K. Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 79-84, 1993.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Ver. Bras. Ciênc. Farm.*, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SAKATA, T.; KOJIMA, T.; FUJIEDA, M.; TAKAHASHI, M.; MICHBATA, T. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro. *P. Nutr. Soc.*, v. 62, p. 73-80, 2003.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M-C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M-C.; ROBERFROID, M.B.; ROWLAND, I.R. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*, v. 80, p. 147-171. 1998.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, v. 61, p. 91-99, 2003.

- SAVAGE, D.C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Technol.*, v. 7, p. 82-87, 1987.
- SAXELIN, M.; CHUANG, N.H.; CHASSY, B.; RAUTELIN, H.; MÄKELÄ, P.H.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, p. 564-566, 1996.
- SCARPIGNATO, C.; RAMPAL, P. Prevention and treatment of traveler's diarrhea: a clinical pharmacological approach. *Chemotherapy*, v. 41, p. 48-81, 1995.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 361-364, 2001.
- SHAHIDI, F.; MENDOSA, A.F.; BOYLSTONE, T.; MOHEBBI, M. A perception to survival of *Bifidobacterium* spp. In bioyoghurt, simulated gastric juice and bile solution. *World Appl. Sci. J.*, v. 3, p. 40-44, 2008.
- SHANAHAN, F. Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 6, p. 107-15, 2000.
- SHANAHAN, F. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads to fantasy to facts and future. *Br. J. Nutr.*, v. 88, p. S5-S9, 2002.
- SHPITZ, B.; BOMSTEIN, Y.; MEKORI, Y.; COHEN, R.; KAUFMAN, Z.; NEUFELD, D.; GALKIN, M.; BERNHEIM, J. Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum. Pathol.*, v. 29, p. 469-475, 1998.
- SILVA, A.M., BAMBIRRA, E.A., OLIVEIRA, A.L., SOUZA, P.P., GOMES, D.A., VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 86, p. 331-336, 1999.
- SILVA, A.M. Efeito de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em camundongos gnotobióticos e convencionais desafiados por *Salmonella entérica* serov. *Typhimurium*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2002. 111p. (Tese, Doutorado em Microbiologia).
- SILVA, A.M., BARBOSA, F.H.F., DUARTE, R., VIERIRA, L.Q., ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 97, 29-37, 2004.
- SINGH, J.; RIVENSON, A.; TOMITA, M.; SHIMAMURA, S.; ISHIBASHI, N.; REDDY, B.S. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 833-841, 1997.
- SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T. ; BARBISAN, L. F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *J. Eur. Food Res. Technol.*, v. 228, p. 231-237, 2008.

- SMITH, S.; VAUGHAM, E.E.; DE VOS, W.M. Quorum sensing within the gut. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, v. 2, p. S81-S92, 2000.
- SOUGIOULTZIS, S.; SIMEONIDIS, S.; BHASKAR, K.R.; CHEN, X.; ANTON, P.M.; KEATES, S.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 343, p. 69-76, 2006.
- SOUZA, C.A.I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. *Arq. Inst. Biol.*, v.67, p. 275-281, 2000.
- SUGIYAMA, K.; ODA, Y.; OTORI, K.; KATO, S.; HASEBE, T.; FUJII, T.; TAJIRI, H.; ESUMI, H. Induction of aberrant crypt foci and flat-type adenocarcinoma in the colons of dogs by N-ethyl-NV-nitro-nitrosoguanidine and their sequential changes. *J. Cancer Res.*, v. 88, p. 934-940, 1997.
- SURAWICZ, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea in humans. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 17, p. 775-783, 2003.
- SUSUKI, K.; MEEK, B.; DÓI, Y.; MURAMATSU, M.; CHIBA, T.; HONJO, T.; FAGARASAN, S. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 101, p. 1981-1986, 2004.
- TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; SATO, M.; NOMOTO, K.; MOROTOMI, M.; YOKOKURA, T. Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 188, p. 111-116, 1999.
- TAKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; SATO, M.; NOMOTO, K.; MOROTOMI, M.; YOKOKURA, T. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*, v. 22, p. 599-605, 2001.
- TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.; ROBINSON, R.K. Review article- Microbial and technological aspects of milks fermented by *Bifidobacterium*. *J. Dairy Res.*, v. 62, p. 151-187, 1995.
- TANNOCK, G.W. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 3189-3194, 2004.
- TARANTO, M.P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2336-2340, 1998.
- TLASKALOVÁ-HOENOVÁ, H.; STEPÁNKOVÁ, R.; HUDCOVIC, T.; TUCKOVÁ, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ, R.; KOZÁKOVÁ, H.; ROSSMANN, P.; BÁRTOVÁ, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D.P.; BOROVSÁ, D.; REHÁKOVÁ, Z.; SINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P.; KOKESOVA, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.*, v.15, p. 97-108, 2004.

- TOIVANEN, P.; VAAHTOVUO, J.; EEROLA, E. Influence of Major Histocompatibility Complex on Bacterial Composition of Fecal Flora. *Infect Immun.*, v. 69, p. 2372–2377, 2001.
- TOURÉ, R., KHEADR, E., LACROIX, C., MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 1058-1069, 2003.
- TUDEK, B.; BIRD, R.P.; BRUCE, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.*, v. 49, p. 1236-1240, 1989.
- TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Disc. Today*, v. 8, p. 692-700, 2003.
- VENTURI, M.; HAMBLY, R.J.; GLINGHAMMAR, B.; RAFTER, J.J.; ROWLAND, I.R. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 2353-2359, 1997.
- VIGGIANO, M.; BADETTI, C.; BERNINI, V.; GARABEDIAN, M.; MANELLI, J.C. *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient with severe burns. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, v.14, p. 356-8, 1995.
- VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, U. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 73, 421S–429S, 2001.
- WOLOCHOW, H.; HILDEBRAND, G.J.; LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J. Infect. Dis.*, v. 116, p. 523-528, 1966.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all, Geneva: WHO; 1998. P.61-111.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. National cancer control programs: Policies and managerial guidelines. 2nd ed. Geneva: WHO; 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em 18 de novembro de 2008.
- YAMAZAKI, K.; TSUNODA, A.; SIBUSAWA, M.; TSUNODA, Y.; KUSANO, M.; FUKUCHI, K.; YAMANAKA, M.; KUSHIMA, M.; NOMOTO, K.; MOROTOMI, M. The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. *Oncol. Rep.*, v. 7, p. 977-982, 2000.
- YOUNG, T.B.; WOLF, D.A. Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *Int. J. Cancer.*, v. 42, p. 167-175, 1988.
- ZORAN, D.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R.; CHAPKIN, R.; LUPTON, J. Diet and carcinogen alter luminal butyrate concentrations and intracellular Ph in isolated rat colonocytes. *Nut. Cancer*, v. 27, p. 222–230, 1997.

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](#)