

Tássia Costa Souza

Seleção de bifidobactéria de origem humana para uso como probiótico em alimento funcional: avaliação do efeito protetor na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium

Belo Horizonte

2012

Tássia Costa Souza

**Seleção de bifidobactéria de origem humana para uso como
probiótico em alimento funcional: avaliação do efeito protetor
na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
sorovar Typhimurium**

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Co-orientadora: Dr.^a Danielle Alves Gomes

Belo Horizonte/MG

2012

Na mente sempre guardarei a lembrança e, no coração, muita saudade... Que é grande e sei que só vai aumentar, porque, marca a falta física de um sorriso, um afago, uma palavra... A ausência é ainda motivo de lágrimas, já não posso mais sentir seus abraços, nem ouvir seus aplausos mudos, mas o que posso fazer para me sentir mais pertinho de vocês é projetar os ensinamentos herdados. Obrigada por terem sempre me apoiado e acreditado em mim, e mais do que nunca pelo exemplo de vida. Os méritos desta conquista pertencem também a vocês por contribuírem em todas as minhas vitórias. A saudade será eterna, assim como o meu amor por vocês.

Aos meus pais Miguel e Flávia (*in memoriam*),

Com amor, dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família: minhas irmãs queridas Lorena e Livia, meus tios e tias e minha avó Sara (*in memoriam*). Por todo o amor, atenção e incentivo, pelos ensinamentos e exemplo de integridade, e principalmente, pela compreensão nos meus momentos de ausência.

Ao meu orientador, Professor Dr. Jacques Robert Nicoli, pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação e confiança. Além de seu exemplo como pesquisador e ser humano. Obrigada por me tranquilizar e apoiar nos momentos difíceis da minha vida.

À minha co-orientadora, Dr.^a Danielle Alves Gomes, pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Professora Dr.^a Rosa Maria Esteves Arantes, que executou todos os exames histológicos e pela sua disponibilidade e paciência na execução do mesmo.

Ao Professor Dr. Gabriel Vinderola, pelos ensinamentos na parte tecnológica, além da alegria e ótima convivência.

À Professora Dr.^a Andréia Marçal Silva, pelo apoio no momento em que mais precisei, pela paciência em me ouvir nas longas conversas pelo telefone, pela presença e amizade.

Ao Professor Dr. Marcelo Resende de Souza, pelo auxílio na correção, pelas sugestões e disponibilidade em me atender, contribuindo enormemente no fechamento deste trabalho.

Às Professoras Dr.^a Elisabeth Neumann e Dr.^a Sílvia Moura pela agradável convivência diária e disponibilidade em ajudar tanto nos desenhos experimentais quanto na parte de apresentação da tese.

À amiga Clélia, que além de toda a ajuda técnica, nos acompanha com sua agradável presença, amizade e alegria constante.

Ao Antônio Mesquita Vaz pela contribuição técnica e, cuidado dos animais.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Laboratório de Microbiologia Oral de Anaeróbios e Laboratório de Microbiologia Ambiental.

Aos amigos do Instituto de Lactología Industrial de Santa Fé, Argentina.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Imunologia e Departamento de Genética.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelos valiosos ensinamentos.

Ao grande amigo Thiago Monteiro, pelo apoio, carinho e paciência mesmo a distância.

Aos meus amigos eternos, Cristy, Élide, Ju, Karina, Kiu, Lu, Marcela e Thiago, por compartilharem comigo momentos importantes da vida.

As instituições de amparo à pesquisa: CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo suporte financeiro utilizado nesta pesquisa.

A todos aqueles, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“A imaginação deveria das asas aos nossos pensamentos, mas nós sempre precisamos de uma prova experimental decisiva, e no momento de refletir, interpretar nossas observações e concluir, a imaginação deve ser verificada e documentada pelos resultados do experimento” **Louis Pasteur**

RESUMO

A microbiota intestinal produz vários efeitos benéficos à saúde, existindo um grande interesse na modulação desta com o uso de probióticos. No presente trabalho, foi avaliado o potencial probiótico de quatro espécies de bifidobactérias isoladas das fezes de crianças saudáveis e identificadas por PCR Multiplex (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium pseudolongum* 119^{1A} e *Bifidobacterium bifidum* 162^{2A}). Foi estudada a velocidade de crescimento, aerotolerância, capacidade de produção de substâncias antagonistas contra patógenos, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e hidrofobicidade. Com base nestes parâmetros obtidos *in vitro*, *B. longum* 5^{1A} apresentou melhor potencial para probiótico, pela maior sensibilidade apresentada aos antimicrobianos, melhor velocidade de crescimento e pela capacidade de produzir substâncias antagonistas contra vários micro-organismos patogênicos. Além disso, esta linhagem instalou-se rapidamente no trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes, atingindo níveis populacionais elevados nas fezes destes animais. O tratamento com iogurtes contendo esta linhagem exerceu um efeito local, pela estimulação da proliferação de células IgA+ no intestino delgado e grosso e, ainda, um efeito protetor frente ao desafio com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, promovendo uma taxa de 100% de sobrevivência, nos animais que receberam iogurtes suplementados com o cultivo fresco, mesmo com a perda da viabilidade e aumento da sensibilidade à resistência gástrica simulada. O tratamento de animais com a bifidobactéria desvinculada de uma matriz alimentar também exerceu uma estimulação na resposta humoral, pelos aumentos dos níveis de sIgA no conteúdo intestinal e IgM no soro, e uma estimulação celular pelo aumento nos níveis de mRNA para IL5 e uma diminuição para Tnfa. Entretanto, não foi capaz de proteger contra a infecção por salmonela. Observou-se uma pequena proteção nos primeiros dias de infecção, mediante estimulação da produção de sIgA após três dias de desafio, o que condiz com o discreto retardo no tempo de morte dos animais tratados e com a avaliação histopatológica. Após nove dias de infecção, com o tratamento, os intestinos ficaram mais preservados e o fígado apresentou discreta proteção. Estes resultados mostram que esta linhagem tem potencial para ser usada como probiótico; entretanto, é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos demonstrados, para otimização do seu uso.

Palavras-chave: probiótico, *Bifidobacterium*, iogurte, *Salmonella*

ABSTRACT

The intestinal microbiota produces various beneficial health effects, and there is a growing interest in its modulation using probiotics. In the present study, we evaluated the potential of four species of probiotic bifidobacteria isolated from the feces of healthy children and identified for PCR Multiplex (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium bifidum* 119^{1A} and *Bifidobacterium pseudolongum* 162^{2A}). We studied the growth rate, aerotolerance, antagonistic activity against pathogens, antimicrobial susceptibility profile and hydrophobicity. Based on these parameters tested *in vitro*, *B. longum* 5^{1A} showed the best potential as candidate for probiotic use, presenting the greatest sensitivity to antimicrobials, the best growth rate and a large ability to produce antagonistic substances against various pathogenic microorganisms. Moreover, this strain colonized rapidly the gastrointestinal tract of germ-free mice, reaching high population levels in the feces of these animals. Treatment with yoghurt containing this strain had a local effect for the stimulation of IgA + cell proliferation in the small and large intestines and a protective effect against challenge with *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, providing a 100% rate of survival in the animals fed yoghurt supplemented with fresh culture, despite the loss of viability and increase in sensitivity to simulated gastric resistance. Treatment of animals with pure culture of bifidobacteria also exerted a stimulation of the humoral response by higher levels of sIgA in intestinal contents and of IgM in serum and cellular stimulation by an increase in levels of mRNA for IL5 and reduction to Tnfa. However, it was not able to totally protect against infection by *Salmonella*. There was a small initial protection in the first days of infection, by stimulating the production of sIgA up to three days post challenge, which agrees with the slight delay in the time of death of the animals treated and the histopathological evaluation. After nine days of infection, the intestines and liver were better preserved in mice treated with the bifidobacteria. These results show that *B. longum* 5^{1A} has a potential to be used as probiotic. However, a better understanding of the mechanisms involved in the beneficial effects of this strain is necessary to optimize its use.

Keywords: probiotic, *Bifidobacterium*, yoghurt, *Salmonella*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. - Antes de Cristo

Actb - *Beta-actina*

AF - Antes da fermentação

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL - Bactérias produtoras de ácido lático

BHI - *Brain Heart Infusion*

CC - Cultivo congelado

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CF - Cultivo fresco

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CS - Componente secretório

C_t - *Cycle Threshold*

DF - Depois da fermentação

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade ótica

DTA - Doenças transmitidas por alimentos

DVS - *Direct Vat System*

EFSA - *European Food Safety Authority Testing*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*

F6PPK - *Fructose- 6 - fosfato fosfoquetolase*

FAO/WHO - *Food and Agricultural Organization/ World Health Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

FOS - Fruto-oligossacarídeos

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

Gapdh - *Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase*

GOS - Galacto-oligossacarídeos
GRAS - Geralmente reconhecidas como seguras
HE - Hematoxilina-eosina
HMOs - *Human milk oligossacarídes*
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
ID - Inoculação direta
II - Inoculação indireta
IL - Interleucina
IgA+ - Células plasmáticas produtoras de IgA
IgM - Imunoglobulina M
Ifng - *Interferon gamma*
INLAIN - Instituto de Lactología Industrial
LEFM - Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos
LP-MRS - ágar MRS com propionato de sódio e cloreto de lítio
LPS - Lipopolissacáride
MDR - *Multidrug-resistant*
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MRS - De Man, Rogosa & Sharpe
NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*
PBS - *Phosphate buffered saline*
PCA - *Plate count agar*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PFGE - *Pulsed field gel electrophoresis*
qPCR - *Quantitative polymerase chain reaction*
RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*
RNA - Ácido ribonucléico
RT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*
RT- qPCR - *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

RQ - Quatificação relativa
sIgA - Imunoglobulina A secretória
SOD - Superóxido dismutase
SP1 - *Salmonella* pathogenicity island 1
Tgfb1 - *Transforming growth factor beta 1*
TLRs - *Toll-like receptors*
Tnfa - *Tumor necrosis factor*
TTSS - *Type three secretion system*
UFC - Unidades formadoras de colônias
UNL - Universidad del Litoral
XOS - Xilo-oligossacarídeo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia do íleo (A e C) e cólon (B e D) de camundongos convencionais após dez dias de tratamento com *B. longum* 5^{1A} (C e D) ou não (A e B) 71
- Figura 2.** Fotomicrografia do intestino delgado (íleo) de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela 83
- Figura 3.** Fotomicrografia do intestino grosso (cólon) de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela 84
- Figura 4.** Fotomicrografia do fígado de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela 86

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Cinética de crescimento de *B. longum* 5^{1A} (●), *B. breve* 110^{1A} (■), *B. pseudolongum* 119^{1A} (▲) and *B. bifidum* 162^{2A} (▼) em caldo MRS, a 37°C, em condições de anaerobiose, realizada com base na DO_{600nm}. Os resultados são a média de duplicata de dois experimentos independentes 44
- Gráfico 2.** Porcentagem de hidrofobicidade da parede celular de bifidobactérias. Os resultados são a média da triplicata de três experimentos independentes. As barras verticais indicam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre as bifidobactérias (P<0,05) 52
- Gráfico 3.** Níveis populacionais de *B. longum* 5^{1A} nas fezes de camundongos gnotobióticos durante a monoassociação. O resultado está expresso como média de dois experimentos independentes do log UFC/g de fezes de seis animais. As barras verticais indicam o desvio-padrão da média 57
- Gráfico 4.** Efeito da administração oral de iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} no número de células IgA+ na lâmina própria do intestino delgado e grosso de camundongos BALB/c. Os resultados estão expressos como a média do número de células IgA+/10 campos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimentais (P<0,05) 65
- Gráfico 5.** Efeito da administração dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} no número de células de Küpffer em camundongos BALB/c controle e tratados por dez dias com os diferentes iogurtes. Os resultados estão expressos como média do número de células de Küpffer/100 hepatócitos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias (P>0,05) 66
- Gráfico 6.** Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com os diferentes iogurtes e desafiados com *S. Typhimurium* no 11º dia. *Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo que recebeu o iogurte 3 (P<0,05) 67
- Gráfico 7.** Índice hepático e esplênico de camundongos do grupo controle e

- experimental. Os resultados estão expressos como média do índice hepático ou esplênico (mg órgão/g peso corporal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias ($P>0,05$) 69
- Gráfico 8.** Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P<0,05$) 72
- Gráfico 9.** Níveis de IgM total produzidas no soro de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de IgM ($\mu\text{g/mL}$ soro). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P<0,05$) 72
- Gráfico 10.** Efeito de *B. longum* 5^{1A} nos níveis de mRNA para IL5 (A) e Tnfa (B), em culturas de esplenócitos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P<0,05$) 75
- Gráfico 11.** Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (experimental) e desafiados com *Salmonella* Typhimurium no 11° dia ($P>0,05$) 78
- Gráfico 12.** Ganho de peso (g) de camundongos não tratados (controle) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (experimental) e desafiados com *Salmonella* Typhimurium no 11° dia. Os resultados estão expressos como média dos animais sobreviventes. As barras verticais indicam os desvios-padrão das médias ($P>0,05$) 78
- Gráfico 13.** Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P<0,05$) 81

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Valores de pH obtidos a partir de alíquotas, em diferentes tempos, das curvas de crescimento de <i>Bifidobacterium</i> spp. | 44 |
| Tabela 2. | Tolerância de <i>Bifidobacterium</i> spp. em diferentes tempos (T0, T1, T2, T3 e T4) de exposição ao oxigênio | 46 |
| Tabela 3. | Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos para <i>Bifidobacterium</i> spp. | 48 |
| Tabela 4. | Testes <i>in vitro</i> de produção de substâncias antagonistas por <i>Bifidobacterium</i> spp. contra micro-organismos patogênicos | 54 |
| Tabela 5. | Viabilidade ($\log \text{UFC ml}^{-1} \pm \text{DP}$) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} em diferentes tipos de leites fermentados, e seu pH correspondente, durante armazenamento a 5°C .. | 59 |
| Tabela 6. | Resistência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} à digestão ácida simulada em diferentes tipos de leites fermentados durante o armazenamento a 5°C | 63 |
| Tabela 7. | Índice hepático e esplênico de camundongos do grupo experimental e controle | 81 |

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Códigos dos iogurtes elaborados, em leite em pó desnatado, reconstituído a 10%, utilizando o cultivo lácteo comercial YF-L702 34
- Quadro 2.** Condições padronizadas de RT- qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de cultura de esplenócitos de camundongos NIH 41

SUMÁRIO

| | | |
|-----------------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. | Microbiota gastrintestinal de seres humanos: instalação, composição e funções | 1 |
| 1.2. | Probióticos | 5 |
| 1.2.1. | Histórico | 5 |
| 1.2.2. | Definições | 6 |
| 1.2.3. | Micro-organismos utilizados como probióticos | 6 |
| 1.2.4. | Critérios de seleção e características desejáveis de um probiótico | 7 |
| 1.2.5. | Mecanismos de ação | 9 |
| 1.2.6. | O gênero <i>Bifidobacterium</i> | 9 |
| 1.2.6.1. | Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas | 9 |
| 1.2.6.2. | Efeitos benéficos | 11 |
| 1.2.6.3. | Uso em produtos lácteos fermentados | 14 |
| 1.2.7. | Legislação de probióticos | 17 |
| 1.3. | O gênero <i>Salmonella</i> | 19 |
| 1.3.1. | <i>Salmonella</i> e probióticos | 22 |
| 2. | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3. | OBJETIVOS | 25 |
| 3.1. | Objetivo geral | 25 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 25 |
| 4. | ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 4.1. | Animais | 27 |
| 4.1.1. | Animais isentos de germes | 27 |
| 4.1.2. | Animais convencionais | 27 |
| 4.1.3. | Manejo dos animais e aspecto ético | 28 |
| 4.2. | Micro-organismos | 28 |
| 4.2.1. | Bifidobactérias | 28 |
| 4.2.2. | Micro-organismos patogênicos | 29 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 4.3. | Determinação da velocidade de crescimento das bifidobactérias | 30 |
| 4.4. | Determinação da tolerância ao oxigênio das bifidobactérias | 30 |
| 4.5. | Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bifidobactérias | 31 |
| 4.6. | Determinação do perfil de hidrofobicidade da parede celular das bifidobactérias | 31 |
| 4.7. | Atividade antagonista <i>in vitro</i> das bifidobactérias contra patógenos | 32 |
| 4.8. | Determinação da capacidade de colonização do trato gastrintestinal de animais isentos de germes por <i>B. longum</i> 5^{1A} | 32 |
| 4.9. | Elaboração dos iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A} | 33 |
| 4.9.1. | Análises físico-químicas e microbiológicas | 34 |
| 4.10. | Efeitos de diferentes iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A}, na imunomodulação, em camundongos BALB/c | 35 |
| 4.10.1. | Determinação do número de células IgA+ na lâmina própria intestinal em camundongos BALB/c | 35 |
| 4.10.2. | Determinação do número de células de Küpffer em camundongos BALB/c | 36 |
| 4.11. | Efeito de diferentes iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A}, na mortalidade em decorrência da infecção experimental por <i>S. Typhimurium</i> em camundongos BALB/c | 36 |
| 4.12. | Avaliação da segurança e do perfil imunomodulador do tratamento de <i>B. longum</i> 5^{1A}, em camundongos NIH convencionais | 36 |
| 4.12.1. | Determinação do ganho de peso, índice hepático e esplênico | 37 |
| 4.12.2. | Exame histológico do íleo e cólon | 37 |
| 4.12.3. | Determinação dos níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais no conteúdo intestinal | 37 |
| 4.12.4. | Determinação dos níveis de imunoglobulinas totais do tipo IgM no soro | 38 |
| 4.12.5. | Determinação do efeito de <i>B. longum</i> 5^{1A} na expressão gênica de citocinas em cultivo celular de esplenócitos por qPCR em Tempo Real | 38 |
| 4.13. | Tratamento e desafio dos camundongos NIH com <i>S. Typhimurium</i> | 40 |
| 4.13.1. | Determinação do efeito de <i>B. longum</i> 5^{1A} na mortalidade em decorrência da infecção experimental por <i>S. Typhimurium</i> em camundongos NIH e | |

| | | |
|----------------|---|----|
| | acompanhamento do desenvolvimento ponderal | 40 |
| 4.13.2. | Determinação do efeito de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} nos níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais no conteúdo intestinal e do tipo M (IgM) no soro de camundongos NIH | 42 |
| 4.13.3. | Exame histopatológico de órgãos de camundongos NIH desafiados com <i>S. Typhimurium</i> | 42 |
| 4.14. | Análises estatísticas | 42 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 5.1. | Velocidade de crescimento das bifidobactérias | 43 |
| 5.2. | Tolerância ao oxigênio | 43 |
| 5.3. | Susceptibilidade das bifidobactérias a antimicrobianos | 46 |
| 5.4. | Perfil de hidrofobicidade da parede celular das bifidobactérias | 51 |
| 5.5. | Atividade antagonista <i>in vitro</i> das bifidobactérias contra patógenos | 53 |
| 5.6. | Capacidade de colonização do trato gastrintestinal de animais isentos de germes por <i>B. longum</i> 5^{1A} | 56 |
| 5.7. | Análises físico-químicas e microbiológicas de iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A} | 58 |
| 5.8. | Efeitos dos iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A} na proliferação de células IgA+ na lâmina própria intestinal de camundongos BALB/c | 63 |
| 5.9. | Efeitos dos iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A} no número de células de Küpffer de camundongos BALB/c | 65 |
| 5.10. | Efeitos dos iogurtes adicionados de <i>B. longum</i> 5^{1A} na sobrevivência de camundongos BALB/c desafiados com <i>S. Typhimurium</i> | 66 |
| 5.11. | Avaliação da segurança de <i>B. longum</i> 5^{1A}, em camundongos NIH convencionais | 68 |
| 5.12. | Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais e do tipo M (IgM) no conteúdo intestinal e soro, respectivamente, de camundongos NIH | 70 |
| 5.13. | Perfil de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias em células esplênicas cultivadas em RPMI 1640 por qPCR em Tempo Real | 73 |
| 5.14. | Análise da sobrevivência e desenvolvimento ponderal de camundongos NIH tratados ou não com <i>B. longum</i> 5^{1A} e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> | 77 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 5.15. | Análise da cinética de produção de sIgA e IgM totais no conteúdo intestinal e soro, respectivamente, de camundongos NIH tratados ou não com <i>B. longum</i> 5^{1A} e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> | 80 |
| 5.16. | Análise histológica | 82 |
| 6. | CONCLUSÕES | 87 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microbiota gastrointestinal de seres humanos: instalação, composição e funções

O trato gastrointestinal aloja um ecossistema complexo que associa componentes bióticos, como a microbiota residente, e componentes abióticos, como o alimento ingerido. O termo microbiota foi definido por SAVAGE (1977) como população de micro-organismos presentes nas superfícies mucosas de um indivíduo. Seres humanos e outros animais nascem sem qualquer tipo de micro-organismo associado; no entanto, esta situação é apenas transitória. A colonização do trato gastrointestinal ocorre imediatamente após o nascimento, sendo os primeiros micro-organismos a colonizar o intestino aqueles oriundos da mãe e do ambiente que o circunda. O potencial de óxido-redução positivo no intestino do recém-nascido propicia a instalação de micro-organismos anaeróbicos facultativos. O consumo de oxigênio por estes micro-organismos altera gradualmente o ambiente intestinal, tornando-o mais reduzido, o que permite o crescimento subsequente de anaeróbicos obrigatórios (PENDERS *et al.*, 2006). Após um a dois anos, nos seres humanos, o trato gastrointestinal passa a abrigar uma comunidade microbiana similar à de um adulto, que é extremamente densa e diversa, variando quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função da localização transversal e longitudinal no trato digestivo, e da idade do hospedeiro. Toda esta comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkühn, na superfície do epitélio intestinal ou inserida na camada de mucina (NICOLI & VIEIRA, 2004; ECKBURG *et al.*, 2005; EGERT *et al.*, 2006; MARIAT *et al.*, 2009; NAVA & STAPPENBECK, 2011).

Uma vez instalada, a microbiota digestiva, junto com o seu hospedeiro, representa um dos ecossistemas mais complexos e menos conhecidos e controlados. Nesse ecossistema, encontram-se dois grupos microbianos: a microbiota autóctone, constituída de micro-organismos sempre presentes em níveis populacionais estáveis em um nicho anatômico específico e em uma determinada época da vida; e a microbiota alóctone, encontrada de maneira esporádica e transitória em qualquer local anatômico. Estes últimos, não são implantados em circunstâncias normais, são adquiridos via ingestão de alimentos e bebidas, ou provenientes da pele ou de membranas respiratórias superiores (SAVAGE, 1977; NICOLI & VIEIRA, 2004).

A população de micro-organismos no intestino é composta por 10^{14} unidades formadoras de colônias (UFC), número dez vezes maior que o de células do hospedeiro (SAVAGE, 1977; BERG, 1996). Embora não seja conhecida a composição exata da microbiota, avanços na pesquisa do microbioma humano permitiram não somente conhecer melhor esta composição, como também compreender melhor a funcionalidade microbiana no trato gastrointestinal (ECKBURG *et al.*, 2005; EGERT *et al.*, 2006; DETHLEFSEN *et al.*, 2007; CANI & DELZENNE, 2011). Estes avanços, observados nos últimos anos, advém da implantação de técnicas de biologia molecular, permitindo a identificação de micro-organismos não cultiváveis. Atualmente, estima-se que no trato gastrointestinal estão presentes cerca de 1000 espécies microbianas, sendo o intestino grosso a porção que contém a mais alta densidade e diversidade de micro-organismos e o principal sítio de colonização microbiana, em seres humanos e outros animais (BERG, 1996; EGERT *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009).

Três distintos níveis populacionais microbianos podem ser diferenciados nesta porção: (1) a microbiota dominante (99% da população; 10^9 a 10^{11} UFC/g de conteúdo); (2) a microbiota sub-dominante (0,99% da população, 10^7 a 10^8 UFC/g de conteúdo) e (3) a microbiota residual (0,01% da população, $< 10^7$ UFC/g de conteúdo) (NICOLI & VIEIRA, 2004). A microbiota dominante é constituída somente por bactérias anaeróbias obrigatórias pertencentes aos filos *Actinobacteria* (bactérias Gram positivo com alto conteúdo G+C no genoma), *Bacteroidetes* (bactérias Gram negativo) e *Firmicutes* (bactérias Gram positivo com baixo conteúdo G+C no genoma). Já a microbiota sub-dominante é predominantemente anaeróbia facultativa e, a residual, representada por uma variedade de micro-organismos procarióticos e eucarióticos (NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT *et al.*, 2006; MARIAT *et al.*, 2009).

Em geral, quanto mais numerosa é a população de uma espécie bacteriana, mais estável ela é no seu nicho ecológico. Por isso, no nível de gênero, as microbiotas digestivas dominantes e sub-dominantes permanecem relativamente constantes e estáveis no tempo e de um indivíduo para o outro. Ao contrário, a microbiota residual é bastante variável entre indivíduos e flutua consideravelmente ao longo do tempo, no mesmo indivíduo. Contudo, apesar da estabilidade em termo de gêneros, as populações bacterianas dominantes e sub-dominantes apresentam variações consideráveis quando são examinadas no nível das espécies e linhagens (NICOLI & VIEIRA, 2004; DETHLEFSEN *et al.*, 2007).

Pelo seu tamanho e atividade metabólica, a microbiota intestinal é, muitas vezes, considerada como um órgão ou organismo, atuando nas superfícies das mucosas do hospedeiro (BERG, 1996; EGERT *et al.*, 2006). O peso total da microbiota em um adulto humano é estimado em 1,2 Kg e a atividade metabólica exercida por ela é comparável com a do fígado, que é o órgão metabolicamente mais ativo do corpo humano (NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT *et al.*, 2006). É responsável por três funções importantes para a saúde do hospedeiro: a resistência à colonização (inibe a multiplicação de patógenos alóctones e autóctones oportunistas), a imunomodulação (permite uma resposta imune mais rápida e adequada durante uma agressão infecciosa) e contribuição nutricional (fornece vitaminas e substratos energéticos como ácidos butírico, propiônico e acético) (NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT, *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009; STECHER & HARDT, 2011). Além disso, a presença da microbiota intestinal exerce um importante papel na manutenção da estrutura da mucosa. Estudo em animais isentos de germes mostrou que a presença de uma microbiota normal aumenta a massa da mucosa e a área da superfície intestinal, além de aumentar a taxa de renovação das células epiteliais. Tais mudanças estruturais, provavelmente, têm implicações na absorção de eletrólitos, fluidos e nutrientes e regeneração epitelial (FARTHING, 2004).

O sistema imune associado à mucosa intestinal é composto por células B e T, células dendríticas, macrófagos e outros tipos celulares únicos dentro do sistema como as células M, células de Paneth, linfócitos intraepiteliais, além das células epiteliais que exercem um papel importante na resposta imune inata da mucosa e constituem uma barreira física que divide o lúmen da lâmina própria. Estes tipos celulares estão presentes de forma difusa no epitélio e na lâmina própria da mucosa ou organizados em microambientes localizados, tais como as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos. A comunicação observada entre as células do sistema imune da mucosa intestinal se deve aos distintos tipos celulares que secretam citocinas e quimiocinas, as quais regulam a magnitude e natureza da resposta imune em função do estímulo ativador (FORCHIELLI & WALKER, 2005; MAGALHAES *et al.*, 2007).

Uma vez que a mucosa do trato gastrointestinal é uma das maiores interfaces entre o hospedeiro e o ambiente, é submetida continuamente a uma alta carga antigênica. Existe uma tolerância à microbiota normal e, embora continuamente exposta a essas bactérias comensais, a mucosa intestinal exhibe apenas uma inflamação mínima em resposta aos componentes celulares da microbiota, como por exemplo, o lipopolissacáride (LPS) de bactérias Gram negativo e

lipoproteínas e peptidoglicanos de bactérias Gram positivo. Devido a sistemas sofisticados de detecção de antígenos, o sistema imune associado à mucosa distingue a microbiota normal dos micro-organismos enterovirulentos, mediante moléculas compartilhadas por membros da microbiota, como os motivos moleculares associados a micróbios. O sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos entéricos inclui imunidade adaptativa e imunidade inata. A resposta imune adaptativa é observada quatro a sete dias após a infecção, e esse mecanismo envolve a geração de memória imunológica e a expansão de receptores com especificidade relevante. Em contrapartida, a resposta imune inata é ativada nos primeiros dias ou até mesmo nas primeiras horas para controlar a infecção via receptores de reconhecimento padrão de estruturas moleculares encontradas em vários patógenos, conhecidas como motivos moleculares associados a patógenos, PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*). Os receptores envolvidos neste reconhecimento incluem os TLRs (*Toll-like receptors*) e as proteínas NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) (ADEREM & ULEVITCH, 2000; MEDZHITOV, 2001; FORCHIELLI & WALKER, 2005; KELLY *et al.*, 2007).

Apesar de a microbiota associada ao trato digestivo ser extremamente potente nas suas funções, é também frágil quando perturbada. Diversos fatores podem interferir no processo de instalação da microbiota normal em recém-nascido (tipo de parto; hospitalização e prematuridade; amamentação no seio ou por fórmula; medidas de higiene excessivas e uso de antimicrobianos) ou na sua manutenção em adultos (uso de antimicrobianos; mudanças alimentares drásticas e estresse), provocando, respectivamente, atraso na sua implantação ou falha de suas funções (NICOLI & VIEIRA, 2000; PENDERS *et al.*, 2005; PENDERS *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009). No caso particular de antibioticoterapia, esses distúrbios dos equilíbrios populacionais e das funções protetoras da microbiota gastrointestinal são, provavelmente, responsáveis pela ocorrência de 15 a 40% dos episódios de diarreias associadas ao uso de antibióticos. Além disso, a utilização excessiva e inadequada de antibióticos está, também, associada à ocorrência cada vez maior de multiresistência nos micro-organismos patogênicos. Neste sentido, há um esforço atual para o desenvolvimento de métodos alternativos a serem utilizados na prevenção e/ou no tratamento de infecções microbianas, como, por exemplo, o uso dos probióticos.

1.2. Probióticos

1.2.1. Histórico

A utilização de micro-organismos benéficos ao homem data de milhares de anos atrás. Os benefícios da ingestão de alimentos fermentados já eram mencionados na versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Posteriormente, Plínio, um historiador romano, recomendou o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites, em 76 a.C. (antes de Cristo) (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001).

O russo Elie Metchnikoff (1845-1916), ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por seu pioneirismo nas descrições de fagocitose, foi o primeiro microbiologista a sugerir o consumo de leite fermentado para modular a microbiota digestiva. De acordo com sua teoria, metabólitos tóxicos produzidos pela microbiota intestinal poderiam ter um efeito adverso sobre o hospedeiro. Algumas bactérias degradavam proteínas, causando putrefação e a liberação de compostos, os quais, dependendo de suas concentrações, tornavam-se tóxicos para o organismo. Para reduzir esta auto-intoxicação ele sugeriu manipular a microbiota intestinal, de modo a substituir ou diminuir o número de bactérias putrefativas pela ingestão de leites fermentados com bactérias produtoras do ácido lático. Esta sugestão era baseada na expectativa de vida elevada, observada nos camponeses búlgaros, grandes consumidores de produtos lácteos fermentados. A partir deste dado, ele supôs que os lactobacilos eram importantes para a saúde humana e passou a defender o uso de alimentos fermentados (SHORTT, 1999; METCHNIKOFF, 2004; citado por VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Outro pesquisador que forneceu importante contribuição ao uso de probióticos foi Tissier. Em 1906, ele recomendou a administração de bifidobactérias para modular a microbiota de crianças com diarreia, postulando que estas bactérias poderiam competir com bactérias indesejáveis no intestino, eliminando-as e tornando-se o micro-organismo intestinal dominante. Essa recomendação foi decorrente de sua observação que a microbiota fecal de recém-nascidos amamentados no seio apresentava mais bifidobactérias do que a microbiota fecal de crianças que haviam recebido fórmulas infantis (SHORTT, 1999; NICOLI & VIEIRA, 2000).

Posteriormente, vários outros pesquisadores continuaram a busca por bactérias benéficas para a saúde humana, até que, em 1930, Minoru Shirota, que reconhecia a importância da medicina preventiva e modulação da microbiota gastrintestinal, isolou, no Japão, uma linhagem

de *Lactobacillus* capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal. Esta linhagem, denominada *Lactobacillus casei* linhagem Shirota, foi usada para produção do produto lácteo fermentado chamado *Yakult*, o qual é ainda comercializado. Do final da década de 30 até o final da década de 50, devido às circunstâncias mundiais (depressão, guerras), houve pouca pesquisa nesta área. O interesse na microbiota intestinal humana ressurgiu no início dos anos 60, levando à introdução do conceito de probióticos (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

1.2.2. Definições

O termo probiótico deriva-se do grego e significa “a favor da vida”, sendo o antônimo do termo antibiótico. Foi primeiramente empregado por LILLEY & STILLWELL (1965) para descrever substâncias secretadas por um micro-organismo que estimulam o crescimento de outro micro-organismo. Posteriormente, FULLER (1989) modificou este conceito, introduzindo nova definição para probióticos, que seria “suplemento alimentar constituído de micro-organismos vivos que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”. No entanto, para incluir as amplas aplicações e dados científicos que mostram a ação benéfica de micro-organismos não viáveis ou de seus componentes, SALMINEN e colaboradores (1999) definiram probióticos como preparações de micro-organismos, ou seus constituintes, que têm efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro. Apesar de algumas definições de probióticos focarem a importância de sua viabilidade, alguns trabalhos sugerem que micro-organismos não-viáveis ou seus componentes podem exercer algum efeito benéfico (OUWEHAND & SALMINEN, 1998; PENNER *et al.*, 2005; ADAMS, 2010).

Embora muitas outras definições de probióticos tenham sido publicadas nos últimos anos, a definição atualmente aceita internacionalmente é da Organização Mundial de Saúde e da Organização de Agricultura e Alimentos, que define probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

1.2.3. Micro-organismos utilizados como probióticos

Os micro-organismos mais frequentemente utilizados nas preparações probióticas são as bactérias produtoras de ácido lático (BAL), as quais são encontradas em altos níveis no intestino do homem e de animais saudáveis e são consideradas pela *Food and Drug Administration* (FDA)

como aquelas Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS). Fazem parte deste grupo algumas espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Além dessas, outros micro-organismos probióticos estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, incluem as bifidobactérias, propionibactérias, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, e as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta última usada somente na medicina veterinária (COLLINS *et al.*, 1998; COPPOLA & TURNES, 2004; SENOK *et al.*, 2005). O potencial probiótico desses micro-organismos pode diferir mesmo entre diferentes linhagens de uma mesma espécie (MÄTTÖ *et al.*, 2004; DOGI *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2010).

Atualmente, os produtos compostos por probióticos integram três grandes grupos comerciais: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Este último, é o grupo mais representativo, constituído por iogurtes, leites fermentados, sorvetes e queijos, nos quais se utilizam frequentemente culturas iniciadoras e bifidobactérias (ou lactobacilos) como aditivo ou suplemento (TIMMERMAN *et al.*, 2004; SAAD, 2006).

1.2.4. Critérios de seleção e características desejáveis de um probiótico

Para que um micro-organismo seja selecionado e utilizado na preparação de produtos probióticos ele precisa possuir algumas características importantes. Inúmeros critérios têm sido sugeridos por vários autores; dentre aqueles que são de senso comum envolvem aspectos de segurança (origem do micro-organismo, patogenicidade e infectividade, fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos); tecnológicos (características de produção, propriedades organolépticas, resistência ao processamento e estocagem, resistência a fagos e estabilidade genética); funcionais (resistência as condições adversas do trato gastrointestinal, aderência ao muco e células epiteliais) e benéficos ao hospedeiro (atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos, imunomodulação, efeito hipocolesterolêmico, efeito no metabolismo da lactose e propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas). A comprovação de efeitos benéficos é feita somente por estudos clínicos independentes, duplo-mascarado, randomizado e controlado com placebo (FAO/WHO, 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Alguns autores ressaltam a importância da especificidade do hospedeiro, ou seja, uma linhagem probiótica para uso em seres humanos deve ser isolada de seres humanos. Afirma-se que o probiótico irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar

àquele do qual foi isolado, visto que é hospedeiro-específico (SAARELA *et al.*, 2000). Entretanto, a levedura *S. boulardii*, mesmo não sendo de origem humana ou animal, é reconhecida como probiótico e empregada na indústria farmacêutica desde 1960. Esta levedura tem a capacidade de eliminar ou reduzir os efeitos de diferentes tipos de diarreias e infecções intestinais, neutralizando diferentes tipos de toxinas, como as produzidas por *Clostridium difficile* (CZERUCKA *et al.*, 2007).

Outra característica desejável para um probiótico, muitas vezes relevante para alguns autores, é a capacidade de aderência ao epitélio intestinal. A adesão às células epiteliais é o primeiro passo da colonização (mesmo que temporária) de um micro-organismo, modula o sistema imune intestinal (devido ao contato do probiótico com o tecido linfóide associado ao intestino) e pode impedir a adesão de patógenos. Por isto, têm sido propostos ensaios avaliando propriedades de adesão usando células intestinais humanas para selecionar bactérias probióticas (SALMINEN *et al.*, 1998; LIONG, 2007; VASILEVIC & SHAH, 2008; GUGLIELMETTI *et al.*, 2009). Entretanto, não se conhecem probióticos capazes de se instalar no trato digestivo do adulto, mesmo após sua ingestão prolongada, uma vez que a microbiota residente, ainda que desequilibrada, impede essa colonização. Portanto, a ingestão diária de um probiótico em quantidade adequada é indispensável para manter níveis artificialmente elevados do micro-organismo no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado (MARTINS *et al.*, 2005). Para que isso ocorra, além de permanecer viável durante sua passagem pelo sistema gastrointestinal, o nível populacional do probiótico deve ser suficientemente elevado para ter um impacto no local onde se espera que desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana, considera-se que um micro-organismo poderá agir no ecossistema onde ele se encontra somente quando presente em população igual ou superior a 10^7 células viáveis/g do conteúdo. A concentração em células viáveis do probiótico deve ser, portanto, ajustada na preparação inicial levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do micro-organismo sem se multiplicar no tubo digestivo e o efeito de diluição intestinal de maneira a atingir, no mínimo, 10^7 células/g do conteúdo intestinal. Considera-se, portanto, que a concentração em células vivas do probiótico no produto a ser ingerido deve estar, pelo menos, de 10^8 a 10^9 UFC/g (NICOLI & VIEIRA, 2000).

1.2.5. Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são, basicamente, os mesmos atribuídos à microbiota intestinal, os quais incluem:

Produção de substâncias inibidoras de micro-organismos patogênicos: Os micro-organismos produzem algumas substâncias que inibem o crescimento de vários patógenos, como os ácidos orgânicos, bacteriocinas, substâncias *bacteriocin-like*, substâncias similares a antibióticos e peróxido de hidrogênio (produzido em ambientes aeróbios) (YILDRIM & JOHNSON, 1998; NARDI *et al.*, 2005; RASTALL *et al.*, 2005; LIONG, 2007; CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2008).

Competição por nutrientes e sítios de adesão: Vários micro-organismos usados como probióticos competem por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal e por nutrientes, inibindo, deste modo, a fixação e a alimentação de patógenos (BERNET *et al.*, 1994; NICOLI & VIEIRA, 2000; RASTALL *et al.*, 2005; LIONG, 2007).

Inibição da produção ou ação de toxinas: Alguns probióticos têm a propriedade de inibir a ação de micro-organismos patogênicos, inibindo a produção ou a ação de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo, assim, a sua atuação no epitélio intestinal (CZERUCZA *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 1998; FUKUDA *et al.*, 2011).

Modulação do sistema imune: Evidências sugerem que a modulação (estimulação ou supressão) da resposta imune específica e não-específica pode ser outro mecanismo pelo qual os probióticos protegem o hospedeiro contra as desordens gastrintestinais, infecções respiratórias e doenças alérgicas (PERDIGÓN *et al.*, 1995; NEUMANN *et al.*, 1998; PODOPRIGORA *et al.*, 1999; RASTALL *et al.*, 2005; DOGI *et al.*, 2008; AURELI *et al.*, 2011).

1.2.6. O gênero *Bifidobacterium*

1.2.6.1. Características taxonômicas, metabólicas e ecológicas

As bifidobactérias foram originalmente isoladas e descritas no período de 1899-1900 por Henry Tissier, que observou uma bactéria abundante em forma de Y nas fezes de crianças que se alimentavam de leite materno, mas não naquelas que se alimentavam de fórmulas. Essa bactéria foi anteriormente denominada *Bacillus bifidus* (TISSIER, 1900; citado por LEAHY *et al.*, 2005), devido à sua morfologia bifurcada. Contudo, sua localização taxonômica sofreu várias alterações,

sendo denominada também *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*, antes de ser reconhecida como um gênero à parte, em 1974 (VASILJEVIC & SHAH, 2008). O gênero pertence ao Filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, Ordem *Bifidobacteriales* e Família *Bifidobacteriaceae*, sendo representado atualmente por 37 espécies, as quais foram isoladas principalmente do trato digestivo de mamíferos (LEAHY *et al.*, 2005; TURRONI *et al.*, 2011).

As bifidobactérias são descritas como micro-organismos anaeróbios obrigatórios, embora algumas linhagens possam tolerar o oxigênio. São bactérias imóveis, catalase negativa, Gram positivo, heterofermentativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes curvos, caracterizados, frequentemente, por uma bifurcação em forma de Y. Linhagens isoladas de fezes frescas apresentam formas que variam desde ramificadas, a formas bifurcadas de Y e V. Contudo, em meios de culturas não favoráveis, as bifidobactérias podem se apresentar pleomórficas. A maioria das bifidobactérias isoladas de seres humanos cresce à temperatura ótima de 36-38°C. São ácido tolerantes, e o pH ótimo para seu crescimento está entre 6,5-7,0. As bifidobactérias são micro-organismos sacarolíticos e todas as linhagens caracterizadas possuem a habilidade de fermentar glicose, galactose e frutose, com produção, principalmente, de ácido acético e ácido lático (LEAHY *et al.*, 2005; CRONIN *et al.*, 2011).

Devido à sua capacidade metabólica, estas bactérias são frequentemente incluídas no grupo das bactérias do ácido lático, apesar de serem distintas, devido a diferenças no seu conteúdo de G-C, que varia entre 55% a 67% (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Além disso, as bifidobactérias produzem a partir do metabolismo de 2 moles de glicose, tanto o ácido acético quanto o ácido lático por uma via incomum, que resulta em uma proporção teórica de 3:2 para acetato/lactato, como metabólitos primários. Produzem também a enzima frutose-6-fosfato fosfoquetolase (F6PPK), que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato. Esta enzima é utilizada como uma ferramenta na identificação do gênero; entretanto, não permite a distinção no nível de espécie (SHIN *et al.*, 2000; FANDI *et al.*, 2001; VENTURA *et al.*, 2004).

As bactérias desse gênero são habitantes naturais do trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais de sangue quente, o que pode ser explicado pelo sequenciamento do genoma de *Bifidobacterium longum* NCC2705, demonstrando uma alta adaptação ao trato digestivo humano em termos de metabolismo, capacidade de adesão e atividade imunomodulatória (SCHELL *et al.*, 2002). As bifidobactérias representam a maioria da população bacteriana intestinal total em recém-nascidos saudáveis que se alimentam de leite materno; entretanto, sua

população diminui no intestino humano adulto, embora se mantenha relativamente estável, representando 3% da microbiota fecal (HARMSSEN *et al.*, 2000; CRONIN *et al.*, 2011; TURRONI *et al.*, 2011).

Trabalhos recentes isolaram também bifidobactérias do leite materno, sugerindo que o leite humano pode ser um simbiótico natural contendo as bactérias benéficas (bifidobactérias) e o seu substrato (fator bifidus) para promover a saúde da criança. As espécies de bifidobactérias encontradas foram: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum* e *B. longum* (GUEIMOND *et al.*, 2007; MARTÍN *et al.*, 2009; SOLÍS *et al.*, 2010; ARBOLEYA *et al.*, 2011; ZACARÍAS *et al.*, 2011). No leite humano, estão presentes também os chamados fatores bifidus, oligossacarídeos do leite humano, HMOs (*human milk oligosaccharides*). Algumas bifidobactérias, em particular as primeiras colonizadoras do intestino, são capazes de degradar estes HMOs. Neste contexto, bifidobactérias típicas isoladas de crianças, como *B. infantis* e *B. bifidum* possuem diferentes capacidades de fermentar HMOs, enquanto que bifidobactérias associadas ao adulto geralmente não o utilizam como substrato fermentável. O sequenciamento do genoma de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 explica a capacidade desta linhagem de consumir HMOs mediante um grupo de genes específicos que codifica glicosidases e transportadores de carboidratos necessários para a importação e metabolismo deles (SELA *et al.*, 2008; SELA *et al.*, 2011; TURRONI *et al.*, 2011).

1.2.6.2. Efeitos benéficos

O uso de probióticos tem como objetivo compensar falhas ou reforçar a atividade do ecossistema microbiano gastrintestinal já existente, porém em desequilíbrio ou com previsão de desequilíbrio (tratamento com antibióticos). A terapia com probióticos tem atraído grande interesse na pesquisa de doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas.

A maioria dos ensaios clínicos envolvendo probióticos tem como finalidade a prevenção e tratamento de doenças intestinais, em adultos e crianças. BALs e bifidobactérias têm mostrado um efeito protetor contra as doenças diarreicas, como a infecção por rotavírus. SAAVEDRA e colaboradores (1994) demonstraram que a combinação de *B. bifidum* e *Streptococcus thermophilus* reduz o risco de infecção por rotavírus em crianças. Outros estudos relatam a eficácia dos probióticos no tratamento e prevenção da diarreia associada a antibiótico. Assim, *Bifidobacterium lactis*, em combinação com *S. thermophilus*, mostraram-se capazes de reduzir a

incidência e duração de diarreia associada a antibiótico (CORRÊA *et al.*, 2005). Um dos principais problemas no tratamento com antibióticos é o desbalanço da microbiota intestinal, permitindo a manifestação de patógenos intestinais, como *C. difficile*. Um ensaio clínico conduzido por PLUMMER e colaboradores (2004) mostra que a terapia com *L. acidophilus* e *B. bifidum* pode reduzir a incidência de diarreia associada a antibiótico, pela neutralização das toxinas de *Clostridium*. A “diarreia do viajante” atinge metade dos visitantes de áreas de risco com condições precárias de higiene. Embora seja, na maioria das vezes, autolimitada, causa desconforto para as pessoas acometidas. Um estudo mostrou que a combinação de linhagens probióticas, contendo *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, reduziu significativamente, em 28%, a frequência da diarreia do viajante (LEAHY *et al.*, 2005). Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* em camundongos mostram uma proteção conferida pelos probióticos frente a outras infecções intestinais. SILVA e colaboradores (1999) e (2004) obtiveram sucesso na proteção da infecção por *Salmonella Typhimurium*, em camundongos, pelo tratamento com *B. longum*. Trabalhos similares foram feitos pelo mesmo grupo de pesquisa, utilizando o mesmo modelo de infecção, obtendo resultados promissores para *B. animalis* subsp. *lactis* (MARTINS *et al.*, 2010). Um recente estudo desenvolvido por FUKUDA e colaboradores (2011) mostrou também um efeito protetor de bifidobactérias na infecção por *E. coli* O157:H7. Estes autores atribuem a esta proteção observada, à produção de acetato, a qual acentuou mecanismos de defesa mediados pelas células epiteliais, inibindo desta maneira, a translocação da toxina do enteropatógeno do lúmen intestinal para a corrente sanguínea.

Talvez o maior sucesso obtido, no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn, bolsite e colite ulcerativa), com bactérias probióticas, seja com o probiótico VSL#3, que consiste numa combinação de quatro espécies de lactobacilos, três espécies de bifidobactérias e *S. thermophilus*. Para avaliar o efeito do probiótico na manutenção do período de remissão de bolsite, GIONCHETTI e colaboradores (2000) realizaram um ensaio clínico com pacientes com bolsite crônica e foi observada uma redução no número de recidivas nos pacientes tratados com probiótico, quando comparados com pacientes que receberam placebo. Além disso, depois que a terapia com o probiótico foi encerrada, todos os pacientes desenvolveram bolsite recorrente dentro de três meses. Em 2003, o mesmo grupo de pesquisadores, demonstrou que o probiótico também pode prevenir a doença se a terapia oral for iniciada imediatamente após a cirurgia de colocação de bolsa ileo-anal anastomótica (GIONCHETTI *et al.*, 2003). Recentemente,

GUGLIELMETTI e colaboradores (2011), em um estudo clínico randomizado, duplo-mascarado, controlado com placebo, avaliaram a eficácia de *B. bifidum* MIMBb75 no tratamento da síndrome do intestino irritável. A administração da bifidobactéria trouxe melhoria nos sintomas; dor/desconforto, distensão/inchaço e desordens digestivas, melhorando também a qualidade de vida.

Para uma diminuição da exposição do hospedeiro a agentes carcinógenos, o mecanismo de ação de probióticos ocorre, possivelmente, por: detoxificação de carcinógenos ingeridos; alteração do ambiente intestinal, diminuindo a população e/ou atividade metabólica de bactérias que podem gerar componentes carcinogênicos; produção de compostos (ácido butírico) que podem modular a apoptose das células tumorais; produção de compostos que inibem o crescimento de células tumorais e estimulação do sistema imune que age contra a proliferação de células tumorais (PARVEZ *et al.*, 2006). Alguns trabalhos mostram que algumas linhagens de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são capazes de reduzir os níveis de enzimas como β -gluconidase, azoredutase e nitroreductase, as quais convertem procarcinógenos em carcinógenos. Alguns autores atribuem a diminuição da atividade enzimática, à produção de ácidos graxos de cadeia curta pelos probióticos. Entretanto, são necessários mais estudos mostrando a atividade antimutagênica e anticarcinogênica dos probióticos, para uma possível aplicação na prevenção ou tratamento do câncer de cólon (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Popularmente, pacientes têm creditado a melhora da constipação intestinal ao uso de alimentos contendo probióticos. Entretanto, até o momento, não há evidências suficientes comprovando a eficácia dos probióticos na constipação intestinal. Um trabalho desenvolvido por GUERRA e colaboradores (2011), em parceria com nosso laboratório, avaliou a eficácia de *B. longum* 5^{1A} na constipação intestinal crônica em crianças e adolescentes. Foi observado um efeito positivo em relação à consistência das fezes, frequência evacuatória, dor para evacuar e dor abdominal com a suplementação da bifidobactéria. Entretanto, um aumento da frequência evacuatória e diminuição da dor abdominal e dor para evacuar também foi observado para o grupo placebo que recebeu iogurte sem adição de bifidobactérias, mesmo em intensidade inferior. Uma hipótese para explicar este resultado é uma possível influência benéfica das bactérias fermentadoras do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) na constipação. Existe até mesmo uma discussão sobre a inclusão dessas bactérias no grupo dos probióticos. Como o efeito do

iogurte sozinho foi aumentado pela adição do probiótico, este resultado encoraja a realização de novos ensaios clínicos nesta área.

A administração de bifidobactérias pode ser benéfica também para a prevenção ou tratamento de várias outras doenças como: doenças atópicas, imunossupressão, hiperlipidemia, e infecções por *Helicobacter pylori* (GOTTELAND *et al.*, 2006; VASILJEVIC & SHAH, 2008; HASAN AL-SHERAJI *et al.*, 2012).

1.2.6.3. Uso em produtos lácteos fermentados

O interesse por produtos lácteos fermentados tem aumentado e alguns iogurtes suplementados com bactérias probióticas têm sido desenvolvidos. O isolamento e a caracterização de probióticos que possam ser veiculados por formulações alimentares para o consumo humano tem sido alvo de estudo de diversos grupos de pesquisa aplicada no Brasil e no exterior. Em 1994, o mercado global de probióticos movimentou 6,6 bilhões de dólares, liderado pelo Japão, responsável por mais de 50% desse total. Em 2007 e 2008, a movimentação foi de 13 e 15 bilhões de dólares, respectivamente. Atualmente, o mercado está em cerca de 20 bilhões de dólares, com previsão de superar 22 bilhões em 2013. Dentre os fatores que têm estimulado esse mercado são citados: preocupação do consumidor com a manutenção da saúde e prevenção de doenças, e acúmulo de evidências dos benefícios dos alimentos probióticos, respaldadas em estudos científicos (FERREIRA, 2012).

Os micro-organismos utilizados em fermentação de alimentos provocam modificações benéficas, geralmente melhorando o sabor, a textura e, muitas vezes, acumulando vitaminas (B6, B12, niacina e ácido fólico), além dos ácidos orgânicos, que vão aumentar a vida de prateleira desses produtos. Atuam parcialmente sobre um ou mais dos componentes básicos dos alimentos: hidratos de carbono (sacarolíticos), proteínas (proteolíticos) e gorduras (lipolíticos). Devido a essa incapacidade de oxidar totalmente estes componentes alimentares, substâncias como os ácidos orgânicos e etanol mais energia são produzidas e acumuladas, modificando, desta forma, o sabor, as características reológicas do substrato, além de terem efeito de conservação, impedindo o desenvolvimento de outros micro-organismos, que, caso crescessem, poderiam deteriorar o produto, tornando-o impróprio para o consumo. Quanto à produção de energia, as bactérias do ácido lático necessitam de grande quantidade de carboidratos para obtenção de energia suficiente para biossíntese e multiplicação, resultando em um acúmulo de ácido lático e outros subprodutos.

Quando há produção quase que exclusivamente de ácido láctico, são denominadas de homofermentativas, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, outros compostos, como o CO₂ e, ácido acético e/ou etanol, em quantidades apreciáveis (FERREIRA, 2005).

Os cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são os responsáveis pelo processo fermentativo durante a obtenção do iogurte. Além destes, pode-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. Entretanto, é exigida viabilidade, atividade e concentração de, no mínimo, 10⁷ UFC/g, dos micro-organismos dos cultivos, no produto final e durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007). O crescimento associado das culturas do iogurte resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior produção de ácido láctico e um maior desenvolvimento de aroma.

Logo após a inoculação da cultura iniciadora, *S. thermophilus* apresenta crescimento mais rápido que *L. bulgaricus*, pela capacidade de metabolizar a lactose a pH mais neutro, além de ser favorecido pelo potencial redox inicial. Com o seu crescimento, ácido láctico e fórmico são acumulados no meio, abaixando parcialmente o pH; o potencial redox é reduzido, pelo consumo de oxigênio dissolvido e, em alguns casos, ocorre liberação de CO₂. Todos estes fatores estimulam a proliferação dos lactobacilos, resultando em uma maior acidificação e liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, como treonina, histidina e valina, que estimulam o crescimento de *S. thermophilus*. Ao longo do processo fermentativo, cada vez mais ácido láctico é acumulado no meio, até um ponto que passa a inibir *S. thermophilus*. Quando o pH alcança valores próximos de 4,6, ocorre coagulação do leite, encerrando-se a fermentação no pH de 4,5. No início do processo fermentativo, tem-se, portanto, uma simbiose e, no final, uma antibiose (FERREIRA, 2005; ANGELOV *et al.*, 2009).

Dentre os metabólitos que contribuem para o sabor, estrutura e consistência do iogurte, têm-se o ácido láctico, acetaldeído e diacetil. O acetaldeído é o composto mais importante no sabor do iogurte, sendo produzido, principalmente, pelo *L. bulgaricus*. Dependendo da linhagem e concentração de lactobacilos utilizados na produção de iogurtes, pode ocorrer o fenômeno de pós-acidificação, que consiste na produção de ácido láctico durante o período de estocagem (SHAH, 2000; FERREIRA, 2005; ANGELOV *et al.*, 2009). Atualmente, as indústrias têm utilizado culturas iniciadoras que contenham um maior número de estreptococos que de

lactobacilos, uma vez que terá efeito decisivo no sabor e nas características reológicas do produto final.

A adição de probióticos em um alimento ou bebida o caracteriza como funcional. Segundo ROBERFROID (2002) um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença. Grande parte das pesquisas em termos de alimentos funcionais encontra-se voltada para leites fermentados e iogurtes, seguidos de leite em pó destinado a recém-nascidos, sendo os dois primeiros, os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas. Outros produtos lácteos disponíveis no comércio, em menor escala, incluem sobremesas à base de leite, sorvetes e queijos (SAAD, 2006).

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, devem ser empregadas culturas com base no seu desempenho tecnológico. É importante que mantenham a viabilidade ao serem manipuladas e incorporadas, sem alterar as características intrínsecas do produto. Além disso, da perspectiva do fornecedor, a linhagem probiótica deve apresentar qualidade tecnológica para produção em larga escala, ou seja, uma vez concentrada resistir ao congelamento ou secagem (liofilização ou *spray drying*) (ZACARÍAS *et al.*, 2011).

Alguns fatores podem influenciar a viabilidade e funcionalidade de probióticos em alimentos fermentados, dentre os quais: linhagem, prática de inoculação (adição do probiótico pode ser feita antes ou após a fermentação), acidez final do produto, oxigênio dissolvido, tipo de embalagem, características do processo de elaboração (tempo/temperatura de fermentação), interação entre os micro-organismos presentes, composição química do produto (disponibilidade de nutrientes), concentração do inóculo do cultivo iniciador e da linhagem probiótica, presença ou ausência de inibidores ou estimuladores do crescimento e condições de armazenamento (SHAH, 2000; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; VINDEROLA *et al.*, 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008). Entre as bifidobactérias, algumas linhagens são mais adequadas para aplicações industriais que outras. A boa tolerância ao estresse ácido e oxidativo torna *B. animalis* subsp. *lactis* a espécie mais comumente incorporada aos produtos lácteos, capaz de manter altos níveis de células viáveis durante a estocagem (SÁNCHEZ *et al.*, 2010; CRONIN *et al.*, 2011).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um limitado número de bactérias no cólon que tem o potencial de beneficiar a saúde (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Para que uma substância possa ser definida como tal, deve cumprir os seguintes requisitos: ser de origem vegetal; formar parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas; não ser digerida por enzimas digestivas, ser parcialmente fermentada por um grupo de bactérias e ser osmoticamente ativa (MORAES & COLLA, 2006). Um produto em que estão combinados um probiótico e um prebiótico é denominado de simbiótico. A interação entre eles *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anteriormente ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. Os prebióticos mais comumente utilizados como fatores bifidogênicos são a inulina e os fruto-oligosacarídeos (FOS). Eles têm sido extensivamente utilizados em alimentos lácteos por melhorar a sobrevivência de bifidobactérias durante a vida de prateleira, uma vez que estas bactérias apresentam sensibilidade ao oxigênio e baixa tolerância ao ácido (FERREIRA, 2012).

1.2.7. Legislação de probióticos

Uma questão ainda não conclusa pela literatura é a quantidade e frequência de consumo de probióticos necessários para assegurar os benefícios a eles atribuídos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que, para um produto probiótico apresentar a alegação de que promove a saúde, a quantidade mínima viável da cultura deve estar situada na faixa de 10^8 - 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores são aceitos, desde que se comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação da eficácia deve incluir: laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e sais biliares. A quantidade do probiótico em UFC contida na recomendação diária do produto pronto para consumo deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação: “O (indicar a espécie do micro-organismo) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

Os micro-organismos considerados como probióticos segundo a ANVISA são: *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota, *L. casei* var. *rhamnosus*, *L. casei* var. *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *B. bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*. As bactérias utilizadas na produção de iogurtes, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* não são considerados pela ANVISA como probióticos, por não possuírem efeito probiótico cientificamente comprovado. Segundo a Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, os leites fermentados nos quais se mencione o uso de bifidobactérias, a contagem será de, no mínimo, 10^6 UFC de bifidobactérias/g (BRASIL, 2007).

Mesmo com a utilização de ferramentas moleculares independentes de cultivo para quantificação de probióticos em produtos comerciais, ainda são adotadas, rotineiramente, técnicas de cultivo convencionais para monitoramento da viabilidade. Para permitir este controle no produto final, são requeridos métodos confiáveis e rápidos para enumeração de rotina. Além disso, tais métodos são essenciais para monitorar também possíveis mudanças bioquímicas e fisiológicas na população de probióticos durante a estocagem do produto comercial (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

Um importante parâmetro no monitoramento da viabilidade dos micro-organismos nos produtos comercializados é a possibilidade de contar bactérias probióticas diferencialmente ou seletivamente. Muitas metodologias têm sido propostas nos últimos anos; entretanto, ainda não há um protocolo único oficial e nem meios seletivos ou diferenciais para enumerar probióticos. A enumeração depende da linhagem probiótica, cultura iniciadora e agentes seletivos/diferenciais usados, sendo dificultada naqueles produtos que contêm muitas espécies de micro-organismos, tornando-se impossível na presença de várias linhagens de uma mesma espécie. Para o isolamento das bifidobactérias nos produtos fermentados, as metodologias propostas utilizam diferentes meios de cultura e agregam alguns componentes para tornar o meio seletivo/diferencial como: carboidratos, sais orgânicos e inorgânicos, corantes, cromógenos e antimicrobianos (BEERENS, 1991; HARTEMINK *et al.*, 1996; CHARTERIS *et al.*, 1997; HARTEMINK & ROMBOUITS, 1999; VINDEROLA & REINHEIMER, 1999; ROY, 2001). Outros métodos propostos envolvem técnicas de biologia molecular, utilizadas para identificar e discriminar bifidobactérias presentes nos leites fermentados (COLLADO & HERNÁNDEZ, 2007).

Em 1999, VINDEROLA & REINHEIMER publicaram um trabalho demonstrando que o uso do ágar MRS com propionato de sódio e cloreto de lítio (LP-MRS) permitiu a enumeração

seletiva e diferencial de duas linhagens de *B. bifidum*, na presença de duas linhagens de *L. acidophilus* e quatro diferentes tipos de culturas iniciadoras. Este meio foi eficiente, também, na enumeração de outras linhagens de bifidobactérias (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000). A combinação deste meio proposto com outros meios adequados para enumeração seletiva/diferencial das outras culturas presentes nos produtos fermentados possibilita o monitoramento da viabilidade de micro-organismos presentes em alguns produtos probióticos.

1.3. O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias pertencentes à classe γ -Proteobacteria, Família *Enterobacteriaceae*. São bacilos anaeróbios facultativos, Gram negativo, fermentam a glicose, reduzem nitrato a nitrito e possuem flagelos peritríquios (com exceção de *Salmonella Pullorum*) (BERGEY' MANUAL, 2005). A *Salmonella* foi isolada em 1885, por Daniel Salmon, patologista, e hoje são conhecidos mais de 2500 sorotipos diferentes (JIMÉNEZ & CASTRO, 2003; WHO, 2012). Embora todos os sorotipos possam causar doenças em seres humanos, estes são classificados de acordo com sua adaptação aos hospedeiros. Alguns sorotipos exibem um limitado espectro de hospedeiro, por exemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi em primatas, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Dublin em gado e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Choleraesuis em suínos. Quando esses sorotipos causam doença em seres humanos, costuma ser de forma invasiva. A maioria dos sorotipos, entretanto, possui um amplo espectro de hospedeiros. Classicamente, eles causam gastroenterite, que exige tratamento específico apenas em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Esse grupo compreende *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis, os dois principais sorotipos transmitidos do animal para o homem (WHO, 2012).

A gravidade e natureza da doença dependem do sorotipo da salmonela e da susceptibilidade do hospedeiro envolvido. Há duas principais síndromes associadas a infecção por *Salmonella*: salmonelose não tifóide (doença gastrointestinal conhecida como enterite) e febre tifóide (doença sistêmica) (LAYTON & GALYOV, 2007). *Salmonella* Typhi e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Paratyphi são sorotipos restritos aos seres humanos e causam febre tifóide e paratifóide respectivamente, infecções que são um problema de saúde pública, principalmente em regiões onde há pouco ou nenhum acesso a água potável e onde o tratamento de água é

insatisfatório. Estas infecções, também põem em risco viajantes em países endêmicos. A taxa de mortalidade em infecções não tratadas por febre tifóide pode ser de 10 a 15%. Em alguns casos, pacientes podem recuperar, mas permanecem como carreadores da bactéria, por anos (LAYTON & GALYOV, 2007; CRUMP & MINTZ, 2010; MASTROENI & GRANT, 2011).

A salmonelose é uma infecção de importância tanto em saúde pública como em saúde animal, devido ao impacto econômico que ocasiona. Segundo a Organização Mundial de Saúde, as salmonelas estão entre os patógenos que mais causam impacto a saúde da população, estando associadas a surtos e casos esporádicos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, de 1999 a 2008 foram registrados 6.602 surtos de DTA sendo que *Salmonella* spp. foram associadas a 43% dos casos dos quais o agente etiológico foi identificado. Em relação ao impacto econômico, é o gênero bacteriano que ocasiona maiores perdas na indústria avícola (OCHOA & RODRÍGUES, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2011).

Os antimicrobianos são conhecidos como importantes ferramentas para o tratamento de doenças, tanto em seres humanos quanto em outros animais. Em animais de produção, no entanto, são também usados como promotores de crescimento, sendo adicionados às rações, em doses contínuas e subterapêuticas, o que leva a uma melhor conversão alimentar e ganho de peso. Este modo de uso, porém, pode levar a uma pressão seletiva que propicia o aparecimento de bactérias resistentes, o que, atualmente, é um problema de saúde pública mundial, devido ao risco de disseminação de patógenos e de genes de resistência transmissíveis, via cadeia alimentar, para micro-organismos patogênicos ou comensais humanos, diminuindo as opções de tratamento nas infecções (MEDEIROS *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os antimicrobianos mais utilizados para tratamento de salmonelose em adultos são as fluoroquinolonas. Cefalosporinas de terceira geração são empregadas em crianças com infecção grave e, cloranfenicol, ampicilina, amoxicilina e trimethoprim-sulfamethoxazole são drogas alternativas ao tratamento. As fluoroquinolonas foram primeiramente licenciadas para terapia em seres humanos e, na época, não havia o risco de resistência em *Salmonella*. Entretanto, quando este tratamento foi aplicado em animais de produção, a taxa de resistência desses micro-organismos a esta droga, em animais e alimentos e, subseqüentemente, em infecções em seres humanos, aumentou rapidamente em muitos países. O aparecimento posterior, de linhagens de *Salmonella* multiresistentes, MDR

(*multidrug-resistant*) agravou o problema pela limitação de tratamento efetivo de infecções humanas (WHO, 2012).

A transmissão de *Salmonella* spp. para o homem ocorre, geralmente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados, embora a transmissão pessoa a pessoa possa ocorrer, ou, ainda, pelo contato com animais infectados e ambientes contaminados com matéria fecal (SHINOHARA *et al.*, 2008; MASTROENI & GRANT, 2011). Após sua ingestão e passagem pelo estômago, a *Salmonella* coloniza o intestino, interagindo e translocando através do epitélio intestinal, via três rotas: (i) invasão ativa dos enterócitos, (ii) invasão das células M e, (iii) pelas células dendríticas, que intercalam as células epiteliais. As bactérias, aderidas à superfície das células epiteliais, induzem degeneração nas microvilosidades do enterócito. As linhagens virulentas, preferencialmente, invadem as células M, via expressão do sistema de secreção do tipo III, TTSS (*type three secretion system*), codificado pela ilha de patogenicidade 1 da *Salmonella*, SPI-1 (*Salmonella pathogenicity island 1*), que injeta fatores de virulência na célula alvo. O mecanismo de entrada é caracterizado por um profundo rearranjo do citoesqueleto de actina no local onde a bactéria entra em contato com a célula hospedeira (MARTINOLI *et al.*, 2007; GRASSL & FINLAY, 2008). Uma vez adquirida, pode causar de uma a quatro síndromes: febre entérica (tifóide), enterocolites/diarréia, bacteremia e o hospedeiro se tornar portador assintomático crônico (COBURN *et al.*, 2007).

Em camundongos, *S. Typhimurium* causa uma doença sistêmica similar à febre tifóide causada pela *S. Typhi* em seres humanos, independente da via de infecção. Classicamente, a cinética de infecção em camundongos se caracteriza por quatro fases. A primeira se traduz pela rápida eliminação de bactérias séricas. Durante a semana seguinte à infecção, a *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocitárias. Essa fase precede uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento de certos patógenos, por PAMPs, pelas células fagocíticas. Isso resulta na produção de várias citocinas (Tnfa, IL1, IL6, IL12, Ifng) bem como infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos nos locais de inflamação. Na quarta fase de infecção se instala a defesa inflamatória adquirida, fazendo intervir as células B e T, assim como os fatores humorais que dela decorrem (SALEZ & MALO, 2004; GRASSL & FINLAY, 2008).

A salmonelose experimental em camundongos, utilizando a *S. Typhimurium* constitui um excelente modelo de estudo, sendo os resultados obtidos geralmente extrapolados para a compreensão de vários aspectos da infecção produzida por *S. Typhi*, cujo hospedeiro natural é o

homem. Em camundongos inoculados intragastricamente, observou-se que o sítio primário da infecção por *S. Typhimurium* é o íleo terminal, onde a bactéria interage, preferencialmente, com as células das placas de Peyer. A entrada bacteriana é seguida de morte das células M, a salmonela move-se lateralmente ao longo da lâmina própria ou invade os folículos, onde se multiplicam. Com o tempo, a infecção progride para os linfonodos mesentéricos, chegando ao fígado e baço, onde se multiplica nos macrófagos residentes nestes órgãos. Essa fase é caracterizada por uma rápida multiplicação bacteriana, o que resulta em hepato e esplenomegalia. O crescimento bacteriano no fígado e baço, leva a formação de abscessos contendo predominantemente leucócitos polimorfonucleares, lesões estas que acabam por adquirir forma de granulomas com área central de necrose (HOHMANN *et al.*, 1978; NAKONECZNA & HSU, 1980; NARDI *et al.*, 1991; OCHOA & RODRÍGUEZ, 2005).

1.3.1 *Salmonella* e probióticos

Os agentes antimicrobianos são usados rotineiramente como terapêuticos e profiláticos em salmoneloses humana e animal. Com o aumento da resistência a drogas, novas alternativas têm sido pesquisadas contra esta doença, tais como o uso de probióticos. O efeito de probióticos em casos de salmoneloses já vem sendo demonstrado há alguns anos. Estudando o efeito protetor de diversos micro-organismos em ensaios laboratoriais, relatou-se, utilizando modelo animal, que probióticos como *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *E. coli* EMO, *B. longum*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *E. faecium* e *L. bulgaricus* conferem um efeito protetor aos camundongos desafiados com *S. Typhimurium* (RODRIGUES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1999; FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011).

ASAHARA e colaboradores (2001) observaram um aumento da resistência à infecção por *S. Typhimurium* em camundongos pela administração simbiótica de bifidobactérias e prebióticos, possivelmente, devido à produção de ácidos orgânicos com conseqüente diminuição do pH intestinal. Em um estudo de PERDIGÓN e colaboradores (1990), uma proteção contra infecção por *S. Typhimurium* foi conferida aos camundongos que receberam leite fermentado por *L. casei* e *L. acidophilus*. O pré-tratamento com o leite fermentado contendo ambas as linhagens de lactobacilos inibiu a colonização pela salmonela no baço e fígado, aumentou níveis de anticorpos

no soro e resultou em uma taxa de 100% de sobrevivência dos animais. Em seguida, em 1995, PAUBERT-BRAQUET e colaboradores, testaram o efeito protetor de leite fermentado com diferentes linhagens de *L. casei* e iogurte adicionado de *L. casei* LAB-1, na infecção por *S. Typhimurium*. Em todas as condições avaliadas, a sobrevivência foi maior que no controle, sendo este efeito mais pronunciado nos animais que receberam iogurte adicionado de *L. casei* LAB-1 (87,5%). Outro estudo mostrou um efeito benéfico de iogurte na infecção por este patógeno (HITCHINS *et al.*, 1985).

Um estudo também em modelo animal, utilizando ratos, mostrou que 76,7% do grupo que recebeu diariamente a linhagem *Bifidobacterium lactis* HN019, durante uma semana, e subsequentemente foram infectados com *S. Typhimurium* continuaram vivos após três semanas da intervenção. Enquanto que no grupo controle, a mortalidade foi praticamente total, pois somente 6,9% continuaram vivos após infecção induzida. Além disso, o grupo experimental apresentou menor perda de peso e melhor absorção alimentar (SHU *et al.*, 2000).

Os modelos animais de desafio com *Salmonella* são extremamente importantes para compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos nas doenças causadas por esta bactéria. Eles permitem avaliar possíveis formas de prevenção e tratamento da salmonelose. Um grande número de pesquisas nessa área tem focado no uso do modelo murino desafiado com *S. Typhimurium* e vários resultados apontam efeito protetor de probióticos contra essa infecção.

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por probióticos, pelos efeitos benéficos sobre o hospedeiro, basicamente os mesmos exercidos pela microbiota normal do corpo humano. Neste sentido, micro-organismos constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias, com eficácia comprovada, são amplamente utilizados como probióticos. Vários estudos documentam os benefícios destes probióticos, incluindo a prevenção e o tratamento de infecções gastrintestinais. Evidências científicas comprovando o potencial dos probióticos na melhora da qualidade de vida de pessoas com distúrbios gastrintestinais sustentam um tema promissor e de grande expectativa científica.

A salmonelose é um dos principais problemas de saúde pública e representa um custo significativo para a sociedade em muitos países, em especial naqueles subdesenvolvidos e em desenvolvimento. As linhagens de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos vêm aumentando e um dos grandes problemas atuais da medicina é a alta resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado. Um dos incentivos à pesquisa com probióticos é a possibilidade de compensar esta falha no tratamento com antibióticos, já que uma das grandes vantagens de seu uso terapêutico é não selecionar bactérias resistentes.

As bifidobactérias têm sido, cada vez mais, utilizadas em preparações de alimentos, e são particularmente atrativas como potenciais probióticos para seres humanos, por constituírem uma população predominante da microbiota indígena do cólon e extremamente adaptada a esse ecossistema. Embora alguns benefícios exercidos por essas bactérias sejam relatados em ensaios clínicos, o seu modo de ação e de interação com o hospedeiro ainda é pouco conhecido. Várias preparações probióticas são hoje comercializadas no Brasil, na forma, essencialmente, de produtos lácteos contendo bifidobactérias. As linhagens utilizadas são, geralmente, de origem externa ao Brasil, havendo necessidade de se pagar o direito de comercialização às empresas multinacionais, o que eleva os preços dos produtos. Considerando-se que os principais e a maioria dos casos de diarreia ocorrem em pessoas de baixa renda, seria de grande interesse a seleção de uma bifidobactéria de origem nacional, a ser comercializada a custos mais acessíveis. Pelo exposto, pretende-se neste estudo selecionar, para uso probiótico em alimentos, bactérias do gênero *Bifidobacterium* isoladas de fezes de crianças saudáveis da cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Selecionar bifidobactérias da microbiota indígena de seres humanos brasileiros, para uso como probiótico em alimento funcional.

3.2. Objetivos Específicos

- A) Avaliar e comparar as propriedades tecnológicas das bifidobactérias selecionadas, usando como critérios a velocidade de crescimento a 37°C e aerotolerância.
- B) Determinar e comparar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e perfil de hidrofobicidade de bifidobactérias de origem humana e sua atividade antagonista *in vitro* contra enteropatógenos.
- C) Avaliar a capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes NIH, pela *B. longum* 5^{1A}.
- D) Elaborar iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A}, avaliando sua produção pela influência do tipo de cultura, prática de inoculação e presença de inulina 5%.
- E) Avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, durante 28 dias de armazenamento sob refrigeração, dos iogurtes elaborados.
- F) Avaliar a funcionalidade dos iogurtes elaborados, pela determinação do número de células produtoras de IgA+, no íleo e cólon e, pelo número de células de Küpffer no fígado, em camundongos BALB/c.
- G) Avaliar a taxa de mortalidade em camundongos BALB/c tratados e não tratados com os iogurtes contendo *B. longum* 5^{1A} e desafiados com *S. Typhimurium*.
- H) Avaliar a segurança do tratamento com *B. longum* 5^{1A}, em camundongos NIH, pela determinação do índice hepático e esplênico, ganho de peso e avaliação histológica do íleo e cólon.
- I) Avaliar o perfil imunomodulador de *B. longum* 5^{1A}, em camundongos NIH, pela determinação dos níveis de sIgA e IgM no conteúdo intestinal e soro, respectivamente e níveis de expressão gênica de citocinas inflamatórias e regulatórias em esplenócitos.

- J) Avaliar a taxa de mortalidade e desenvolvimento ponderal em camundongos NIH, tratados e não tratados com *B. longum* 5^{1A} e desafiados com *S. Typhimurium*.
- K) Avaliar o perfil imunomodulador de *B. longum* 5^{1A}, frente uma cinética de infecção com *S. Typhimurium*, em camundongos NIH, pela determinação: dos níveis de sIgA e IgM, no conteúdo intestinal e soro, respectivamente.
- L) Determinar e comparar aspectos histológicos de porções intestinais e fígado de camundongos NIH, tratados e não tratados com *B. longum* 5^{1A} e desafiados com *S. Typhimurium*.

4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LEFM, ICB, UFMG) e também no Instituto de Lactología Industrial da Universidad del Litoral em Santa Fé, Argentina (INLAIN, UNL-CONICET).

4.1. Animais

4.1.1. Animais isentos de germes

Foram utilizados camundongos isentos de germes, de 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem NIH (Taconic, Germantown, EUA). Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sendo mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, EUA) e manuseados de acordo com as técnicas já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Para os experimentos, os animais receberam *ad libitum* uma ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, BR) e água, esterilizadas por calor úmido. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands) no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério.

4.1.2. Animais convencionais

Para os ensaios *in vivo* da funcionalidade dos iogurtes adicionados de bifidobactérias, foram utilizados camundongos BALB/c, machos, de cinco a seis semanas de idade, provenientes do Centro de Experimentações Biológicas e Biotério da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Litoral (Esperanza, Santa Fé, Argentina). Um ciclo diurno/noturno de 12 horas e uma temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ com umidade de $55 \pm 2\%$ foram mantidos no biotério do Instituto de Lactología Industrial. Os animais receberam *ad libitum* uma ração sólida esterilizada

comercial para roedores (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) e água. Para os ensaios *in vivo* da funcionalidade de *B. longum* 5^{1A}, foram utilizados camundongos convencionais, de 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem NIH (Taconic), provenientes do biotério do ICB/UFMG. Estes últimos foram derivados de matrizes isentos de germes, os quais foram convencionalizados a partir de diluições fecais de outros animais convencionais. Os animais foram utilizados a partir da segunda geração, após a convencionalização. Os animais receberam ração sólida (Nuvilab) e água, *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério.

4.1.3. Manejo dos animais e aspecto ético

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida respeitando o “*Guide for the care and use of experimental animal*” (1996). A realização do presente trabalho de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo registrado sob o número 109/2008. Os experimentos realizados em Santa Fé foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Litoral.

4.2. Micro-organismos

4.2.1. Bifidobactérias

As espécies de bifidobactérias utilizadas neste estudo foram isoladas e caracterizadas no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes micro-organismos foram isolados de fezes de crianças saudáveis de até cinco anos de idade, da cidade de Salvador (Bahia, BR), e identificados por testes morfotintórios (Coloração de Gram), respiratórios e bioquímicos, seguido de PCR Multiplex, de acordo com KWON e colaboradores (2005). No Centro Universitário de Belo Horizonte (UNI-BH), foi testada, por turbidimetria, a velocidade de crescimento de 124 dessas amostras, sendo aquelas com maior velocidade de crescimento submetidas ao teste de aerotolerância, para seleção das melhores. Das amostras analisadas, foram selecionadas as quatro

espécies que apresentaram os melhores resultados aos testes realizados: *B. longum* 5^{1A}, *B. breve* 110^{1A}, *B. pseudolongum* 119^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A}. As culturas foram mantidas a -80°C em caldo De Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação foi feita em caldo MRS, a 37°C, durante 48 horas, em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, EUA), contendo uma atmosfera de 85%N₂, 10%H₂ e 5%CO₂. Após ativação, as culturas foram cultivadas em caldo MRS, a 37°C, durante 24-48 horas, em condições anaeróbicas.

4.2.2. Micro-organismos patogênicos

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium, de origem humana, utilizada nas infecções experimentais nos camundongos foi isolada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG, Brasil) e faz parte da coleção de cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG).

Para os experimentos de antagonismo *in vitro*, além da linhagem de *S. Typhimurium* de origem humana foram utilizadas também como reveladoras linhagens dos patógenos *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae*, todas de origem humana e pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, e linhagens de referência de *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Candida albicans* ATCC 18804, *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Clostridium perfringens* tipo A ATCC 13124, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella* Typhi ATCC 19430, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Shigella sonnei* ATCC 11060, todas cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ).

As linhagens patogênicas (com exceção das linhagens de *Bacteroides* e *Clostridium*) foram conservadas a -20°C, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. Para todos os experimentos, as bactérias foram ativadas em caldo BHI, a 37°C, durante 18 horas. As bactérias anaeróbicas *C. difficile*, *C. perfringens*, *B. fragilis* e *B. vulgatus* foram conservadas a -80°C, em caldo BHI-s (BHI suplementado com 0,5% de extrato de

levedura, 0,1% de hemina e 0,1% de menadiona) (HOLDMAN *et al.*, 1977), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação destas linhagens foi feita em caldo BHI-s, a 37°C, em anaerobiose, durante 24-48 horas.

4.3. Determinação da velocidade de crescimento das bifidobactérias

Com o intuito de avaliar o perfil do crescimento das bifidobactérias, foi feita uma curva, a partir de um cultivo, em 50 mL de caldo MRS, de cada bifidobactéria. A partir deste, mediu-se a densidade ótica (DO) de cada suspensão celular para iniciar a curva de crescimento. Calculou-se o volume (mL) necessário de cada pré-inóculo para se obter uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,1 em 300 mL de caldo MRS. Uma alíquota de 4 mL foi retirada após o inóculo para a determinação do pH e absorvância a 600 nm, ponto este considerado o tempo zero (T_0) do ensaio. O cultivo foi mantido, a 37°C, sob anaerobiose e o crescimento celular monitorado em intervalos por até 72 horas. Alíquotas coletadas em cada ponto da curva foram utilizadas para medida de DO e pH. As curvas de crescimento das bifidobactérias foram feitas em duplicata e em dois experimentos independentes. A taxa de crescimento específica (μ) foi calculada segundo a equação: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$, onde X_2 e X_1 são as densidades óticas no tempo t_2 e t_1 , respectivamente. Média do tempo de duplicação (T_d) foi calculada: $T_d = \ln 2 / \mu$ (SHIN *et al.*, 2000).

4.4. Determinação da tolerância ao oxigênio das bifidobactérias

O teste de tolerância ao oxigênio foi feito segundo FARIAS e colaboradores (2001), com modificações. A partir de um cultivo de 24-48 horas de cada amostra de bifidobactéria, foram feitos *spots* de 3,0 μ L em ágar MRS seguido de incubação, a 37°C, durante 48 horas, em câmara de anaerobiose. Simultaneamente, uma segunda placa inoculada com as mesmas linhagens foram mantidas na câmara anaeróbica como controle. Após crescimento, as placas experimentais foram expostas ao oxigênio, mantendo-as sob refrigeração a 4°C. Em intervalos, por até 72 horas, foi feita a coleta de cada *spot*, sendo repassados para tubos contendo caldo MRS. Após 48 horas de incubação, a 37°C, em câmara de anaerobiose foi avaliada a turvação das culturas nos diferentes tempos. A tolerância ao oxigênio foi determinada pela intensidade do crescimento, em anaerobiose, após exposição ao oxigênio em diferentes tempos (+: crescimento fraco; ++: crescimento moderado; +++: crescimento máximo). A pureza das culturas foram checadas no

final de cada ensaio pela coloração de Gram e examinação microscópica (100x). Os testes foram realizados em duplicata, sendo feitas duas repetições.

4.5. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bifidobactérias

As bifidobactérias foram testadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos seguindo-se o método de diluição em ágar (CLSI, 2012). Concentrações crescentes dos antimicrobianos foram adicionadas ao ágar *Brucella* (Difco), suplementado com hemina (Inlab, Diadema, Brasil) e menadiona (Inlab), fundido. Os meios foram plaqueados em duplicata. Com o replicador de Steers (STEERS *et al.*, 1959), inóculos padronizados de, aproximadamente, 10^5 UFC/mL (diluídos a 0,5 na escala de *McFarland*) foram adicionados às placas e incubados a 37°C, em anaerobiose. Placas sem droga inoculadas foram usadas como controle no início e no final da série. A leitura do experimento foi realizada após 48 horas de incubação e a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano. Como controle para os testes, foi utilizado *B. fragilis* ATCC 25285. Para a discriminação entre resistente e sensível, foram utilizados *break-points*, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), para as drogas preconizadas para anaeróbios e para as demais foram utilizados *break-points* sugeridos pelos autores Aimmo e colaboradores (2007) e Ouoba e colaboradores (2008). Os antimicrobianos testados incluíram inibidores da síntese de parede celular (cefotaxima, dicloxacilina, penicilina G, piperacilina e vancomicina), de síntese proteica (cloranfenicol, doxiciclina, eritromicina, neomicina e tetraciclina) e de ácidos nucleicos (metronidazol). Todos os antimicrobianos foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, EUA), exceto o metronidazol (All Chemistry, São Paulo, Brasil) e penicilina G (Fluka, St. Gallen, Suíça). Os testes foram realizados em duplicata, sendo feitas duas repetições.

4.6. Determinação do perfil de hidrofobicidade da parede celular das bifidobactérias

A habilidade das bifidobactérias de aderir a hidrocarbonos como medida de sua hidrofobicidade foi determinada segundo VINDEROLA & REINHEIMER (2003), com modificações. As linhagens de bifidobactérias foram cultivadas sob condições anaeróbicas, a 37°C, por 24 horas, sendo, em seguida, centrifugadas a 1500 x g, por 10 minutos. As células foram lavadas, duas vezes, em salina tampão fosfato esterilizada (*phosphate buffered saline*

PBS), suspensas no mesmo tampão, e a densidade óptica (DOA) ajustada para, aproximadamente, 1,0 a 560 nm. Então, adicionou-se 0,6 mL de η -hexadecano (Sigma-Aldrich Chemical) a 3,0 mL desta suspensão e, após homogeneização, incubou-se a 37°C, por 1 hora, para a separação das fases. A DO_{560nm} (DOB) foi determinada na fase aquosa e os resultados foram expressos como porcentagem da adesão bacteriana ao solvente, obtida segundo a fórmula: $H\% = [(DOA - DOB) / DOA] \times 100$. Os testes foram realizados em triplicata, sendo feitas três repetições.

4.7. Atividade antagonista *in vitro* das bifidobactérias contra patógenos

O teste *in vitro* para verificar a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla (NARDI *et al.*, 1999). Uma micro-gota de 5,0 μ L da cultura de cada bifidobactéria crescida em caldo MRS por 24 horas, a 37°C, em anaerobiose, foi colocada no centro da placa contendo ágar MRS. Após incubação a 37°C, por 48 horas, em anaerobiose, as placas foram colocadas em posição invertida e, em cada tampa, colocado 1,0 mL de clorofórmio. Após 30 minutos, as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de 3,5 mL de ágar BHI (para reveladores anaeróbios facultativos) ou BHI-s (para reveladores anaeróbicos obrigatórios) semi-sólido, inoculado com 10⁷ UFC da linhagem reveladora foi colocada sobre o ágar. Após incubação a 37°C, por 24-48 horas, foi efetuada a leitura dos testes, avaliando-se a presença ou ausência de halos de inibição ao redor do *spot*, independentemente do seu tamanho. Os experimentos foram realizados em duplicata sendo feitas duas repetições e o diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital (Digimatic Calipar, Mitutoyo, Suzano, Brasil).

4.8. Determinação da capacidade de colonização do trato gastrointestinal de animais isentos de germes por *B. longum* 5^{1A}

O experimento foi conduzido utilizando-se um grupo de três camundongos isentos de germes, sendo realizadas duas repetições. Os animais receberam um inóculo único de 0,1 mL de *B. longum* 5^{1A} contendo 10⁹ UFC/mL. Após a monoassociação, o nível populacional de bifidobactérias foi determinado nas fezes dos camundongos. Em dias pré-determinados, durante dez dias, as fezes foram colhidas sob estimulação anal, sendo, então, pesadas e submetidas a

diluições decimais em salina tampão fosfato esterilizada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em ágar MRS para enumeração bacteriana. A incubação foi feita em câmara de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Os resultados foram expressos como média do log do número de UFC por grama de fezes de seis animais (MARTINS *et al.*, 2009).

4.9. Elaboração dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A}

Para elaboração dos iogurtes, foi utilizado o cultivo lácteo comercial DVS (*direct vat system*) YF-L702 (Christian Hansen Lab., Horsholm, Dinamarca), adquirido na forma congelada, contendo as bactérias *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* na proporção 10:1 (10¹¹/g). Com o intuito de avaliar a influência do tipo de cultivo de *B. longum* 5^{1A}, prática de inoculação e presença do prebiótico inulina 5% (Orafti®, Bélgica) foram elaborados sete diferentes tipos de iogurtes (Quadro 1). *Bifidobacterium longum* 5^{1A} foi usada nas formas de cultivo fresco e congelado. Dois tipos de inoculação foram avaliados: inoculação direta (no mesmo momento da adição das culturas iniciadoras) e inoculação indireta (após fermentação das culturas iniciadoras).

Para o preparo do cultivo fresco, *B. longum* 5^{1A} foi repassada três vezes em caldo MRS (Biokar, Beauvais, França), adicionado de 0,1% (p/v) de L-cisteína hidrocloreto (Biopack, Buenos Aires, Argentina) e incubado por 18 horas, sob condições anaeróbicas (GasPak System-Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), a 37°C. Para o preparo do cultivo congelado, uma cultura *overnight* de *B. longum* 5^{1A} foi centrifugada (6000 x g/15 minutos/5°C), lavada duas vezes em PBS (pH 7,4) e suspensa em leite em pó desnatado, reconstituído a 20% (p/v) (San Regim, Buenos Aires, Argentina). A suspensão celular foi alíquotada e mantida a -70°C até o uso. A viabilidade foi verificada em MRS (Biokar) adicionado de L-cisteína hidrocloreto.

Independentemente da metodologia, adicionou-se uma concentração de bifidobactéria para obtenção de 10⁸ UFC/mL. A fermentação foi feita adicionando-se o cultivo lácteo em leite em pó desnatado, reconstituído a 10% (San Regim), a 43°C, até atingir um pH próximo a 4,6. A adição do cultivo fresco ou congelado foi feita antes ou após a fermentação. Para alguns iogurtes, 5% de inulina foi adicionada antes da autoclavação do leite (110°C por 30 minutos). O produto fermentado foi refrigerado em banho de gelo, antes da adição da bifidobactéria. Os iogurtes foram mantidos a 5°C, por 4 semanas.

Quadro 1 - Códigos dos iogurtes elaborados, em leite em pó desnatado, reconstituído a 10%, utilizando o cultivo lácteo comercial YF-L702

| Códigos | Tipos de iogurtes |
|-----------|---|
| Iogurte 1 | Tradicional (sem adição de bifidobactérias) |
| Iogurte 2 | Adição de CF/AF (ID) |
| Iogurte 3 | Adição de CF/DF (II) |
| Iogurte 4 | Adição de CC/AF (ID) |
| Iogurte 5 | Adição de CC/DF (II) |
| Iogurte 6 | Adição de CF/DF + 5% Inulina |
| Iogurte 7 | Adição de CC/DF + 5% Inulina |

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Legenda: CF: Cultivo fresco da bifidobactéria; CC: Cultivo congelado da bifidobactéria; AF: Adição do cultivo antes da fermentação; DF: Adição do cultivo depois da fermentação; ID: Inoculação direta; II: Inoculação indireta

4.9.1. Análises físico-químicas e microbiológicas

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram monitorados, logo após a produção dos iogurtes e após 14 e 28 dias de armazenamento a 5°C. Foram retiradas amostras para análises de pH e resistência ao fluido gástrico (análise *in vitro*), conforme metodologia proposta por VINDEROLA e colaboradores (2011b). Uma alíquota de cada iogurte foi homogeneizada com o mesmo volume de solução “saliva-gástrica simulada” contendo CaCl₂ (0,22 g/L), NaCl (16,2 g/L), KCl (2,2 g/L), NaHCO₃ (1,2 g/L) e 0,3% (p/v) de pepsina suína (Merck, Darmstadt, Alemanha), e ajustada para pH 3,00. Um mililitro foi coletado (antes do ajuste do pH) e após 90 minutos de incubação a 37°C, em banho-maria, para enumeração da bifidobactéria em LP-MRS. Os resultados foram expressos como diferença na contagem celular (log UFC/mL) entre o tempo 0 e após 90 minutos de incubação. Para verificar a viabilidade da bifidobactéria no iogurte, foi feita a contagem seletiva em ágar LP-MRS, adicionado de L-cisteína. Diluições adequadas do iogurte foram feitas em água peptonada esterilizada (0,1%) e plaqueadas. As placas foram incubadas anaerobicamente a 37°C, por 48 horas (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999). A

viabilidade da cultura iniciadora foi feita em ágar padrão para contagem (PCA, Britania, Argentina), adicionado de leite em pó desnatado, reconstituído a 10%. A incubação foi feita a 43°C, por 48 horas.

4.10. Efeito de diferentes iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} na imunomodulação em camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c, divididos em cinco grupos (quatro animais/grupo), receberam por dez dias consecutivos, via intra-gástrica, 0,2 mL dos seguintes produtos, conforme Quadro 1:

- (a) grupo 1- Controle: recebeu leite em pó desnatado, reconstituído a 10%;
- (b) grupo 2- Recebeu o iogurte 1;
- (c) grupo 3- Recebeu o iogurte 3;
- (d) grupo 4- Recebeu o iogurte 5;
- (e) grupo 5- Recebeu o iogurte 6.

Após dez dias de administração, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, após anestesia intraperitoneal (9 partes de cetamina, 100 mg/mL; 9 partes de xilazina, 20 mg/mL; 3 partes de acepromazina 10 mg/mL e 79 partes de solução salina esterilizada).

4.10.1. Determinação do número de células IgA+ na lâmina própria intestinal em camundongos BALB/c

A enumeração de células IgA+ foi determinada em cortes histológicos do íleo e cólon, por imunofluorescência, empregando-se um anticorpo monoespecífico anti-IgA de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich Chemical). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (*Nikon eclipse* com lâmpada de Hg) e o número de células fluorescentes contado, sendo o resultado expresso como número de células IgA+/10 campos observados. Células positivas (fluorescentes) foram contadas em um aumento de 400x (contagem duplo-mascarado) (ZACARÍAS *et al.*, 2011).

4.10.2. Determinação do número de células de Küpffer em camundongos BALB/c

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram retirados, fixados em formaldeído a 4% e processados para inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de três a cinco micrômetros de espessura, posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Para o exame morfológico, foram obtidas imagens utilizando-se uma microcâmara JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Alemanha). Cinco imagens por lâmina, em um aumento de 20x, foram capturadas aleatoriamente do parênquima hepático, evitando-se as áreas de veia central e de espaço porta. As imagens capturadas foram examinadas pela patologista (Prof^a. Dr.^a Rosa Maria Esteves Arantes, Departamento de Patologia Geral/ICB/UFMG), que não tinha conhecimento das amostras. Foram contados todos os hepatócitos e todas as células de Küpffer presentes em cada campo. Trabalhou-se com a média das cinco imagens e dos quatro animais/grupo. Os resultados foram indicados em número de células de Küpffer por 100 hepatócitos (MARTINS *et al.*, 2007).

4.11. Efeito de diferentes iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} na mortalidade em decorrência da infecção experimental por *S. Typhimurium* em camundongos BALB/c

Para avaliar a capacidade protetora dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} frente a uma infecção por *S. Typhimurium*, camundongos BALB/c foram aleatoriamente divididos em cinco grupos (dez animais/grupo), e tratados conforme item 4.10. Após dez dias de tratamento, os animais receberam uma dose de 10⁷ UFC/mL de *S. Typhimurium*, por via intra-gástrica. A sobrevivência foi monitorada durante vinte dias pós infecção. Neste período, os camundongos voltaram a receber os tratamentos. Os resultados foram expressos como porcentagem de animais que sobreviveram à infecção.

4.12. Avaliação da segurança e do perfil imunomodulador do tratamento de *B. longum* 5^{1A}, em camundongos NIH convencionais

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (controle e experimental), contendo sete animais por grupo. Os camundongos do grupo experimental receberam um inóculo diário de 0,1 mL da bifidobactéria contendo 10⁹ UFC/mL, suspensas em salina 0,9% esterilizada

e os animais do grupo controle receberam 0,1 mL de salina 0,9% esterilizada, durante dez dias consecutivos, por via intra-gástrica. Após dez dias de administração, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (cetamina 100mg/Kg de peso e xilasina 20 mg/kg de peso) e sacrificados, por deslocamento cervical. Os resultados foram obtidos de dois experimentos independentes, exceto os ensaios de expressão gênica e análise histológica, os quais foram feitos somente em uma repetição.

4.12.1. Determinação do ganho de peso, índice hepático e esplênico

Os camundongos foram pesados no início do experimento e no dia do sacrifício para avaliação do ganho de peso. Após o sacrifício, fígado e baço foram retirados e pesados para determinação do índice hepático e esplênico, respectivamente. Os resultados foram expressos como peso do órgão (mg) por peso corporal (g) (ZHOU *et al.*, 2000).

4.12.2. Exame histológico do íleo e cólon

Amostras do íleo e cólon dos camundongos do grupo controle e experimental foram submetidas a um exame histológico. Um fragmento de aproximadamente 5 cm dos intestinos foi coletado e aberto longitudinalmente e esticado sobre papel filtro. Esse material foi pré-fixado em solução de *Bouin*, e enrolado em espiral, com a mucosa voltada para dentro, de modo a formar um *Swiss roll* (ARANTES & NOGUEIRA, 1997). Foram executados cortes de três a cinco µm de espessura e os fragmentos assim obtidos foram corados pela Hematoxilina & Eosina (HE). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados sequencialmente por uma mesma patologista (Prof^a. Dr.^a Rosa Maria Esteves Arantes), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista (MARTINS *et al.*, 2009).

4.12.3. Determinação dos níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais no conteúdo intestinal

A determinação do nível de sIgA foi feita pelo método de ELISA de captura (RODRIGUES *et al.*, 2000). O intestino delgado foi removido pelo corte nas junções

gastroduodenal e ileocecal, o conteúdo retirado, pesado e lavado com salina tampão fosfato pH 7,2, na proporção de 500 mg do conteúdo/2,0 mL de PBS. Ao PBS, foi adicionado 1% (v/v) de inibidor de protease (P-8340, Sigma-Aldrich Chemical). Depois de centrifugado a 2000 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C. As sIgA totais foram determinadas utilizando-se anticorpos anti-IgA de camundongo (M-8769, Sigma-Aldrich Chemical) desenvolvidos em cabra, para revestimento das placas, e anticorpos anti-IgA de camundongo, conjugados com peroxidase (A-4789, Sigma-Aldrich Chemical), desenvolvidos em cabra, para detecção. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando-se um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EUA). A leitura a 492 nm foi feita em um leitor de placas de Elisa (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, Wilmington, EUA). Os resultados foram expressos como µg de sIgA/g de conteúdo intestinal calculadas a partir da curva padrão±desvio-padrão.

4.12.4. Determinação dos níveis de imunoglobulinas totais do tipo IgM no soro

Os níveis da imunoglobulina do tipo IgM no soro obtido a partir do plexo axilar dos camundongos do grupo controle e experimental foram determinados pelo método de ELISA de captura, de acordo com SILVA *et al.* (2004). O soro obtido foi armazenado a -20°C. até as análises. A dosagem foi feita utilizando-se anticorpos anti-IgM (M-8644, Sigma-Aldrich Chemical) de camundongo, desenvolvidos em cabra, para revestimento. Para detecção, foram utilizados anticorpos conjugados com peroxidase, anti-IgM (A-8786, Sigma-Aldrich Chemical) de camundongo, desenvolvidos em cabra. A concentração de IgM foi determinada utilizando-se um padrão de IgM purificado (0101-01, Southern Biotechnology Associates). A leitura a 492 nm foi feita em um leitor de placas de Elisa (Thermo Scientific). Os resultados foram expressos como µg de IgM/mL de soro calculadas a partir da curva padrão±desvio-padrão.

4.12.5. Determinação do efeito de *B. longum* 5^{1A} na expressão gênica de citocinas em cultivo celular de esplenócitos por qPCR em Tempo Real

Após o sacrifício dos animais, o baço foi coletado sob condições assépticas, em meio RPMI 1640 (Gibco™ Invitrogen Corporation) e macerados. Em seguida, as células foram

centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos, a 4°C. As hemácias foram, então, rompidas (solução lise - 17mM tris-HCL e 144 mM de cloreto de amônia) e as células lavadas e centrifugadas por mais duas vezes. Após o descarte do sobrenadante, as células do baço foram suspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), inativado previamente, e 0,1% de solução de estreptomicina e penicilina (P-0781, Sigma-Aldrich Chemical). As células foram contadas em câmara de *Newbauer* e a concentração final da suspensão de células foi ajustada para $5,0 \times 10^6$ células/mL. A suspensão celular foi distribuída em placas de 24 poços estéreis (1,0 mL/poço) e incubadas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂, por 48 horas (SILVA *et al.*, 2004). Após incubação, o sobrenadante foi coletado, e as células preservadas em Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) a -20°C, até o momento da extração do RNA.

O RNA das células do baço foi extraído segundo metodologia descrita por HENRIQUES e colaboradores (2011). Após quantificação, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific), foram selecionadas as amostras que apresentaram uma concentração superior a 70ng/μl e relação ácido nucléico/proteína (DO260/DO280) com valores entre 1,68 e 1,96.

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído e tratado com DNase I, conforme recomendação do fabricante (#ENO521, Fermentas). A reação foi feita utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), com um volume final de reação de 20μL, contendo 0,7μg de RNA. A reação foi levada ao termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Wells), onde as amostras foram incubadas por 10 minutos, a 25°C, 120 minutos, a 37°C, 5 segundos, a 85°C e, finalmente, a 4°C, até as amostras serem recolhidas. O cDNA, produto da reação, foi armazenado a -20°C, até sua amplificação.

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada através de PCR em tempo real, usando-se iniciadores com sequências específicas para *Tgfb1*, *Tnfa*, *Ifng*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL10*, *IL12b* e *IL17a* (GIULIETTI *et al.*, 2001). As reações foram desenvolvidas sob um sistema de detecção de sequência ABI PRISM®7900HT (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System 96-well), usando-se 5% da reação de cDNA em volume total de 20 μL de mistura de PCR. As reações foram desenvolvidas usando-se *Power SYBR® Green PCR Master Mix (2x)* (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. As condições para a reação de PCR foram de: pré-aquecimento a 50°C, por 2 minutos; desnaturação a 95°C, por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação e quantificação (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C), seguidos

de etapas de aquecimento, resfriamento e aquecimento sucessivas (15 segundos, a 95°C, 15 segundos, a 60°C e, finalmente, 15 segundos, a 95°C). Foram utilizadas nas reações placas MicroAmpTM Optical 96-Well Reaction Plate fechadas com selante MicroAmpTM Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). As condições de padronização e sequências de cada par de *primers*, bem como as eficiências das reações, temperatura de anelamento e tamanho do amplicon produzidos na amplificação de cada gene padronizado estão resumidos no Quadro 2. Para a padronização das reações foram feitas curvas de diluição seriada de cDNA para cada um dos genes. Os padrões para avaliação da qualidade das reações foram a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação.

A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método de limiar de ciclos para determinar o incremento em vezes do produto. Para normalização dos dados de expressão, foram usados os resultados das amplificações do cDNA codificado pelos genes Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e Actb (Beta-actina), que foram os genes de referência usados neste trabalho. A mudança na expressão foi representada como relativa aos animais tratados com salina.

4.13. Tratamento e desafio dos camundongos NIH com *S. Typhimurium*

Os animais do grupo experimental receberam um inóculo diário de 0,1 mL da cultura de bifidobactéria contendo 10^9 UFC/mL e os animais do grupo controle receberam 0,1 mL de salina, por via intra-gástrica, dez dias antes do desafio com a bactéria patogênica, até o final do período experimental. Para o preparo do inóculo da *S. Typhimurium*, uma cultura crescida por 18 horas, a 37°C, foi submetida a diluições sucessivas em salina tamponada esterilizada, para obtenção de 10^5 UFC/mL. Os animais dos grupos controle e experimental receberam no dia do desafio (11º dia) um inóculo de 0,1 mL, contendo 10^4 UFC da bactéria patogênica, por via intra-gástrica. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas foram feitas em ágar MacConkey, após 24 horas de incubação, a 37°C.

4.13.1. Determinação do efeito de *B. longum* 5^{1A} na mortalidade em decorrência da infecção experimental por *S. Typhimurium* em camundongos NIH e acompanhamento do desenvolvimento ponderal

Quadro 2 - Condições padronizadas de RT- qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas em amostras obtidas de cultura de esplenócitos de camundongos NIH

| Gene | Sequência dos <i>primers</i> | [<i>primer</i>] (μ M) | Eficiência (%) | T° de anelamento | Tamanho do <i>amplicon</i> |
|-------|------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------|
| Gapdh | F TCACCACCATGGAGAAGGC | 0,3 | 94,48 | 60° C | 168 bp |
| | R GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA | | | | |
| Actb | F AGAGGGAAATCGTGCGTGAC | 0,3 | 92,51 | 60° C | 138 bp |
| | R CAATAGTGATGACCTGGCCGT | | | | |
| IL4 | F ACAGGAGAAGGGACGCCAT | 0,75 | 103,7 | 60° C | 95 bp |
| | R GAAGCCCTACAGACGAGCTCA | | | | |
| IL5 | F AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT | 0,5 | 100,3 | 60° C | 117 bp |
| | R TCCAATGCATAGCTGGTGATTT | | | | |
| IL6 | F GAGGATACTACTCCCAACAGACC | 0,75 | 91,2 | 60° C | 141 bp |
| | R AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA | | | | |
| IL10 | F GGTTGCCAAGCCTTATCGGA | 0,3 | 105,04 | 60° C | 191 bp |
| | R ACCTGCTCCACTGCCTTGCT | | | | |
| IL12b | F GGAAGCACGGCAGCAGAATA | 1,0 | 95,52 | 60° C | 180 bp |
| | R AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG | | | | |
| IL17a | F GCTCCAGAAGGCCCTCAGA | 1,25 | 105,22 | 60° C | 142 bp |
| | R AGCTTCCCTCCGCATTGA | | | | |
| Infg | F TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA | 0,5 | 93,92 | 60° C | 92 bp |
| | R TGGCTCTGCAGGATTTTCATG | | | | |
| Tgfb1 | F TGACGTCCTGGAGTTGTACGG | 0,75 | 105,06 | 60° C | 170 bp |
| | R GGTTTCATGTCATGGATGGTGC | | | | |
| Tnfa | F CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA | 0,75 | 94,96 | 60° C | 175 bp |
| | R TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | | | | |

Fonte: Giulietti *et al.*, 2001 e dados da pesquisa, 2011

Legenda: bp- base pair. F- primer forward. R- primer reverse

A bifidobactéria foi testada quanto à sua capacidade de proteger camundongos contra o desafio experimental por *S. Typhimurium*. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (dez animais/grupo), e tratados conforme item 4.13. A mortalidade por inóculo intra-gástrico de *S. Typhimurium* foi determinada em animais, tratados ou não com *B. longum* 5^{1A} e desafiados no 11° dia, além do desenvolvimento ponderal no decorrer de 32 dias (SILVA *et al.*, 2004).

4.13.2. Determinação do efeito de *B. longum* 5^{1A} nos níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais no conteúdo intestinal e do tipo M (IgM) no soro, de camundongos NIH

Para avaliar o perfil de imunoglobulinas no conteúdo intestinal (sIgA) e no soro (IgM) no curso da infecção por *S. Typhimurium*, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (20 animais/grupo), e tratados conforme item 4.13. Os animais do grupo controle e experimental foram sacrificados após 1, 3, 6 e 9 dias de infecção. A determinação dos níveis de sIgA e IgM totais foi realizada conforme descrito nos itens 4.12.3 e 4.12.4.

4.13.3. Exame histopatológico de órgãos de camundongos NIH desafiados com *S. Typhimurium*

Após nove dias de infecção, amostras do lóbulo maior do fígado e de porções do trato digestivo (íleo e cólon) dos camundongos dos grupos controle e experimental, foram submetidas a um exame histopatológico, conforme descrito no item 4.12.2. (MARTINS *et al.*, 2009).

4.14. Análises estatísticas

Os testes foram feitos utilizando-se o programa Sigma Stat 3.1. (Systat Software, Inc., 2004) e SPSS software (SPSS Inc.), e considerando 0,05 como limiar de confiança. Antes do tratamento estatístico, foi feito o Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnof). Os testes aplicados foram:

- 1- Anova: para análises dos resultados de hidrofobicidade (pós teste Tukey), contagem de células de Küpffer, viabilidade da bifidobactéria nos iogurtes e pH (pós teste Duncan's), imunoglobulinas no ensaio de cinética (pós teste Tukey) e índices hepático e esplênico no ensaio de cinética (pós teste Tukey)
 - 2- Teste exato de Fisher e *Log Rank Survival*: para as análises de mortalidade
 - 3- Teste Q de Cochran: para análises do antagonismo *in vitro*
- Teste t: Para as análises de imunoglobulinas e citocinas, índices hepático e esplênico e ganho de peso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Velocidade de crescimento das bifidobactérias

Uma importante característica para um micro-organismo ser usado como probiótico é ter boas propriedades tecnológicas, sendo uma delas, apresentar bom crescimento *in vitro*. Micro-organismos anaeróbios obrigatórios, em geral, apresentam uma velocidade de crescimento menor que os anaeróbios facultativos, necessitando, na maioria das vezes, de um período de incubação igual ou superior a 48 horas. Devido à natureza fastidiosa destes micro-organismos, o cultivo em laboratório é dificultado (OUWEHAND *et al.*, 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008). Por isso, é interessante avaliar e comparar este perfil entre as bifidobactérias.

O Gráfico 1 representa a curva de crescimento das quatro amostras, sob condições de anaerobiose e a Tabela 1 a medida de pH em cada tempo. O pH do meio, que no início foi de aproximadamente $6,21 \pm 0,05$, teve uma diminuição ao longo da curva, atingindo um pH final variando de $4,09 \pm 0,06$ a $4,5 \pm 0,13$. Nota-se que uma diminuição do pH acompanhou o crescimento, sendo que *B. longum* 5^{1A} acidificou o meio mais rapidamente que as demais bifidobactérias. A diminuição do pH é resultante do metabolismo fermentativo, promovendo liberação de ácidos acético e lático em uma proporção teórica de 3:2. Em relação à velocidade de crescimento, *B. longum* 5^{1A} apresentou crescimento mais acentuado (Média do tempo de duplicação: $2,2 \pm 0,2$ h⁻¹) em relação as demais (*B. breve* 110^{1A}: $6,8 \pm 1,5$ h⁻¹; *B. pseudolongum* 119^{1A}: $4,7 \pm 0,6$ h⁻¹; *B. bifidum* 162^{2A}: $7,2 \pm 1,6$ h⁻¹). Após 24 horas, *B. longum* 5^{1A} atingiu seu máximo de crescimento, conforme consta na Figura 1 e durante o intervalo de 12-24 horas acidificou bruscamente o pH, o que não foi observado para as demais bifidobactérias. Sendo assim, neste trabalho, *B. longum* 5^{1A} apresentou um crescimento satisfatório para seu emprego em escala industrial.

5.2. Tolerância ao oxigênio

Em adição à velocidade de crescimento, outra característica tecnológica satisfatória para um probiótico anaeróbio é ser tolerante ao oxigênio.

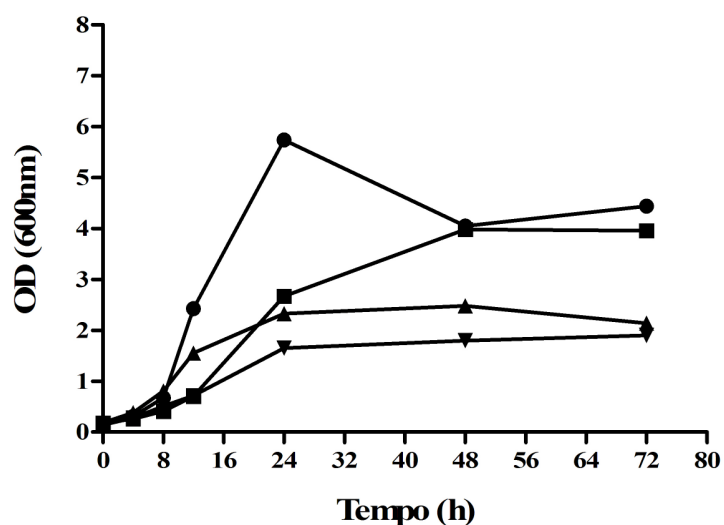


Gráfico 1 - Cinética de crescimento de *B. longum* 5^{1A} (●), *B. breve* 110^{1A} (■), *B. pseudolongum* 119^{1A} (▲) and *B. bifidum* 162^{2A} (▼) em caldo MRS, a 37°C, em condições de anaerobiose, realizada com base na DO_{600nm}. Os resultados são a média de duplicata de dois experimentos independentes.

Tabela 1 - Valores de pH obtidos a partir de alíquotas, em diferentes tempos, das curvas de crescimento de *Bifidobacterium* spp.

| Tempo (h) | Amostras de bifidobactérias | | | |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| | <i>B. longum</i> 5 ^{1A} | <i>B. breve</i> 110 ^{1A} | <i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A} | <i>B. bifidum</i> 162 ^{2A} |
| 0 | 6,22±0,07 | 6,18±0,09 | 6,17±0,13 | 6,28±0,0 |
| 4 | 6,03±0,11 | 6,10±0,08 | 6,06±0,1 | 6,05±0,09 |
| 8 | 5,71±0,02 | 6,00±0,1 | 5,86±0,01 | 5,83±0,04 |
| 12 | 5,09±0,04 | 5,87±0,04 | 5,46±0,25 | 5,51±0,11 |
| 24 | 4,25±0,09 | 5,34±0,16 | 4,86±0,02 | 4,97±0,01 |
| 48 | 4,16±0,13 | 4,75±0,0 | 4,53±0,03 | 4,67±0,02 |
| 72 | 4,09±0,06 | 4,38±0,03 | 4,36±0,02 | 4,50±0,13 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2009

Legenda: h: horas

Uma vez que as bifidobactérias são anaeróbias obrigatórias, tem-se uma preocupação em prevenir os efeitos tóxicos do oxigênio quando são cultivadas para aplicações industriais. Nestes micro-organismos estão ausentes mecanismos celulares eficientes na remoção do oxigênio, portanto, uma exposição a esta substância, causa acúmulo de metabólitos tóxicos, levando à morte celular por dano oxidativo. Este efeito letal do oxigênio é chamado toxicidade do oxigênio e a prevenção desta toxicidade é crucial durante o processamento da biomassa celular e, também, durante estocagem de produtos contendo bifidobactérias (SHIMAMURA *et al.*, 1992; FARIAS *et al.*, 2001; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004). Diante disso, avaliou-se, qualitativamente, a capacidade das amostras de bifidobactérias de tolerar a exposição ao oxigênio por até 72 horas.

Pela análise da Tabela 2, observa-se que as quatro bifidobactérias comportaram-se de maneira similar, independentemente do tempo de exposição ao oxigênio, por até 72 horas. Estes resultados mostram que, em relação a este parâmetro, todas estão aptas à produção industrial. Alguns autores observaram uma diversidade de comportamento quanto a esta característica, entre diferentes espécies e mesmo entre diferentes linhagens de uma mesma espécie, indicando que tolerância ao oxigênio é espécie/linhagem específica (SHIMAMURA *et al.*, 1992; MÄTTÖ *et al.*, 2004; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004; SIMPSON *et al.*, 2005). SHIMAMURA e colaboradores (1992), por exemplo, ao avaliar o nível de tolerância ao oxigênio de quatro espécies de bifidobactérias (*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* e *B. adolescentis*) observaram uma variação na sensibilidade ao oxigênio. *Bifidobacterium adolescentis* teve seu crescimento suprimido por baixas concentrações de oxigênio, enquanto que as demais espécies tiveram bom crescimento sob condições parciais de aeração. Neste mesmo trabalho, demonstrou-se que bifidobactérias expressam atividade reduzida de NAD-oxidase e NAD-peroxidase, enzimas estas que reduzem o oxigênio molecular, produzindo peróxido de hidrogênio (NAD-oxidase) e água (NAD-peroxidase). A atividade de ambas as enzimas foi inversamente proporcional à sensibilidade ao oxigênio. Estes autores sugerem que atividade reduzida de NAD-oxidase e NAD-peroxidase em espécies de bifidobactérias, exercem um importante papel na prevenção da toxicidade ao oxigênio, enquanto que a atividade de superóxido dismutase (SOD), também detectada, não tem influência na sensibilidade ao oxigênio. TALWALKAR & KAILASAPATHY (2004) também atribuem uma participação essencial das enzimas NAD-oxidase e NAD-peroxidase.

Tabela 2 - Tolerância de *Bifidobacterium* spp. em diferentes tempos (T0, T1, T2, T3 e T4) de exposição ao oxigênio

| Amostras | T0 | T1 (8 horas) | T2 (24 horas) | T3 (48 horas) | T4 (72 horas) |
|--|-----|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>B. longum</i> 5 ^{1A} | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>B. breve</i> 110 ^{1A} | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A} | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>B. bifidum</i> 162 ^{2A} | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Legenda: +: Crescimento fraco; ++: Crescimento moderado; +++: Crescimento máximo

Portanto, presume-se que a tolerância observada neste ensaio envolve a participação de enzimas de detoxificação ao oxigênio que contribuem para eliminação do oxigênio presente, possibilitando assim, a sobrevivência, em baixas concentrações de oxigênio.

5.3. Susceptibilidade das bifidobactérias a antimicrobianos

A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos, principalmente entre os micro-organismos patogênicos, é um dos grandes problemas vividos pela medicina atual. Na procura de novos métodos de combate às infecções gastrintestinais, uma alternativa que tem se mostrado eficiente é o emprego dos probióticos, associados ou não às terapias já existentes, na forma de alimentos funcionais ou de preparações farmacêuticas. Além de poder ter mais de um mecanismo de ação, outra grande vantagem do uso de probióticos é não selecionar bactérias resistentes. Entretanto, estudos devem ser realizados para a avaliação da segurança de possíveis linhagens candidatas a probióticos. Ser seguro é o critério mais importante para selecionar linhagens probióticas potenciais e incorporá-las em produtos alimentares. E, um dos critérios de segurança exigidos pela FAO/WHO (2001) é a pesquisa de resistência a antimicrobianos de lactobacilos e bifidobactérias.

De maneira geral, uma ampla sensibilidade aos antibacterianos é preferida como critério de seleção de probióticos, para evitar uma possível transmissão de elementos genéticos de resistência no ecossistema digestivo (AIMMO *et al.*, 2007; OUOBA *et al.*, 2008). Neste sentido,

avaliamos o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bifidobactérias incluídas neste estudo. Tendo por base os valores da CIM (Tabela 3), foi possível constatar que a susceptibilidade varia de acordo com a espécie e o antimicrobiano testado. A espécie *B. longum* 5^{1A} apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, exceto neomicina. As demais bifidobactérias foram também resistentes à neomicina (CIM = 32 µg/mL), o que corrobora resultados encontrados por outros autores (ZHOU *et al.*, 2005; AIMMO *et al.*, 2007; FLÓREZ *et al.*, 2008; OUOBA *et al.*, 2008). Em geral, *Bifidobacterium* sp. são naturalmente resistentes a aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina, canamicina e estreptomicina) e esta resistência intrínseca pode ser explicada pela falta de transporte, mediada por citocromo, desta droga para a célula procarionte (AMMOR *et al.*, 2007; FLÓREZ *et al.*, 2008).

Todas as bifidobactérias foram sensíveis ao cloranfenicol, dicloxaciclina, doxiciclina, penicilina G, piperacilina e vancomicina. A espécie *B. breve* 110^{1A} foi resistente à cefoxitina, à eritromicina e ao metronidazol (CIM = 64, CIM = 128 e CIM = 512 µg/mL, respectivamente), *B. pseudolongum* 119^{1A} resistente à eritromicina e à tetraciclina (CIM = 128 e CIM = 64 µg/mL, respectivamente) e *B. bifidum* 162^{2A} resistente ao metronidazol (CIM > 512 µg/mL) (Tabela 3). Para a discriminação entre resistente e sensível, foram utilizados *break-points*, segundo o CLSI (2012), para as drogas preconizadas para anaeróbios e, para as demais foram utilizados *break-points* sugeridos pelos autores AIMMO e colaboradores (2007) e OUOBA e colaboradores (2008) (Tabela 3). Resultados similares de susceptibilidade ao cloranfenicol, penicilina, piperaciclina e vancomicina foram encontrados por outros autores (DELGADO *et al.*, 2005; MOUBARECK *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005; MASCO *et al.*, 2006; MATTO *et al.*, 2007; OUOBA *et al.*, 2008). Diferenças no perfil de susceptibilidade às drogas cefoxitina, doxiciclina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina têm sido demonstradas, em muitos trabalhos (DELGADO *et al.*, 2005; MOUBARECK *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005; MASCO *et al.*, 2006; AIMMO *et al.*, 2007, AMMOR *et al.*, 2008). Para a dicloxaciclina, os resultados foram similares aos obtidos por AIMMO e colaboradores (2007). Estes autores encontraram valores de CIM variando de 4 a 16 µg/mL em 22 amostras de bifidobactérias, das quais 90% foram inibidas por uma concentração de 4 µg/mL desta droga.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos para *Bifidobacterium* spp.

| Antimicrobianos | <i>B. longum</i> 5 ^{1A} | <i>B. breve</i> 110 ^{1A} | <i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A} | <i>B. bifidum</i> 162 ^{2A} | <i>B. fragilis</i> ATCC 25285 | Break-points |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|--|----------------------------------|--------------|
| Cefoxitina | 8,0 | 64,0 | 0,5 | 1,0 | 4,0 | $\geq 64^*$ |
| Cloranfenicol | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 4,0 | $\geq 32^*$ |
| Dicloxaciclina | 2,0-4,0 | 8,0 | 0,5 | 0,5 | $\geq 4,0$ | 32*** |
| Doxiciclina | 0,5 | 1,0 | 16,0 | 1,0 | 0,125 | 32*** |
| Eritromicina | 0,25 | 128,0 | 128,0 | 0,125 | 16,0 | 8** |
| Metronidazol | 0,5 | 512 | 2,0 | >512 | 0,25 | $\geq 32^*$ |
| Neomicina | 32,0 | 32,0 | 32,0 | 32,0 | $\geq 64,0$ | 16** |
| Penicilina G | 0,125 | 0,25 | 0,06 | 0,015 | $\geq 4,0$ | $\geq 2^*$ |
| Piperacilina | 2,0 | 2,0 | 0,125 | 0,125 | 4,0 | $\geq 128^*$ |
| Tetraciclina | 2,0 | 2,0 | 64,0 | 2,0 | 0,125 | $\geq 16^*$ |
| Vancomicina | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 32,0 | 4** |

Fonte: Dados da pesquisa, 2008

Legenda: *Break-points* recomendados por *CLSI (2012); **Ouoba e colaboradores (2008); ***Aimmo e colaboradores (2007)

Uma grande variedade de métodos e protocolos é descrita no estudo sobre o fenômeno de resistência a antimicrobianos em bifidobactérias. Estes métodos incluem teste de susceptibilidade a vários antimicrobianos e aplicação de tecnologia molecular. Métodos de biologia molecular tais como detecção da presença de plasmídeos, PCR com iniciadores específicos para um ou mais genes de resistência, ribotipagem, hibridização, RAPD e PFGE são hoje aplicados nos estudos de caracterização molecular de linhagens de bifidobactérias e do padrão de resistência a antimicrobianos, e a caracterização dos determinantes genéticos responsáveis por esta resistência (FLÓREZ *et al.*, 2006; MASCO *et al.*, 2006; OUOBA *et al.*, 2008). Entretanto, o teste de

susceptibilidade aos antimicrobianos de BALs e bifidobactérias deveria ser baseado em metodologias padronizadas, mas, nenhuma metodologia é proposta pelo CLSI.

Inicialmente, a pesquisa de susceptibilidade aos antimicrobianos era focada em bactérias de relevância clínica e por isso, a metodologia padrão e *break-points* não foram validados para bactérias não patogênicas (MÄTTÖ *et al.*, 2006). Por este motivo, vários meios de cultivo e técnicas têm sido empregados nos testes de susceptibilidade de bifidobactérias, gerando uma discordância de *break-points* dos antimicrobianos (AMMOR *et al.*, 2007). Os diferentes métodos usados: E-test (MÄTTÖ *et al.*, 2006; MÄTTÖ *et al.*, 2007; FLÓREZ *et al.*, 2008), diluição em ágar (MOUBARECK *et al.*, 2005; AIRES *et al.*, 2007; OUOBA *et al.*, 2008), disco-difusão (CHARTERIS *et al.*, 1998; MOUBARECK *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005; KASTNER *et al.*, 2006; MASCO *et al.*, 2006; DOMING *et al.*, 2007) e microdiluição (KLARE *et al.*, 2005; MASCO *et al.*, 2006; AIMMO *et al.*, 2007; DOMING *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2008) dificultam a comparação de resultados. Em geral, métodos de diluição e E-test são preferíveis como método de referência sobre técnicas convencionais baseadas em difusão, por determinar a CIM e sugerir, de forma mais confiável, a natureza da resistência (intrínseca ou adquirida) (VANKERCKHOVEN *et al.*, 2008). Além disso, algumas metodologias não são padronizadas para alguns antimicrobianos, e a variação nos componentes dos meios de cultivo, inóculo, temperatura e período de incubação podem influenciar nos resultados (KLARE *et al.*, 2005; MÄTTÖ *et al.*, 2006; AMMOR *et al.*, 2007).

A maioria das BAL e bifidobactérias requer condições especiais de crescimento, e meios convencionais usados para teste de susceptibilidade, como Müller-Hinton ou Isosensitest, não conferem um crescimento adequado para estes micro-organismos. Apesar de crescerem bem em MRS, alguns autores não recomendam o uso deste meio de cultura nestes ensaios. Uma possível interação antagonista entre componentes do MRS e agentes antimicrobianos específicos pode ocorrer (trimetoprim e sulfonamidas). Além disso, o baixo valor do pH do MRS (pH 6,2±0,2) pode diminuir a atividade de alguns antibióticos (aminoglicosídeos). Diante de tantas limitações, definições claras de valores de *break-points* que discriminem linhagens resistentes e sensíveis, e padronização da metodologia utilizando meios de cultivo adequados, são requeridos para o teste de susceptibilidade das BAL e bifidobactérias (KLARE *et al.*, 2005; AMMOR *et al.*, 2007).

Na tentativa de contornar este problema, somente na Europa, o comitê *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), composto por membros de seis

países: Reino Unido, França, Holanda, Alemanha, Noruega e Suécia e, o grupo *European Food Safety Authority* (EFSA) publicou, em 2008, o guia técnico *Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance*. Entretanto, além de não ter um consenso nos valores de *break-points* entre eles, estes diferem dos valores, para a mesma droga, daqueles preconizados pelo CLSI. Vale ressaltar que o que é preconizado pelo CLSI (2012) como método de referência para avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de micro-organismos anaeróbios é o teste de diluição em ágar, utilizando linhagens de controle de qualidade, como por exemplo, *B. fragilis* 25285.

A resistência a antimicrobianos pode ser inerente ao gênero ou espécie bacteriana (natural ou intrínseca) e adquirida, resultante de uma ou mais mutações sequenciais no DNA do micro-organismo ou pela incorporação de genes de resistência transferíveis de uma linhagem doadora. Resistência intrínseca e adquirida por mutações apresentam baixo risco de transmissão horizontal, enquanto que o risco de transferência é máximo se a resistência adquirida for mediada por genes exógenos. O DNA exógeno pode ser adquirido por conjugação, transdução e transformação, podendo ser transferido por plasmídeos, transposons e integrons para outras espécies de bactérias ou gêneros (AMMOR *et al.*, 2007; AMMOR *et al.*, 2008; VANKERCKHOVEN *et al.*, 2008).

As linhagens que apresentam resistência intrínseca a determinados antimicrobianos podem beneficiar pacientes cuja microbiota encontra-se desbalanceada pelo seu uso, representando uma característica importante e até mesmo desejável. O conhecimento do padrão de resistência faz-se necessário quando probióticos são administrados associados à terapia antimicrobiana, para verificar a capacidade de sobrevivência dos mesmos no ecossistema intestinal. Neste caso, a associação do antimicrobiano com uma linhagem probiótica resistente intrinsecamente pode oferecer resultados significativamente melhores. Por outro lado, existe a possibilidade de linhagens de bactérias probióticas serem portadoras de plasmídios contendo genes de resistência a antimicrobianos sendo capazes de transmitir esses fatores de resistência para bactérias patogênicas ou membros da microbiota indígena intestinal (SALMINEN *et al.*, 1998). Por isso, a resistência encontrada em *B. breve* 110^{1A}, *B. pseudolongum* 119^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A} a alguns antimicrobianos deve ser mais estudada, para que sejam estabelecidas, com mais segurança, as relações risco/benefício do uso destas bifidobactérias como probiótico. A presença de genes de resistência potencialmente transferíveis em muitas BALs e bifidobactérias é bem

estabelecida. A maioria dos determinantes encontrados nestes micro-organismos apresenta sequencia idêntica à de genes descritos anteriormente em outros grupos bacterianos, sugerindo que a resistência seja adquirida (AMMOR *et al.*, 2007).

5.4. Perfil de hidrofobicidade da parede celular das bifidobactérias

Uma característica desejada para um probiótico é a capacidade de aderência à mucosa intestinal, permitindo a sua permanência e atuação no ecossistema digestivo. Muitos mecanismos estão envolvidos na adesão de micro-organismos às células epiteliais intestinais, sendo um deles a natureza hidrofóbica da superfície externa microbiana. Desta forma, a determinação da adesão dos micro-organismos a solventes hidrofóbicos, como forma de estimar a habilidade da linhagem de se aderir às células epiteliais, é uma ferramenta qualitativa válida e metodologicamente simples, que permite fazer uma triagem visando selecionar bactérias para serem testadas como probióticos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; BARBOSA *et al.*, 2005; KLAYRAUNG *et al.*, 2008). Neste sentido, avaliou-se o perfil de hidrofobicidade da parede celular das quatro amostras de bifidobactérias.

Pela análise do Gráfico 2, constatou-se que *B. bifidum* 162^{2A} possui a maior probabilidade de adesão ao epitélio intestinal pela alta hidrofobicidade ($67,51 \pm 6,99\%$) ($P < 0,05$), quando comparado ao *B. breve* 110^{1A} ($14,5 \pm 2,5\%$), *B. pseudolongum* 119^{1A} ($22,18 \pm 6,24\%$) e *B. longum* 5^{1A} ($24,4 \pm 3,05\%$). VINDEROLA & REINHEIMER (2003) obtiveram resultados similares, ao determinar o perfil hidrofóbico da parede celular, de quatro linhagens de *B. bifidum*, as quais apresentaram hidrofobicidade entre $46,7 \pm 0,9\%$ e $64,7 \pm 2,1\%$, enquanto que três linhagens de *B. longum* apresentaram valores mais baixos, entre $22,5 \pm 0,9\%$ e $28,9 \pm 2,3\%$. Ao comparar a mesma característica entre dois cultivos comerciais da Christian Hansen Lab. (*Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46), BARBOSA e colaboradores (2005) observaram que a linhagem *B. lactis* Bb12 possui uma parede celular mais hidrofóbica, quando comparada com *B. longum* Bb46. Outros autores avaliaram este perfil entre outras bifidobactérias e foi constatado que existe uma variabilidade nesta característica entre espécies e linhagens de uma mesma espécie (PÉREZ *et al.*, 1998; DEL RE *et al.*, 2000; VINDEROLA *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2006).

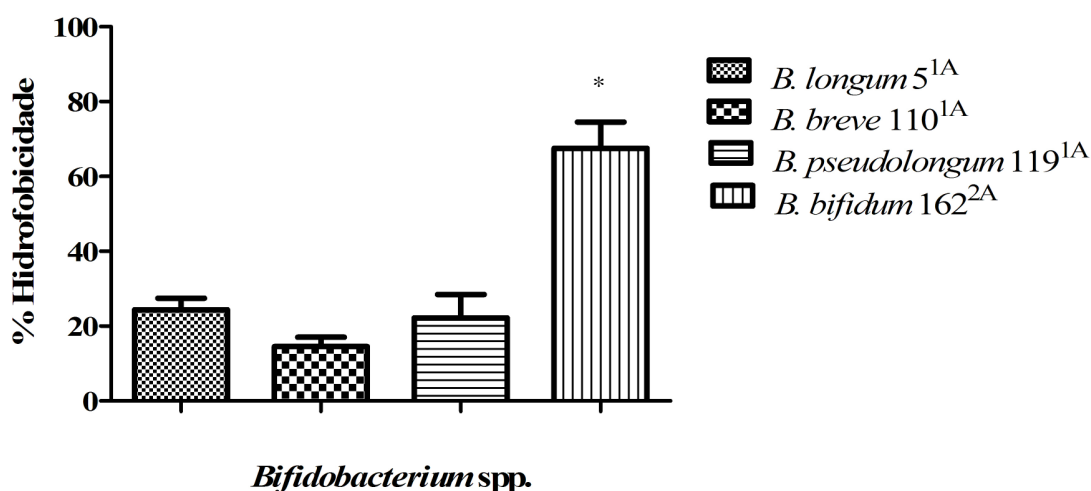


Gráfico 2 - Porcentagem de hidrofobicidade da parede celular de bifidobactérias. Os resultados são a média da triplicata de três experimentos independentes. As barras verticais indicam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre as bifidobactérias ($P < 0,05$).

A adesão celular é um processo complexo que envolve o contato da célula bacteriana com a superfície epitelial, sendo, portanto, afetada pela composição e estrutura da parede celular e por interações específicas e não-específicas entre as superfícies envolvidas. Por isso, existem diferenças significativas para a hidrofobicidade entre espécies e entre linhagens de uma mesma espécie bacteriana (PÉREZ *et al.*, 1998; DEL RE *et al.*, 2000; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003; BARBOSA *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006).

Embora a determinação da hidrofobicidade, pelo método escolhido, seja uma medida indireta (mensuração da adesão bacteriana a substratos hidrofóbicos), está bem estabelecido na literatura que existe algum tipo de relação deste fator com a capacidade de aderência ao epitélio intestinal pelos micro-organismos. Alguns autores atribuem a habilidade de adesão microbiana avaliando em conjunto três parâmetros *in vitro*: capacidade de adesão às células Caco-2, de auto-agregação e hidrofobicidade da superfície celular (DEL RE *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2006). Segundo DEL RE e colaboradores (2000), as linhagens de bifidobactérias que foram capazes de aderir à monocamada de células epiteliais, autoagregar e manifestar bom grau de hidrofobicidade são potenciais linhagens aderentes. Por existir uma correlação destes três métodos, estes autores

sugerem métodos alternativos ao de adesão em células Caco-2 (usado com sucesso para avaliar a habilidade de adesão de bifidobactérias) para avaliar esta característica, já que é um método caro e que consome tempo, sendo um deles, o teste de hidrofobicidade. Além destes autores, outros, também observaram uma correlação entre hidrofobicidade de superfície e aderência em células Caco-2 de linhagens de bifidobactérias, ou seja, as linhagens que se apresentaram mais hidrofóbicas exibiram maior capacidade adesiva (PAN *et al.*, 2006).

Um perfil mais hidrofóbico da parede celular pode conferir uma vantagem competitiva, importante para manutenção de um probiótico no trato gastrointestinal. A adesão é um pré-requisito para colonização bacteriana e, pode trazer benefícios para o hospedeiro como: excluir ou reduzir a aderência de enteropatógenos, possivelmente, pelo bloqueio de receptores que seriam utilizados pelos mesmos; e estimular o sistema imune. Sugere-se a alta hidrofobicidade da superfície para explicar porque certas linhagens microbianas apresentam lenta cinética de eliminação do trato digestivo que outras, após a parada da administração (BERNET *et al.*, 1993; MARTINS *et al.*, 2009). Vale ressaltar que, apesar da capacidade de adesão à mucosa intestinal ser um dos critérios na seleção de probióticos, ela não é uma característica obrigatória, já que podem ser utilizadas outras estratégias, como administração do probiótico em níveis suficientes para exercer seu efeito benéfico.

5.5. Atividade antagonista *in vitro* das bifidobactérias contra patógenos

A utilização cada vez mais frequente de bactérias do gênero *Bifidobacterium* como probióticos requer que estas sejam constantemente avaliadas quanto às suas propriedades funcionais. Bifidobactérias, assim como bactérias do ácido lático, podem desempenhar um importante papel na inibição de micro-organismos patogênicos intestinais, sendo a produção de substâncias antimicrobianas, um dos mecanismos propostos (LAHTINEN *et al.*, 2007).

Para o teste de produção de substâncias antagonistas difusíveis por *B. longum* 5^{1A}, *B. breve* 110^{1A}, *B. pseudolongum* 119^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A} contra micro-organismos patogênicos, foi analisada a expressão de halos de inibição, indicativa de antagonismo contra os micro-organismos testados. De acordo com a Tabela 4, foram observados halos de inibição contra a maioria dos patógenos testados, evidenciando, assim, a produção de substância(s) inibitória(s) por todas as bifidobactérias avaliadas. Entretanto, nem todas as reveladoras utilizadas foram

Tabela 4 - Testes *in vitro* de produção de substâncias antagonistas por *Bifidobacterium* spp. contra micro-organismos patogênicos

| Reveladoras | Halo de inibição (média do diâmetro ± desvio-padrão em mm) | | | |
|-------------------------|--|-----------------------------------|--|-------------------------------------|
| | <i>B. longum</i> 5 ^{1A} | <i>B. breve</i> 110 ^{1A} | <i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A} | <i>B. bifidum</i> 162 ^{2A} |
| <i>B. cereus</i> | 22,07±2,03 | 16,17±3,24 | 33,28±3,73 | 36,21±1,56 |
| <i>B. fragilis</i> | 10,12±0,61 | - | 15,47±1,57 | - |
| <i>B. vulgatus</i> | 13,12±2,36 | - | 16,52±2,34 | - |
| <i>C. albicans</i> | - | - | - | - |
| <i>C. difficile</i> | 26,43±3,61 | 12,94±2,09 | 36,27±1,79 | 24,18±2,07 |
| <i>C. perfringens</i> | 36,75±2,15 | 23,18±1,47 | 34,45±3,2 | 28,97±2,47 |
| <i>E. aerogenes</i> | 46,57±4,06 | 15,94±1,12 | 25,54±1,96 | - |
| <i>E. faecalis</i> | 16,62±1,29 | - | 13,55±1,35 | - |
| <i>L. monocytogenes</i> | 29,33±1,32 | 29,36±2,04 | 26,9±3,42 | 19,64±2,74 |
| <i>S. flexneri</i> * | 31,68±1,16 | 17,94±1,64 | 41,33±4,52 | 42,09±4,02 |
| <i>S. sonnei</i> | 28,75±1,65 | 19,79±1,8 | 37,4±4,92 | 41,71±3,82 |
| <i>S. Typhi</i> | 20,81±4,87 | 11,83±1,71 | 22,14±4,39 | 18,19±1,96 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 28,48±2,04 | 14,53±3,39 | 34,56±3,79 | 36,88±0,47 |
| <i>S. Typhimurium</i> * | 36,33±3,98 | - | 23,68±2,74 | - |
| <i>V. cholerae</i> * | 18,15±1,96 | 19,2±1,8 | 36,24±2,59 | 31,41±4,12 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2008

Legenda: - = ausência de halo de inibição

*: linhagem de origem humana pertencente à coleção do LEFM

Nota: Os resultados estão expressos como média da duplicata, de dois experimentos independentes, do diâmetro do halo de inibição, em milímetros.

sensíveis à atividade antagonista das bifidobactérias. As reveladoras *E. faecalis* ATCC 19433, *B. vulgatus* ATCC 8482, *B. fragilis* ATCC 25285 e *S. Typhimurium* não foram sensíveis às substâncias antagonistas produzidas por *B. breve* 110^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A}. O crescimento de *E. aerogenes* ATCC 13048 também não foi inibido por *B. bifidum* 162^{2A}, e nenhuma bifidobactéria testada foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* ATCC 18804. Dentre as bifidobactérias, *B. longum* 5^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} apresentaram o maior espectro inibitório, inibindo 100% dos patógenos bacterianos e 93,33% do total de reveladoras, enquanto que *B. breve* 110^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A} inibiram 66,66% e 60%, respectivamente, do total de reveladoras (P<0,05). Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório, utilizando a mesma metodologia, já haviam mostrado que bifidobactérias são capazes de produzir substâncias antagonistas difusíveis contra vários patógenos (MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

O primeiro relato de atividade antimicrobiana de bifidobactérias foi feito por TISSIER (1900), que descreveu o antagonismo de *B. bifidum* contra *E. coli* (TISSIER, 1990, citado por CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2008). Acreditava-se que o antagonismo produzido pelas bifidobactérias resultasse, primariamente, da ação dos ácidos láctico e acético produzidos no metabolismo da glicose. A atividade antimicrobiana destes ácidos é, em parte, devido ao fato de que na forma não dissociada podem atravessar a membrana celular microbiana e, uma vez no interior da célula, dissociam-se reduzindo o pH intracelular, o que irá interferir com importantes funções metabólicas da célula (MAKRAS & VUYST, 2006; BARBOSA *et al.*, 2011). Contudo, muitos trabalhos têm demonstrado que outros compostos antimicrobianos podem contribuir ou ser responsáveis pela atividade antagonista (O'RIORDAN & FITZGERALD, 1998; YILDIRIM, *et al.*, 1999; LAHTINEN *et al.*, 2007; CHEIKHYOUSSEF, *et al.*, 2008).

YILDIRIM & JOHNSON (1998) descreveram uma bacteriocina, denominada bifidocina B, produzida pelo *B. bifidum* NCFB1454, capaz de inibir o crescimento de certas bactérias Gram positivo como as dos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria* e *Pediococcus*. As bacteriocinas têm atraído grande interesse por seu uso potencial como conservante em alimentos (YILDIRIM, *et al.*, 1999). Outros trabalhos atribuem a atividade antagonista à produção de peróxido de hidrogênio e compostos *bacteriocin-like* (COLLADO *et al.*, 2005; LAHTINEN *et al.*, 2007; CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2008). A técnica utilizada no presente trabalho permite concluir que a(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) é (são) difusível(is) e extracelular(es), uma vez que a(s) mesma(s) difundiu(ram)-se no ágar para

exercer(em) seu(s) efeito(s) sobre as bactérias reveladoras. Entretanto, não foi possível identificar a natureza da(s) substância(s) que estaria(m) envolvida(s) no antagonismo. Assim, os resultados obtidos podem representar a atividade antagonista de uma série de substâncias, atuando separadamente ou em conjunto. A produção de peróxido de hidrogênio, outro possível responsável pela inibição pode ser descartada, já que o ensaio de antagonismo foi conduzido em câmara anaeróbica.

A adição de probióticos que apresentam um amplo espectro de atividade antagonista confere uma vantagem aos alimentos, por aumentar a vida de prateleira do produto, substituir conservantes artificiais, além de outros benefícios, dependendo da funcionalidade do probiótico. Linhagens com atividades antagonistas contra certos tipos de micro-organismos psicrotóxicos são relevantes se estes estão presentes em baixos níveis em alimentos refrigerados, uma vez que deterioram estes alimentos devido à habilidade de se multiplicar em altos níveis nestes produtos (O'RIORDAN & FITZGERALD, 1998). Além disso, após a sua ingestão, esses probióticos podem continuar desenvolvendo os seus efeitos benéficos no trato digestivo. A atividade antagonista das bifidobactérias contra o estabelecimento de micro-organismos patogênicos é uma das hipóteses para explicar o efeito protetor do probiótico contra infecções, mas além deste benefício, esta propriedade permite uma homeotase no ecossistema intestinal, por modular em condições normais a composição e densidade da microbiota intestinal. Apesar de existirem dados na literatura mostrando que os resultados de antagonismo *in vitro* não podem ser extrapolados para o antagonismo *in vivo*, estes testes são reconhecidamente úteis quando se deseja fazer uma triagem de possíveis linhagens com potencial uso como probiótico. Além disso, o antagonismo *in vitro* é um dos testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde e da Organização de Agricultura e Alimentos nas Diretrizes para Avaliação dos Probióticos (FAO/WHO, 2002).

5.6. Capacidade de colonização do trato gastrintestinal de animais isentos de germes por *B. longum* 5^{1A}

Bifidobacterium longum 5^{1A} foi selecionada para prosseguir os estudos, uma vez que apresentou melhores resultados nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, antagonismo *in vitro* e velocidade de crescimento. Portanto, antes de avaliar as propriedades funcionais *in vivo* desta linhagem, foi primeiro determinado a capacidade de *B. longum* 5^{1A} de resistir a condições

adversas do trato gastrointestinal e chegar ao seu local de ação em níveis populacionais elevados, para que possa exercer todas as suas propriedades benéficas.

Neste estudo, os níveis alcançados pela bifidobactéria nas fezes dos animais gnotobióticos apresentaram-se satisfatórios, com valores médios variando de $8,13 \pm 1,17$ a $10,08 \pm 0,1$ log UFC/g de fezes, indicando que foi capaz de colonizar o trato digestivo de animais isentos de germes e de se manter em níveis elevados ao longo dos 10 dias de acompanhamento (Gráfico 3). Outros trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório também mostraram que bifidobactérias são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo de camundongos, resistindo às condições de estresse, alcançando níveis populacionais altos e estáveis (SILVA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010).

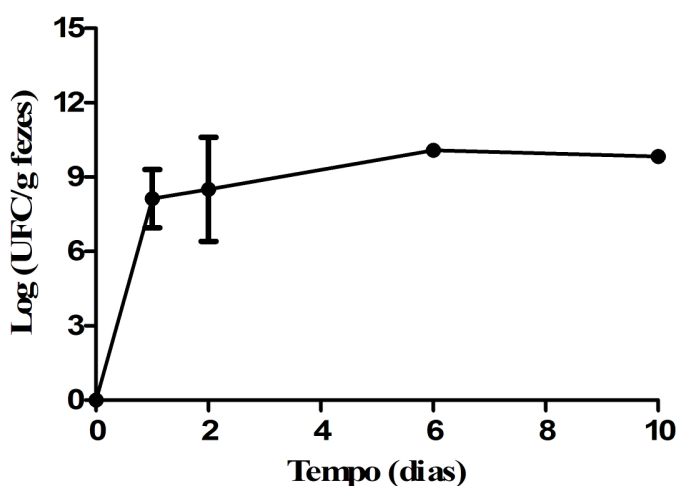


Gráfico 3 - Níveis populacionais de *B. longum* 5^{1A} nas fezes de camundongos gnotobióticos durante a monoassociação. O resultado está expresso como média de dois experimentos independentes do log UFC/g de fezes de seis animais. As barras verticais indicam o desvio-padrão da média.

Ao comparar o resultado do teste de hidrofobicidade com este, pode-se perceber que nem sempre os testes *in vitro* correspondem ao *in vivo* e vice-versa. Quando comparado com os modelos *in vitro*, a vantagem do uso do modelo animal em experimentos é de trabalhar com condições simulando toda a complexidade do ser humano. Portanto, a distância de extrapolação dos resultados do modelo animal para o ser humano é muito menor e mais confiável do que de

um ensaio *in vitro* para o ser humano. Este modelo animal representa um sistema experimental simplificado e excelente para avaliação do potencial probiótico de micro-organismos, pois permite o estudo da capacidade de sobrevivência de um único isolado no ambiente gastrointestinal sem a interferência e competitividade da complexa microbiota presente no intestino de animais. Segundo o *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, publicado em conjunto pela OMS e FAO, após a identificação e seleção *in vitro* de probióticos e antes de ensaios clínicos, a utilização de modelos animais é recomendada para a avaliação das características funcionais e de segurança (FAO/WHO, 2002; Martins *et al.*, 2012).

5.7. Análises físico-químicas e microbiológicas de iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A}

Os diferentes iogurtes foram produzidos de forma a explorar as diferentes variáveis tecnológicas normalmente empregadas na indústria, para adequar a uma matriz alimentar. A cultura utilizada como cultivo congelado, resistiu às condições de congelamento, mantendo-se viável. Os resultados da viabilidade da bifidobactéria e do pH durante 28 dias de armazenamento a 5°C estão expressos na Tabela 5. Como pode ser observada, a adição do cultivo congelado ou fresco, antes da fermentação, resulta em perda da viabilidade (redução de aproximadamente 1,5 log). Após 14 dias de armazenamento, em todos os iogurtes produzidos, houve uma diminuição da viabilidade, pela redução de 1-2 ciclos log aproximadamente e, após 28 dias, mesmo na presença de inulina, a viabilidade diminuiu ao longo do período de estocagem, alcançando valores menores de 3,0 log (UFC/mL). Não foi observado nenhum efeito de pós-acidificação ao longo da vida de prateleira, os valores de pH mantiveram próximos de 4,6. Em relação a viabilidade do cultivo iniciador, foi feita a enumeração total de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Não houve alteração nos níveis populacionais destes dois micro-organismos durante a vida de prateleira, permanecendo em torno de 10⁸ UFC/mL.

É preocupante a menção de muitos estudos de sobrevivência de probióticos em alimentos usando células viáveis de culturas *overnight*. Na indústria alimentícia, isto não ocorre, os probióticos são principalmente comercializados como culturas congeladas ou liofilizadas (SAXELIN *et al.*, 1999; VASILJEVIC & SHAH, 2008; MULLER *et al.*, 2009). Atualmente o emprego de cultivo na forma de *spray drying* também está sendo utilizado como método alternativo ao congelamento e liofilização (SIMPSON *et al.*, 2005; VASILJEVIC & SHAH, 2008

Tabela 5 - Viabilidade (log UFC ml⁻¹ ± DP) de *B. longum* 5^{1A} em diferentes tipos de leites fermentados, e seu pH correspondente, durante armazenamento a 5°C

| Tipos de leites fermentados | Log UFC ml ⁻¹ ± DP | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | pH ± DP | | |
| | Tempo (dias) | | |
| | 0* | 14 | 28 |
| Iogurte 2 | 6,46 ± 0,12 ^a | 5,44 ± 0,16 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,63 ± 0,08 | 4,68 ± 0,03 | 4,73 ± 0,02 |
| Iogurte 3 | 8,03 ± 0,14 ^a | 6,60 ± 0,28 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,59 ± 0,01 | 4,65 ± 0,04 | 4,64 ± 0,10 |
| Iogurte 4 | 6,56 ± 0,37 ^a | 5,82 ± 0,13 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,59 ± 0,09 | 4,68 ± 0,05 | 4,68 ± 0,09 |
| Iogurte 5 | 8,19 ± 0,11 ^a | 6,43 ± 0,28 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,60 ± 0,01 | 4,70 ± 0,06 | 4,66 ± 0,12 |
| Iogurte 6 | 8,17 ± 0,12 ^a | 6,61 ± 0,23 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,55 ± 0,03 | 4,52 ± 0,12 | 4,56 ± 0,07 |
| Iogurte 7 | 8,22 ± 0,08 ^a | 6,13 ± 0,09 ^b | < 3,00 ^c |
| | 4,59 ± 0,04 | 4,58 ± 0,05 | 4,59 ± 0,11 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Legenda: DP = desvio-padrão

*Contagem de bifidobactérias no dia da produção (tempo 0).

Nota: Os resultados estão expressos como média da duplicata, da contagem do log UFC ml⁻¹ ± DP

^{a,b,c} Valores em linha com diferentes letras são significativamente diferentes (p<0,05).

ZACARÍAS *et al.*, 2011). Neste trabalho *B. longum* 5^{1A} resistiu às condições de congelamento, sem perda da viabilidade, conforme encontrado em outros trabalhos para outras linhagens (SAXELIN *et al.*, 1999; ZACARÍAS *et al.*, 2011).

O fenômeno de pós-acidificação não foi observado neste trabalho, correspondendo com o esperado, uma vez que o cultivo iniciador utilizado apresentava em sua composição uma proporção maior de estreptococos em relação aos lactobacilos (10:1). Este fenômeno pode ocorrer em baixo pH e baixa temperatura devido a natureza acidofílica de *L. bulgaricus* (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; VASILJEVIC & SHAH, 2008). Como muitas

linhagens de bifidobactérias são sensíveis aos valores de pH abaixo de 4,6, um produto ideal para sua sobrevivência deve apresentar um valor de pH final acima de 4,6 para prevenir o declínio desta população (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Em todos os casos, *B. longum* 5^{1A}, perdeu a viabilidade durante a fermentação do leite e/ou durante o período de estocagem. Muitas linhagens probióticas mostram sobrevivência limitada em leites fermentados durante armazenamento sob refrigeração (SAXELIN *et al.*, 1999; VINDEROLA *et al.*, 2009). Entre as bifidobactérias, algumas linhagens parecem ser mais adequadas para aplicações industriais que outras. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen) e DN-173 010 (Danone) são as linhagens mais utilizadas na indústria alimentícia. Entretanto, outras espécies também têm sido usadas com sucesso para o desenvolvimento de culturas probióticas comerciais já sendo encontradas no mercado: *B. bifidum* BF2, *B. breve* BR2, *B. infantis* BT e M-63, *B. longum* BG3 e BB536 e *B. pseudolongum* M-602 (MULLER *et al.*, 2009).

A adição da bifidobactéria antes ou após a fermentação foi feita para mimetizar a produção de leites fermentados batido ou pastoso, respectivamente. A redução da viabilidade da bifidobactéria durante o processo fermentativo pode ser explicada pela temperatura elevada (43°C) a que foi exposta e/ou inibição pela liberação de metabólitos tóxicos produzidos pela cultura iniciadora (VINDEROLA *et al.*, 2002). Temperatura de incubação é um fator importante relacionado à prática de inoculação. Geralmente, o iogurte é fermentado a 43°C (temperatura ótima para o cultivo iniciador), entretanto, a temperatura ótima de crescimento da bifidobactéria é 37°C. Portanto, uma temperatura mais baixa (em torno de 40°C) pode favorecer a sobrevivência de bifidobactérias, sem prejudicar o processo fermentativo (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). Outra alternativa válida para contornar este problema é a adição da bifidobactéria após a fermentação do leite, entretanto, sua sobrevivência mesmo nesta condição, não é garantida. Alguns autores sugerem também a aplicação da fermentação de dois passos: fermentação inicial com a cultura probiótica por duas horas, seguida de fermentação com o cultivo iniciador por quatro horas. Isto permite que o probiótico atinja a fase final lag ou início da fase log resultando em altas contagens após seis horas de fermentação (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Neste trabalho, mesmo a adição da bifidobactéria após a fermentação não aumentou a sua sobrevivência nos iogurtes. Apesar de ter muitos dados na literatura de inibição do probiótico pelo cultivo iniciador, pode ocorrer também uma estimulação, devido à natureza proteolítica de

L. bulgaricus, com conseqüente liberaçãõ de aminoácidos essenciais requeridos para o crescimento da bifidobactéria. Além disso, *S. thermophilus* pode estimular o crescimento de bifidobactérias pelo consumo de oxigênio (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Portanto, a escolha do cultivo ideal para cada probiótico é crucial para a viabilidade, independentemente da prática de inoculaçãõ adotada.

A prática de inoculaçãõ direta é viável em termos práticos para a indústria, uma vez que se adiciona, em um só momento, a cultura iniciadora juntamente com a cultura probiótica. No entanto, como as bifidobactérias produzem, durante a fermentaçãõ, ácido acético e láctico, à taxa de 3:2, seu desenvolvimento excessivo pode gerar produtos com sabor “a vinagre”, dificultando a aceitaçãõ do produto pelos consumidores (ZACARCHENCO & MASSAGUER-ROIG, 2004). Por este motivo, as indústrias de leites fermentados optam por adicionar a bifidobactéria após o final do preparo do iogurte e, em seguida, refrigeram o produto. Assim, a bifidobactéria estará presente em baixíssima atividade fermentativa, produzindo quantidades irrisórias de ácido acético, o que poderia alterar o sabor do iogurte.

Ao comparar os valores encontrados neste trabalho com os preconizados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e também pela ANVISA, percebemos que os iogurtes encontram-se fora dos padrões (BRASIL, 2007). Somente no tempo 0 e após 14 dias de armazenamento, os iogurtes 3, 5, 6 e 7 estão dentro do estabelecido na legislaçãõ, uma vez que considera-se a ingestãõ diária de pelo menos 100 mL de iogurte. Vale a pena ressaltar que para um probiótico exercer um efeito benéfico no ecossistema digestivo, considera-se que a concentraçãõ em células viáveis no local de atuaçãõ deve estar pelo menos de 10^7 UFC/g do conteúdo (NICOLI & VIEIRA, 2000).

O efeito da inulina em acentuar a sobrevivência de bifidobactérias durante o período de armazenamento de leites fermentados é bem descrito na literatura (CAPELA *et al.*, 2006; AKIN *et al.*, 2007). Entretanto, no nosso estudo, o acréscimo de inulina não provocou efeito positivo na viabilidade, mostrando que existe uma influênciã específica de linhagem e matriz alimentar. Embora o efeito bifidogênico da inulina seja bem documentado, não está claro ainda quais espécies de *Bifidobacterium* são estimuladas *in vivo* e se outros grupos de micro-organismos são afetados pelo seu consumo (RAMIREZ-FARIAS *et al.*, 2009). Muitos trabalhos estão disponíveis avaliando a capacidade de linhagens de bifidobactérias de crescer *in vitro* principalmente na

presença de FOS e inulina. ROSSI e colaboradores (2005) demonstraram que das 55 linhagens testadas, todas foram capazes de crescer em FOS, mas, somente 8 em inulina. Este autor sugere que esta característica não é peculiar de *Bifidobacterium* spp. e sim específica da linhagem.

Outro trabalho interessante foi publicado em 2000, em que se avaliou o efeito de prebióticos (FOS, galacto-oligossacarídeo - GOS e inulina) no crescimento, atividade e viabilidade de duas linhagens de *B. bifidum* (Bf-1 e Bf-6) incorporadas ao leite. Para todos os prebióticos observou-se um aumento proporcional do efeito em relação à concentração de prebiótico, sendo máximo em 5% (p/v). A inulina foi o prebiótico menos efetivo em todos os parâmetros avaliados entre as fontes de carboidratos testadas. Mesmo em baixas concentrações, FOS promoveu um estímulo no crescimento e aumentou consideravelmente a viabilidade da bifidobactéria após quatro semanas de armazenamento a 4°C (SHIN *et al.*, 2000).

Para tentar contornar este problema da perda da viabilidade, algumas estratégias podem ser adotadas, modificando algumas variáveis tecnológicas como: aumento de sólidos totais (acrécimo de 2% (p/v) de leite em pó desnatado e 2% (p/v) de concentrado protéico de soro), uso de temperatura de fermentação mais baixa (40°C), uso de outro cultivo iniciador assim como outro prebiótico. Estes fatores juntos são variáveis tecnológicas candidatas a otimizar sobrevivência da bactéria probiótica em leite fermentado (CHAMPAGNE & GARDNER, 2005; ROSS *et al.*, 2005). MAZOCHI e colaboradores (2010) mostraram sobrevivência de 7,5 log UFC/mL desta linhagem por 40 dias em iogurte produzido com leite de cabra e saborizado com morango. Isto mostra que a matriz alimentar onde o probiótico está incluído tem um papel decisivo na determinação da viabilidade durante elaboração do produto e proteção das células para consumo (RANADHEERA *et al.*, 2010). Outra opção seria utilizar queijos como veículos para probióticos com alta sensibilidade ao ácido láctico, devido ao alto pH (4,5-5,6), matriz sólida (exclusão do oxigênio) e alto conteúdo de gordura (VINDEROLA *et al.*, 2011a). Outra importante ferramenta para proteger células sensíveis na matriz alimentar para melhorar a sobrevivência é a aplicação de técnicas de microencapsulação. Microencapsulação é um processo onde as células são retidas dentro de uma membrana encapsulante para reduzir a injúria ou morte celular (VASILJEVIC & SHAH, 2008; BURGAIN *et al.*, 2011).

A resistência da bifidobactéria a digestão gástrica simulada foi avaliada em três pontos durante o armazenamento. Após a fermentação a sensibilidade foi mais alta para os iogurtes que

foram inoculados com a bifidobactéria antes da fermentação (redução do log de 1,3-1,7) comparadas com as culturas adicionadas após fermentação (valores entre 0,43-0,99) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resistência de *B. longum* 5^{1A} à digestão ácida simulada em diferentes tipos de leites fermentados durante o armazenamento a 5°C

| Tipos de leites fermentados | $\Delta \log \text{UFC}/\text{ml}^{-1} *$ | | |
|-----------------------------|---|------|--------|
| | Tempo (dias) | | |
| | 0 | 14 | 28 |
| Iogurte 2 | 1,30 | 3,58 | > 3,00 |
| Iogurte 3 | 0,65 | 5,25 | > 3,00 |
| Iogurte 4 | 1,70 | 3,00 | > 3,00 |
| Iogurte 5 | 0,51 | 5,25 | > 3,00 |
| Iogurte 6 | 0,43 | 5,18 | > 3,00 |
| Iogurte 7 | 0,99 | 4,70 | > 3,00 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Legenda: DP = desvio-padrão

Nota: Os resultados estão expressos como média da duplicata, da contagem do log UFC ml⁻¹ \pm DP

*Diferenças na viabilidade (log UFC/ml) antes e após a acidificação em leites fermentados a pH 3,0 por 90 minutos a 37°C na presença de 0,5% NaCl e de 0,1% pepsina suína.

Após 14 dias de armazenamento, observou-se uma sensibilidade celular aumentada com perda da viabilidade ranqueando 3,0-5,25 ciclos log UFC/mL, alcançando valores maiores que 3 log ciclos após 28 dias, independentemente do iogurte. A diferença na viabilidade, antes e após a acidificação em iogurtes, armazenados por 28 dias, foi difícil de ser mensurada devido aos baixos níveis populacionais da bifidobactéria. Mudanças na resistência de bactérias probióticas a digestão ácida gástrica, durante a vida de prateleira, já foi registrada para bifidobactérias em suco de fruta e leite desnatado (SAARELA *et al.*, 2006) e para lactobacilos em leites fermentados comerciais (VINDEROLA *et al.*, 2011b).

5.8. Efeito dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} na proliferação de células IgA+ na lâmina própria intestinal de camundongos BALB/c

O Gráfico 4 mostra o número de células IgA+ na lâmina própria do intestino de camundongos que receberam os produtos fermentados. Um significativo aumento foi observado ($P < 0,05$) neste parâmetro no intestino delgado de camundongos que receberam iogurtes contendo bifidobactérias adicionadas após a fermentação, como cultivo fresco e congelado ou animais que receberam iogurte com a bifidobactéria como cultivo fresco e inulina (Controle: $228,5 \pm 19,0$ células IgA+/10 campos; Iogurte 1: $248,0 \pm 58,05$ células IgA+/10 campos, Iogurte 3: $342,66 \pm 51,36$ células IgA+/10 campos; Iogurte 5: $307,33 \pm 45,99$ células IgA+/10 campos; Iogurte 6: $277,66 \pm 16,0$ células IgA+/10 campos). Nenhuma diferença foi observada entre os três grupos. No intestino grosso, um significativo aumento do número de células IgA+ foi observado quando os animais receberam iogurtes, com ou sem inulina, e adicionados com a bifidobactéria como cultura fresca, sendo nenhuma diferença detectada entre estes dois grupos (Controle: $372,1 \pm 24,0$ células IgA+/10 campos; Iogurte 1: $382,79 \pm 15,52$ células IgA+/10 campos, Iogurte 3: $459,89 \pm 32,0$ células IgA+/10 campos; Iogurte 5: $393,55 \pm 24,45$ células IgA+/10 campos; Iogurte 6: $423,0 \pm 16,0$ células IgA+/10 campos) ($P < 0,05$). Um dos benefícios atribuídos aos probióticos é sua capacidade de modular positivamente a resposta imune intestinal, de maneira linhagem específica (LÓPEZ *et al.*, 2010). A ativação do sistema imune pode levar a exercer diferentes efeitos benéficos em um caminho preventivo e terapêutico. Dentro da mucosa intestinal a principal função de IgA é exercer exclusão imune de patógenos e proteínas exógenas em cooperação com os mecanismos de defesa não específicos (MACPHERSON *et al.*, 2001).

As variáveis tecnológicas “fresco” e “congelado” e a adição ou não da inulina tiveram um impacto similar na proliferação das células IgA+ no intestino delgado. Entretanto, no intestino grosso, a adição de bifidobactérias como cultivo congelado falhou em induzir a proliferação de células IgA+ comparadas com o cultivo fresco. A razão desta observação permanece desconhecida, mais estudos de mecanismos imunes devem ser conduzidos. Entretanto, em concordância com este resultado, observamos que alguns tratamentos tecnológicos, como *spray drying*, pode mudar a capacidade imunoestimuladora de componentes bioativos (BURNS *et al.*, 2010). Como muitos dos determinantes antigênicos apresentando capacidade imunoestimulante estão localizadas na superfície da parede celular da bactéria probiótica (CORTHÉSY *et al.*, 2007), eles podem de alguma maneira ser afetados pelo tratamento tecnológico aplicado. Vale ressaltar que, os ensaios microbiológicos e físico-químicos foram realizados simultaneamente.

Portanto, durante os dez dias de administração dos iogurtes aos animais, ainda sim, apresentavam níveis populacionais de bifidobactérias satisfatórios (Tabela 5).

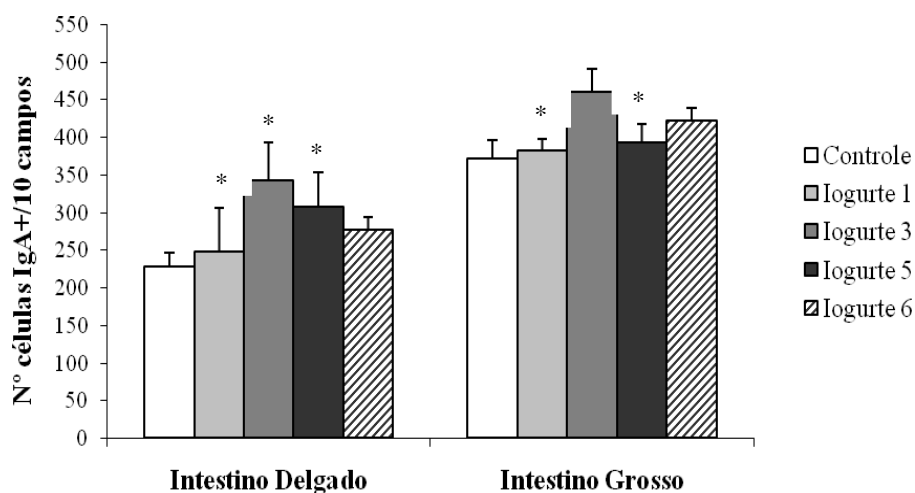


Gráfico 4 - Efeito da administração oral de iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} no número de células IgA+ na lâmina própria do intestino delgado e grosso de camundongos BALB/c. Os resultados estão expressos como a média do número de células IgA+/10 campos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimentais (P<0,05).

5.9. Efeito dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} no número de células de Küpffer de camundongos BALB/c

Em todos os animais, os fígados apresentavam citoarquitetura de aspecto habitual, sem infiltrados inflamatórios ou lesões dignos de nota. Não houve diferença estatisticamente significativa (P>0,05) quando se comparou o número de células de Küpffer nos animais controles (51,3 ± 6,26 células de Küpffer por 100 hepatócitos) com aquelas nos tratados com os iogurtes (Iogurte 1: 63,17 ± 9,18 células de Küpffer por 100 hepatócitos; Iogurte 3: 59,92 ± 5,2 células de Küpffer por 100 hepatócitos; Iogurte 5: 63,95 ± 9,27 células de Küpffer por 100 hepatócitos e Iogurte 6: 48,41 ± 0,92 células de Küpffer por 100 hepatócitos) (Gráfico 5). Nos grupos experimentais que receberam os iogurtes 1, 3 e 5, observou-se aumento das células de Küpffer,

em relação ao controle, uma vez que se apresentavam vesiculosas e hiperplásicas, sugerindo um aumento da atividade metabólica. Em contrapartida, nos grupos controle e que recebeu o iogurte 6, estas células se apresentavam quiescentes e menores. As células de Küpffer representam uma das maiores populações de macrófagos teciduais, e juntamente com os neutrófilos, são responsáveis pelo clareamento de bactérias da corrente sanguínea. Trabalhos demonstram um aumento no número de células de Küpffer em camundongos monoassociados com *L. delbrueckii* UFV H2B20 e *S. boulardii* comparados com camundongos isentos de germes sendo este aumento simultâneo com o aumento do clareamento de bactérias patogênicas injetadas sistemicamente (NEUMANN *et al.*, 1998; RODRIGUES, *et al.*, 2000). SILVA e colaboradores (2004) também não encontraram diferenças ao avaliar este parâmetro em camundongos monoassociados com *B. longum* Bb46.

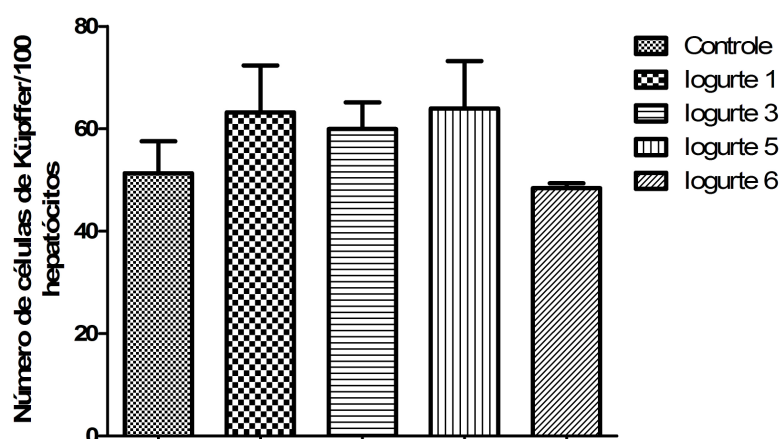


Gráfico 5 - Efeito da administração dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} no número de células de Küpffer em camundongos BALB/c controle e tratados por dez dias com os diferentes iogurtes. Os resultados estão expressos como média do número de células de Küpffer/100 hepatócitos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias ($P > 0,05$).

5.10. Efeito dos iogurtes adicionados de *B. longum* 5^{1A} na sobrevivência de camundongos BALB/c desafiados com *S. Typhimurium*

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi a capacidade de os iogurtes protegerem os animais contra infecção por *S. Typhimurium*. Uma dose única do patógeno foi administrada aos

camundongos no 11º dia de tratamento. A sobrevivência pós-infecção foi monitorada por 20 dias. Os animais que receberam o iogurte contendo a bifidobactéria adicionada como cultivo fresco sem inulina apresentaram sobrevivência de 100%, estatisticamente diferente do grupo controle (50%) (Gráfico 6) ($P < 0,05$). O grupo que recebeu iogurte adicionado de cultivo fresco e inulina não teve capacidade similar de sobrevivência. Os demais tratamentos aumentaram a sobrevivência em relação ao controle, porém não houve diferença estatisticamente comprovada.

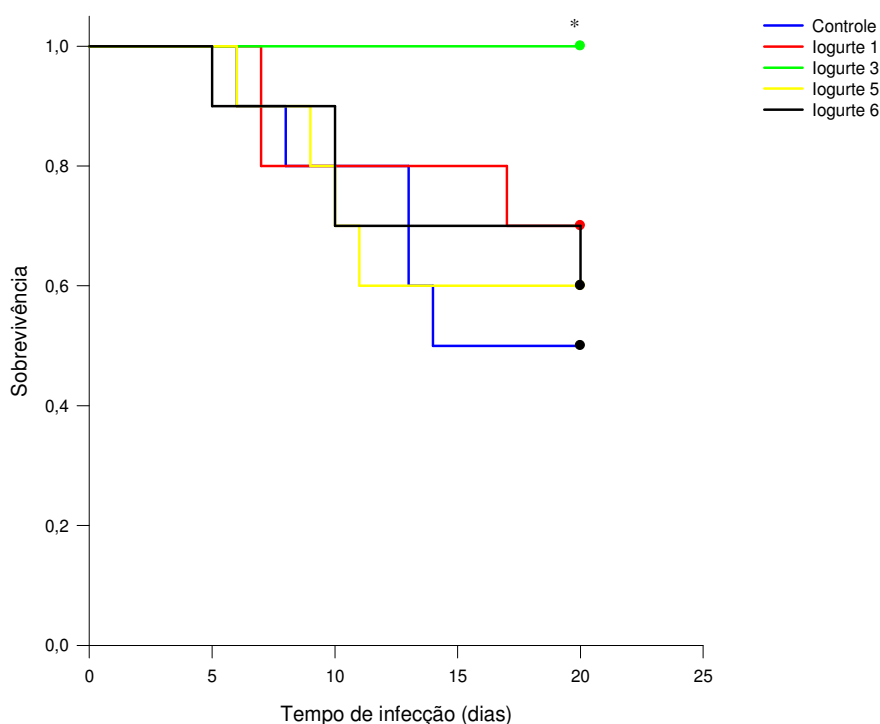


Gráfico 6 - Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com os diferentes iogurtes e desafiados com *S. Typhimurium* no 11º dia. *Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo que recebeu o iogurte 3 ($P < 0,05$).

Os resultados disponíveis são contraditórios no que diz respeito a prevenção de infecção por *Salmonella* por prebióticos. Em certas circunstâncias os prebióticos inulina e FOS podem acentuar a colonização e translocação de *S. Enteritidis* em ratos (TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2004). Além deste trabalho, TEN BRUGGENCATE e colaboradores (2003) mostraram que FOS

da dieta aumentou a translocação de *Salmonella* em ratos de maneira dose dependente, enquanto que PETERSEN e colaboradores (2009) registraram que suplementando uma dieta para roedores com amido de milho e 10% FOS ou XOS (xilo-oligossacarídeo) aumenta a translocação de *S. Typhimurium* SL1344 em camundongos. Por outro lado, há muitos registros mostrando os efeitos positivos da administração de inulina, sozinha ou com probióticos na prevenção ou atenuação da infecção por *Salmonella* em modelos animais (BUDDINGTON *et al.*, 2002; APANAVICIUS *et al.*, 2007; BENYACOUB *et al.*, 2008; RISHI *et al.*, 2009). Estudos adicionais são necessários para determinar o papel da inulina durante o curso da infecção por *Salmonella* em modelos animais.

HITCHINS e colaboradores (1985) demonstraram que o tratamento com iogurte pode aumentar a taxa de sobrevivência de ratos infectados com *S. Typhimurium*. Os animais do grupo experimental tiveram significativamente menor morbidade e melhor ganho de peso que os animais do grupo controle após o desafio com a bactéria patogênica. Neste estudo, a sobrevivência de 100% encontrada nos animais que receberam o iogurte suplementado com o cultivo fresco da bifidobactéria não pode ser atribuída ao cultivo iniciador, já que o mesmo efeito não foi observado nos demais grupos. Mesmo com a perda da viabilidade, houve uma proteção contra infecção por *S. Typhimurium*, possivelmente ocasionada, pelo menos em parte pelo aumento no número de células IgA+ no intestino delgado e grosso, no momento da infecção. Ou ainda, as células mortas da bifidobactéria administradas no final do experimento, podem ter exercido um efeito imunomodulador que não foi observado quando esta linhagem foi submetida ao congelamento. Existem trabalhos que enfatizam uma possível “desvinculação” entre viabilidade e funcionalidade (SAARELA *et al.*, 2006; ADAMS, 2010) e que a verificação da primeira não é condição suficiente para o cumprimento da segunda.

5.11. Avaliação da segurança de *B. longum* 5^{1A}, em camundongos NIH convencionais

Para a seleção de uma bactéria probiótica são avaliadas algumas propriedades, como funcionalidade, aspectos tecnológicos e segurança. Apesar das bifidobactérias serem reconhecidamente seguras, é importante avaliar a segurança de candidatas a probióticos. Infectividade e patogenicidade são parâmetros importantes no estudo de bactérias probióticas (ZHOU *et al.*, 2000; BARRENETXE *et al.*, 2006). Por isso, neste trabalho avaliou-se se o

tratamento com *B. longum* 5^{1A} promove alterações no índice hepático e esplênico, ganho de peso e ainda, na mucosa intestinal de camundongos NIH convencionais.

Em relação ao ganho de peso, o tratamento por dez dias com a bifidobactéria não provocou mudanças neste parâmetro (Controle: 7,99±2,18 g e Experimental: 7,75±1,46 g; P>0,05). Um exame macroscópico não revelou diferenças no aspecto das vísceras entre os grupos. Hepatomegalia e esplenomegalia são indicativos indiretos de infecção. Pela análise do Gráfico 7, pode-se observar que *B. longum* 5^{1A} não provocou alterações nestes índices (Índice Hepático/Controle: 56,33±4,84 mg fígado/g peso corporal; Experimental: 55,16±5,85 mg fígado/g peso corporal; Índice Esplênico/Controle: 5,83±1,15 mg baço/g peso corporal; Experimental: 5,58±0,72 mg baço/g peso corporal; P>0,05).

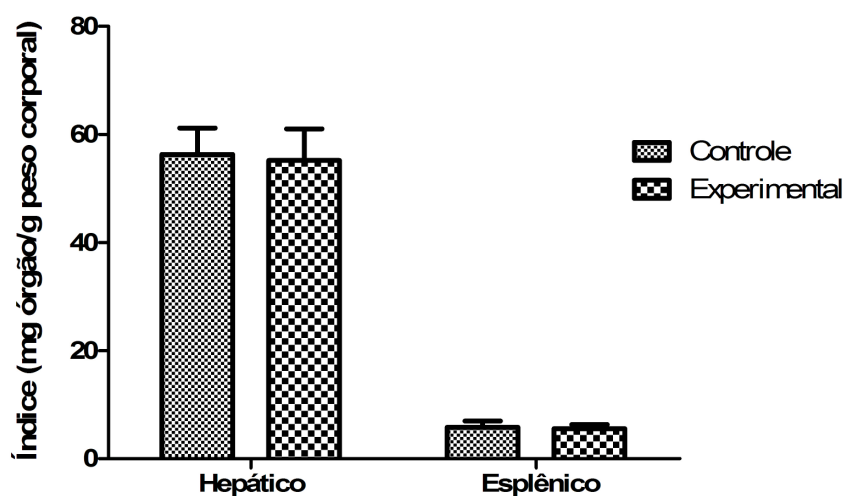


Gráfico 7 - Índice hepático e esplênico de camundongos do grupo controle e experimental. Os resultados estão expressos como média do índice hepático ou esplênico (mg órgão/g peso corporal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias (P>0,05).

Quanto à histologia do intestino delgado e grosso, o tratamento com a bifidobactéria não provocou lesões no íleo e cólon (Figura 1). O grupo controle apresentou aspecto habitual, sem alterações da parede intestinal em todas as suas camadas, mucosa íntegra com vilosidades de

aspecto e tamanho preservado, sem alterações da celularidade das criptas e superfície (Figuras 1A e B). Os fragmentos intestinais correspondentes ao íleo do grupo tratado com a bifidobactéria apresentaram-se com discretas alterações degenerativas na superfície do epitélio do íleo de alguns animais (Figura 1C), no entanto sem presença de edema na lâmina própria ou aumento da celularidade da mucosa. O cólon apresentou-se com a mucosa íntegra, sem edema ou infiltrado inflamatório (Figura 1D). Além disso, durante todo o tratamento experimental, não foi observada nenhuma alteração do comportamento e atividade dos animais, que apresentaram pêlo brilhante em todos os grupos experimentais tratados, bem como no grupo controle salina. Também, não apresentaram diarreia ou qualquer outro sinal clínico que poderia ser atribuído ao tratamento com os isolados. Estes resultados indicam que *B. longum* 5^{1A} não causa nenhum efeito adverso na saúde dos camundongos quando tratados por dez dias.

Outras linhagens potencialmente probióticas apresentaram resultados similares aos aqui descritos quando foram administradas em animais (ZHOU *et al.*, 2000; BARRENETXE *et al.*, 2006). *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 e *Bifidobacterium lactis* HN019 foram administrados oralmente por 4 semanas em camundongos BALB/c. Nos animais tratados não foram observadas alterações do índice hepático, esplênico, aspectos histológicos do fígado, intestino e baço e outros parâmetros de saúde avaliados. Estes resultados atestam que o consumo dessas linhagens bacterianas foi seguro em animais e, provavelmente, também seguro para seres humanos (ZHOU *et al.*, 2000).

5.12. Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) totais e do tipo M (IgM) no conteúdo intestinal e soro, respectivamente, de camundongos NIH

Os Gráficos 8 e 9 mostram a influência de *B. longum* 5^{1A} nos níveis de sIgA e IgM produzidas no conteúdo intestinal e soro, respectivamente. Uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental foi observada nos níveis de sIgA total (43,02±26,47 µg/g de conteúdo intestinal de animais do grupo controle x 136,28±42,04 µg/g de conteúdo intestinal de animais do grupo experimental; P<0,05) e IgM total (63,73±15,2 µg/mL de soro de animais do grupo controle x 75,25±14,29 µg/mL de soro de animais do grupo experimental; P<0,05).

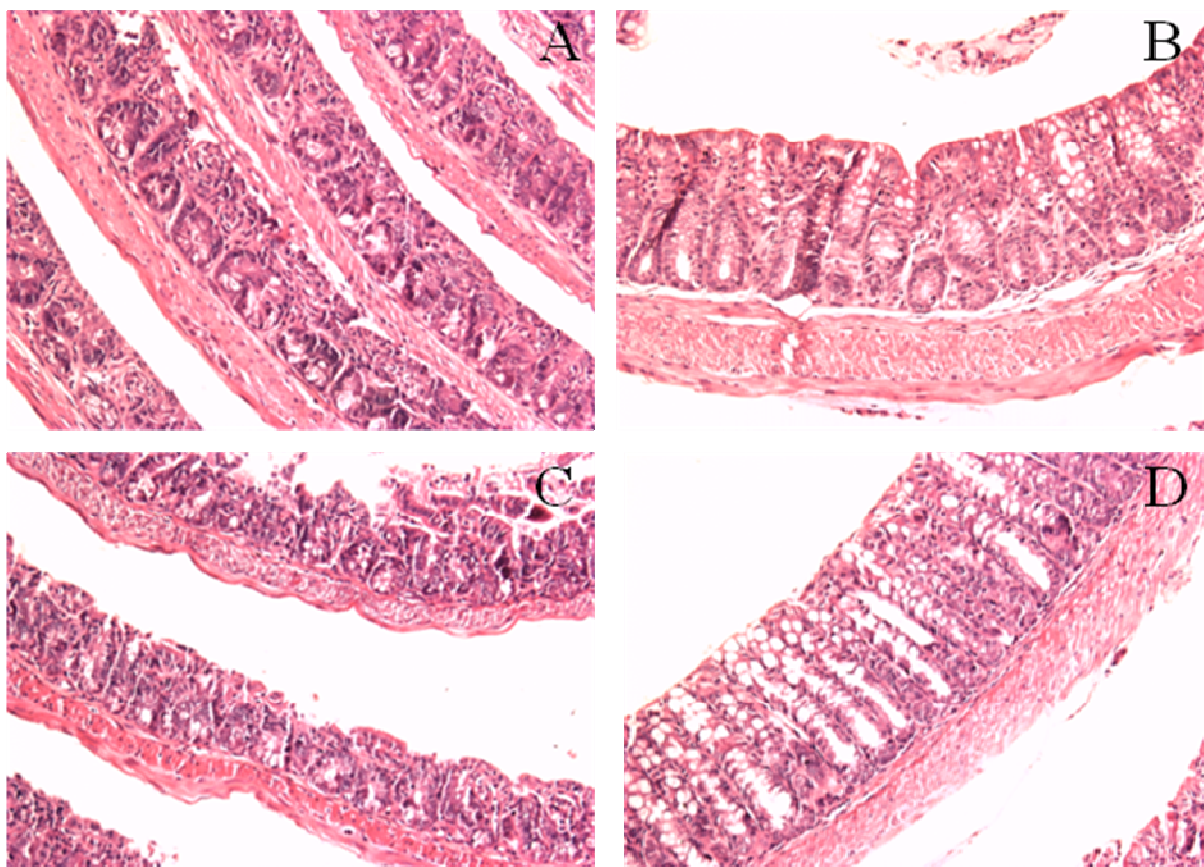


Figura 1 - Fotomicrografia do íleo (A e C) e cólon (B e D) de camundongos convencionais após dez dias de tratamento com *B. longum* 5^{1A} (C e D) ou não (A e B).

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Nota: O tratamento com a bifidobactéria não produziu lesão, entretanto, observou-se em alguns animais alterações histológicas no íleo, indicando uma discreta degeneração na superfície epitelial. Representativo de três animais/grupo. Coloração H&E, objetiva: 10x.

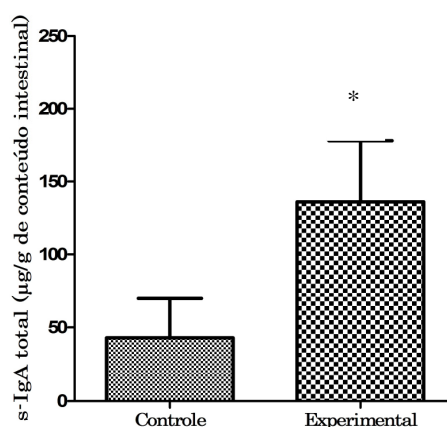


Gráfico 8 - Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA (µg/g conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P < 0,05$).

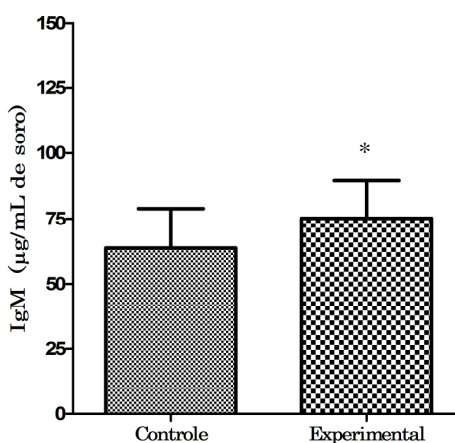


Gráfico 9 - Níveis de IgM total produzidas no soro de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de IgM (µg/mL soro). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P < 0,05$).

Um dos primeiros mecanismos de defesa contra patógenos intestinais é a produção local de IgA secretória (sIgA), que representa uma barreira imunológica contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal, ligando-se ou à superfície bacteriana e prendendo-a na camada mucosa do epitélio intestinal, ou às moléculas da superfície bacteriana que medeiam a adesão às células epiteliais, prevenindo, assim, a translocação para órgãos internos. Esta imunoglobulina está envolvida, principalmente, em proteção imune específica da superfície mucosa intestinal. Ela resiste à proteólise intraluminal e não ativa o sistema de complemento ou resposta inflamatória. Isso a faz ideal para desempenhar sua função na primeira linha de defesa, em combinação com os mecanismos de defesa imunológicos celulares (HAJISHENGALLIS *et al.*, 1992).

A sIgA é o isotipo de anticorpo predominante na mucosa intestinal, sendo secretada na forma de dímero e transportada através do epitélio mucoso por uma proteína receptora de imunoglobulinas poliméricas, também conhecida como componente secretório (CS). A ligação a este componente é seguida pelo transporte através da célula epitelial pelo complexo dímero IgA-CS, que é chamado de anticorpo IgA secretória (ABBAS & LICHTMAN, 2005). A habilidade de estimulação de produção de sIgA não é a mesma para diferentes micro-organismos, entretanto, diversos trabalhos têm demonstrado o aumento de sIgA após administração de bactérias lácticas e bifidobactérias em camundongos monoassociados e convencionais (PERDIGÓN *et al.*, 1995; MARTINS *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010). Este aumento na produção de IgA na mucosa intestinal, pode ser atribuído ao aumento do número de células plasmáticas produtoras de IgA ou aumento da atividade de secreção destas células residentes na mucosa intestinal. O mecanismo de aumento da produção de IgA pode ser melhor esclarecido através da contagem de células produtoras de IgA na lâmina própria, usando para isso a marcação de núcleos nas preparações marcadas também com anti-IgA conjugado com FITC.

5.13. Perfil de citocinas regulatórias e pró-inflamatórias em células esplênicas cultivadas em RPMI 1640 por qPCR em Tempo Real

Para o estudo dos mecanismos imunes envolvidos pela administração de probióticos têm sido empregadas técnicas que permitem a dosagem de mediadores da resposta imunológica, como as citocinas. A maior parte do conhecimento adquirido sobre o perfil de citocinas foi obtido pela técnica de ELISA. Entretanto, devido às limitações dessa técnica, alternativas para a dosagem

desses mediadores vêm sendo empregadas, como o uso da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). O desenvolvimento da qPCR disponibilizou uma ferramenta sensível para avaliação concomitante de um número grande de citocinas em uma pequena quantidade de material biológico, através da quantificação do mRNA das citocinas. Entretanto, devido aos mecanismos de regulação pós-transcricionais (controle da meia vida do mRNA no citoplasma, taxa de tradução, meia vida proteica, vias de exportação de proteínas, etc...) o mRNA permite apenas uma estimativa do perfil de citocinas produzido em nível proteico. Apesar da variedade de métodos que são usados para quantificar a expressão de mRNA, RT-qPCR é atualmente o método mais preciso para quantificação de mRNA de citocinas, que são frequentemente expressas em baixos níveis na célula (GIULIETTI *et al.*, 2001).

A técnica de qPCR em tempo real permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições. Esta quantificação pode ser feita de forma relativa, ou seja, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo (neste caso tratamento com *B. longum* 5^{1A}) com outro grupo não exposto, denominado grupo controle. Objetivando uma melhor análise dos dados optou-se pela verificação individual das curvas de amplificação, remoção dos sinais não específicos e o ajuste manual do limiar de detecção para que os resultados fossem obtidos na faixa de amplificação exponencial. Definiu-se, desta maneira, um limiar de detecção distinto para cada gene testado.

Para testar a eficiência de amplificação de cada um dos genes-alvo, diluições decimais de cDNA foram testadas e os resultados da reação (dados pelo valor de *Cycle Threshold*, CT) foram tabeladas para o cálculo da equação de regressão e do R². As equações de regressão obtidas mostraram boas condições de amplificação e correlação positiva entre as variáveis. Todos os iniciadores apresentaram eficiência entre 90 a 110%.

Os resultados dos efeitos de *B. longum* 5^{1A} sobre o nível relativo de expressão gênica (nível de mRNA) das citocinas IL4, IL5, IL6, IL10, IL12b, IL17a, Ifng, Tgfb1 e Tnfa foi expresso em quantidades médias relativas de mRNA, de acordo com o método descrito por HELLEMANS e colaboradores (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão do grupo controle. O resultado do grupo experimental é mostrado como uma quantidade relativa da expressão do grupo calibrador que tem nível de expressão definido como 1x. Os genes Gapdh e Actb foram usados com segurança para normalização dos dados de expressão de citocinas, uma

vez que, não foram encontradas diferenças de expressão relativa entre os grupos experimental e controle.

O Gráfico 10 (A, B) corresponde o nível de mRNA relativo (RQ) que codificam as citocinas IL5 e Tnfa. Observa-se que o tratamento com *B. longum* 5^{1A} promoveu um aumento significativo no nível de mRNA de IL5 e uma diminuição significativa no nível de mRNA de Tnfa. Em relação às demais citocinas não houve alterações significativas nos níveis de expressão (dados não mostrados).

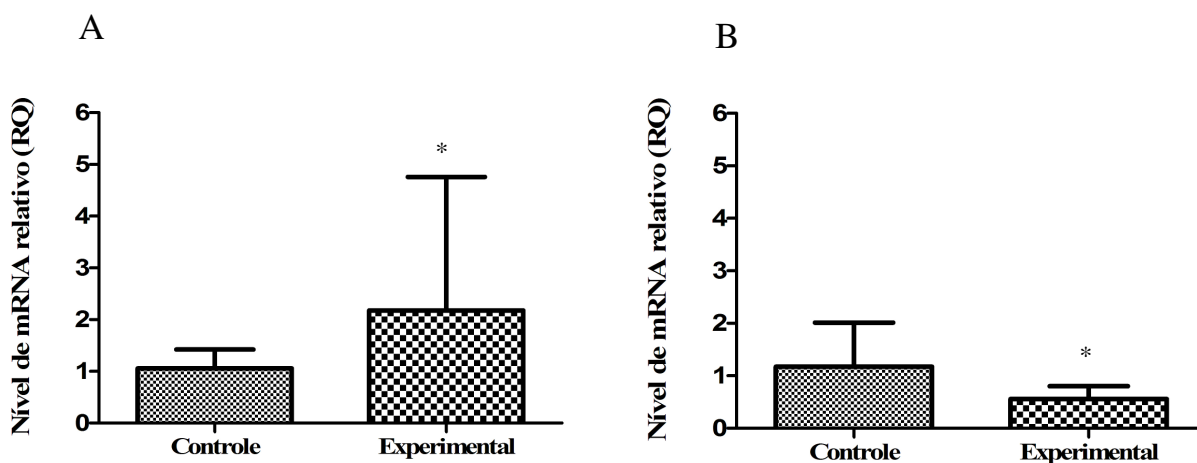


Gráfico 10. Efeito de *B. longum* 5^{1A} nos níveis de mRNA para IL5 (A) e Tnfa (B), em culturas de esplenócitos. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental (P<0,05).

As citocinas podem ser secretadas por vários tipos celulares como por exemplo macrófagos, células dendríticas e os linfócitos. Neste trabalho, os resultados de expressão de citocinas observados no cultivo de esplenócitos, podem ser um indicativo da presença da resposta celular de linfócitos T, uma vez que o cultivo feito estimula a proliferação desta população de células. No entanto, o perfil de citocinas observado pode também ter sido gerado pela interação com outras células presentes, como as células dendríticas e macrófagos residentes. O recrutamento e ativação das células T pela presença de antígenos, produzem um perfil de citocinas que caracteriza o tipo de subpopulação (Th1/ Th2/ Th17/T_{reg}). Nessa abordagem, o perfil de citocinas presente pode gerar um ambiente adequado para a polarização de um

determinado tipo de célula T em detrimento do outro, favorecendo uma determinada resposta Th ou T_{reg} (DELCENSERIE *et al.*, 2008).

A polarização de células T em células Th1 ou Th2 é geralmente dependente das condições ambientais (tipo de célula dendrítica, citocinas presentes, natureza e dose do antígeno encontrado durante sua polarização). As células T imaturas podem passar através de um estágio transitório (Th0) durante a ativação. A diferenciação de células Th1 requer Ifng enquanto o desenvolvimento de Th2 requer IL4 (DELCENSERIE *et al.*, 2008). Os fatores envolvidos nas respostas imunes Th1 tem impacto negativo sobre a diferenciação de Th2 e vice-versa (MURPHY & REINER, 2002). Outras citocinas estão associadas a respostas Th1 (IL2 e Tnfa) ou Th2 (IL5, IL6, IL9, IL10), mas sua produção não é necessariamente característica de Th1 ou Th2 (COFFMAN *et al.*, 1989; LEONARD, 2003). Nos últimos anos, porém, outras subpopulações de células T têm sido descritas e sua importância para a resposta imune vem sendo compreendida. A célula Th17 é um tipo de subpopulação de células T que é caracterizado pela secreção de IL17, produzida através da estimulação por Tgfb1 e IL6 (BETTELLI *et al.*, 2006; HARRINGTON *et al.*, 2006).

MÉNARD e colaboradores (2008) avaliaram o impacto de dez linhagens de *Bifidobacterium* spp. no balanço Th1/Th2 em animais isentos de germes. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias (resposta Th1) Tnfa e Ifng, em culturas de esplenócitos, estimuladas com concanavalina A, foram aumentados significativamente, com a monoassociação de três e cinco linhagens de *Bifidobacterium* spp., respectivamente. Na resposta Th2, houve também um aumento na secreção de IL4 com a monoassociação de cinco linhagens e, para a citocina regulatória IL10, duas linhagens foram capazes de estimular a secreção desta citocina. Algumas linhagens exibiram perfis de resposta Th1 e Th2 simultaneamente, enquanto que outras apresentaram uma resposta polarizada para Th1 ou Th2.

Outros trabalhos também demonstraram um aumento nos níveis de Ifng em células de baço de camundongos tratados com *B. lactis* e estimuladas com concanavalina A (GILL *et al.*, 2000). Algumas linhagens induzem significativamente maiores secreções de citocinas pró-inflamatórias enquanto que outras modulam negativamente a resposta inflamatória (HE *et al.*, 2002). Peptideoglicanos são os principais componentes da parede celular de Gram positivo e são conhecidos induzir citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos indicam que a parede celular de diferentes linhagens de mesma espécie causam diferentes respostas pró-inflamatórias por causa

das diferenças na composição do peptídeo glicano. Portanto, a determinação da orientação da resposta (Th1 ou Th2) é linhagem específica (ZHANG *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004; MÉNARD *et al.*, 2008).

Um balanço adequado entre as respostas pró-inflamatórias e regulatórias é importante para a manutenção da saúde (LEE & MAZMANIAN, 2010). Assim, a suplementação com probióticos pode corrigir a disbiose e restaurar a homeostase intestinal através dos mecanismos imunomodulatórios induzidos por essas bactérias (REID *et al.*, 2011). O perfil de citocinas induzido por *B. longum* 5^{1A} no baço de camundongos NIH gera condição para produção de respostas do tipo Th2, já que foi aumentada a expressão de IL5 e diminuição de Tnfa.

5.14. Análise da sobrevivência e desenvolvimento ponderal de camundongos NIH tratados ou não com *B. longum* 5^{1A} e desafiados com *S. Typhimurium*

Para avaliar o efeito que *B. longum* 5^{1A}, sem estar veiculado a uma matriz alimentar, provocaria no hospedeiro quando seu ecossistema intestinal fosse desafiado, foi determinada a mortalidade por *S. Typhimurium*. Além disso, o desempenho ponderal dos animais também foi registrado. O Gráfico 11 ilustra a mortalidade acumulada dos camundongos, tratados ou não com *B. longum* 5^{1A}, no período de 22 dias após o desafio com *S. Typhimurium*. Como pode ser observado, não houve diferença do grupo tratado em relação ao grupo controle pelo Teste exato de Fisher ($P > 0,05$). Para avaliar se houve diferença ao longo da curva de sobrevivência entre o grupo controle e os experimentais, os resultados foram também submetidos à análise pelo Teste Log Rank Survival e, também não foi observada diferença no tempo de morte dos animais quando comparado o grupo controle ($P > 0,05$).

Quanto à morbidade observamos que não houve diferença significativa no ganho de peso entre os animais do grupo controle e os animais do grupo tratado com a bifidobactéria (Após 8 dias/Controle: $7,37 \pm 1,4$ e Experimental: $7,18 \pm 1,31$; após 16 dias/Controle: $9,36 \pm 2,13$ e Experimental: $9,14 \pm 1,93$; após 24 dias/Controle: $9,78 \pm 3,4$ e Experimental: $7,16 \pm 3,68$; após 32 dias/Controle: $12,99 \pm 1,49$ e Experimental: $7,66 \pm 4,65$; $P > 0,05$) (Gráfico 12).

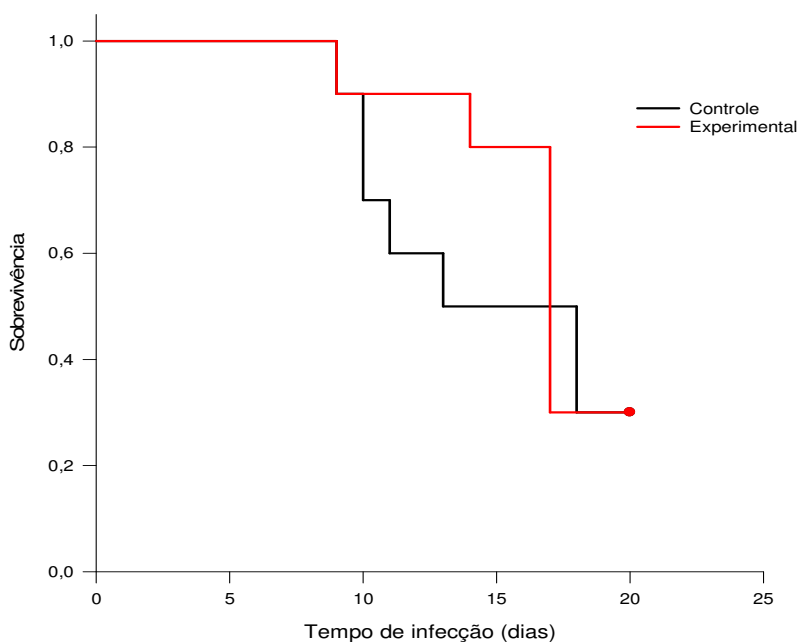


Gráfico 11 - Análise comparativa entre a curva de sobrevivência de camundongos não tratados (controle) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (experimental) e desafiados com *Salmonella* Typhimurium no 11º dia ($P>0,05$).

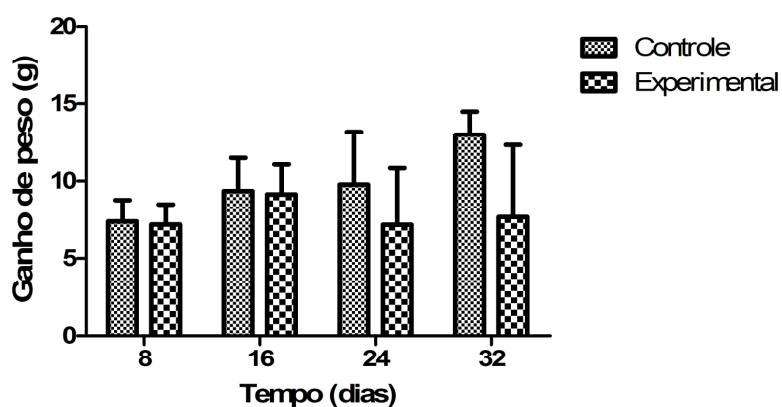


Gráfico 12 - Ganho de peso (g) de camundongos não tratados (controle) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (experimental) e desafiados com *Salmonella* Typhimurium no 11º dia. Os resultados estão expressos como média dos animais sobreviventes. As barras verticais indicam os desvios-padrão das médias ($P>0,05$).

Os animais manifestaram a doença dentro de seis a nove dias após o desafio, sendo que as mortes começaram no nono dia após o desafio. Todos os animais desafiados, tratados ou não com a bifidobactéria apresentaram mudança de comportamento, tornando-se menos ativos e apresentando arrepiamento dos pêlos do corpo e perda do seu brilho natural. Portanto, pode-se concluir que a dose de 10^4 UFC de *Salmonella* foi suficiente para produzir os sintomas associados ao modelo de salmonelose em animais convencionais da linhagem NIH com 4 semanas de idade. A observação de micro-abcessos na superfície do fígado que possuía também cor mais opaca são sinais condizentes com a translocação bacteriana presente no modelo de desafio com *Salmonella* (MITTRÜCKER & KAUFMANN, 2000). A *Salmonella* causa mudança na permeabilidade intestinal, principalmente devido alterações na estrutura do epitélio intestinal e mudança na arquitetura tecidual deste órgão (SANTOS *et al.*, 2001), confirmadas neste trabalho pelas análises de cortes histológicos do íleo e cólon.

MARTINS e colaboradores (2010) mostraram um efeito protetor em camundongos monoassociados com *B. lactis* (Bifido B) e desafiados com *S. Typhimurium*. Neste trabalho, observou-se redução do número fecal de *Salmonella* e diminuição da taxa de mortalidade. SILVA e colaboradores (2004) também mostraram um efeito protetor de *B. longum* Bb46 contra este patógeno. Entretanto, a proteção foi conferida por outro mecanismo diferente de um antagonismo *in vivo* conforme demonstrado por MARTINS e colaboradores (2010). Sugere-se que ocorra uma modulação da resposta inflamatória.

Estes resultados são contraditórios ao que foi encontrado quando esta mesma linhagem foi incorporada ao iogurte. Mesmo perdendo a viabilidade ela foi capaz de proteger camundongos BALB/c da infecção por *S. Typhimurium*. Entretanto, o mesmo não ocorre quando é administrada na forma de cultivo fresco, como células viáveis. Dentre as variáveis presentes em ambos experimentos tem-se: raças diferentes de camundongos (Swiss NIH x BALB/c), diferenças na idade dos animais (3 semanas x 5-6 semanas), dose infectiva (10^4 UFC/animal x 10^6 UFC/animal) e sexo dos animais (ambos os sexos x machos), além das diferenças no veículo (salina 0,9% x iogurte) e viabilidade da bifidobactéria. Entretanto, foi avaliada a influência nos níveis de sIgA no conteúdo intestinal após igual período de tratamento e, estes resultados correponderam aqueles encontrados com os iogurtes suplementados com a bifidobactéria (estimulação das células produtoras de IgA+ nos intestinos delgado e grosso).

5.15. Análise da cinética de produção de sIgA e IgM totais no conteúdo intestinal e soro, respectivamente, de camundongos NIH tratados ou não com *B. longum* 5^{1A} e desafiados com *S. Typhimurium*

Neste estudo, houve uma diferença significativa na produção de sIgA total entre os grupos após 3 e 6 dias de infecção por *S. Typhimurium* ($P < 0,05$) (Após 1 dia de infecção/Controle: $170,5 \pm 65,56$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal e Experimental: $251,73 \pm 35,84$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal; após 3 dias de infecção/Controle: $226,72 \pm 63,97$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal e Experimental: $445,95 \pm 79,87$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal; após 6 dias de infecção/Controle: $551,24 \pm 120,49$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal e Experimental: $373,68 \pm 107,06$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal; após 9 dias de infecção/Controle: $302,44 \pm 100,48$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal e Experimental: $181,39 \pm 31,56$ $\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal) (Gráfico 13). No início da infecção, o tratamento com *B. longum* 5^{1A}, promoveu um aumento nestes níveis, enquanto que após seis dias, os animais do grupo controle apresentaram concentrações maiores desta imunoglobulina no conteúdo intestinal.

Em relação às concentrações de IgM no soro dos animais, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos em nenhum tempo de infecção (Após 1 dia de infecção/Controle: $90,95 \pm 9,27$ $\mu\text{g/mL}$ de soro e Experimental: $110,75 \pm 11,94$ $\mu\text{g/mL}$ de soro; após 3 dias de infecção/Controle: $97,77 \pm 10,49$ $\mu\text{g/mL}$ de soro e Experimental: $93,95 \pm 22,45$ $\mu\text{g/mL}$ de soro; após 6 dias de infecção/Controle: $114,93 \pm 40,05$ $\mu\text{g/mL}$ de soro e Experimental: $131,33 \pm 45,98$ $\mu\text{g/mL}$ de soro; após 9 dias de infecção/Controle: $80,6 \pm 34,75$ $\mu\text{g/mL}$ de soro e Experimental: $129,17 \pm 64,58$ $\mu\text{g/mL}$ de soro) (Gráfico 13).

A sIgA atua logo no início da infecção, desta forma, é importante ter um estímulo de sua produção nos primeiros dias para tentar bloquear a invasão da salmonela pelo epitélio. A injeção de hibridomas de células B produtoras de IgA anti-*Salmonella* preveniu a infecção oral de camundongos (MICHETTI *et al.*, 1992). A proteção contra a infecção provavelmente foi mediada pela inibição da adesão bacteriana em células M e enterócitos, que é vital para o sucesso da penetração bacteriana (MICHETTI *et al.*, 1994). Após nove dias de infecção, outros mecanismos provavelmente estão envolvidos em conjunto com a resposta local no intestino.

Observou-se um aumento dos índices hepáticos e esplênicos no decorrer da infecção em ambos os grupos (Tabela 7), entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). O aumento dos valores de índice esplênico pode ser relacionado com a elevação do número de

esplenócitos, na tentativa de aumentar a resposta imune para controlar a infecção, e não apenas como resultado do aumento do volume do fluido ou do tecido conectivo desse órgão (HILBURGER *et al.*, 1997).

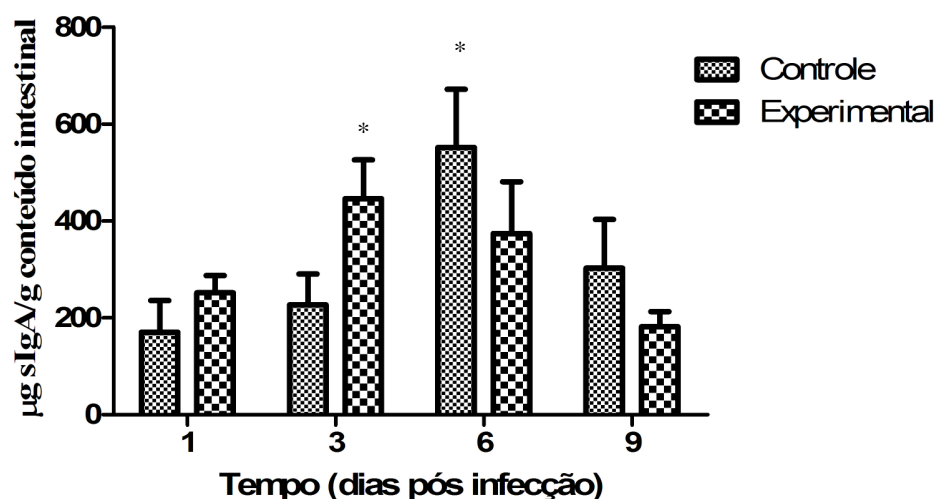


Gráfico 13 - Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos NIH controle e experimental. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($P < 0,05$).

Tabela 7 - Índice hepático e esplênico de camundongos do grupo experimental e controle

| Dias pós infecção | Índice Hepático | | Índice Esplênico | |
|-------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|
| | Controle | Experimental | Controle | Experimental |
| 1 | 48,8 \pm 5,5 | 50,1 \pm 4,21 | 5,1 \pm 0,3 | 5,3 \pm 0,5 |
| 3 | 51,39 \pm 5,7 | 44,3 \pm 0,7 | 5,4 \pm 0,8 | 4,5 \pm 0,6 |
| 6 | 51,9 \pm 6,8 | 62,8 \pm 11,9 | 5,9 \pm 1,2 | 7,79 \pm 1,6 |
| 9 | 73,3 \pm 33,7 | 85,8 \pm 28,13 | 10,1 \pm 6,3 | 12,5 \pm 7,8 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Nota: Os resultados estão expressos como: peso órgão (mg)/peso corporal (g) ($P > 0,05$).

5.16. Análise histológica

O material histológico do íleo, cólon e fígado corado por H&E dos animais de cada grupo foi muito homogêneo permitindo representar os grupos pelas fotomicrografias aqui descritas. As análises histológicas foram feitas em amostras coletadas após nove dias de infecção.

Íleo: Os rocamboles representativos da parede intestinal de todos os animais do grupo não tratado com bifidobactéria e infectado com *Salmonella* mostraram lesões discretas, inespecíficas segmentares, distribuídas irregularmente ao longo da parede, caracterizadas por presença de áreas de encurtamento e alargamento das vilosidades, bem como pequenas áreas de erosão superficial. Observaram-se sinais de regeneração epitelial, com hipercromasia nuclear na região das criptas e alterações reacionais do epitélio. Áreas de lesão foram intercaladas com áreas sem alterações significativas da mucosa. A parede muscular apresentou edema significativo, e o aspecto panorâmico das lesões permitiu identificar áreas com perda da arquitetura sugestivas de fenômenos isquêmicos (Figuras 2A e B). No grupo tratado com a bifidobactéria, houve preservação intestinal sendo o aspecto da mucosa pouco comprometido em comparação com as amostras não tratadas. A parede muscular estava íntegra e contínua em todas as amostras deste grupo (Figuras 2C e D). Em ambos os grupos desafiados a celularidade da mucosa e o edema da lâmina própria não foram aspectos proeminentes neste tempo.

Cólon: A estrutura do cólon após nove dias de infecção por *Salmonella* apresentou poucas alterações significativas. Assim como ocorreu no íleo, embora a arquitetura esteja preservada, em várias regiões observa-se erosão epitelial evidente, alterações reacionais das criptas glandulares, aumento da celularidade intraepitelial, resultando em irregularidade na altura da mucosa, bem como visíveis alterações degenerativas do epitélio com ausência de diferenciação mucosecretora. Observa-se aumento da celularidade e edema da lâmina própria e áreas de espessamento da parede muscular intestinal também devido a edema e congestão. Na submucosa há edema intenso e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 3A e B). No grupo tratado com bifidobactéria os colóns apresentaram evidências muito discretas de lesão, com nítida proteção da barreira epitelial intestinal, ausência de reatividade vascular e edema muito discretos da lâmina própria/submucosa discreta lesão da mucosa, entretanto, edema da lâmina própria de menor grau

que aquele observado no grupo controle, assim como menor incidência de infiltrados inflamatórios (Figuras 3C e D).

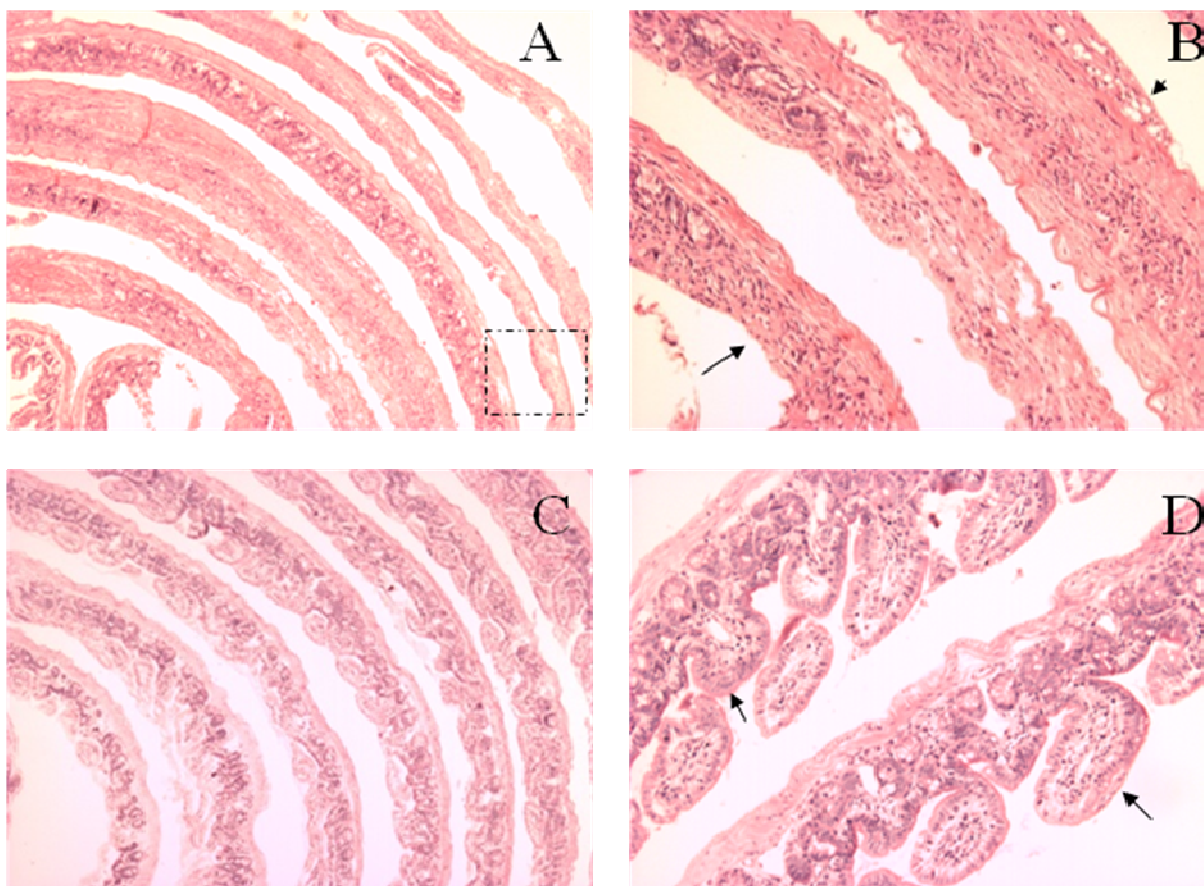


Figura 2 - Fotomicrografia do intestino delgado (íleo) de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela.

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Nota: Notar as áreas de desnudamento da mucosa (destaque em A, e setas em B), com perda significativa do revestimento epitelial e sinais de isquemia no grupo não tratado e desafiado com salmonela (A e B). No grupo tratado, observa-se melhor preservação das vilosidades (setas) e da parede muscular quando comparado com o grupo não tratado. Representativo de quatro animais/grupo. Coloração H&E, objetiva: 4x (A e C), 10x (B e D).

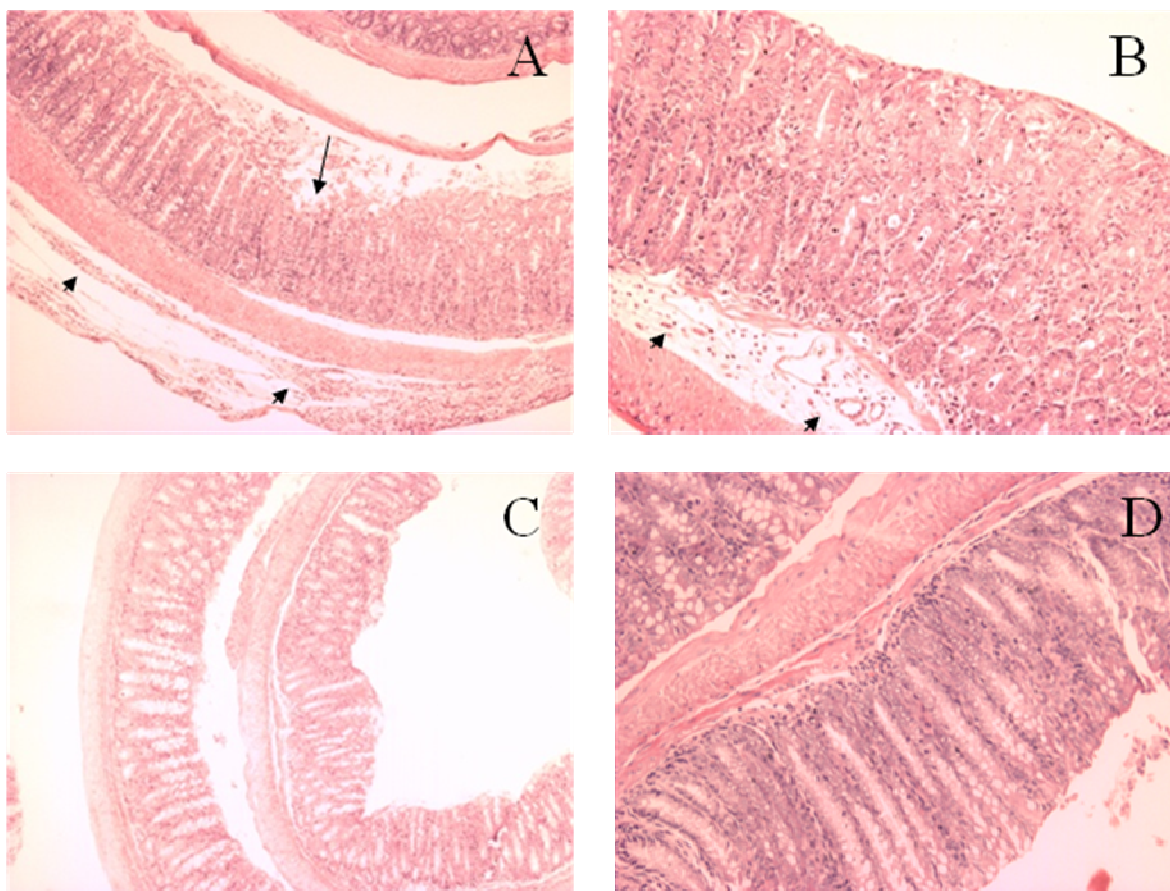


Figura 3 - Fotomicrografia do intestino grosso (cólon) de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela.

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Nota: Notar as áreas de erosão superficial, com diminuição segmentar da espessura da mucosa (setas longas), e significativas alterações da arquitetura glandular no grupo não tratado e desafiado com salmonela (A e B). No grupo tratado, há preservação das glândulas intestinais cujo epitélio hiper Cromático denota atividade regenerativa aumentada. Há presença de células mucosecretoras bem diferenciadas, o que não se observa no grupo não tratado. Representativo de quatro animais/grupo. Coloração H&E, objetiva: 4x (A e C), 10x (B e D).

Fígado: Observou-se nos animais desafiados e não tratados a presença de sinais indiretos de translocação bacteriana caracterizados por focos de infiltrado inflamatório, degeneração e necrose de pequenos grupos de hepatócitos distribuídos difusamente no parênquima tanto em áreas periportais como centrolobulares (Figuras 4A e 4B). Há degeneração hialina de hepatócitos próximos aos focos de inflamação com neutrófilos e células mononucleares. O aspecto panorâmico dos fígados dos animais tratados com a bifidobactéria mostra melhor preservação do parênquima hepático, e embora sejam visíveis os focos inflamatórios com predomínio de mononucleares, as repercussões degenerativas nos hepatócitos foram discretas (Figuras 18C e D).

De um modo geral, o tratamento com a bifidobactéria conferiu uma discreta proteção no intestino delgado e grosso. No fígado, esta proteção torna-se mais evidentemente caracterizada por uma preservação do parênquima tecidual mesmo na vigência de focos de inflamação. Podemos propor que o nosso modelo de infecção por salmonela induz alterações locais (no intestino) e sistêmicas (aqui representadas pelo fígado). A proteção conferida pelo probiótico testado aqui, parece conferir alguma proteção ao intestino, bem como uma proteção ao parênquima hepático. O intestino grosso apresenta sinais de integridade que são compatíveis com maior capacidade regenerativa, que se especula ser induzida pelo probiótico.

O aumento observado no índice hepático dos animais desafiados com salmonela, tratados ou não com a bifidobactéria pode ser explicado pela análise histológica do fígado onde foi detectado infiltrados inflamatórios. Em adição a esses achados, alterações da arquitetura do intestino observadas em cortes do íleo está de acordo com o padrão esperado para animais infectados com *Salmonella*. A preservação da arquitetura do cólon observada nos animais está de acordo com dados anteriores, nos quais foi relatado que *Salmonella enteritidis* ataca preferencialmente o íleo terminal com menor extensão de dano observada no cólon (WELTON *et al.*, 2008; DE LEBLANC *et al.*, 2010).

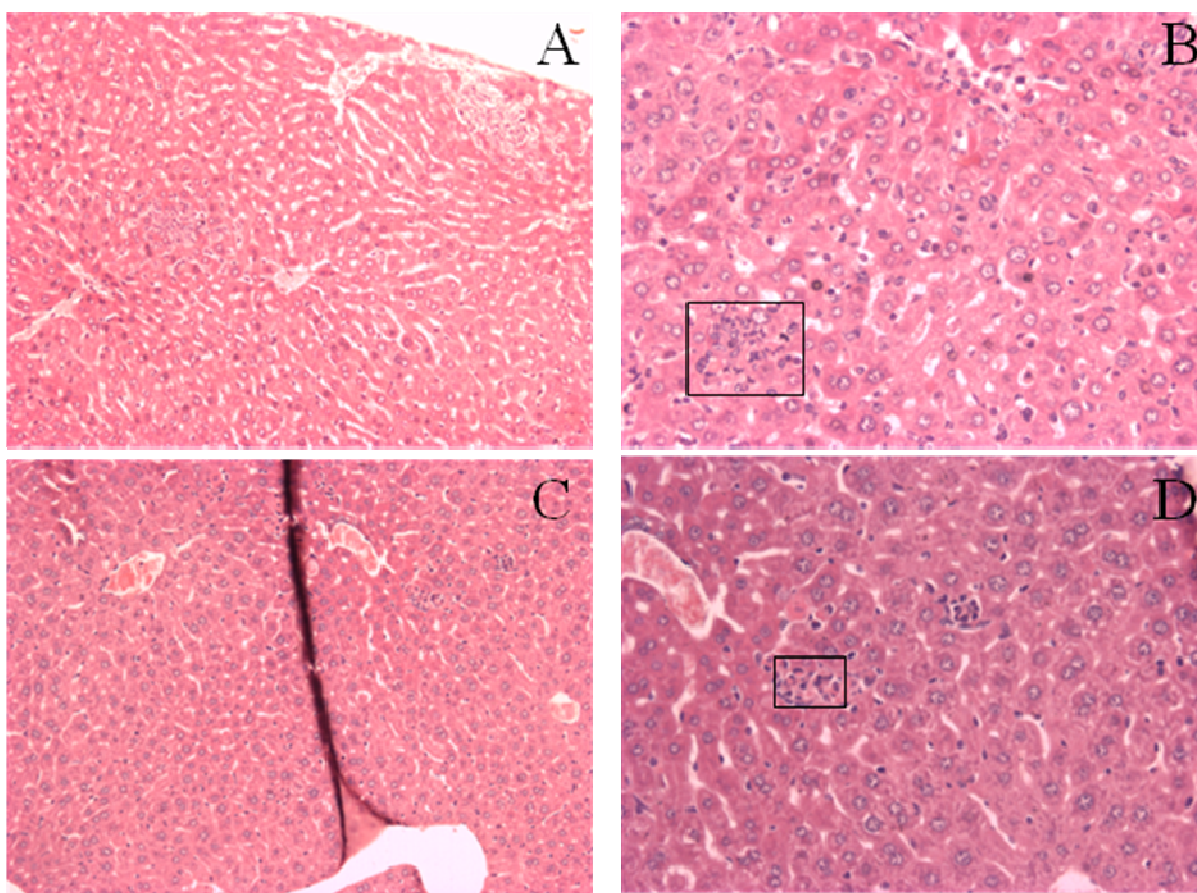


Figura 4 - Fotomicrografia do fígado de camundongos convencionais não tratados (A e B) e tratados com *B. longum* 5^{1A} (C e D), após nove dias de infecção por salmonela.

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Nota: Notar os focos de infiltrado mais visíveis nos locais em destaque. Representativo de quatro animais/grupo.

Coloração H&E, objetiva: 4x (A e C), 10x (B e D).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos podem ser resumidos como a seguir:

- *Bifidobacterium longum* 5^{1A} apresentou as melhores características tecnológicas, teve um maior espectro de inibição de patógenos, e foi sensível a todos os antimicrobianos testados, exceto a neomicina.
- *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, instalou-se rapidamente no trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes, atingindo altos níveis populacionais nas fezes.
- A incorporação de *B. longum* 5^{1A} em iogurtes não resultou em um alimento funcional estável quanto a viabilidade e a resistência gástrica, entretanto, promoveu a proliferação de células IgA+ no intestino delgado e grosso e proteção frente a infecção por *S. Typhimurium*, mas não alterou o número de células de Küpffer no fígado.
- O tratamento com a bifidobactéria não causou alterações histológicas nos intestinos, estimulou a produção de sIgA e IgM no soro, além de induzir aumento na expressão das citocinas IL5, e diminuição da expressão de Tnfa em culturas de esplenócitos.
- O tratamento com a bifidobactéria não aumentou a sobrevivência de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*, assim como também não conferiu melhoria nos aspectos de morbidade.
- Após três dias de desafio com *S. Typhimurium*, *B. longum* 5^{1A} exerce um efeito local, estimulando a produção de sIgA no conteúdo intestinal, entretanto, não exerceu efeito na produção sistêmica de IgM.
- Após nove dias de infecção, em nível histológico, o tratamento com a bifidobactéria conferiu uma proteção nos intestinos contra *S. Typhimurium* e, no fígado, um efeito protetor discreto.

Os resultados resumidos acima demonstram que, entre as amostras fecais humanas de *Bifidobacterium* spp. avaliadas, *B. longum* 5^{1A} tem o melhor potencial para ser usada como probiótico em alimento funcional, pelas análises tecnológicas, de segurança e funcionais feitas *in vitro*. O tipo de processamento da cultura de bifidobactéria exerce uma influência na funcionalidade, uma vez que a incorporação do cultivo fresco ao iogurte conferiu uma proteção após infecção induzida e estimulou a resposta imune local. Entretanto, é necessário uma melhor compreensão dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos benéficos para otimização do seu uso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.
- ADAMS, C.A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 37-46, 2010.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782-787, 2000.
- AIMMO, M.R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p. 35-42, 2007.
- AIRES, J.; DOUCET-POPULAIRE, F.; BUTEL, M.J. Tetracycline resistance mediated by *tet* (W), *tet* (M), and *tet* (O) genes of *Bifidobacterium* isolates from humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2751-2754, 2007.
- AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.
- AMMOR, M.S.; FLÓREZ, A.B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, p. 559-570, 2007.
- AMMOR, M.S.; FLÓREZ, A.B.; HOEK, A.H.A.M.; REYES-GAVILÁN, C.G.; AARTS, H.J.M.; MARGOLLES, A. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 6-15, 2008.
- ANGELOV, M.; KOSTOV, G.; SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; KOPRINKOVA-HRISTOVA, P. Proto-cooperation factors in yogurt starter cultures. **Revue de Genie Industriel**, v. 3, p.4-12, 2009.

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou Saúde/Alegação de Propriedade Funcional Aprovadas/Probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 17 de março de 2012.
- APANAVICIUS, C.J.; POWELL, K.L.; VESTER, B.M.; KARR-LILIENTHAL, L.K.; POPE, L.L.; FASTINGER, N.D.; WALLIG, M.A.; TAPPENDEN, K.A.; SWANSON, K.S. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from *Salmonella* challenge in weanling puppies. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1923-1930, 2007.
- ARANTES, R.M.; NOGUEIRA, A.M. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, v. 290, p. 61-69, 1997.
- ARBOLEYA, S.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; SOLÍS, G.; SALMINEN, S.; REYES-GAVILÁN, C.G.; GUEIMOND, M. Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p.28-36, 2011.
- ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; SHIMIZU, M.; WATANUKI, M.; TANAKA, R. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection by symbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 985-996, 2001.
- AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A.M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366-376, 2011.
- BARBOSA, F.H.F.; SILVA, A.M.; MARTINS, F.S.; NICOLI, J.R. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 1-11, 2005.

- BARBOSA, F.H.F.; BARBOSA, L.P.J.L.; BAMBIRRA, L.H.S.; ALBURJAILE, F.F. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, p. 1-10, 2011.
- BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; GRIJALBA, A.; MARTÍNEZ-PEÑUELA, J.M.; MARZO, F.; URDANETA, E. Modulación de la fisiología gastrointestinal mediante cepas probióticas de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 29, p. 337-347, 2006.
- BEERENS, H. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2418-2419, 1991.
- BENYACOUB, J.; ROCHAT, F.; SAUDAN, K.Y.; ROCHAT, I.; ANTILLE, N.; CHERBUT, C.; WEID, T.; SCHIFFRIN, E.J.; BLUM, S. Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 123-129, 2008.
- BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 430-435, 1996.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Ed. George M. Garrity. Williams & Wilkins, 2th ed., v. 2, p. 1106, 2005.
- BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4121-4128, 1993.
- BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, v. 35, p. 483-489, 1994.
- BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-238, 2006.

- 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 564-568, 1998.
- BRASIL. Diário Oficial da União. Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, DF, 23 out. 2007.
- BUDDINGTON, K.K.; DONAHO, J.B.; BUDDINGTON, R.K. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 472-477, 2002.
- BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.
- BURNS, P.; MOLINARI, F.; BECCARIA, A.; PÁEZ, R.; MEINARDI, C.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Suitability of buttermilk for fermentation with *Lactobacillus helveticus* and production of a functional peptide-enriched powder by spray-drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1370-1378, 2010.
- CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. The gut microbiome as therapeutic target. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, p. 202-212, 2011.
- CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, p. 203-211, 2006.
- CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 61-84, 2005.
- 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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 1-27, 1997.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 333-337, 1998.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacterias: From production to their application. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 215-222, 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Approved Standards CLSI, Wayne, Pa, M100-S22, v. 32, 2012.

COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology & Cell Biology**, v. 85, p. 112-118, 2007.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; HUDAK, S.; JACKSON, J.; RENNICK, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. **Science**, v. 245, p. 308-310, 1989.

COLLADO, M.C.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLES, R.; HERNÁNDEZ, M.; FERRÚZ, M.A.; SANZ, Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 385-391, 2005.

COLLADO, M.C.; HERNÁNDEZ, M. Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. **Microbiological Research**, v. 162, p. 86-92, 2007.

COLLINS, J.K. THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of Probiotics Strains for Human Applications. **International of Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

- COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta immune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-1303, 2004.
- CORRÊA, N.B.O.; LIMA, F.M.L.S.; NICOLI, J.R.; PÉRET, L.A.F.; PENNA, F.J. A randomized placebo-controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 385-389, 2005.
- CORTHÉSY, B.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 781S-790S, 2007.
- CRONIN, M.; VENTURA, M.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 4-18, 2011.
- CRUMP, J.A.; MINTZ, E.D. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 241-246, 2010.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 767-778, 2007.
- DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 10, p. 37-54, 2008.
- DE LEBLANC, A. M.; CASTILLO, N.A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 223-231, 2010.
- DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p. 438-442, 2000.

- DELGADO, S.; FLÓREZ, A.B.; MAYO, B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. **Current Microbiology**, v. 50, p. 202-207, 2005.
- DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811-818, 2007.
- DOGI, C.A.; GALDEANO, M.; PERDIGÓN, G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram (+) and Gram (-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. **Cytokine**, v. 41, p. 223-231, 2008.
- DOMIG, K.J.; MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; MAIR, C.; PETERSSON, A.; AMTMANN, E.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Antibiotic susceptibility testing of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* strains: broth microdilution vs. agar disc diffusion assay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 191-195, 2007.
- ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.
- EGERT, M.; GRAAF, A.A.; SMIDT, H.; VOS, W.M.; VENEMA, K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 86-91, 2006.
- EFSA - European Food Safety Authority. Technical guidance: Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **The EFSA Journal**, v. 732, p. 1-15, 2008.
- EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, 2012.
- FANDI, K.G.; GHAZALI, H.M.; YAZID, A.M.; RAHA, A.R. Purification and N-terminal amino acid sequence of fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* BB536. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 235-239, 2001.

- FAO/WHO Expert Consultation: **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, Córdoba (Argentina), 2001.
- FAO/WHO Expert Consultation: **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario (Canada), 2002.
- FARIAS, F.F.; LIMA, F.L.; CARVALHO, M.A.R.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.M. Influence of Isolation Site, Laboratory Handling and Growth Stage on Oxygen Tolerance of *Fusobacterium* Strains. **Anaerobe**, v. 7, p. 271-276, 2001.
- FARTHING, M.J.G. Bugs and the gut: an unstable marriage. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, p. 233-239, 2004.
- FERREIRA, C.L.L. Fermentação dos produtos lácteos. In: Ferreira CLLF. **Produtos Lácteos fermentados (Aspectos bioquímicos e tecnológicos)**. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias lácticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: Ferreira CLLF. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**.1 ed. Viçosa: Rubio, 2012.
- FILHO-LIMA, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-370, 2000.
- FLÓREZ, A.B.; AMMOR, M.S.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; MARGOLLES, A.; MAYO, B. Molecular analysis of tet (W) gene-mediated tetracycline resistance in dominant intestinal *Bifidobacterium* species from healthy humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7377-7379, 2006.
- FLÓREZ, A.B.; AMMOR, M.S.; MAYO, B.; HOEK, A.H.A.M.; HUYS, G. Antimicrobial susceptibility profiles of 32 type strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Streptococcus* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 484-504, 2008.

- FORCHIELLI, M.L.; WALKER, W.A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p.S41-S48, 2005.
- FUKUDA, S.; TOH, H.; HASE, K.; OSHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; YOSHIMURA, K.; TOBE, T.; CLARKE, J.M.; TOPPING, D.L.; SUZUKI, T.; TAYLOR, T.D.; ITOH, K.; KIKUCHI, J.; MORITA, H.; HATTORI, M.; OHNO, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, p. 543-549, 2011.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.
- GILL, H.S.; RUTHERFORD, K.J.; PRASAD, J.; GOPAL, P.K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 167-176, 2000.
- GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; VENTURI, A.; CAMPIERI, M. Probiotics in infective diarrhea and inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, p. 489-493, 2000.
- GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; HELWIG, U.; VENTURI, A.; LAMMERS, K.M.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.; POGGIOLI, G.; MIGLIOLI, M.; CAMPIERI, M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1202-1209, 2003.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantity Cytokine Gene Expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.
- GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 1077-1086, 2006.

- GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 22-26, 2008.
- GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, p. 64-66, 2007.
- GUERRA, P.V.P.; LIMA, L.N.; SOUZA, T.C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F.J.; SILVA, A.M.; NICOLI, J.R.; GUIMARAES, E.V. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, p. 3916-3921, 2011.
- GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI, I.; MINUZZO, M.; ARIOLI, S.; PARINI, C.; COMELLI, E.; MORA, D. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. **Current Microbiology**, v. 59, p. 167-172, 2009.
- GUGLIELMETTI, S.; MORA, D.; GSCHWENDER, M.; POPP, K. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life - a double-blind, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, p. 1123-1132, 2011.
- HAJISHENGALLIS, G.; NIKOLOVA, E.; RUSSEL, M.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA 1 protease cleavage. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 5057-5064, 1992.
- HARMSSEN, H.J.; WILDEBOER-VELOO, A.C.; RAANGES, G.C.; WAGENDORP, A.A.; KLIJN, N.; BINDELS, J.G.; WELLING, G.W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, p. 61-67, 2000.
- HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; WEAVER, C.T. Expanding the effector CD4T+ cell repertoire: the Th17 lineage. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 349-356, 2006.

- HARTEMINK, R.; KOK, B.J.; WEENK, G.H.; ROMBOUTS, F.M. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 27, p. 33-43, 1996.
- HARTEMINK, R.; ROMBOUTS, F.M. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 181-192, 1999.
- HASAN AL-SHERAJI, S.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. **Food Chemistry**, v. 135, p. 356-361, 2012.
- HE, F.; MORITA, H.; OUWEHAND, A.C.; HOSODA, M.; HIRAMATSU, M.; KURISAKI, J.; ISOLAURI, E.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. **Microbiology and Immunology**, v. 46, p. 781-785, 2002.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, p. 1-14, 2007.
- HENRIQUES, L.C.F.; BRITO, L.C.N.B.; TAVARES, W.L.F.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P.R. Cytokine Analysis in Lesions Refractory to Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1659-1662, 2011.
- HILBURGER, M.E.; ADLER, M.W.; ROGERS, T.J.; EISENSTEIN, T.K. Morphine alters macrophage and lymphocyte populations in the spleen and peritoneal cavity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 80, p. 106-114, 1997.
- HITCHINS, A.D; WELL, P.; McDONOUGH, F.E.; WONG, N.P. Amelioration of the adverse effect of a gastrointestinal challenge with *Salmonella enteritidis* on weaning rats by yogurt diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, p. 92-100, 1985.

- HOHMANN, A.W.; SCHMIDT, G.; ROWLEY, D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. **Infection and Immunity**, v. 22, p. 763-770, 1978.
- HOLDMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe Laboratory Manual**. The Virginia Polytechnic Institute and State. University Anaerobe Laboratory, 156 p., 1977.
- JIMÉNEZ, M.M.S; CASTRO, N.M.C. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. **Infectio**, v.7, p. 22-29, 2003.
- KASTNER, S.; PERRETEN, V.; BLEULER, H.; HUGENSCHMIDT, G.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 145-155, 2006.
- KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, v. 622, p. 58-69, 2007.
- KLARE, I.; KONSTABEL, C.; MULLER-BERTLING, S.; REISSBRODT, R.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; GOOSSENS, H.; WITTE, W. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8982-8986, 2005.
- KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; SIRITHUNYALUG, J.; OKONOJI, S. Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Thai Traditional Food. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 485-503, 2008.
- KWON, H.S.; YANG, E.H.; LEE, S.H.; YEON, S.W.; KANG, B.H.; KIM, T.Y. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 55-62, 2005.
- LAHTINEN, S.J.; JALONEN, L., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.J. Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 125-128, 2007.

- LAYTON, A.N.; GALYYOV, E.E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 9, p. 1-17, 2007.
- LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; van SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1303-1315, 2005.
- LEE, Y.K.; MAZMANIAN, S.K. Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? **Science**, v. 330, p. 1768-1773, 2010.
- LEONARD, W.J. Type 1 cytokines and interferons and their receptors. In: PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 701-747, 2003.
- LILLEY, D.M.; STILWELL, R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LIONG, M. Probiotics: A Critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 316-328, 2007.
- LÓPEZ, P.; GUEIMOND, M.; MARGOLLES, A.; SUÁREZ, A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 157-165, 2010.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.
- MACPHERSON, A.J.; HUNZIKER, L.; MCCOY, K.; LAMARRE, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. **Mirobes and Infection**, v. 3, p. 1021-1035, 2001.
- MAGALHAES, J.G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S.E. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 106-115, 2007.

- MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology**, v. 79, p. 183-189, 2001.
- MAKRAS, L.; VUYST, L. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1049-1057, 2006.
- MARIAT, D.; FIRMESSE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARAES, V.D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTIER, G.; FURET, J.P. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-6, 2009.
- MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNANDEZ, L.; MARIN, M.L.; ZOETENDAL, E.G. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assesment of the bifidobacterial population by PCR-DGGE and qRTi-PCR. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 75, p. 965-969, 2009.
- MARTINOLI, C.; CHIAVELLI, A.; RESCIGNO, M. Entry route of *Salmonella* Typhimurium directs the type of induced immune response. **Immunity**, v. 27, p. 975-984, 2007.
- MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 1-13, 2005.
- MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; ARANTES, R.M.E.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 352-359, 2007.
- MARTINS, F.S.; SILVA, A.A.; VIEIRA, A.T.; BARBOSA, F.H.F.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*,

Escherichia coli, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 623-630, 2009.

MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; GOMES, D.A.; ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; CARA, D.C.; NARDI, R.M.D.; NICOLI, J.R. Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. **Archives of Microbiology**, v. 192, p. 995-1003, 2010.

MARTINS, F.S.; ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TIAGO, F.C.P.; MARTINS, A.K.S.; SILVA, F.C.P.; SOUZA, E.L.S.; SOUSA, L.P.; ARAÚJO, H.R.C.; PIMENTA, P.F.; BONJARDIM, C.A.; ARANTES, R.M.E.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune response and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 359-364, 2011.

MARTINS, F.S.; GENEROSO, S.V.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVA, A.M.; NEUMANN, E.; LIMA-FILHO, J.V.M.; BAMBIRRA, E.A.; ARANTES, R.M.E.; CARMONA, D.C.; CARDOSO, V.N.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Modelos Animais Gnotobióticos e Convencionais para a Seleção e Avaliação de Probióticos. In: Ferreira CLLF. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. 1ed. Viçosa: Rubio, 2012.

MASCO, L.; HOORDE, V.; BRANDT, E.; SWINGS, J.; HUYS, G. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 85-94, 2006.

MASTROENI, P; GRANT, A.J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. 1-15, 2011.

MÄTTÖ, J.; MALINEN, E.; SUIHKO, M.L.; ALANDER, M.; PALVA, A.; SAARELA, M. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 459-470, 2004.

- MÄTTÖ, J.; SUIHKO, M.L.; SAARELA, M. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using the Etest method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 42-48, 2006.
- MÄTTÖ, J.; HOEK, A.H.A.M.; DOMIG, K.J.; SAARELA, M.; FLÓREZ, A.B.; BROCKMANN, E.; AMTMANN, E.; MAYO, B.; AARTS, H.J.M.; DANIELSEN, M. Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the Etest method. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1123-1131, 2007.
- MAZOCHI, V.; JUNIOR, F.E.M.; VAL, C.H.; DINIZ, D.N.; RESENDE, A.F.; NICOLI, J.R.; SILVA, A.M. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1484-1490, 2010.
- MEDEIROS, M.A.N.; OLIVEIRA, D.C.N.; RODRIGUES, D.P.; FREITAS, D.R.C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, p. 555-560, 2011.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.1, p. 135-145, 2001.
- MÉNARD, O.; BUTEL, M.; GABORIAU-ROUTHIAU, V.; WALIGORA-DUPRIET, A. Gnotobiotic Mouse Immune Response Induced by *Bifidobacterium* sp. Strains Isolated from Infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 660-666, 2008.
- METCHNIKOFF, I.I. The prolongation of life. **Optimistic Studies**. (reprinted edition 1907). New York, NY, USA: Springer. 360p, 2004.
- MICHETTI, P.; MAHAN, M.J.; SLAUCH, J.M.; MEKALANOS, J.J.; NEUTRA, M.R. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1786-1792, 1992.
- MICHETTI, P.; PORTA, N.; MAHAN, M.J.; SLAUCH, J.M.; MEKALANOS, J.J.; BLUM, A.L. KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. Monoclonal immunoglobulin A prevents

adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium*. **Gastroenterology**, v. 107, p. 915-923, 1994.

MITTRÜCKER, H.W.; KAUFMANN, S.H. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 457-463, 2000.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOUBARECK, C.; GAVINI, F.; VAUGIEN, L.; BUTEL, M.J.; DOUCET-POPULAIRE, F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 38-44, 2005.

MULLER, J.A.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Manufacture of probiotic bacteria. In: **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**, eds. Charalampopoulos, D.; Rastall, R.A., p. 727-762. New York: Springer, 2009.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 933-944, 2002.

NAKONECZNA, I.; HSU, H.S. The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 61, p. 76-84, 1980.

NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germfree mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 31, p. 239-243, 1991.

NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. **Anaerobe**, v. 5, p. 409-411, 1999.

- NARDI, R.M.D.; SANTORO, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; PIMENTA, A.M.C.; FERRAZ, V.P.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 649-656, 2005.
- NAVA, G.M.; STAPPENBECK, T.S. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. **Gut Microbes**, v. 2, p. 99-104, 2011.
- NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; 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 germ-free mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, p. 34-38, 2000.
- NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: LPCastro; LGV Coelho. (Org.). **Gastroenterologia**. 1 ed. Rio de Janeiro, v. 1, p. 1037-1047, 2004.
- OCHOA, I.M.F.; RODRÍGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, p. 25-42, 2005.
- O'RIORDAN, K.; FITZGERALD, G.F. Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 103-114, 1998.
- OUOBA, L.I.I.; LEI, V.; JENSEN, L.B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 217-224, 2008.
- OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 749-758, 1998.

- OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.
- PAN, W.; LI, P.; LIU, Z. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. **Anaerobe**, v. 12, p. 148-152, 2006.
- PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.A.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171-1185, 2006.
- PAUBERT-BRAQUET, M.; GRAN, X.H.; GAUDICHON, C.; HEDEF, N.; SERIK-OFF, A.; BOULEY, C.; BONAVIDA, B.; BRANQUET, P. Enhancement of host resistance against *Salmonella Typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei* strains. **International Journal of Immunotherapy**, v. 11, p. 153-161, 1995.
- PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJIS, C.; STOBBERINGH, E.E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 141-147, 2005.
- PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-521, 2006.
- PENNER, R.; FEDORAK, R.N.; MADSEN, K.L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 596-603, 2005.
- PERDIGÓN, G.; NADER DE MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.A. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **The Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 255-264, 1990.

- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Symposium: probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness – Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1597-1606, 1995.
- PÉREZ, P.F.; MINNAARD, Y.; DISALVO, E.A.; ANTONI, G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 21-26, 1998.
- PETERSEN, A.; HEEGAARD, P.M.H.; PEDERSEN, A.L.; ANDERSEN, J.B; SØRENSEN, R.B.; FRØKIÆR, H.; LAHTINEN, S.J.; OUWEHAND, A.C.; POULSEN, M.; LICHT, T.R. Some putative prebiotics increase the severity of *Salmonella* enteric serovar *Typhimurium* infection in mice. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-11, 2009.
- PLEASANTS, J.R. Gnotobiotics. In: MELBY Jr, E.C.; ALTMANN, N.H. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Cleveland, C. R. C press, p. 119-174, 1974.
- PLUMMER, S.; WEAVER, M.A.; HARRIS, J.C.; DEE, P.; HUNTER, J. *Clostridium difficile* pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. **International Microbiology**, v. 7, p. 59-62, 2004.
- PODOPRIGORA, G.I.; COMUNIAN, L.B.; PIMENTEL, E.F.; MOURA, L.N.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Study of stimulatory effect of bifidobacteria on the host mononuclear phagocyte system using gnotobiotic animal models. **Anaerobe**, v. 5, p. 509-512, 1999.
- RAMIREZ-FARIAS, C.; SLEZAK, K.; FULLER, K.; DUNCAN, A.; HOLTROP, G.; LOUIS, P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 541-550, 2009.
- RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C.; Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.
- RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, H.S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. Modulation of the microbial ecology of

- the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 145-152, 2005.
- REID, G.; YOUNES, J.A.; VAN DER MEI, H.C.; GLOOR, G.B.; KNIGHT, R.; BUSSCHER, H.J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 27-38, 2011.
- RISHI, P.; MAVI, S.K.; BHARRHAN, S.; SHUKLA, G.; TEWARI, R. Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 222-230, 2009.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-110, 2002.
- RODRIGUES, A.C.P.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 251-256, 1996.
- RODRIGUES, A.C.P.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 404-411, 2000.
- ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETTI, A.; NICOLINI, M.; POMPEI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6150-6158, 2005.
- ROY, D. Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 167-182, 2001.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; HATTO, J.; MATTILA SANDHOLM, T.
Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-15, 2000.
- SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; ALAKOMI, H.L.; SIGVART-MATTILA, P.; MATTO, J.
Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1477-1482, 2006.
- SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. **Lancet**, v. 344, p. 1046-1049, 1994.
- SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Medicine Science (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.
- SALMINEN, S., VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DEVOS, W.M.; FONDEN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM. Demonstration of safety of probiotics: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93-106, 1998.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 107-110, 1999.
- SÁNCHEZ, B.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M., MARGOLLES, A.; REYES-GAVILLÁN, C.G.; RUAS-MADJEDO, P. Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 800-805, 2010.
- SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; ADAMS, L.G.; BÄUMLER, A.J. Animal models of *Salmonella* infections enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1335-1344, 2001.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p.107-133, 1977.

- SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 387-392, 1999.
- SCHELL, M.A.; KARMIRANTZOU, M.; SNEL, B.; VILANOVA, D.; BERGER, B.; PESSI, G.; ZWAHLEN, M.; DESIERE, F.; BORK, P.; DELLEY, M.; PRIDMORE, R.D.; ARIGONI, F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. **PNAS**, v. 99, p. 14422-14427, 2002.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361S-364S, 2001.
- SELA, D.A.; CHAPMAN, J.; ADEUYA, A.; KIM, J.H.; CHEN, F.; WHITEHEAD, T.R.; LAPIDUS, A.; ROKHSAR, D.S.; LEBRILLA, C.B.; GERMAN, J.B.; PRICE, N.P.; RICHARDSON, P.M.; MILLS, D.A. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 18964-18969, 2008.
- SELA, D.A. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 58-64, 2011.
- SENOCK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; BOTTA, G.A. Probiotics: facts or myths. **Clinical Microbiological**, v. 11, p. 958-966, 2005.
- SHAH, N.P. Symposium: Probiotic bacteria - Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.
- SHIMAMURA, S.; ABE, F.; ISHIBASHI, N.; MIYAKAWA, H.; YAESHIMA, T.; ARAYA, T.; TOMITA, M. Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* species. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3296-3306, 1992.
- SHIN, H.S.; LEE, J.H.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 884-887, 2000.

- SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L.L. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.
- SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 411-417, 1999.
- SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K.J.; FENWICK, S.G.; PRASAD, J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) Enhances resistance to oral *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 213-222, 2000.
- SILVA, M.E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais**. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1986 (Dissertação, Mestrado).
- 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* Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 331-336, 1999.
- SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 29-37, 2004.
- SIMPSON, P.J.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 493-501, 2005.
- SOLÍS, G.; REYES-GAVILAN, C.G.; FERNÁNDEZ, N.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, p. 307-310, 2010.
- STECHEER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 82-91, 2011.

- STEERS, E.; FOLTZ, E.L.; GRAVES, B.S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiotic Chemother**, v. 9, p. 307-311, 1959.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2004.
- TEN BRUGGENCATE, S.J.M. ; BOVEE-OUDEHOOVEN, I.M.J. ; LETTINK-WISSINK, M.L.G. ; MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of *Salmonella* in rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2313-2318, 2003.
- TEN BRUGGENCATE, S.J.M. ; BOVEE-OUDEHOOVEN, I.M.J. ; LETTINK-WISSINK, M.L.G. ; KATAN, M.B. ; MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to *Salmonella* : protective role of calcium. **Gut**, v. 53, p. 530-535, 2004.
- TIMMERMAN, H.M. ; KONING, C.J.M. ; MULDER, L. ; ROMBOOTS, F.M. ; BEYNEN, A.C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 219-233, 2004.
- TISSIER, H. **Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique)**. Thesis, ed. CARRÉ G. ET MAUD C., University of Paris, Paris, France, pp. 253, 1900.
- TURRONI, F.; SINDEREN, D.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 37-44, 2011.
- VANKERCKHOVEN, V.; HUYS, G.; VANCANNEY, M.; VAEL, C.; KLARE, I.; ROMOND, M.; ENTENZA, J.M.; MOREILLON, P.; WIND, R.D.; KNOL, J.; WIERTZ, E.; POT, B.; VAUGHAN, E.E.; KAHLMETER, G.; GOOSSENS, H. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 102-114, 2008.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

- VENTURA, M.; van SINDEREN, D.; FITZGERALD, G.F.; ZINK, R. Insights into taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 205-223, 2004.
- VIEIRA, L.Q.; SANTOS, L.M.; NEUMANN, E.; SILVA, A.P.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R. Probiotics protect mice against experimental infections. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. S168-S169, 2008.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 721-729, 2002.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barriers resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895-904, 2003.
- VINDEROLA, C.G.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulation capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 230-243, 2004.
- VINDEROLA, C.G.; REYES-GAVILÁN, C.; REINHEIMER, J.A. Probiotics and prebiotics in fermented dairy products. In: **Contemporary Food Engineering**, eds. Ribeiro, C.P.; Passos, M.L., p. 601-634. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2009.
- VINDEROLA, C.G.; BURNS, P.; REINHEIMER, J.A. Technology and stability of probiotic and prebiotic cheeses. In: **Probiotics and Prebiotics Foods: Technology, Stability and**

Benefits to Human Health, eds. Shah, N.P.; Cruz, A.G.; Faria, J.A.F., p. 169-202. Nova Science Publishers, 2011a.

VINDEROLA, C.G.; CÉSPEDES, M.; MATEOLLI, D.; CÁRDENAS, P.; LESCANO, M.; AIMARETTI, N.; REINHEIMER, J.A. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during cold storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 269-275, 2011b.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 674-679, 2004.

ZACARÍAS, M.F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 548-555, 2011.

ZHANG, X.; RIMPILAINEN, M.; HOFFMAN, B.; SIMELYTE, E.; AHO, H.; TOIVANEN, P. Experimental chronic arthritis and granulomatous inflammation induced by *Bifidobacterium* cell walls. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, p. 171-179, 2001.

ZHOU, J.S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K.J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M.J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 87-96, 2000.

ZHOU, J.S.; PILLIDGE, C.J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 211-217, 2005.

WALL, R.; ROSS, R.P.; RYAN, C.A.; HUSSEY, S.; MURPHY, B.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Role of gut microbiota in early infant development. **Clinical Medicine: Pediatric**, v. 3, p. 45-54, 2009.

WELTON, M.L.; SHELTON, A.A.; CHANG, G.I.; VARMA, M.G. Colon, rectum and anus. In: NORTON, J.A.F.; BARIE, P.S.; CHANG, A.E.; LOWRY, S.F.; MULVIHILL, S.J.; PASS, H.I.; THOMPSON, R.W. **Surgery: Basic science and clinical evidence**. 2 ed. New York: Springer, p. 1011-1110, 2008.

WHO. World Health Organization - Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acessado em 08 de fevereiro de 2012.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Food Protection**, v. 6, p. 47-51, 1998.

YILDIRIM, Z.; WINTERS, D.K.; JOHNSON, M.G. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 45-54, 1999.