

FLÁVIA FERREIRA ALVES

**HISTOMORFOMETRIA DA MUCOSA COLONO-CECAL DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS A DIETA CONTENDO LEITE HUMANO
PASTEURIZADO SUPLEMENTADO COM BACTÉRIAS LÁTICAS
PROBIÓTICAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

FLÁVIA FERREIRA ALVES

HISTOMORFOMETRIA DA MUCOSA COLONO-CECAL DE RATOS
Wistar SUBMETIDOS A DIETA CONTENDO LEITE HUMANO
PASTEURIZADO SUPLEMENTADO COM BACTÉRIAS LÁTICAS
PROBIÓTICAS

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

Aprovada: 12 de fevereiro de 2009

Prof.^a. Dr.^a. Izabel Regina Santos Costa
Maldonado
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Co-Orientador)

Prof.^a. Dr.^a. Regina Célia Santos Mendonça

Dr.^a. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof.^a. Dr.^a. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

"... sonhos e desejos podem se tornar realidade somente se fizermos jus e
acreditarmos neles!"

Carlos Drumond de Andrade

Aos meus pais FÁTIMA e MIGUEL (*i.m.*)

Aos meus irmãos PATRÍCIA e BRUNO,

Ao ROGÉRIO e

Aos meus amigos,

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus pela vida e a Nossa Senhora das Graças por interceder por mim em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos durante o período de pós-graduação.

À Prof^ª. Célia Lúcia de L. F. Ferreira, pela orientação, pelos vastos ensinamentos transmitidos, pelo respeito e pela oportunidade de desenvolver este belo trabalho.

Aos meus conselheiros, Prof^ª. Izabel R. S. C. Maldonado e Prof. Sérgio L. P. da Matta, pelas sugestões, críticas e valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliarem este trabalho

À coordenação do Laboratório de Biologia Estrutural-UFV, na pessoa do Prof^º Sérgio L. P. da Matta, pela concessão do espaço e equipamentos necessários ao desenvolvimento deste estudo, e à coordenação do Laboratório de Biologia Vegetal-UFV, pela concessão do fotomicroscópio e do Programa *Image Pro Plus*.

À “família” do Laboratório de Culturas Láticas. Em especial à Luciana e à Karina pela amizade, pela colaboração, pelos conhecimentos compartilhados e pela paciência durante estes anos; à Juliana, Fabiana, Joice, Tatiana, Milene, Jordânia, Letícia, Eder e Carol Oliveira, pela amizade e convivência; aos amigos Penha, Aline,

João Paulo e Edimara pelos bons momentos que passamos juntos, e ao laboratorista Célio de Souza pela colaboração durante estes anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural, em especial à Marli, Alex e Daiane, pelos ensinamentos, valiosos momentos e experiências trocadas durante este período.

Às estagiárias Ana Carolina Brumano e Bruna Fontana, pela amizade, dedicação e preciosa ajuda, durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe pela constante luta, apoio, compreensão, carinho, e amor incondicional, e ao esforço do meu querido pai (sempre presente no meu coração), que por meio de noites de sono perdidas e momentos longe da família, me permitiu chegar até aqui. Eu amo muito vocês!

Às minhas avós Dina e Ninha pelo apoio espiritual e pelas constantes orações dedicadas a mim.

Aos meus irmãos Patrícia e Bruno, pelo apoio, amizade, alegre convívio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu noivo Rogério, pelo carinho, apoio incondicional, compreensão e paciência nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado me incentivando sempre com muito amor e assim tornando os meus dias mais felizes.

Às queridas amigas Ana Flávia, Dorinha, Rita e Nilce e à minha “prima-irmã” Fernanda, por tantas vezes terem me escutado, me aconselhado e me incentivado sempre.

A todos que colaboraram e torceram pela realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

FLÁVIA FERREIRA ALVES, filha de Miguel Francisco Alves e Maria de Fátima Ferreira Alves, nasceu em 29 de janeiro de 1982, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em 2002 iniciou o Curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), colou grau em março de 2007. Nos anos de 2005 e 2006 foi estagiária do Laboratório de Culturas Lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos, sob a orientação da Professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.

Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV (nível de mestrado), atuou na linha de pesquisa de Biotecnologia e Microbiologia de Alimentos, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Probióticos e saúde da criança	4
2.2 Leite humano e saúde da criança	8
2.3 Mucosa do intestino grosso	12
2.4 Microbiota e produção de muco	15
2.5 Probióticos e efeito barreira	17
3. OBJETIVO	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Origem e concentração das estirpes de bactérias bífidas	21
4.2 Origem do leite humano e tratamento térmico	22
4.3 Delineamento experimental	22
4.4 Coleta e preparo do material histológico	23
4.5 Microtomia	23
4.6 Coloração	23
4.6.1 Técnica Azul de Toluidina Borato de Sódio 1 %	23
4.6.2 Técnica combinada Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff	24
4.6.3 Técnica combinada Orceína e Alcian Blue	24
4.7 Captura das imagens	25
4.8 Análises morfométricas	25

4.8.1 Profundidade e diâmetro das criptas intestinais	25
4.8.2 Espessura da mucosa	26
4.9 Contagem de figuras mitóticas nas criptas	27
4.10 Contagem de células colunares e produtoras de mucopolissacarídeos	28
4.11 Descrição das células produtoras de mucopolissacarídeos	28
4.12 Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Análise morfométrica e contagens de figuras mitóticas	29
5.2 Contagens celulares	36
5.2.1 Células colunares e produtoras de mucopolissacarídeos	36
5.2.2 Contagem de células produtoras de mucopolissacarídeos ácidos, neutros e mistos	42
5.3 Descrição do material histológico	46
5.3.1 Células coradas com Alcian Blue e Ácido periódico de Schiff	46
5.3.2. Células coradas com Orceína e Alcian Blue	47
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

ALVES, Flávia Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Histomorfometria da mucosa colono-cecal de ratos *Wistar* submetidos a dieta contendo leite humano pasteurizado suplementado com Bactérias Láticas Probióticas.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Orientadores: Izabel Regina Santos Costa Maldonado e Sérgio Luis Pinto da Matta.

O objetivo desta investigação foi verificar a histomorfometria da mucosa intestinal de ratos *Wistar*, alimentados com leite humano (LH) pasteurizado, suplementado com um *pool* de estirpes de bactérias láticas probióticas. O LH foi obtido de doadoras voluntárias. Parte do leite coletado recebeu tratamento térmico de pasteurização (63,5 °C por 30 min), enquanto a outra não. Sete estirpes probióticas (*Lactobacillus gasseri*) foram veiculadas na forma de *pool* (concentrado a 10^{10} UFC g⁻¹) em LH pasteurizado (LPB) e não pasteurizado (LCB). Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: C (controle); LC (leite humano não pasteurizado); LCB (leite humano não pasteurizado adicionado de bactérias probióticas); LP (leite humano pasteurizado) e LPB (leite humano pasteurizado adicionado de bactérias probióticas). Após 21 dias de tratamento os animais foram eutanasiados (câmara de CO₂). Fragmentos do ceco e do cólon proximal foram coletados e processados para realização das análises histomorfométricas, incluindo medidas de altura da camada mucosa, profundidade e diâmetro das criptas do ceco e do cólon, contagem de figuras mitóticas e de células produtoras de mucopolissacarídeos e colunares nessas regiões, e descritivas (frequência e distribuição das células produtoras de mucopolissacarídeos). Utilizou-se a técnica de coloração Azul de Toluidina Borato de Sódio para realização das medidas morfométricas e contagens de figuras mitóticas. As técnicas combinadas Alcian Blue +

Ácido Periódico de Schiff (AB +PAS) e Orceína + Alcian Blue (O + AB) foram utilizadas para evidenciar as células produtoras de mucopolissacarídeos. As maiores médias de espessura da mucosa e profundidade de cripta foram observadas no grupo LC. No entanto, não foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) entre os grupos para as variáveis diâmetro da cripta e contagem de figuras mitóticas. Comparando-se células produtoras de mucopolissacarídeo ácido (MA), neutro (MN) e mistura de mucopolissacarídeos (AN), a quantidade de células produtoras de MA, MN e AN não diferiu ($p \leq 0,05$) entre os grupos o que sugeriu que a adição das bactérias probióticas não alterou a contagem dessas células. Da mesma forma, a quantidade de células colunares foi semelhante em todos os grupos. Na análise descritiva não foi constatada diferença entre os grupos. Os resultados desse estudo sugeriram que a adição das sete estirpes probióticas (*Lactobacillus gasseri* Ufvcc 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206) ao leite humano não causou efeito adverso à mucosa intestinal murina.

ABSTRACT

ALVES, Flávia Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february de 2009.
Histomorphometry of the mucous colonic-cecal of *Wistar* rats subjected to a diet of pasteurized human milk supplemented with probiotic bacteria. Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-Advisers: Izabel Regina Santos Costa Maldonado and Sérgio Luis Pinto da Matta.

This work aims to verify the histomorphometry of the intestinal mucous layer of Wistar rats fed with pasteurized human milk (LH), and supplemented with probiotic bacteria. The LH used was donated by female volunteers. A portion of the milk that was collected was pasteurized at 63.5 °C for 30 minutes; the other portion did not receive any thermal treatment. Seven stirps of probiotic bacteria (*Lactobacillus gasseri*) were mixed and added to the LPB (human pasteurized milk) - pool method - concentrated at 10^{10} UFC g⁻¹, and human non pasteurized milk (LCB). The rats were split into five experimental groups: C (control); LC (human non pasteurized milk); LCB (human non pasteurized milk added of probiotic); LP (human pasteurized milk) and LPB (human pasteurized milk added of probiotic). After 21 days of exposure, the rats were euthanatized (chamber of CO₂). Fragments of the cecum and proximal colon were collected and prepared to be used in the histomorphometric analyses (measurement of the height of the intestinal mucous layer, depth and diameter of the Lieberkuhn's glands and of the colon, counting of mitotic figures and cells that produce mucus and colonocytes in the region) and in the descriptive analyses (frequency and distribution of

cells that produce mucus). The technique utilized was the Toluidine Blue in sodium borate technique, to determine the morphometric measurements and to count mitotic figures. The combined methods Alcian Blue + Periodic acid-Schiff stain (AB + PAS) and Orcein + Alcian Blue (O + AB) were utilized to show evidence of cells that produce mucins. The highest averages for the height of the mucous and depth of the Lieberkuhn's glands were observed in the LC group. Nonetheless, no differences were observed among the groups regarding variables such as diameter of the Lieberkuhn's glands and counting of mitotic figures. Comparing cells that produce acid mucins (MA), cells that produce neutral mucins (MN) and cells that produce a mix of mucins (AN) it did not differ ($p < 0,05$) among groups, which suggest that the addition of the probiotic bacterium did not alter the counting of those cells. Likewise, the proportion of colonocytes was similar in all groups. In the descriptive analysis, there was no difference among the groups. The outcome of this study suggested that the addition of seven stirps of probiotic (*Lactobacillus gasseri*) to the human milk did not cause any adverse effect to the murine intestinal mucous.

1. INTRODUÇÃO

O epitélio do sistema digestório do recém-nascido (RN) apresenta um alto *turnover* celular, ou seja, uma rápida renovação de células, que perdura ao longo da vida. Esse processo é regulado e mantido por células tronco que dão origem a todas as linhagens de células intestinais. Essa renovação do epitélio ocorre nas criptas (glândulas) intestinais, estimando-se que no cólon de camundongos cada cripta produza de 14 a 21 células por hora, enquanto no rato, a produção é mais lenta (7 a 11 células por cripta por hora). Nas criptas do intestino grosso de humanos estima-se que o tempo de rotação celular varia entre 3 e 8 dias.

As células-tronco estão localizadas em porções distintas nas criptas do intestino. No intestino delgado e no cólon descendente se encontram na porção basal da cripta, enquanto no cólon ascendente (proximal), essas células são identificadas na porção mediana da cripta. Essas células, à medida que vão sendo submetidas ao processo de diferenciação, vão descendendo para a parte basal da cripta ou ascendem em direção à superfície epitelial, assumindo funções próprias na mucosa. No intestino humano esse período varia de 7 a 10 dias.

A renovação celular ocorre naturalmente em indivíduos saudáveis, porém existem alguns fatores que estimulam este processo, os chamados agentes tróficos. Pré e probióticos possuem ação trófica à mucosa intestinal, ou seja, estimulam o processo mitótico nas criptas, e conseqüentemente aumentam o número de células e a proteção ao epitélio intestinal.

Considerados prebióticos, os oligossacarídeos presentes no LH se ligam a sítios de adesão na mucosa intestinal, possuindo assim importante papel na proteção do epitélio contra patógenos entéricos, mecanismo conhecido como exclusão competitiva. Indiretamente, os oligossacarídeos favorecem os mecanismos de proliferação celular inferindo assim maior higidez à mucosa intestinal. A presença continuada dos oligossacarídeos, pela ingestão de LH, garante uma microbiota equilibrada nos intestinos.

Os microrganismos presentes no trato digestório influenciam vários processos, dentre os quais a distribuição e a constituição do tecido linfático associado à mucosa intestinal (GALT), a diferenciação do epitélio intestinal e a síntese de mucopolissacarídeos pelas células caliciformes. As células caliciformes são produtoras de muco e estão distribuídas entre os enterócitos do epitélio de revestimento de diferentes órgãos de vertebrados superiores. A importância biológica do muco se deve principalmente às propriedades moleculares das mucinas, que constituem um grupo heterogêneo de glicoproteínas. O muco produzido pelas células caliciformes forma uma barreira no epitélio intestinal o que impede que patógenos entéricos tenham acesso à camada subepitelial.

A alimentação do RN está diretamente relacionada com a microbiota que habitará seu sistema digestório. Crianças alimentadas com LH possuem uma microbiota intestinal com predomínio de bactérias bífidas, havendo pequena quantidade de espécies bacterianas potencialmente patogênicas. Em contraste, as crianças alimentadas com fórmulas lácteas artificiais desenvolvem uma microbiota mais diversa composta não só de bifidobactérias, mas com elevada concentração de bacteróides, enterobactérias, enterococos e *Clostridium* sp.

A importância da alimentação do RN com LH é indiscutível, porém existem situações em que a amamentação está impossibilitada, e o leite proveniente de Bancos de Leite Humano (BLH) torna-se imprescindível. No entanto a pasteurização lenta (63,5 °C por 30 min) utilizada nos BLH, embora garanta a sua qualidade microbiológica, causa perda em componentes nutricionais, imunológicos e em fatores bifidogênicos. A suplementação de bactérias probióticas ao LH dos BLH atuaria contribuindo na manutenção e /ou reposição de uma microbiota intestinal benéfica.

Estudos têm indicado que os microrganismos somente influenciam no ecossistema em que se encontram quando suas populações são superiores a 10^8 UFC / g ou mL de conteúdo. No entanto, alterações no ambiente intestinal, causadas, por

exemplo, por dietas modificadas, podem desregular os fatores que mantêm a integridade da mucosa intestinal, influenciando, por exemplo, na permeabilidade da barreira a patógenos. Dessa forma, com o objetivo de verificar a segurança da adição de estirpes probióticas ao leite depositado nos BLH, a proposta desse trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de LH com *Lactobacillus gasseri* na modulação da mucosa intestinal por meio de histomorfometria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Probióticos e Saúde da Criança

Ao nascimento o trato digestório dos recém-nascidos (RN) é estéril. Após o parto os microrganismos da mãe, do ambiente e da alimentação, o coloniza, e este sistema passa a abrigar uma complexa e heterogênea população de microrganismos, em sua maioria bactérias, que constituem a microbiota intestinal (MACKIE et al 1999; BRANDT et al, 2006).

No estômago e no intestino delgado estes microrganismos encontram um ambiente desfavorável para colonização e proliferação, pois a ação de substâncias antagonistas, do suco gástrico, da bile e das secreções pancreáticas e o intenso movimento peristáltico no intestino delgado, dificultam esses processos. Já no cólon, as bactérias encontram condições favoráveis para a sua adesão e colonização devido a presença de poucas secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento de nutrientes (BRANDT et al, 2006).

A interação entre os microrganismos e o hospedeiro pode ser benéfica à saúde humana (CORREA et al, 2005) visto que, após a colonização do trato digestório, a microbiota autóctone participa de uma série de processos necessários à manutenção da saúde do recém-nascido. Entre esses processos encontram-se as funções antibacteriana, imunomoduladora e metabólico-nutricional (BRANDT et al, 2006).

Em função dos inúmeros benefícios atribuídos à microbiota comensal, incluindo a proteção do epitélio do recém-nascido por meio da formação de uma barreira física (MOAL e SERVIN, 2006), as investigações nessa área têm atraído o interesse de vários pesquisadores (ARVOLA et al., 1999; BORRIELLO et al, 2003; KUKKONEN et al, 2007; FERREIRA et al, 2008). Um dos focos dessas pesquisas diz respeito à

possibilidade de se promover a manipulação terapêutica da microbiota intestinal para melhorar a saúde do hospedeiro, por meio da administração de diversas espécies de microrganismos denominados probióticos (ALANDER et al, 1999).

O termo probiótico é derivado do grego e transmite o significado de “em prol da vida” (HAMILTON-MILLER et al, 2003). Ao longo dos anos o termo passou por uma série de descrições e definições: oposto de antibióticos; organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal, células microbianas vivas, que quando ingeridas em quantidades adequadas afetam benéficamente a saúde do hospedeiro melhorando o balanço da microbiota intestinal (FAO/WHO, 2002; VASILJEVIC, 2008) microrganismos isolados do trato intestinal humano ou de uma determinada espécie animal que, consumidos em quantidades adequadas, têm a finalidade principal de promover o balanceamento da microbiota intestinal das respectivas espécies (FERREIRA, 2003). Dentre os microrganismos de efeito benéfico, as bactérias do ácido lático são as mais estudadas (FERREIRA, 2003) e entre essas as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por serem isoladas do trato digestório de humanos saudáveis, são as mais utilizadas como suplementos alimentares (BIELECKA et al, 2002).

São vários os benefícios atribuídos ao consumo adequado desses microrganismos e dentre eles destacam-se a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (ISOLAURI et al, 2004), controle de infecções intestinais (SHU et al, 2001; 2001; ISOLAURI, 2003), diminuição da intolerância à lactose em indivíduos lactase não persistente (LOURENS- HATTINGH e VILJOEN, 2001; GRIFFIN et al, 2002), aumento da atividade anticarcinogênica (RAFTER, 2003) e redução do nível de colesterol sanguíneo (TARANTO et al, 1998; PEREIRA e GIBSON 2002). Outros benefícios atribuídos ao uso de probióticos são auxílio na digestão de nutrientes, produção de vitaminas K e algumas do grupo B (DEGUCHI et al, 1985), estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos (ISOLAURI et al, 2003), ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (KAUR et al, 2002; GUARNER e MALAGELADA, 2003), produção de metabólitos que reduzem o pH do lúmen intestinal e exclusão de patógenos por meio da competição por nutrientes e por sítios de adesão (ISOLAURI et al, 2008).

A aderência de microrganismos à mucosa intestinal engloba a participação de adesinas e composição da parede celular microbiana e receptores específicos na mucosa intestinal. A interação entre esses elementos promove a fixação do microrganismo ao

intestino, o que impede sua eliminação pelo peristaltismo e pelas correntes de fluidos que tendem levá-las para o exterior do organismo. A capacidade de aderir à mucosa intestinal já foi demonstrada para algumas estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* utilizadas como probióticos (TRABULSI e SAMPAIO, 2000; MACK et al, 2002), sendo que essa adesão pode ser variável dependendo, entre outros fatores, do microrganismo e do hospedeiro.

Em experimento *in vitro* realizado por Ouwehand e colaboradores são dois (1999), verificou-se que a capacidade de adesão do microrganismo ao muco intestinal isolado de fezes variou entre bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* e a levedura *Saccharomyces boulardii*. *Lactobacillus rhamnosus* GG apresentou maior capacidade de adesão ao muco (43 %) e *Lactobacillus casei* foi a estirpe que apresentou menor aderência (3 %). Ainda segundo os mesmos autores, a idade do hospedeiro influenciou inversamente a adesão, ou seja, a aderência ao muco intestinal de recém-nascidos foi maior que ao muco de indivíduos adultos.

Concluído o primeiro passo da colonização, os microrganismos de efeito benéfico passam a modular a microbiota e indiretamente a saúde do hospedeiro. Em estudo realizado por Mack et al (1999), verificou-se que *Lactobacillus plantarum* 299 v aumentou o nível de expressão mRNA de mucinas e assim impediu a adesão de *E.coli* enteropatogênica à mucosa intestinal.

A utilização de probióticos no tratamento e prevenção de doenças em crianças recém-nascidas tem mostrado bons resultados. Arvola et al, (1999) demonstraram efeito benéfico de *Lactobacillus* GG (*Lactobacillus casei* ssp *rhamnosus*) no combate a diarreia provocada por *Clostridium difficile*, que pode ocorrer após terapia com antibióticos. O *Lactobacillus* GG também mostrou ter efeito positivo na resposta imune do hospedeiro (ISOLAURI et al, 2004) além de promover diminuição na resposta de hipersensibilidade de substâncias alergênicas em crianças (KALLIOMAKI et al, 2001; KUKKONEN et al, 2007).

Lactobacilos e bifidobactérias também estão relacionados com a redução do risco de alergias de origem alimentar. Essas bactérias são capazes de induzir a quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, processo que pode contribuir para a redução da alergenicidade a proteínas (MORAIS e JACOB, 2006).

Até o momento, o único tratamento para alergias de origem alimentar é a eliminação do alimento envolvido da dieta. Entretanto, existem evidências científicas para a aplicação de probióticos no controle destas alergias. Os resultados de ensaios

clínicos confirmaram que probióticos podem ser aplicados para atenuar sintomas de doenças alérgicas em humanos e podem levar a uma nova forma de tratamento de alergias de origem alimentar, particularmente em crianças que possuem microbiota em desenvolvimento (MATTILA-SANDHOLM et al, 1999).

Em prematuros que receberam precocemente bactérias potencialmente benéficas constatou-se redução na incidência e da gravidade da enterocolite necrosante. A suplementação dos recém-nascidos prematuros foi feita com uma mistura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*. A incidência de enterocolite necrosante no grupo suplementado foi significativamente menor do que no grupo controle: 9 em 180 versus 24 em 187. Também não foi observado quadro grave de enterocolite no grupo que fez uso de probiótico, enquanto ocorreram 6 casos no grupo usado como controle (LIN et al, 2005). Resultados semelhantes foram observados em experimentação com ratos recém-nascidos, nos quais a colonização intestinal com *Bifidobacterium infantis* promoveu a significativa redução do risco de incidência de enterocolite necrosante neonatal (CAPLAN et al, 1999).

Em experimento realizado por Kitajima et al (1997), verificou-se que *Bifidobacterium breve* foi capaz de colonizar efetivamente o intestino de RN de muito baixo peso (< 1.500 g) internados em UTI neonatal, sendo que esse fato foi associado ao maior ganho de peso dessas crianças.

Estudo similar avaliou 971 crianças com 4 a 6 meses de idade, casualizados em dois grupos: no primeiro as crianças consumiam diariamente (durante 5 meses) uma fórmula infantil fermentada por *Bifidobacterium breve* e *Streptococcus thermophilus* e no segundo uma fórmula infantil padrão com a mesma composição nutricional. A incidência e a duração da diarreia aguda e o número de hospitalizações não diferiram entre os grupos, porém os episódios diarréicos foram menos severos nas crianças que receberam fórmula infantil fermentada (THIBAUT et al, 2004).

Microrganismos do gênero *Bifidobacterium*, isolados de fezes de crianças, foram avaliados *in vitro* em relação à atividade antimicrobiana, e constatou-se que várias estirpes exerceram atividade antagonista a patógenos, sugerindo que elas podem participar do efeito barreira na mucosa intestinal humana (LIÉVIN et al, 2000). Similar experimento *in vitro*, utilizando células Caco-2, demonstrou a capacidade de *Lactobacillus casei rhamnosus* GG e *Lactobacillus casei* Shirota de competir por sítios de adesão e excluir estirpes patogênicas de *E. coli* e *Salmonella* ssp (LEE et al, 2003).

Em estudo realizado no Japão avaliaram-se sete crianças com idade entre 15 e 31 meses, que receberam uma fórmula infantil contendo bactérias bífidas por 21 dias. No estudo que tinha como objetivo verificar a influência do consumo de probióticos na microbiota intestinal e imunidade local, verificou-se que a contagem de bifidobactérias no conteúdo fecal apresentou discreto aumento e que a concentração de IgA fecal, determinada durante a ingestão da fórmula, foi significativamente maior do que antes da ingestão. Esse aumento na secreção de IgA pode aumentar a resistência da mucosa contra patógenos intestinais (FUKUSHIMA, et al, 1998).

Existem algumas situações em que a administração de microrganismos vivos não é aconselhável, como é o caso em que o indivíduo apresenta-se imunocomprometido, seja pela presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou quando submetidos a tratamentos de radioterapia e quimioterapia. Nesses casos, uma alternativa é estimulação do crescimento de microrganismos já presentes no intestino do hospedeiro, por meio de compostos denominados prebióticos. Esses compostos geralmente são fibras não digeríveis na parte superior do intestino e que por este motivo chegam intactas ao cólon onde são utilizados como fonte de carbono pelas bactérias bífidas (MODLER, 1994).

As principais substâncias consideradas prebióticas são as oligofrutoses e as inulinas, porém o LH também tem sido citado na literatura (BORBA et al, 2003) por carrear compostos (fatores bifidogênicos) que serão fermentados por esse grupo específico de microrganismos no cólon infantil. Os oligossacarídeos e glicoproteínas do leite materno não são digeridos no trato digestório superior permitindo que esses compostos alcancem o intestino grosso, onde serão utilizados como substrato principalmente para o estímulo de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, por esse motivo o nome fator biofidogênico (ENGFER et al, 2000, NEWBURG et al, 2005).

2.2 Leite humano e saúde da criança

O LH é um alimento natural e superior para os recém-nascidos, possui uma combinação única de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais, assim como enzimas e células vivas importantes para o sistema imunológico da criança. Promove, além destas vantagens nutricionais e imunológicas, fatores psicológicos e econômicos. A Organização Mundial da Saúde afirma que a amamentação reduz a mortalidade infantil e confere benefícios à saúde até a maioridade (WHO, 2008).

O LH possui como fatores de superioridade sua melhor digestibilidade, composição química balanceada, ausência de compostos alergênicos, proteção conferida contra infecções e o relacionamento afetivo entre a mãe e o filho. Além do custo que é praticamente inexistente quando transferido diretamente da mãe ao lactente (ALMEIDA, 1986).

A alimentação do recém-nascido está diretamente relacionada com a microbiota que se desenvolverá em seu trato digestório. Foi demonstrado que na microbiota intestinal de crianças em aleitamento materno predominam bactérias bífidas, enquanto as crianças em uso de fórmulas lácteas artificiais desenvolvem microbiota mais diversa, composta não só de bifidobactérias, como também de bacteróides, enterobactérias, enterococos e *Clostridium* sp (BRANDT et al, 2006).

Essas diferenças encontradas na microbiota dos recém-nascidos em aleitamento materno e naqueles que consomem leite artificial podem ser explicadas por vários mecanismos. Constituintes do leite materno, como a IgA secretória, a lisozima e a lactoferrina inibem o aumento de microrganismos patogênicos (BRANDT et al, 2006).

A IgA secretória representa 90 % do total de imunoglobulinas presente no colostro e no LH, e por apresentar boa resistência à acidez e à atividade enzimática alcança o trato digestório na sua forma intacta, podendo assim exercer sua função de imunização passiva (EUCLYDES, 2000).

A lisozima presente no LH apresenta atividade bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas, por meio da hidrólise de peptídeoglicanos da parede celular desses microrganismos. Acredita-se que essa enzima exerce importante papel na redução dos processos infecciosos em RN amamentados, principalmente durante o período em que a secreção de IgA no trato digestório dos mesmos ainda é insuficiente (NEWBURG et al, 2005).

A lactoferrina, uma proteína presente em alta concentração no LH, possui a capacidade de seqüestrar o ferro do meio, e assim pode inibir o crescimento de microrganismos dependentes desse mineral (BERNT e WALKER, 1999).

O LH carrega substâncias que favorecem a colonização por bifidobactérias. Esses compostos, considerados bifidogênicos, são principalmente glicoproteínas e oligossacarídeos que estimulam o crescimento de bactérias bífidas, como *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium infantis* (NEWBURG et al, 2005).

Experimentos recentes verificaram a proposta de que oligossacarídeos presentes no LH funcionam com prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento de

microrganismos do gênero *Bifidobacterium*. Ward et al (2006) observaram que os oligossacarídeos do LH foram utilizados como fonte de carbono por *Bifidobacterium infantis* enquanto *Lactobacillus gasseri* não foi capaz de fermentá-los, sugerindo que esses compostos promovem um aumento da população de bifidobactérias no intestino de crianças.

A fração constituída pelos oligossacarídeos é a terceira maior entre os componentes sólidos do LH, apresentando aproximadamente 12 g L⁻¹ no leite “maduro” e 22 g L⁻¹ no colostro, ficando atrás apenas da gordura e da lactose (DAI et al., 2000). A proteção conferida pelos oligossacarídeos tem sido atribuída à propriedade de antiadesividade contra patógenos entéricos (DAI et al, 2000; PUCCIO et al, 2007), que em presença desses compostos não conseguem se aderir à mucosa intestinal e dessa forma não concluem o primeiro passo da colonização. Newburg et al (2005), após uma extensa revisão sobre oligossacarídeos do LH e a proteção conferida contra patógenos entéricos, concluíram que esses compostos são os principais componentes do sistema imune inato e que eles possuem um significativo papel na proteção da criança frente às doenças entéricas.

Outro fato a ser considerado é que o pH intestinal dos bebês amamentados com LH é mantido num patamar mais baixo, principalmente em função do acúmulo de ácido acético, resultante do metabolismo de bactérias bífidas no lúmen intestinal. Este ambiente ácido pode inibir o crescimento de patógenos entéricos.

Midolo et al (1995) avaliaram o efeito antogonista das bactérias *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *raamnosus*, *L. bulgaricus* e *B. bifidus* sobre o crescimento *in vitro* de *H. pylori* e concluíram que aparentemente a inibição do crescimento foi devido à produção de ácidos acético, láctico e hidrocloreídrico. Além dos ácidos, outras substâncias antagonistas metabolizadas por microrganismos probióticos como peróxido de hidrogênio e biosurfactantes exercem importantes funções na proteção da saúde intestinal dos RN (SERVIN, 2004).

Em similar estudo *in vitro*, observou-se que estirpes de *Bifidobacterium infants* exerceram atividade antagonista a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Os ácidos acético e láctico foram os principais ácidos orgânicos envolvidos no antagonismo a esses patógenos. Concluiu-se que, principalmente o ácido acético produzido pelas bactérias bífidas, alterou o processo de transporte de nutrientes através da membrana dos microrganismos patogênicos (YUSOF et al, 2000).

Graças a esses e vários outros benefícios a relação existente entre a amamentação e a saúde da criança tem sido constantemente registrada por várias civilizações (NEWBURG e WALKER, 2007), sendo o aleitamento materno a primeira prática alimentar a ser estimulada para a promoção da saúde, formação de hábitos alimentares saudáveis e prevenção de várias doenças.

A alimentação com LH diminui a incidência e ou a severidade de uma extensa faixa de doenças infecciosas, incluindo meningites bacterianas, infecções do trato respiratório, diarreias e enterocolites necrosante (HYLANDER et al,1998; BACHRACH et al, 2003; TURCK, 2005; NEWBURG e WALKER, 2007). Entretanto, algumas situações podem impedir a amamentação, como é o caso de crianças adotadas ou filhas de mães que morreram no parto, ou casos em que a nutriz possui alguma doença infecciosa, que está em quimioterapia /radioterapia, ou faz uso de medicamentos ou drogas que contra-indiquem a amamentação (EUCLYDES, 2000; BRASIL, 2004).

A utilização de LH depositado nos Bancos de Leite Humano (BLH) é uma alternativa muito utilizada na solução desse problema. Como o LH pode ser facilmente contaminado e veículo de várias doenças infecciosas, os profissionais dos BLH empregam uma série de medidas de segurança para garantir a qualidade e inocuidade dessa matéria prima (ARNOLD e LARSON, 1993). O tratamento térmico (63,5 °C por 30 min) é uma prática de rotina nesses estabelecimentos e tem como objetivo a eliminação de bactérias e vírus, potencialmente patogênicos.

É evidente que o tratamento térmico é necessário e imprescindível neste alimento, porém ele pode levar à perda de alguns componentes termossensíveis, como é o caso de perda na quantidade de imunoglobulinas, lactoferrina, lisozimas, linfócitos, lipase, ácido fólico e fosfatase alcalina (BJORKSTEN et al,1980; ARNOLD e LARSON 1993). Borba e Ferreira (2003) ao avaliarem o efeito da pasteurização do LH sobre o crescimento *in vitro* de bifidobactérias, constataram que o LH pasteurizado apresentou efeito inibidor sobre a espécie em estudo, enquanto o LH não tratado termicamente estimulou o crescimento das mesmas.

Uma possível forma de compensar a inativação dos fatores bifidogênicos pela pasteurização seria a adição direta (na forma liofilizada) de bactérias bífidas no leite pasteurizado nos BLH (TESHIMA e FERREIRA, 2003).

Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. serem consideradas seguras (GRAS - “generally recognized as safe”), é importante a determinação das características de segurança antes da utilização de novas estirpes.

Com o objetivo de verificar a segurança do consumo de bactérias potencialmente probióticas, vários estudos avaliam seu efeito na estrutura intestinal por meio de análises histomorfométricas (ZHOU et al, 2000; KLEESSEN et al, 2003; BUDIÑO et al, 2005; PELICANO et al, 2005), investigando a profundidade de criptas e comprimento de vilosidade (ZHOU et al, 2000; BUDIÑO et al, 2005), modulação da produção de muco (KLEESSEN et al, 2003), a espessura da mucosa (SHU et al, 1999; ZHOU et al, 2000) entre outros. Esses parâmetros irão indicar se as bactérias probióticas em questão terão algum efeito adverso na integridade da mucosa intestinal, e em consequência predisposição à translocação bacteriana.

2.3 Mucosa do intestino grosso

O intestino grosso de mamíferos é formado por ceco, cólons ascendente (proximal), transverso, descendente e sigmóide, além do reto e ânus. Como nos outros órgãos do trato digestório, o intestino grosso é composto por camadas concêntricas denominadas, a partir do lúmen de mucosa, submucosa, muscular e adventícia ou serosa (KIERSZENBAUM, 2004).

Das camadas que constituem a parede do intestino grosso, a mucosa é que está mais próxima ao lúmen e em contato com a microbiota intestinal. As células epiteliais representam a maior superfície de contato entre o organismo e o ambiente luminal, sendo que a superfície da mucosa de humanos corresponde a aproximadamente 200 m² (VAN DIJK, 1997). Além de apresentarem a maior área de exposição, as superfícies mucosas são também as mais permeáveis à entrada de antígenos (PEDRUZZI, 2002).

Sob o ponto de vista histológico, a mucosa do intestino grosso é caracterizada por ausência de vilosidades, presença de criptas, epitélio do tipo simples prismático recoberto por uma camada de muco, e uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo contendo nódulos linfóides, na parte basal da mucosa é possível se observar uma fina camada de músculos denominada muscular da mucosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As criptas são glândulas tubulares simples, presentes no tanto intestino delgado entre vilosidades intestinais, quanto no intestino grosso. São conhecidas também como glândulas intestinais ou de Lieberkühn (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O epitélio da cripta é composto por uma camada simples de células, cujas superfícies apicais estão voltadas para o lúmen da cripta. Uma fina membrana basal separa as células da glândula intestinal da lâmina própria circundante (TRIER, 1963).

No ceco e no cólon ascendente, as criptas são constituídas por vários tipos de células, dentre elas colunares absortivas, de Paneth, enteroendócrinas e caliciformes (KIERSZENBAUM, 2004), além das células-tronco e das secretoras de profundidade de cripta (*deep crypt secretory cells*) (KARAM, 1999). Em adição, as células M estão presentes nos folículos linfóides associados ao epitélio. As células mucosas e as absortivas são as mais freqüentes no epitélio da mucosa do intestino grosso. A integridade da camada epitelial é mantida pelas complexas junções intercelulares compostas por junções de oclusão, de aderência e desmossomos, sendo que as junções gap permitem a que comunicação intercelular ocorra (MOAL e SERVIN, 2006).

As células de Paneth, raras no intestino grosso, podendo, no entanto, serem observadas no ceco, são responsáveis pelo armazenamento de lisozima, defensinas e fator de necrose tumoral α , os quais conferem proteção ao epitélio contra patógenos. Os enterócitos (no cólon também denominadas de colonócitos) são células de função essencialmente absortiva, no cólon absorvem principalmente água e eletrólitos. As células enteroendócrinas secretam hormônios peptídeos (serotonina, p.ex) que atuam como sinalizadores no processo digestivo. As células caliciformes são produtoras de muco, cilíndricas, e encontram-se distribuídas entre os enterócitos do epitélio de revestimento de diferentes órgãos de vertebrados superiores (KIERSZENBAUM, 2004).

Semelhante ao observado em outros tipos celulares de natureza epitelial, as células caliciformes também estão em constante renovação. Com base nos estudos de autorradiografia, constatou-se que as células caliciformes e demais células epiteliais como Paneth, enterócitos e células enteroendócrinas, são originadas a partir da divisão de células-tronco multipotentes, localizadas nas porções medianas e basais das criptas intestinais (Fig. 1). A proliferação contínua das células-tronco, por meio de divisões celulares assimétricas, é responsável pela manutenção da população de células progenitoras e também pela origem de uma população de células intermediárias de amplificação, que continuam a proliferar-se ainda no interior da cripta, e entre a população de células caliciformes funcionalmente ativas de adultos (GOES e TABOGA, 2005).

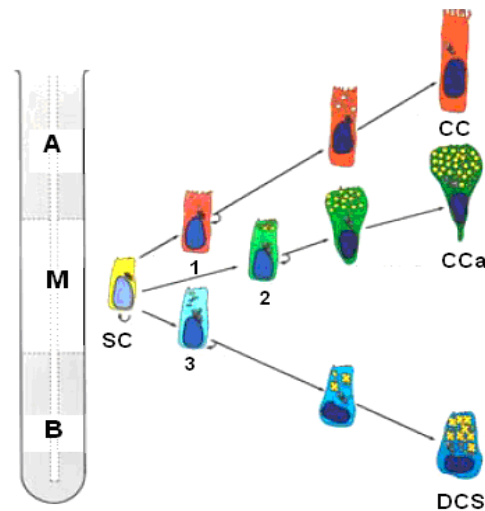


Figura 1: Esquema da diferenciação celular na cripta do cólon ascendente, segundo KARAM (1999). A cripta é subdividida em três porções: basal (B), mediana (M) e apical (A). As células-tronco (SC) se localizam na parte mediana da cripta e originam as seguintes linhagens: 1. Células vacuolizadas que se diferenciam em colunares (CC); 2. Células que se diferenciam em caliciformes (CCa) e 3. Células que originam as DCS (células secretoras de profundidade de cripta).

A frequência das células caliciformes é bastante variável entre os diferentes órgãos de um mesmo indivíduo ou mesmo entre regiões do mesmo órgão. Essa variação deve-se, dentre outros fatores, à maior necessidade de muco em um determinado local. Além das necessidades funcionais intrínsecas de cada local, fatores extrínsecos em contato com a superfície epitelial, também podem alterar a quantidade de células caliciformes, além do tipo e quantidade de muco (GÓES e TABOGA, 2005).

Relatos científicos têm indicado aumento da produção de muco em respostas a dietas contendo fibras fermentáveis (FONTAINE et al, 1996; McCULLOUGH et al, 1998; KLEESSEN et al, 2003) e microrganismos benéficos (KLEESSEN et al, 2003; DEPLANCKE e GASKINS, 2001; DOCK-NASCIMENTO et al, 2007).

Em estudo com animais *germ free* e animais com microbiota humana associada à mucosa intestinal, alimentados com inulina, Fontaine et al (1996) verificaram que os animais que possuíam microbiota associada ao trato digestório apresentaram diferentes frequência, distribuição e tipos de mucina nas mucosas cecais e colônicas. Nos animais com microbiota associada o oligossacarídeo proporcionou aumento das mucinas sulfatadas no ceco e diminuição das mucinas ácidas não sulfatadas nas mucosas

colônicas e cecais. Além disso, observou-se baixa quantidade de muco sobre a mucosa colônica, sugerindo que o fato pode está relacionado com o metabolismo microbiano.

Segundo Deplancke e Gaskins (2001), a microbiota pode influenciar a liberação de muco pelas células caliciformes, por meio da liberação de fatores bioativos ou por meio da ativação do sistema imunológico do hospedeiro.

2.4 Microbiota e produção de muco

Estudos têm indicado os aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica no trato digestivo (DOCK et al, 2004; RINNE et al, 2005; TERAN et al, 2008) principalmente em relação ao papel desse ecossistema na nutrição e saúde (GIBSON e WILLIAMS, 1999). No intestino delgado e grosso, a microbiota influencia entre outros processos a distribuição e a constituição do tecido linfático associado à mucosa intestinal (GALT), (FALK et al, 1998), diferenciação do epitélio intestinal, e síntese de mucopolissacarídeos pelas células caliciformes (DEPLANCKE e GASKINS, 2001) (Fig. 2).

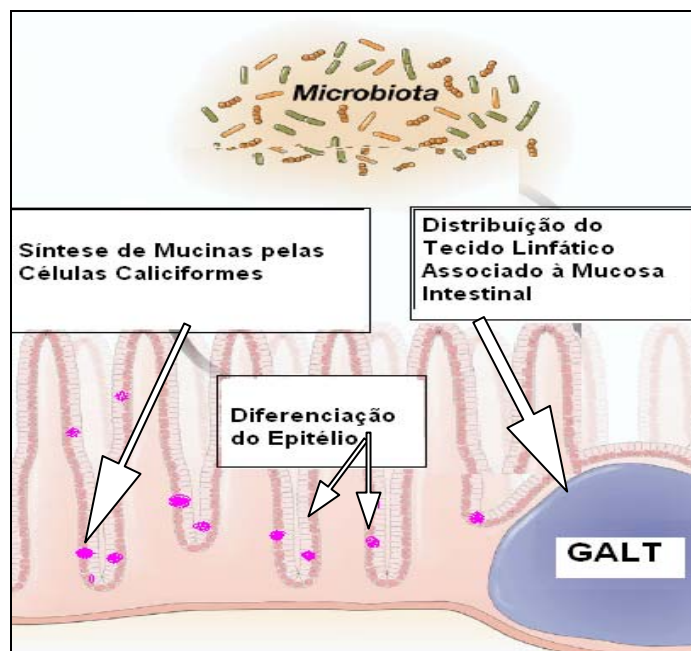


Figura 2: Esquema representativo da influência da microbiota sobre mucosa intestinal (Modificado de Andrew, 2009).

Estudos em animais *germ free*, têm evidenciado que a microbiota intestinal influencia a distribuição e a fisiologia de células caliciformes. Estes animais apresentam reduzido número de células caliciformes, em comparação aos animais convencionais (ISHIKAWA et al, 1989, KANDORI et al, 1996). No entanto, a camada de muco no intestino dos animais *germ free* é mais espessa do que a existente nos animais convencionais, pois existe a falta de enzimas bacterianas que possam degradar parte das mucinas. Conseqüentemente, animais *germ free* apresentam dilatação do ceco, situação que pode ser revertida com a introdução de bactérias, especialmente dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* e *Bifidobacterium* (HOSKINS et al, 1985).

O muco produzido pelas células caliciformes possui como principal componente as mucinas, as quais são formadas por grupo heterogêneo de glicoproteínas (80 % carboidrato e 20 % de proteína) (SHIRAZI et al, 2000). As mucinas são classificadas como neutras e ácidas. As mucinas ácidas são subdivididas em sialomucinas e sulfomucinas, de acordo com a presença de ácido siálico ou grupos sulfato. As sialomucinas, por sua vez, são caracterizadas conforme a proporção existente de moléculas de N-acetil ou de O-acetil, derivadas do ácido siálico. As regiões ricas em mucinas neutras são identificadas pela reação do PAS, enquanto o corante Alcian-Blue identifica as ácidas, especialmente as sialomucinas (FARIA JÚNIOR et al, 2007).

Parte do muco é liberado por exocitose no lúmen intestinal. Na superfície do epitélio, o muco se hidrata, formando um gel que protege a mucosa contra a abrasão mecânica e de adesão de patógenos (KIERSZENBAUM, 2004), atuando ainda como meio de lubrificação e transporte entre o conteúdo luminal e o epitélio (DEPLANCKE e GASKINS, 2001). Além dessa barreira física, os componentes do muco promovem também uma barreira química para proteger a mucosa de agentes prejudiciais. Substâncias antimicrobianas como AMPs (peptídeos antimicrobianos) e fatores trefoil (TFF) podem estar presentes no muco, e assim promover maior proteção ao hospedeiro. Vestergaard et al (2008) verificaram a presença de dois tipos de fatores trefoil no LH (TFF 1 e TFF 3), sugerindo que esses compostos podem promover maior proteção à mucosa intestinal do neonato.

O muco está envolvido em outras importantes funções, como por exemplo, desenvolvimento do feto, renovação e diferenciação do epitélio e processos de carcinogênese (MOAL e SERVIN, 2006). Em humanos são conhecidos pelo menos 18 genes de mucinas. Eles são nomeados com o prefixo MUC e numerados, segundo a ordem cronológica de descoberta. O gene MUC 2, por exemplo, dá origem a maioria

das mucinas no cólon, enquanto o gene MUC 3 é mais expressado no intestino delgado (MACK et al, 2002). Os genes que codificam a produção de mucinas podem originar diferentes tipos de muco, como os solúveis, os de ligação com a membrana e os formadores de gel (MOAL e SERVIN, 2006).

Por outro lado, o muco também pode ser útil para as bactérias entéricas, principalmente por oferecer numerosas vantagens ecológicas tanto para a microbiota residente quanto para os patógenos que podem estar presentes no lúmen intestinal, promovendo nutrientes para o crescimento bacteriano e conseqüentemente favorecendo a aderência e a colonização do epitélio (MOAL e SERVIN, 2006). Katayama et al (2005) isolaram glicosidases produzidas pela *Bifidobacterium bifidum*, propondo que estas enzimas são importantes para as bifidobactérias poderem utilizar os oligossacarídeos presentes no muco.

A aderência das bactérias à mucosa intestinal, sejam patogênicas ou não, envolve a participação de adesinas bacterianas, da composição da parede celular e de receptores da mucosa intestinal. A interação entre esses elementos promove a fixação da bactéria à mucosa, o que impede sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e pelas correntes de fluidos que tendem a levá-las para o exterior do organismo. A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial é reversível e mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e diferenciação de cargas (PELLETIER, 1997).

A adesão à mucosa intestinal é um pré-requisito para a colonização intestinal e um dos critérios para seleção de microrganismos probióticos. Essa capacidade de aderir às células derivadas da mucosa intestinal ou à própria mucosa, já foi demonstrada, para algumas estirpes do gênero *Lactobacillus* (JUNTUNEN et al, 2001; SERVIN et al., 2003) e *Bifidobacterium* (JUNTUNEN et al, 2001; BARBOSA et al, 2005) utilizadas como probióticos (TRABULSI e SAMPAIO, 2000).

A propriedade de exclusão ou redução da aderência de patógenos entéricos foi demonstrada para vários probióticos, provavelmente sendo conseqüência do bloqueio de receptores que seriam utilizados pelos mesmos. Essa propriedade é muito importante, considerando que ela contribui para o efeito protetor dos probióticos contra infecções intestinais (TRABULSI e SAMPAIO, 2000).

2.5 Probióticos e efeito barreira

A microbiota intestinal contribui para a proteção do hospedeiro contra patógenos entéricos, prevenindo o estabelecimento desses microrganismos no trato digestório. Esse efeito é conhecido como exclusão competitiva ou efeito barreira (FULLER, 1999). Os microrganismos comensais ou de efeito benéfico formam uma barreira física que impede o ataque e adesão de microrganismos patogênicos. Essa proteção é muito importante, pois como já foi dito as superfícies mucosas são muito permeáveis à entrada de antígenos pela pele (PEDRUZZI, 2002).

O desequilíbrio da microbiota intestinal, causado por tratamentos com antibióticos, radioterapia / quimioterapia, ou situações de estresse, podem deixar o hospedeiro vulnerável à ação de patógenos, pois, microrganismos dos gêneros *Clostridium* e *Escherichia* podem coexistir em pequenos números no intestino de hospedeiros saudáveis, porém após antibiótico terapia, por exemplo, esses microrganismos passam a predominar e os diferentes tipos de patologias podem surgir. No entanto ingestão de microrganismos probióticos ou o consumo de compostos capazes de estimular o crescimento de bactérias potencialmente benéficas podem auxiliar o restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal, reduzindo assim a probabilidade de colonização do epitélio pelos microrganismos patogênicos (TESHIMA, 2003).

A fermentação de compostos pela microbiota colônica gera produtos como os ácidos orgânicos (acético e lático, p.ex.) capazes de reduzir o pH do meio e assim restringir o crescimento de alguns microrganismos indesejáveis. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o efeito antagonista de estirpes de bifidobactérias ao crescimento de patógenos entéricos (BALLONGUE et al, 1993; FERREIRA et al, 2008).

Pesquisadores avaliaram o efeito da administração de leite fermentado carreando espécies de bifidobactérias de origem humana e animal em 48 voluntários. Foi observado que a administração das estirpes de origem animal não resultou em alteração nas concentrações de *Clostridium*, *Bacterioides* e *Escherichia coli*, enquanto que as espécies de origem humana apresentaram redução significativa desses microrganismos nas fezes (BALLONGUE et al, 1993). Em estudo comparativo da modulação da microbiota intestinal por pré / probióticos e simbióticos, os pesquisadores verificaram que a população de *E. coli* no ceco e no cólon de animais que consumiram prebióticos e simbióticos foi significativamente reduzida (FERREIRA et al, 2008).

Outro fato importante a ser considerado na função barreira é a competição por nutriente e sítios de adesão na mucosa intestinal. Katayama et al (2005) isolaram

glicosidases produzidas pela *Bifidobacterium bifidum*. Esses autores propuseram que estas enzimas são importantes para as bifidobactérias utilizarem os oligossacarídeos presentes no muco. A presença dessas enzimas mucolíticas permite que essas bactérias colonizem o epitélio colônico e assim impeçam a adesão de patógenos. A competição por sítios de adesão foi verificada em estudo com lactobacilos. Os pesquisadores constataram que *Lactobacillus plantarum* sintetiza adesinas para receptores intestinais que contêm manose, dessa forma competem com a *E. coli*, que necessita se ligar às células intestinais por meio desses receptores para exercer sua atividade patogênica (PAVAN et al, 2006).

A microbiota endógena também é capaz de inibir a aderência de patógenos, por meio do aumento da produção de mucinas intestinais (MOAL e SERVIN, 2006). Em estudo *in vitro*, Mack et al (1999), verificaram que *Lactobacillus plantarum* 299 v aumentou o nível de expressão mRNA das mucinas tipo MUC 2 e MUC 3 e assim impediu a adesão de *E.coli* enteropatogênica.

A estimulação do sistema imunológico do hospedeiro também é outro componente da função barreira. Pesquisas recentes têm demonstrado que probióticos podem ser efetivos não somente na prevenção de inflamações intestinais, mas também podem estimular a resposta do sistema imunológico (PERDIGON et al, 2001; ISOLAURI et al, 2004). Estudos em crianças com eczema recebendo alimentos suplementados com probióticos mostraram benefícios na diminuição tanto dos distúrbios intestinais como no eczema (ISOLAURI et al, 2000, KALLIOMAKI et al, 2001; KUKKONEN, et al, 2007).

Em virtude de todos esses benefícios, torna-se difícil deixar de reconhecer os aspectos positivos da predominância de uma microbiota benéfica e de seu metabolismo na nutrição e saúde do hospedeiro (MACKIE et al, 1999). Embora os probióticos não sejam indicados para cura de doenças, eles constituem um adjunto importante para a manutenção da saúde de RN.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo analisar por meio de análises histomorfométricas e reações histoquímicas para polissacarídeos, os efeitos de bactérias probióticas, carregada no leite humano pasteurizado, sobre a mucosa do ceco e do cólon proximal de ratos *Wistar*, visando verificar se a suplementação do leite humano pasteurizado com um *pool* de bactérias probióticas (*Lactobacillus gasseri* Ufvcc 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206), na concentração de 10^{10} UFC g⁻¹, afeta adversamente as variáveis indicadoras da renovação do epitélio da mucosa intestinal e a proporção de células produtoras de mucopolissacarídeos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Culturas Láticas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de Nutrição Experimental e no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (nº. processo 50702452817).

4.1 Origem e concentração das estirpes de bactérias bífidas

O concentrado celular foi composto de sete estirpes de bactérias probióticas (*Lactobacillus gasseri*), de origem humana, isoladas de fezes de recém-nascido (TESHIMA, 2002) e mantidas na Coleção de Culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFVCC). As estirpes (UFVCC 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206) armazenadas a -80 °C foram ativadas em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Difco®) modificado (0,075 % agar, 0,02 % de carbonato de sódio, 0,01 % cloreto de cálcio dihidratado, 1 % de uma solução de cisteína a 0,05 %, esterilizada a frio (filtro Millipore, 0,45 µm). Após o crescimento em caldo MRSm, as estirpes foram reunidas e centrifugadas a 2750 g por 10 min. Após lavagem em tampão fosfato estéril, pH 7,2, o pellet foi ressuscitado em leite humano pasteurizado ou não pasteurizado, resultando em uma concentração final de 10^{10} UFC mL⁻¹.

4.2 Origem do leite humano e tratamento térmico

O leite humano foi obtido de doadoras voluntárias, residentes na cidade de Viçosa (MG), com tempo de lactação compreendido entre 10 e 30 dias e que não estavam fazendo uso de qualquer tipo de medicamento. Os padrões adotados para a coleta do leite humano e a manutenção das amostras foram de acordo com o procedimento descrito no Manual de Rotina para Bancos de Leite Humano (Ministério da Saúde, INAN, 1994). O leite coletado foi dividido em dois lotes, sendo que um lote recebeu tratamento térmico de pasteurização (63,5 °C por 30 minutos). O leite pasteurizado foi subdividido em lotes que receberam (LPB) ou não (LP) o concentrado celular de bactérias probióticas. O mesmo procedimento foi adotado para o leite que não foi pasteurizado.

4.3 Delineamento experimental

O modelo experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, em duas repetições, sendo cada um dos cinco animais de cada grupo, considerado uma repetição. Foram utilizadas 25 ratas da raça *Wistar*, com 21 dias de idade, recém-desmamadas, pesando entre 50 e 52 g, oriundas do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram distribuídos de forma homogênea em cinco grupos e receberam tratamentos distintos (Tabela1).

Tabela 1 – Grupos e tratamento utilizados no experimento. C = controle, LC = leite cru, LCB = leite cru adicionado de bactérias probióticas, LP = leite pasteurizado e LPB = leite pasteurizado adicionado de bactérias probióticas.

Grupos / Tratamentos	C	LC	LCB	LP	LPB
Dieta (Labina)	X	X	X	X	X
Água destilada <i>ad libitum</i>	X	X	X	X	X
Água destilada (0,1 mL)	X	–	–	–	–
Leite Humano Cru (0,1 mL)	–	X	X	–	–
Leite Humano Pasteurizado (0,1 mL)	–	–	–	X	X
Concentrado de probióticos	–	–	X	–	X

X = presença do componente.

Durante o experimento, o LH cru ou pasteurizado, com ou sem o concentrado de bactérias probióticas, foi administrado diariamente aos animais por via oral, com água e dieta padrão *ad libitum*. Os animais foram alocados em gaiolas individuais e mantidos sob condições de temperatura controlada para 25 °C +/- 5 °C e ciclos de claro e escuro de 12 horas.

4.4 Coleta e preparo do material

Após 21 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados (câmara de CO₂). Fragmentos do ceco e do cólon proximal foram colhidos, lavados em solução salina e fixados em solução de Paraformaldeído 4 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos foram processados para inclusão em parafina e resina e armazenados no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (RAMOS, 2006).

4.5 Microtomia

A microtomia do material realizada com micrótomo rotativo (Leica RM 2045) consistiu na obtenção de cortes transversais semi-seriados, com espessura de 3 µm e intervalo entre cortes de 40 µm para o material incluído em resina (Historesin[®], Leica) e cortes com espessura de 5 µm e intervalo de 50 µm para o material incluído em parafina (RAMOS, 2006).

4.6 Coloração

As secções histológicas, distribuídas em mais de uma lâmina, foram submetidas à coloração Azul de Toluidina Borato de Sódio 1 % para realização das medidas morfométricas e a dois diferentes métodos de coloração para evidência de mucopolissacarídeos: técnica combinada Alcian Blue (AB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para revelação de mucopolissacarídeos neutros (coloração avermelhada a rósea) e ácidos (azul claro). A mistura de ambos os mucopolissacarídeos resulta na coloração arroxeadas. A técnica combinada Orceína e Alcian Blue foi utilizada para evidenciar sulfomucinas (tons de marrom) e sialomucinas (azuis).

4.6.1 Técnica Azul de Toluidina Borato de Sódio 1 %

As preparações foram mergulhadas em solução de azul de toluidina-borato de sódio 1 % (azul de toluidina 0,5 g, borato de sódio 1,0 g e 100 ml de água destilada) por 30 segundos e depois lavadas em água corrente até a retirada do excesso de corante. Posteriormente, as lâminas foram secas em placa aquecedora e montadas em resina Entellan® (Merck, Alemanha) (BANCROFT e STEVENS, 1996).

4.6.2 Técnica combinada Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff (AB+PAS) (adaptada de Macmanus e Mowry, 1960).

As preparações do material em resina foram mergulhadas em solução de alcian blue (pH 2,5) 1 % diluídos em 3 % de ácido acético por 2 horas em estufa a 60 °C. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e mergulhadas durante pelo menos 45 minutos em solução de ácido periódico. Após esta etapa, elas foram lavadas em água destilada e incubadas (ao abrigo da luz) em reativo de Schiff por pelo menos 1 hora (até que se observou uma coloração rósea no fragmento). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, lavadas em água corrente, secas em placa aquecedora e montadas em Entellan® (Merck) Com esta técnica pretendeu-se evidenciar em azul as células produtoras de mucopolissacarídeo ácido e na cor rósea, as produtoras de mucopolissacarídeo neutro. Quando ocorreu mistura dos dois mucopolissacarídeos no citoplasma da mesma célula, a cor final dependeu do mucopolissacarídeo dominante, variando do azul púrpura ao violeta.

4.6.3 Técnica combinada Orceína e Alcian Blue (O+AB) (adaptada de Singh e Gorton, 1989).

As secções de 5 µm de tecido incluído em parafina histológica foram desparafinizadas, hidratadas e oxidadas em solução de 0,25 % de permanganato de potássio diluído em solução de ácido sulfúrico 0,25 % por 1 minuto. Seguiu-se à descoloração em solução de ácido oxálico a 2 % por 5 segundos. As secções foram lavadas em água destilada e coradas por 6 horas em solução de orceína (pH 1,5) obtida pela diluição de 1 g de orceína sintética em 100 mL de álcool 75 % adicionado de 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. As secções foram lavadas novamente em água corrente por 10 minutos e diferenciadas em solução alcoólica acidificada (1 %) por 10 segundos. As preparações foram lavadas novamente e mergulhadas em solução de alcian blue (pH

2,5) por 2 minutos. Posteriormente seguiram-se os procedimentos de desidratação, diafanização e montagem em Entellan® (Merck).

4.7 Captura das imagens

As imagens das secções histológicas foram capturadas em microscópio de luz Olympus AX 70, equipado com acessório fotográfico U-PHOTO (Olympus), acoplado a um sistema computadorizado (programa SPOT, versão 3.5.9 para Windows) no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Foram capturadas 25 imagens de pelo menos dois cortes transversais do ceco e dois do cólon ascendente do mesmo animal utilizando-se objetiva de 20X e zoom de 1,25.

4.8 Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas nas fotos obtidas com o sistema de captura de imagens descrito no item 4.7. As medições foram realizadas utilizando-se o programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics - EUA). Todas as análises morfométricas foram realizadas, em momentos diferentes, por 2 observadores treinados, para redução dos erros experimentais.

4.8.1 Profundidade e diâmetro das criptas intestinais

Para as medidas de profundidade (Fig. 4), apenas criptas com lúmen visível e epitélio bem definido, foram utilizadas. Foram selecionadas 20 criptas em corte longitudinal (Fig. 3) por animal, em cada um dos segmentos do intestino, em 3 secções histológicas diferentes, com distância mínima entre elas de 40 µm. Para a determinação dos diâmetros da base e do ápice das criptas (Fig. 4), optou-se em utilizar as imagens em que as criptas apareciam em corte transversal (Fig. 3), tomando-se o cuidado de observar as características que diferem a parte basal (maior quantidade de células produtoras de mucinas, ou proximidade da muscular da mucosa, p.ex.) da parte apical da cripta. Do mesmo modo realizado para a profundidade de cripta, obteve-se 20 medidas para os diâmetros da base e do ápice das criptas do ceco e do cólon por animal em estudo. Um total de 200 medidas (100 no ceco e 100 no cólon proximal), por observador, foi obtido para cada uma das variáveis analisadas, em cada um dos grupos experimentais.

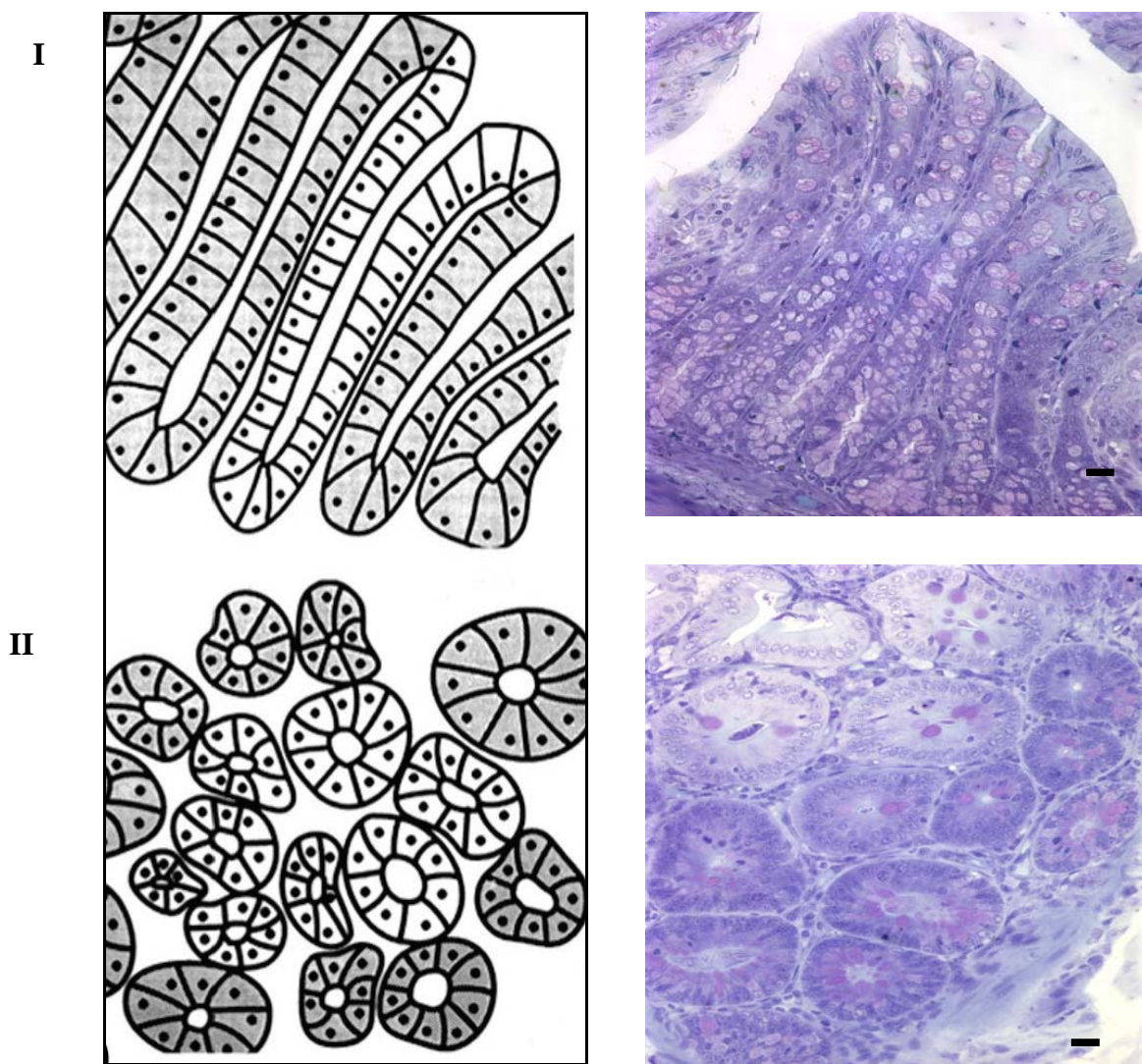


Figura 3: Esquemas e fotomicrografias de criptas intestinais em cortes longitudinais (I) e transversais (II). Azul de toluidina borato de sódio 1 %. Adaptado de Leedham et al, 2005. Barra 30 μm .

4.8.2 Espessura da mucosa

A espessura da mucosa intestinal (Fig. 4) foi obtida pela média de 10 medições por animal, realizadas na túnica mucosa em 3 secções histológicas diferentes com distância mínima entre elas de 40 μm . Um total de 100 medidas (50 no ceco e 50 no cólon proximal), por observador, foi realizado em cada um dos grupos em estudo. Os procedimentos adotados estavam de acordo com as práticas realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural da UFV.

4.9 Contagem de mitose nas criptas

Figuras mitóticas (Fig. 4) foram contadas nas imagens digitais utilizadas para medidas de profundidade e diâmetro das criptas. Utilizou-se 40 fotos por animal (20 do ceco e 20 do cólon proximal), cada uma delas representando uma área de $172.640 \mu\text{m}^2$. Do mesmo modo que realizado na morfometria das criptas, a contagem de figuras mitóticas foi realizada por dois observadores.

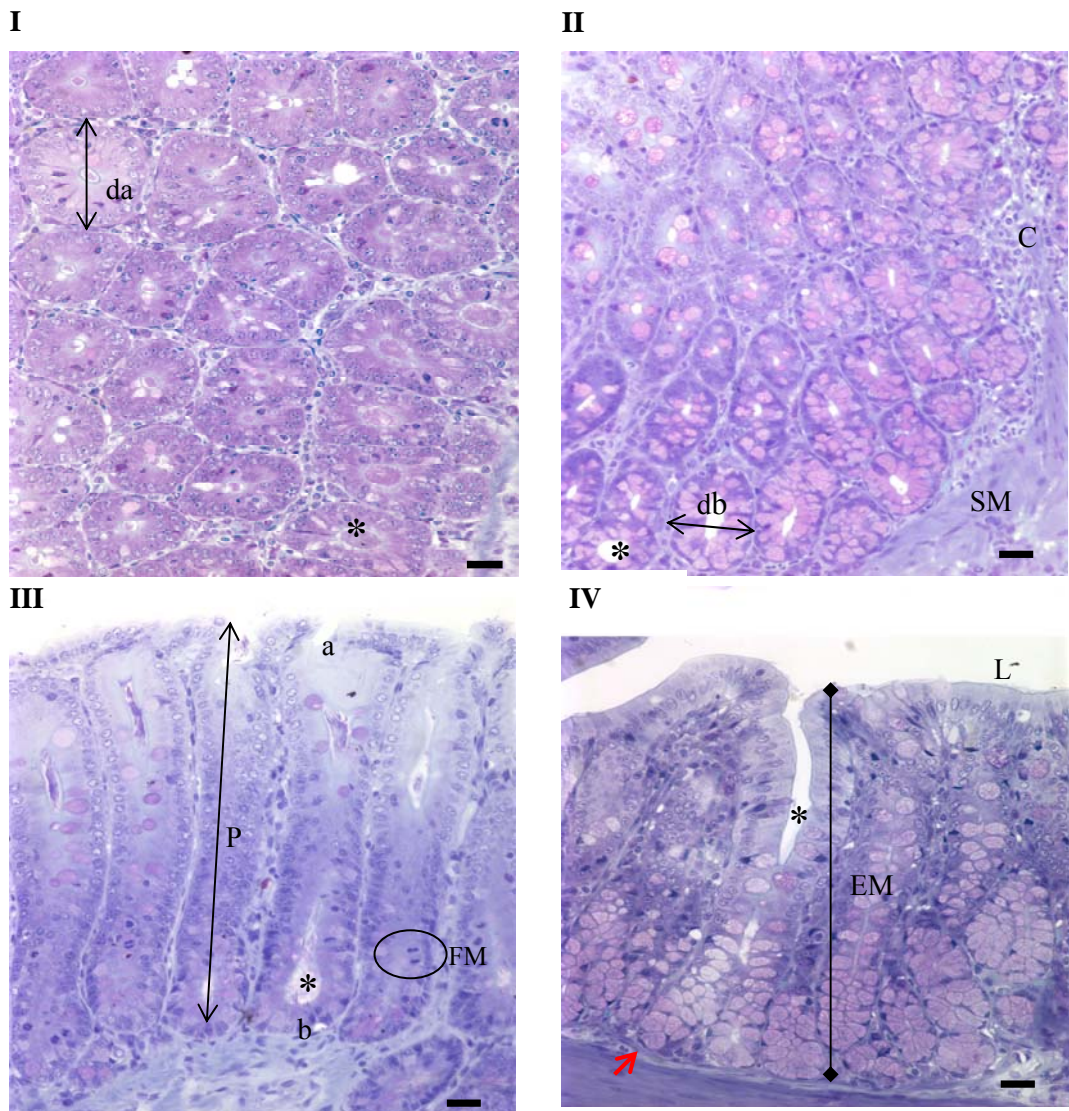


Figura 4: Cortes transversais e longitudinais da região do ceco (I e III) e do cólon proximal (II e IV) de ratos *Wistar*. da = diâmetro do ápice da cripta; C = tecido conjuntivo; db = diâmetro da base da cripta; SM = submucosa; a = ápice da cripta; b = base da cripta; P = profundidade da cripta; FM = figura mitótica; EM = espessura da mucosa; L = lúmen intestinal; * = luz da cripta; Seta vermelha indica a muscular da mucosa. Azul de toluidina borato de sódio 1%. Barra = $30 \mu\text{m}$.

4.10 Contagem de células colunares e de células produtoras de mucopolissacarídeos

A contagem das células colunares, de células produtoras de mucopolissacarídeo, i.e. mucopolissacarídeo ácido (AB^+), mucopolissacarídeo neutro (PAS^+), mistura de mucopolissacarídeos (AB^+ e PAS^+) e contagem total de células nas criptas foi realizada em 40 criptas por animal (20 no ceco e 20 no cólon proximal), e os valores anotados foram tabulados. As contagens foram feitas em criptas com epitélio definido e lúmen visível. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Olympus BX 40 com objetiva de 40 X por dois observadores treinados e em diferentes momentos. Após a contagem de células produtoras de mucopolissacarídeo e de células colunares, a percentagem de ambas nas criptas foi determinada. O mesmo procedimento foi utilizado para verificar a percentagem de células produtoras de mucopolissacarídeos ácido e neutro (SALES, 2007).

4.11 Descrição das células produtoras de mucopolissacarídeo nas criptas colônicas e cecais

Procedeu-se a descrição das células nas criptas com o objetivo de verificar a frequência, localização, forma celular e nuclear das células produtoras de MA, MN, AN (material corado por $AB+PAS$), sulfomucinas e sialomucinas (material corado por $O+AB$), nos diferentes grupos. O material histológico dos cinco grupos experimentais foi analisado por 2 observadores (para diminuição de erros experimentais) em microscópio óptico Olympus BX 40 com objetiva de 40 X, de acordo com os procedimentos de rotina no Laboratório de Biologia Estrutural da UFV.

4.12 Análise estatística

O modelo estatístico utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado. Para análise estatística dos dados foi utilizado o software STATISTICA para Windows 3.11. Os dados foram apresentados em média, desvio padrão. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey para análise das médias. Foi adotado nível de significância ($P < 0,05$) para todos os testes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises morfométricas e contagem de figuras mitóticas

A morfometria tem sido utilizada para análises de alterações morfológicas de tecidos e órgãos, como por exemplo, modificações na mucosa intestinal em resposta a diversos tratamentos, permitindo a análise de aspectos morfológicos das estruturas em estudo (ZARZAUR e KUDSK, 2001).

As criptas do ceco e do cólon proximal dos ratos analisados estavam bem preservadas e não apresentaram características marcantes entre os tratamentos. No ceco não foi verificado nenhum efeito significativo ($P > 0,05$) dos tratamentos nas variáveis diâmetro e número de figuras mitóticas, ao passo que nas variáveis espessura da mucosa e profundidade de cripta foi constatado efeito significativo ($P < 0,05$) (Quadro 1). Os resultados do teste de médias (Teste de Tukey a 5 %) das análises morfométricas e contagens de figuras mitóticas realizadas nas criptas intestinais do ceco dos animais estão representados na Figuras 5.

No cólon proximal dos ratos em experimentação foi constatada diferença significativa ($P < 0,05$) apenas na variável profundidade de cripta (Quadro 2). Os resultados do teste de médias (Teste de Tukey 5 %) para as variáveis estudadas neste segmento intestinal, estão representados, na Figuras 6.

Quadro 1: Resultado da análise de variância das variáveis estudadas no ceco. Diâmetro do ápice da cripta (DA), diâmetro da base cripta (DB), espessura da camada mucosa (EM), número de figuras mitóticas (FM) e profundidade da cripta intestinal (PC).

Variável	FV	GL	SQ	QMR	F calc.
DA			50,1	12,5	0,35 ^{ns}
DB			36,36	9,09	0,54 ^{ns}
EM	Tratamentos	4	14284,91	3571,23	5,12 [*]
FM			1,06	0,27	0,90 ^{ns}
PC			17013,42	4253,36	4,45 [*]
DA			724,6	36,2	
DB			336,67	1,83	
EM	Resíduo	20	13940,85	697,04	
FM			5,86	0,29	
PC			19101,51	955,07	
DA			774,7	32,28	
DB			373,03	15,54	
EM	Total	24	28225,75	1176,07	
FM			6,92	0,29	
PC			36114,94	1504,79	

FV: fonte de variação

GL: graus de liberdade

SQ: soma de quadrados

QMR: quadrado médio do resíduo

F calc: F calculado

ns: F não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* F significativo ao nível de 5 % de probabilidade

Quadro 2: Resultado da análise de variância das variáveis estudadas no cólon proximal. Diâmetro do ápice da cripta (DA), diâmetro da base cripta (DB), espessura da camada mucosa (EM), número de figuras mitóticas (FM) e profundidade da cripta intestinal (PC).

Variável	FV	GL	SQ	QMR	F calc.
DA			35,02	8,75	0,318 ^{ns}
DB			0,64	0,16	0,016 ^{ns}
EM	Tratamentos	4	6755,11	1688,78	1,489 ^{ns}
FM			1,42	0,36	1,954 ^{ns}
PC			7867,43	1966,86	2,974 [*]
DA			551,22	27,56	
DB			200,45	10,02	
EM	Resíduo	20	22690,62	1134,53	
FM			3,64	0,18	
PC			13224,97	661,25	
DA			586,24	24,43	
DB			201,09	8,38	
EM	Total	24	29445,73	1226,91	
FM			5,06	0,21	
PC			21092,40	878,85	

FV: fonte de variação

GL: graus de liberdade

SQ: soma de quadrados

QMR: quadrado médio do resíduo

F calc: F calculado

ns: F não significativo ao nível de 5 % de probabilidade

* F significativo ao nível de 5 % de probabilidade

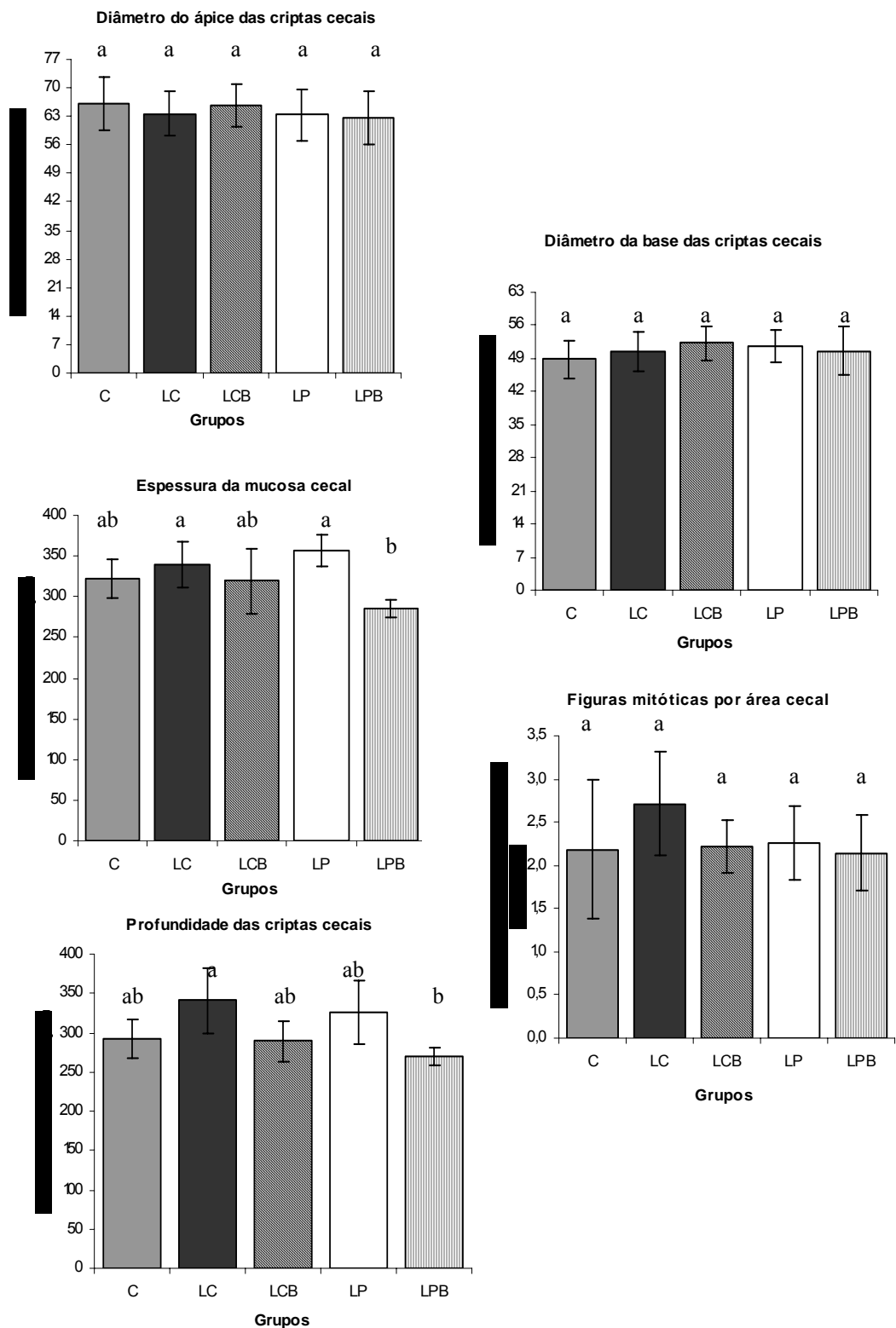


Figura 5: Valores médios dos diâmetros do ápice e da base das criptas intestinais, da espessura da mucosa, da profundidade das criptas e a contagem média de figuras mitóticas, no ceco de ratos *Wistar* nos cinco grupos de tratamentos. C = controle; LC = leite cru; LCB = leite cru + bactérias probióticas; LP = leite pasteurizado e LPB = leite pasteurizado + bactéria probiótica. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros representa o desvio padrão entre as médias.

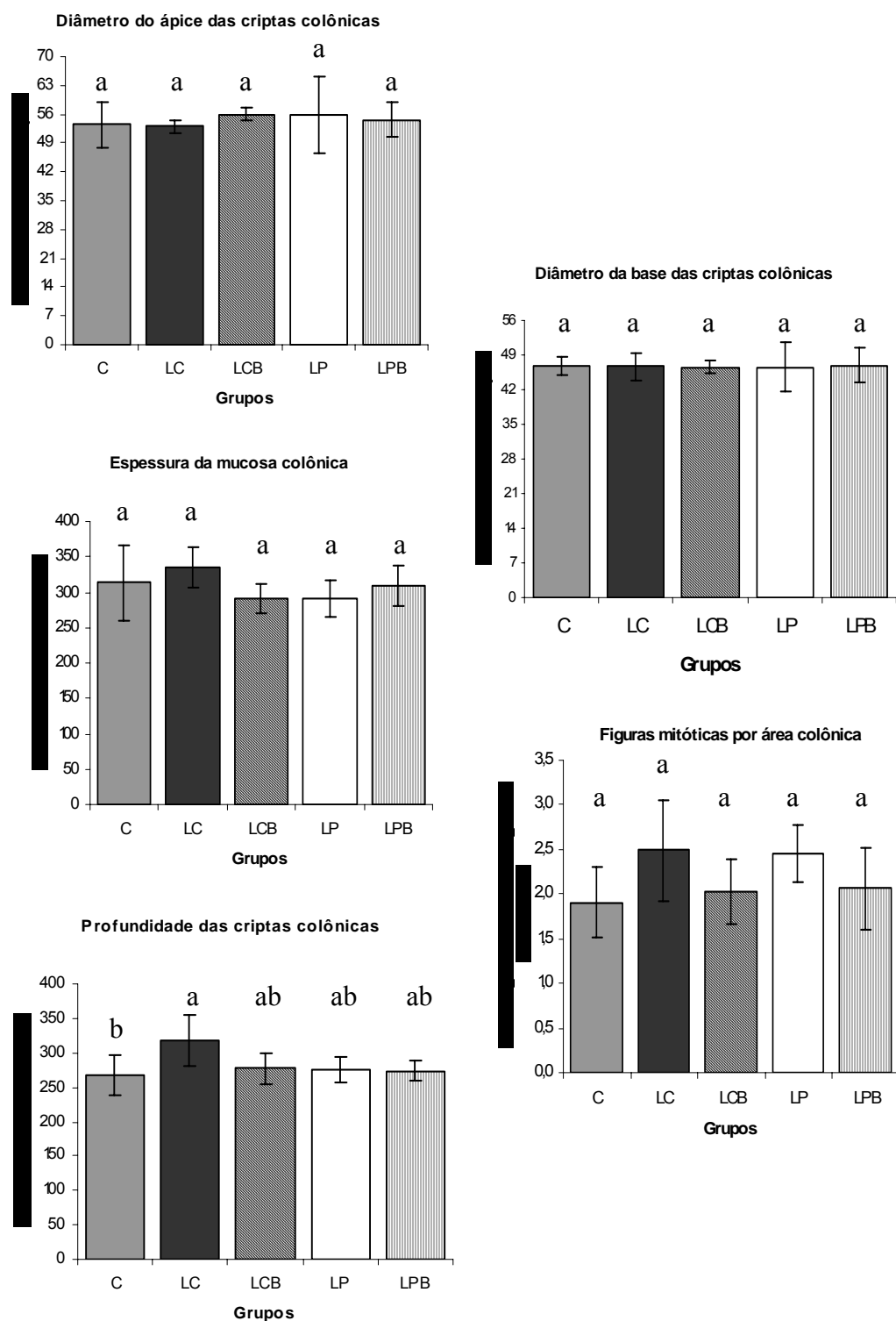


Figura 6: Valores médios dos diâmetros do ápice e da base das criptas intestinais, da espessura da mucosa, da profundidade das criptas e a contagem média de figuras mitóticas, no cólon proximal de ratos *Wistar* nos cinco grupos de tratamentos. C = controle; LC = leite cru; LCB = leite cru + bactérias probióticas; LP = leite pasteurizado e LPB = leite pasteurizado bactérias probióticas. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros representa o desvio padrão entre as médias.

Nos dois segmentos do intestino não foi constatada diferença ($P > 0,05$) entre os diferentes grupos para a variável diâmetro da cripta (Fig. 5 e 6). O diâmetro da base variou de 48,78 a 52,28 μm no ceco e 46,48 a 46,85 μm no cólon proximal. No ápice da cripta esses valores ficaram na faixa de 62,61 e 66,14 μm no ceco e 52,99 e 55,93 μm no cólon proximal. A análise dessa variável morfométrica é de primordial importância visto que criptas que apresentam valores de diâmetro superiores a 115 μm são consideradas aberrantes (TSUKAMOTO et al, 2001), isto é, propensas a desenvolverem tumores intestinais malignos. Portanto, como pode ser verificado, a presença das bactérias probióticas (LCB, LPB) não interferiram adversamente nessa variável.

Os maiores valores de espessura da mucosa no ceco (Fig.5) foram observados nos animais dos grupos LC (338,925 μm) e LP (356,446 μm) ($P < 0,05$), sendo que esses valores não diferiram entre si e nem dos valores encontrados no grupo C (321,304 μm) e LCB (319,618 μm), porém, foram superiores aos observados no grupo LPB (284,564). No entanto, a espessura da mucosa do grupo LPB foi semelhante ($P > 0,05$) àquela dos grupos C e LCB. No cólon proximal dos diferentes grupos não houve diferença ($P > 0,05$) nessa variável (Fig. 6), sendo que tais valores variaram de 290,39 a 334,66 μm nesse segmento intestinal.

As figuras mitóticas (prófase, metáfase, anáfase e telófase) foram facilmente identificadas nas criptas do ceco e do cólon proximal dos animais em estudo (Fig. 7). Os resultados indicaram que não houve diferença ($P > 0,05$) na quantificação de figuras mitóticas contadas por área (μm^2) nos diferentes grupos experimentais. A inexistência de diferença nessa variável sugere que a adição de bactérias probióticas não afeta de maneira adversa à renovação celular nas criptas do ceco e do cólon proximal.

Constatou-se diferença ($P < 0,05$) entre as medidas de profundidade de cripta no ceco e no cólon proximal. No ceco, os indivíduos do grupo LC (341,362 μm) apresentaram os maiores valores de profundidade de cripta ao passo que os menores foram encontrados nos grupos LPB (269,926 μm), não diferindo, no entanto, dos demais grupos (Fig. 5). As medidas de profundidade de cripta no cólon proximal dos animais do grupo LC (317,143 μm) foram maiores do que as encontradas no grupo C (268,163 μm) e não diferiram ($P > 0,05$) dos demais grupos (Fig. 6).

A maioria dos estudos que avaliaram profundidade de cripta em animais tratados com bactérias probióticas se concentra no intestino delgado (BRADLEY et al, 1994; PLUSKE et al, 1997; PELICANO et al, 2003), provavelmente por ser este o segmento do tubo digestório, no qual ocorre a absorção de nutrientes e a conclusão da digestão.

No entanto, os resultados destes estudos são contraditórios, pois alguns autores (PELICANO et al, 2003) não observaram diferença na profundidade de cripta intestinal de animais tratados ou não com bactéria probiótica, ao passo que outros autores (BRADLEY et al, 1994; PLUSKE et al, 1997) verificaram que as criptas intestinais dos animais tratados com probióticos apresentaram-se mais profundas do que as criptas dos animais do grupo não tratado. Segundo Ribeiro (1996), as bactérias probióticas competem com bactérias patogênicas pelos sítios de adesão na mucosa intestinal, diminuindo a incidência de diarreias e melhorando a absorção de nutrientes, sendo que esse mecanismo interfere diretamente na estrutura da mucosa intestinal.

No presente estudo, constatou-se que os maiores valores de profundidade de cripta foram obtidos nos animais do grupo LC, talvez em função da presença de vários oligossacarídeos na composição do leite que atuam como prebiótico (NEWBURG et al, 2005). O LH possui vários fatores como anticorpos, antioxidantes, inibidores de protease, lisozima, lactoferrina, fator bífido, componentes lipídicos, dentre outros compostos que conferem proteção à mucosa intestinal do recém-nascido (BERNT e WALKER, 1999; EUCLIDES, 2000). Além disso, os lipídios do LH possuem atividade antimicrobiana, podendo atuar contra bactérias, vírus e protozoários (ISAACS et al, 1990; FOMON, 1993). Essa propriedade se deve principalmente a ação de ácidos graxos livres e monoacilgliceróis liberados após a digestão dos triacilgliceróis do leite no trato digestório infantil (ISAACS et al, 1990).

A integridade da barreira intestinal depende da proliferação das células epiteliais. Algumas substâncias como glutamina e ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como os metabolizados pelas bactérias comensais no intestino grosso, são capazes de aumentar a proliferação celular (ICHIKAWA et al, 2002).

Bactérias do ácido lático (BAL), incluindo bactérias probióticas dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* produzem SCFA como parte de seu metabolismo (SAKATA et al, 1999). Ichikawa et al (1999) verificaram que ratos alimentados com dieta contendo *Lactobacillus casei* e *Clostridium butyricum* apresentaram uma maior produção de células nas criptas intestinais. Essa produção chegou a 70 % a mais no ceco e 200 % a mais no cólon distal, comparado aos animais de um grupo controle. Em estudo similar *Pediococcus acidilactici* favoreceu a proliferação de enterócitos no epitélio dos intestinos delgado e grosso dos animais (DI GIANCAMILLO et al, 2008). No entanto, no atual estudo as profundidades de cripta dos animais que receberam o leite pasteurizado contendo as bactérias probióticas (LPB)

não diferiram daquelas dos animais do grupo LP, sugerindo, mais uma vez que a adição das estirpes de *Lactobacillus gasseri* ao leite pasteurizado não afeta significativamente esse parâmetro.

Os resultados da presente experimentação sugerem que a suplementação de leite humano pasteurizado com um *pool* de estirpes de bactérias probióticas não interferiu nas variáveis, aqui estudadas, relacionadas ao estímulo da renovação do epitélio intestinal do ceco e do cólon proximal, em ratos *Wistar*.

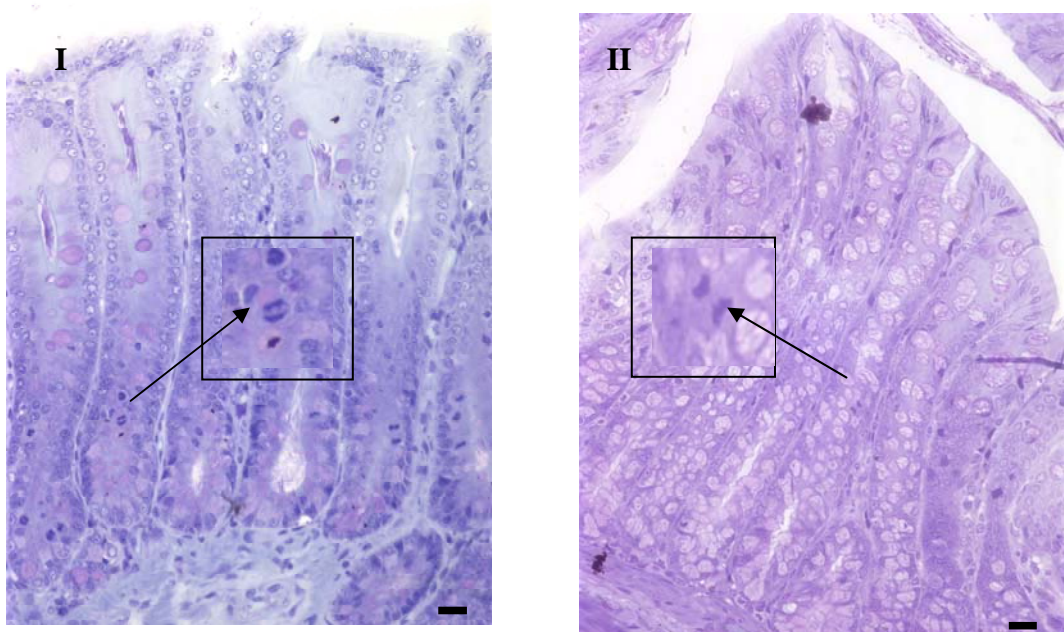


Figura 7: Fotomicrografias de secções histológicas do intestino grosso (I ceco e II cólon proximal). No detalhe figuras mitóticas visualizadas nos segmentos intestinais. Azul de Toluidina / borato de sódio 1%. Barra = 30 µm. Detalhe aumento 3X.

5.2 Contagens celulares

5.2.1 Células colunares e produtoras de mucopolissacarídeos

As Figuras 8 e 9 exemplificam os diferentes tipos de células produtoras de mucopolissacarídeos, encontradas nas criptas, nos diferentes grupos. As criptas do ceco e do cólon proximal dos animais de todos os grupos apresentaram-se bem preservadas e sem diferenças marcantes entre os grupos. As células produtoras de mucopolissacarídeos foram abundantes no intestino grosso dos animais em estudo principalmente no cólon, onde se observou a predominância de mucopolissacarídeo ácido da base até o ápice da cripta em todos os tratamentos. Os resultados das contagens médias de células por cripta nesses dois segmentos, estão apresentados nas

Tabelas 2 e 3. A Figura 10 representa a proporção entre células colunares e produtoras de mucopolissacarídeos.

CECO

Grupos

I = Controle (C)

II = Leite cru (LC)

III = Leite cru + bactérias probióticas (LCB)

IV = Leite pasteurizado (LP)

V = Leite pasteurizado + bactérias probióticas (LPB)

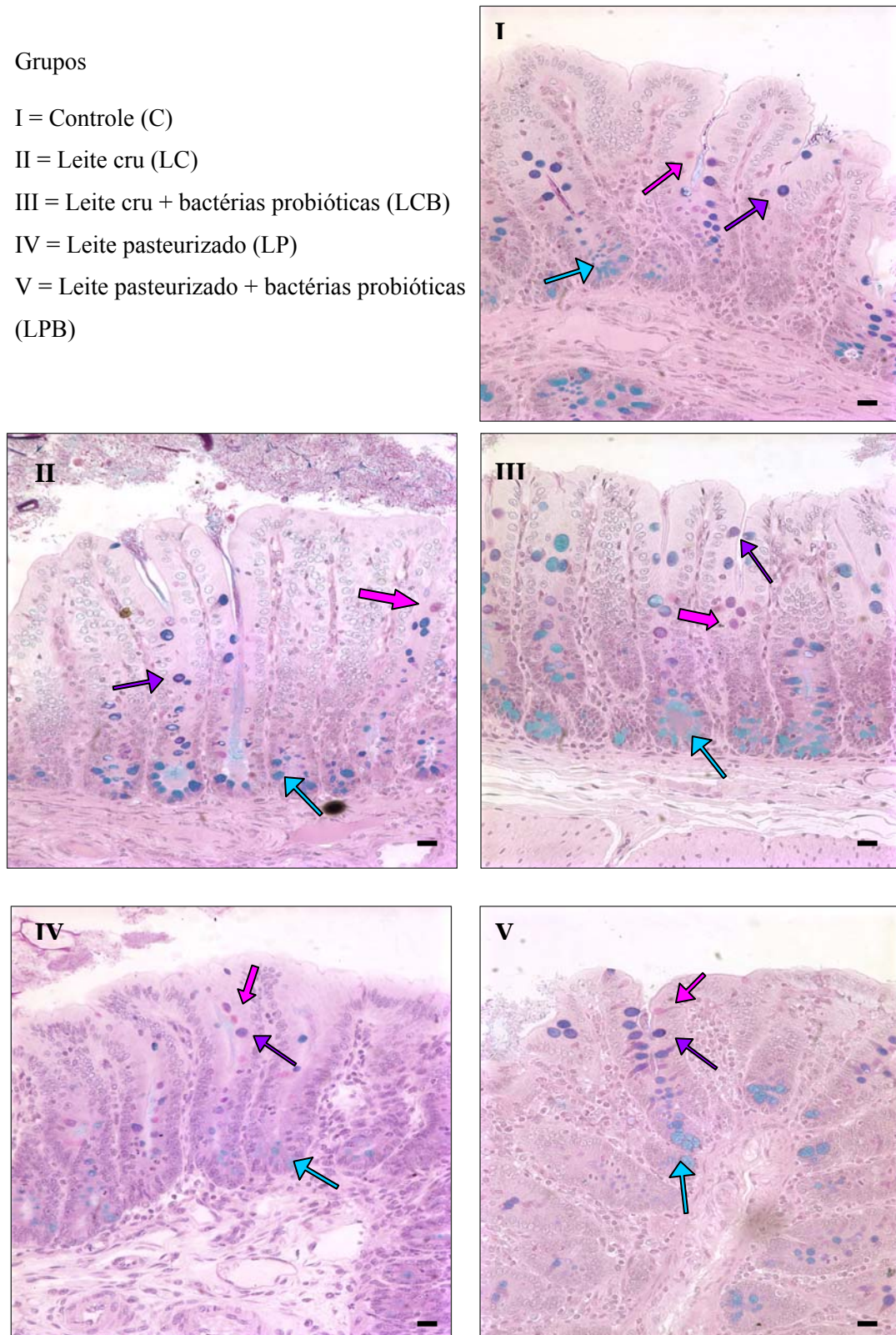


Figura 8: Secção transversal da região do ceco de ratos *Wistar* que foram submetidos à reação de AB +PAS. Seta azul: AB⁺ (mucopolissacarídeo ácido); seta rosa: PAS⁺ (mucopolissacarídeo neutro); seta roxa: AB⁺PAS⁺ (mucopolissacarídeo ácido e neutro). Barra = 30 µm

CÓLON PROXIMAL

Grupos

I = Controle (C)

II = Leite cru (LC)

III = Leite cru + bactérias probióticas (LCB)

IV = Leite pasteurizado (LP)

V = Leite pasteurizado + bactérias probióticas (LPB)

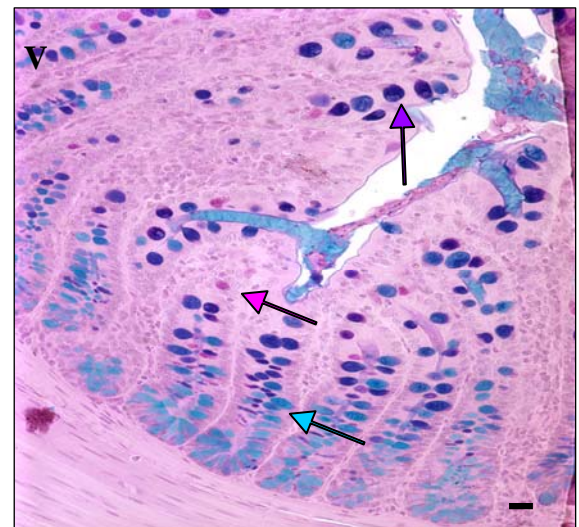
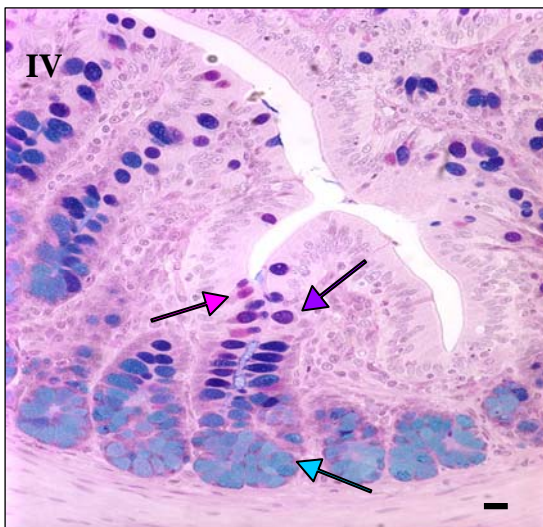
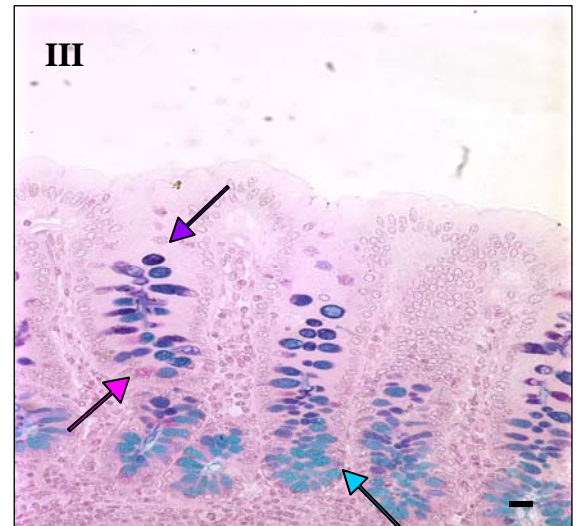
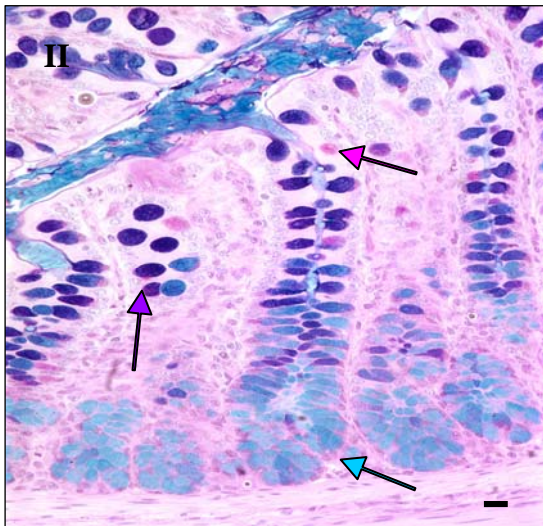
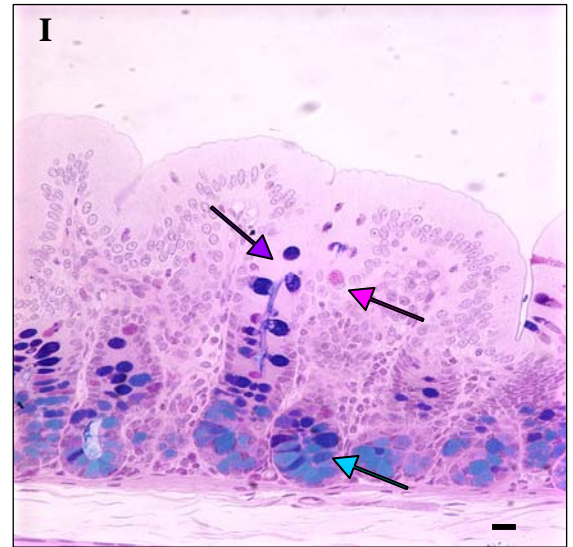


Figura 9: Secção transversal da região do cólon proximal de ratos *Wistar* que foram submetidos à reação de AB+PAS. Seta azul: AB⁺ (mucopolissacarídeo ácido); seta rosa: PAS⁺ (mucopolissacarídeo neutro); seta roxa: AB⁺PAS⁺ (mucopolissacarídeo ácido e neutro). Barra = 30 μ m

Tabela 2 – Média de células por cripta do ceco de ratos *Wistar* dos grupos controle (C), leite cru (LC), leite cru adicionado de bactérias probióticas (LCB), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias probióticas (LPB)

<u>Grupos</u>	Nº. médio de células por cripta					
	Produtoras de Mucopolissacarídeo		Colunar		Total	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
C	^{ns} 18,35	5,87	^{ns} 51,67	11,53	^{ns} 69,99	7,65
LC	18,85	3,04	60,13	7,51	78,98	9,94
LCB	15,84	5,42	53,62	8,62	69,46	4,64
LP	12,14	4,52	59,03	6,42	71,17	4,80
LPB	14,66	4,51	52,20	9,01	66,86	9,15

DP = desvio padrão entre médias; ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 3 – Média de células por cripta do cólon proximal de ratos *Wistar* dos grupos controle (C), leite cru (LC), leite cru adicionado de bactérias probióticas (LCB), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias probióticas (LPB)

<u>Grupos</u>	Nº. médio de células por cripta					
	Produtoras de Mucopolissacarídeos		Colunar		Total	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
C	^{ns} 32,75	6,13	^{ns} 42,36	3,57	^{ns} 75,10	7,18
LC	34,92	8,17	43,44	4,40	77,93	10,49
LCB	32,78	2,32	35,73	6,71	68,51	5,02
LP	32,34	2,77	43,04	6,76	75,78	4,29
LPB	33,42	6,72	39,31	10,78	72,73	14,44

DP = desvio padrão entre médias; ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

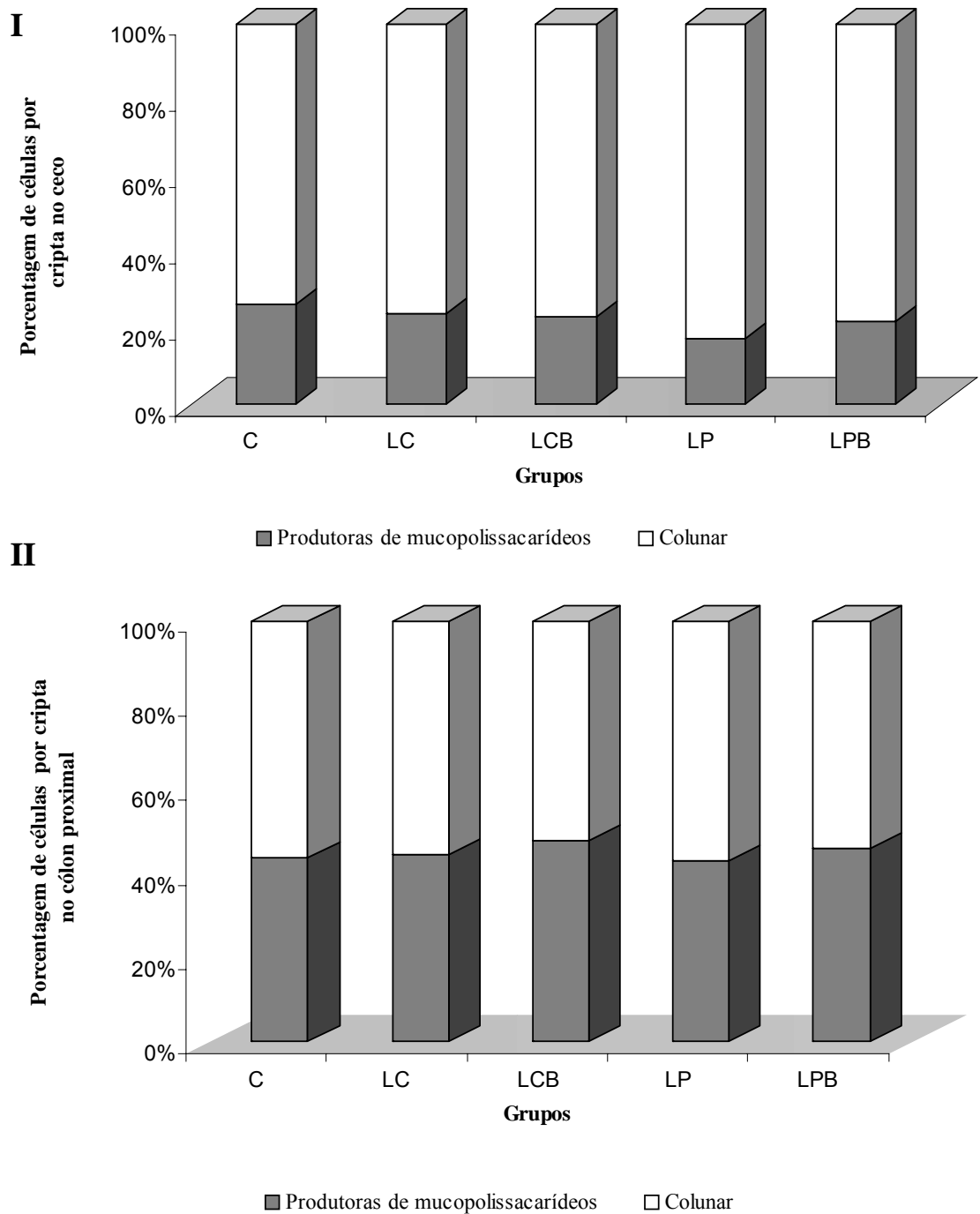


Figura 10: Proporção entre células produtoras de mucopolissacarídeo e células colunares nas criptas do ceco (I) e do cólon proximal (II) de ratos *Wistar* nos grupos: C = controle; LC = leite cru; LCB = leite cru + bactérias probióticas; LP = leite pasteurizado e LPB = leite pasteurizado + bactérias probióticas. Contagem média (5 animais por grupo, 20 criptas por animal, em 2 repetições).

Os resultados indicaram que não houve diferença ($P > 0,05$) entre as contagens de células produtoras de mucopolissacarídeos, de células colunares e da contagem total de células nos dois segmentos do intestino analisados (Tabelas 2 e 3) entre os grupos. Essa evidencia foi comprovada pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

As células colunares são importantes na absorção de nutrientes (KIERSZENBAUM, 2004) e a presença do muco é imprescindível para a promoção da integridade do epitélio intestinal uma vez que as mucinas possuem sítios de aderência específicos para alguns microrganismos e dessa forma impedem o contato direto desses agentes microbianos à mucosa intestinal (MOAL e SERVIN, 2006). O muco, portanto, tem papel imprescindível no efeito barreira, protegendo o indivíduo da translocação bacteriana, assim como de agentes tóxicos que pudessem estar presentes nos intestinos.

O muco está envolvido numa relação de protocooperação entre o hospedeiro e microrganismos entéricos, pois as mucinas quando hidratadas formam um gel, que além de proteger o epitélio, fornecem nutrientes à microbiota intestinal. Por outro lado, o metabolismo microbiano gera produtos como ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) envolvidos no processo de proliferação celular (ICHIKAWA et al, 2002). O efeito modulador dos SCFA foi comprovado em camundongos que receberam doses diárias de butirato (10 mM) ou solução salina, durante 7 dias. Os pesquisadores comprovaram que o butirato foi capaz de aumentar a expressão dos genes MUC 2 e MUC 1, contudo observou-se uma diminuição na espessura da camada de muco sobre a mucosa colônica desses animais (GAUDIER et al, 2008). A microbiota intestinal também foi capaz de modular a expressão de genes das mucinas em ratos *Wistar* que consumiram fórmula contendo microrganismos probióticos e de efeito probiótico (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus thermophilus*). Esses animais apresentaram aumento de 60% no conteúdo luminal de mucinas, e constatou-se que os microrganismos estimularam principalmente a expressão do gene MUC 2, porém os genes MUC 1 e MUC 3 apresentaram um leve aumento na expressão (CABALERRO-FRANCO et al, 2007). Em estudo similar verificou-se que *Lactobacillus plantarum* 299V aumentou a expressão de mRNA dos genes MUC 2 e MUC 3 e assim impediu a adesão de *E.coli* enteropatogênica à mucosa intestinal, o que comprova o efeito barreira das mucinas (Mack et al, 1999).

Outros compostos, como algumas fibras não digeríveis, podem, indiretamente modular a produção de mucinas. Açúcares fermentescíveis como os oligossacarídeos presentes no LH não são digeridos na parte superior do intestino e chegam intactos ao cólon, onde são utilizados como fonte de carbono pela microbiota colônica, estimulando principalmente bactérias do gênero *Bifidobacterium* (FONTAINE et al, 1998; KLESSEN et al, 2002). Em modelo murino, animais que receberam dieta contendo mistura de fibras fermentáveis apresentaram aumento no número de células caliciformes nas criptas e nas vilosidades intestinais. Os autores sugeriram que o efeito observado deveu-se, entre outros fatores, ao efeito trófico dos SCFA oriundos do metabolismo microbiano (McCOLLOGH et al, 1998). Em estudo semelhante ratos que consumiram uma dieta contendo inulina e oligofrutose apresentaram modificações na arquitetura da mucosa intestinal, com aumento do número de células caliciformes e modificação do tipo de mucina produzido pelas células muco-excretoras (KLESSEN et al, 2002). Além disso, a microbiota intestinal desses animais apresentou maior quantidade de bifidobactérias associada à camada de muco.

Dados científicos têm indicado que a microbiota endógena possui um importante papel na renovação e diferenciação celular do epitélio intestinal. No entanto, no presente estudo a administração de 7 estirpes probióticas ao leite cru ou pasteurizado não afetou a proporção de células colunares e produtoras de mucina (Fig.10) no ceco e cólon proximal de ratos *Wistar*.

5.2.2 Contagem de células produtoras de mucopolissacarídeos ácidos (MA), neutros (MN) e mistos (AN)

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as médias e o desvio padrão para as contagens de células produtoras de MA, MN e AN. A Figura 11 representa a proporção entre as células produtoras de MA, MN e AN.

Tabela 4 - Média de células por cripta do ceco de ratos *Wistar* dos grupos controle (C), leite cru (LC), leite cru adicionado de bactérias probióticas (LCB), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias probióticas (LPB). MA = mucopolissacarídeo ácido; MN = mucopolissacarídeo neutro; AN = mucopolissacarídeo ácido e neutro

<u>Grupos</u>	Média da contagem de células por cripta					
	Células produtoras de MA		Células produtoras de MN		Células produtoras de AN	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
C	^{ns} 13,90	6,35	^{ns} 1,39	1,23	^{ns} 3,06	1,05
LC	15,43	4,36	1,97	1,10	1,45	0,93
LCB	12,68	3,45	0,62	0,32	2,55	2,17
LP	10,24	4,81	0,86	0,84	1,04	0,77
LPB	11,30	4,21	0,88	0,43	2,49	0,74

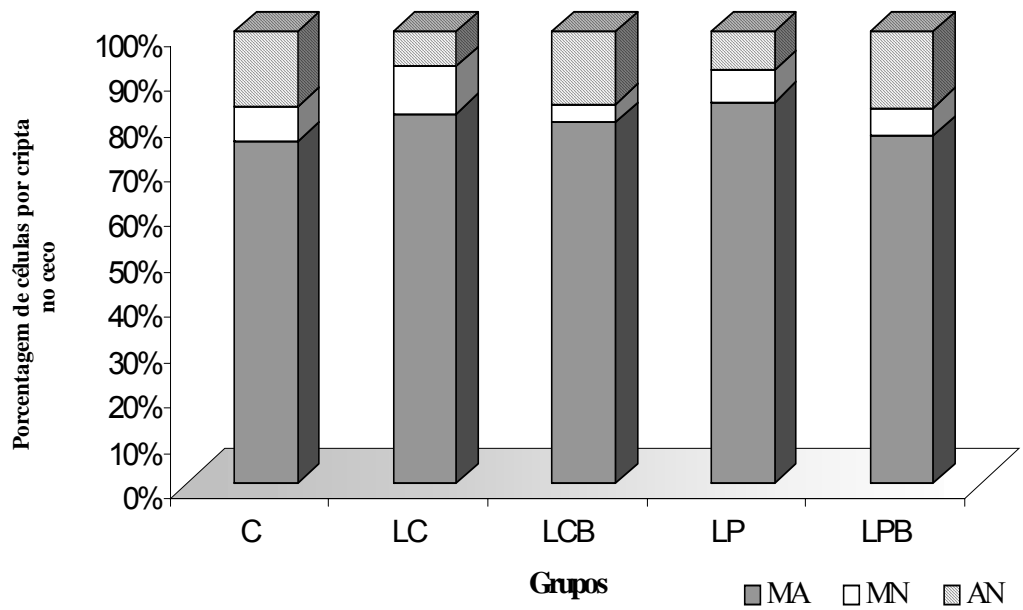
DP = desvio padrão entre médias; ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 5 – Média de células por cripta do cólon proximal de ratos *Wistar* dos grupos controle (C), leite cru (LC), leite cru adicionado de bactérias probióticas (LCB), leite pasteurizado (LP) e leite pasteurizado adicionado de bactérias probióticas (LPB). MA = mucopolissacarídeo ácido; MN = mucopolissacarídeo neutro; AN = mucopolissacarídeo ácido e neutro

<u>Grupos</u>	Média da contagem de células por cripta					
	Células produtoras de MA		Células produtoras de MN		Células produtoras de AN	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
C	^{ns} 17,64	4,90	^{ns} 2,77	0,84	^{ns} 12,34	2,02
LC	17,99	7,28	1,79	1,06	15,15	2,29
LCB	16,44	3,12	2,32	1,43	14,02	1,89
LP	19,55	1,34	2,37	0,48	10,42	2,56
LPB		4,36				5,38

DP = desvio padrão entre médias; ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

I



II

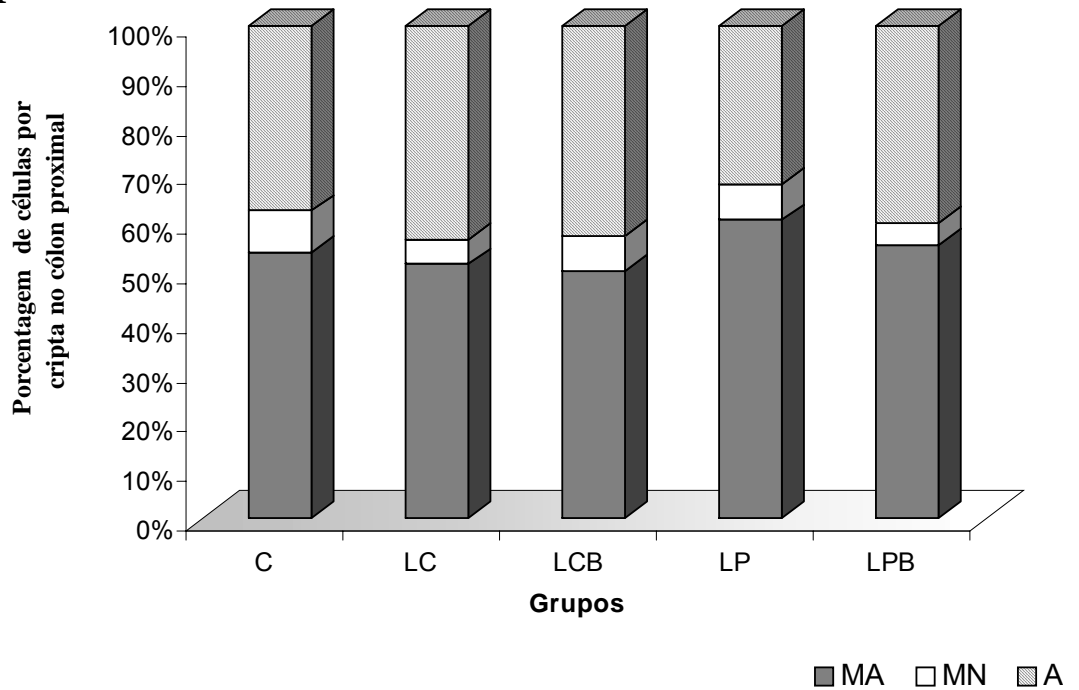


Figura 11: Proporção entre células produtoras de MA (mucopolissacarídeo ácido), MN (mucopolissacarídeo neutro) e AN (mucopolissacarídeo ácido e neutro), nas criptas do ceco (I) e do cólon proximal (II). Grupos: C = controle; LC = leite cru; LCB = leite cru + bactérias probióticas; LP = leite pasteurizado e LPB = leite pasteurizado + bactérias probióticas.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para as contagens de células produtoras de MA, MN e AN, entre os grupos (Tab. 4 e 5).

A produção do muco é um fator crítico na função barreira do intestino e sua diminuição resulta em aumento significativo da passagem de bactérias principalmente pelo íleo intacto de ratos (ALBANESE et al, 1994). Bactérias endógenas dos intestinos podem translocar para outros sítios, quando a integridade da mucosa de alguma forma (ausência do muco, agentes patogênicos, toxinas microbianas ou dietéticas) esteja comprometida (BERG, 1983). Muitos desses microrganismos podem atravessar a barreira intestinal, se alojar nos nódulos linfáticos, fígado, baço dentre outros, podendo desencadear septicemia, choque ou até mesmo levar a falência múltipla dos órgãos (GUARNER e MALAGELADA, 2003). Dessa forma, a presença do muco contribui com uma barreira física, impedindo uma ligação direta do microrganismo com o epitélio, dificultando sua translocação.

Segundo Deplancke e Gaskins (2001), as células caliciformes produtoras de MN predominam nos intestinos. No entanto, em regiões com densidade elevada de microrganismos, como na região cecal e colônica, as células caliciformes produtoras de MA passam a predominar, uma vez que alguns tipos de MA permitem melhor adesão microbiana, quando comparados com os outros tipos de mucopolissacarídeos, cuja função básica é proteção contra abrasões físicas, como por exemplo, facilitando a expulsão do bolo fecal. Essas observações foram confirmadas no presente estudo, onde a contagem média de células produtoras de MA foi significativamente maior que as de células produtoras de MN em todos os grupos, sejam no ceco (Tab. 4) ou no cólon (Tab. 5). Essa superioridade numérica de MA é importante, pois mucopolissacarídeos ácidos, principalmente do tipo sulfomucinas parecem estar envolvidos na diminuição do processo de translocação bacteriana (DEPLANCKE e GASKINS, 2001). No presente estudo a ingestão das estirpes probióticas por ratos *Wistar* não alterou a proporção desses mucopolissacarídeos (Tab. 4 e 5 e Fig. 11).

Importa lembrar que a proporção elevada de células produtoras de MA têm papel significativo para o RN uma vez que nos primeiros anos de vida o sistema imune da criança não está completamente desenvolvido e a presença desse tipo de mucopolissacarídeo é fundamental na função barreira no epitélio intestinal. No entanto, estudos clínicos precisam ser realizados para se ter a real idéia dos efeitos de bactérias probióticas na histomorfometria da mucosa intestinal humana.

5.3 Descrição do material histológico

5.3.1 Células coradas com Alcian Blue (AB⁺) e Ácido periódico de Schiff (PAS⁺)

As células produtoras de MA, MN e de AN nas criptas do ceco e do cólon proximal dos 5 animais de cada grupo, foram descritas quanto a frequência, distribuição na cripta, forma celular e forma nuclear, visualizando-se todo o corte histológico para cada segmento.

Como pode ser observado na Figura 9 a análise do cólon proximal mostrou que as células produtoras de MA (AB⁺) estavam mais concentradas na base da cripta e em maior quantidade em relação à porção mediana e no ápice das mesmas. As células produtoras de MN (PAS⁺) e de mistura dos dois tipos de mucopolissacarídeos AN (AB⁺ e PAS⁺) estavam mais localizadas na porção mediana e no ápice e pouco presentes na porção basal. As células produtoras de MN foram menos freqüentes que as de AN e as duas foram menos freqüentes em relação às de MA. O padrão de forma da célula e do núcleo se manteve para os três tipos de células secretoras. As células basais apresentavam morfologia triangular e núcleo achatado, ao passo que as células das porções medianas e apicais mostravam-se globosas com núcleos também achatados. A morfologia nuclear relaciona-se ao acúmulo do mucopolissacarídeo no citoplasma da célula, que acaba por reduzir o espaço a ser ocupado pelos elementos citoplasmáticos, inclusive, o núcleo. Não foi constatada diferença visual entre os grupos estudados.

A análise do ceco (Fig. 8) mostrou expressiva redução da quantidade de células secretoras de mucopolissacarídeos em relação ao cólon proximal e melhor distribuição pelo epitélio da cripta. No ceco, não foi visualizado acúmulo de células secretoras de MA, apesar de mais encontradas na base das criptas. Essas células estavam bem distribuídas pela cripta e em menor quantidade nas porções mediana e apical. As células produtoras de MN, e de AN apareceram em menor quantidade. Pôde-se perceber que em seqüência crescente da quantidade de células encontradas pelas criptas têm-se as células produtoras de MN, de AN e MA. A morfologia celular e nuclear seguiu o padrão encontrado para o cólon proximal. Não foi visualizada nenhuma diferença entre os grupos experimentais.

Segundo Deplancke e Gaskins (2001) a relação entre mucopolissacarídeos neutros e ácidos no intestino de mamíferos aumenta entre o período de nascimento e de desmame e diminui após essa fase. Deplancke et al (2000) estudando ratos do

nascimento até a completa maturação do sistema gastrointestinal, verificaram que os mucopolissacarídeos neutros, assim como os sulfatados aparecem principalmente nas porções apicais das criptas intestinais e nas superfícies do epitélio colônico, independente da idade dos indivíduos, e que os mucopolissacarídeos ácidos não sulfatados aparecem principalmente na base das criptas intestinais. Essa distribuição também foi observada no presente estudo.

5.3.2 Células coradas com orceína (O^+) e alcian blue (AB^+)

As células produtoras de mucopolissacarídeos sulfatados (O^+) e de sialomucinas (AB^+) nas criptas do ceco e do cólon proximal dos 5 animais de cada grupo foram descritas quanto à frequência, distribuição na cripta, forma celular e forma nuclear, visualizando-se todo o corte histológico para cada segmento. Na Figura 12 estão apresentadas imagens de células coradas pela técnica Orceína e Alcian Blue.

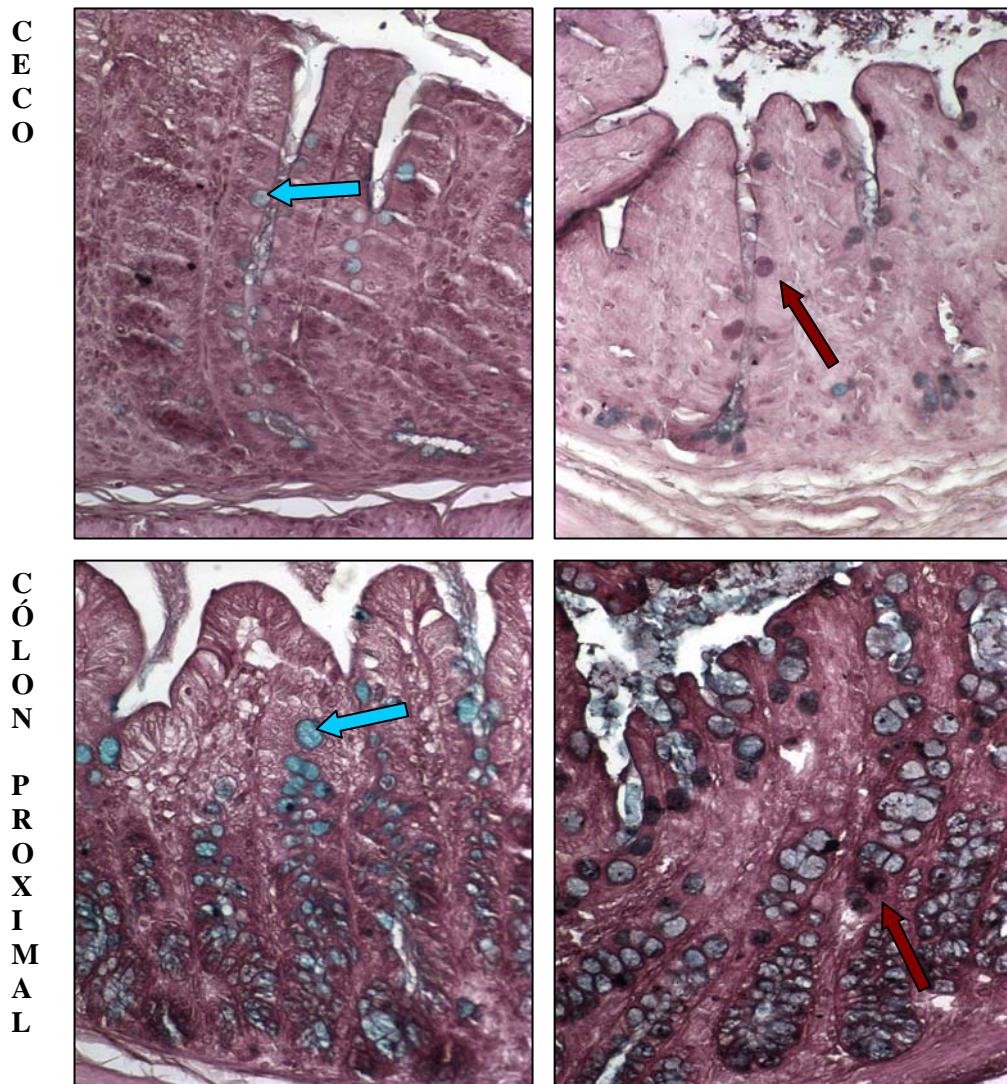


Figura 12: Secção transversal da região do ceco e do cólon proximal de ratos *Wistar* que foram submetidos à reação de O^+ + AB^+ . Coloração azul (seta azul): sialomucinas; coloração amarronzada (seta marrom): sulfomucinas.

Como podem ser observadas na Figura 12, as criptas do cólon proximal dos animais em estudo, em comparação com o ceco, apresentaram alta frequência de células produtoras de sialomucinas (coradas em azul- AB⁺). A distribuição das células coradas com AB⁺ foi em toda cripta, porém a maior frequência foi observada na base das mesmas. As formas celulares visualizadas foram globulares com núcleos globosos, da porção mediana para o ápice da cripta, e piramidais com núcleos achatados e alongados, quando essas apareciam na base da glândula.

As células produtoras de mucopolissacarídeos sulfatados – sulfomucinas - (coradas em marrom) foram mais raras que as de sialomucinas, apresentando baixa frequência em todos os grupos estudados. As células produtoras de sulfomucinas foram observadas da porção mediana para base da glândula. As formas celulares predominantes foram globulares com núcleos globosos.

No ceco observou-se menor número de células mucosas em relação ao cólon (Fig. 12), sendo este fato explicado pelo maior número de microrganismos presentes neste último compartimento intestinal. A frequência de células produtoras de sialomucinas foi de baixa a média (comparadas ao cólon proximal), sendo que as mesmas foram observadas em maior frequência na base das criptas. As formas celulares visualizadas foram globulares com núcleos globosos, da porção mediana para o ápice da cripta, e piramidais com núcleos achatados e alongados, quando estas apareciam na base da glândula. Nesse compartimento celular, não se observou diferença entre os grupos. As células produtoras de sulfomucinas foram pouco frequentes e apareciam da porção mediana para o ápice da cripta. A forma celular predominante em todos os grupos foi a globular, apresentando núcleo achatado e alongado.

Pesquisadores observaram a predominância de sialomucinas no intestino grosso de ratos, e afirmaram que a predominância desse tipo de mucopolissacarídeo no ceco e cólon pode ser explicada pelo fato de alguns tipos de mucinas serem menos degradados pela atividade mucolítica de microrganismos (MESLIN et al, 1999). Mucopolissacarídeos sulfatados, assim como os neutros, parecem sofrer mais a degradação por microrganismos, enquanto as sialomucinas são mais resistentes a esse tipo de atividade microbiana, além disso, a presença de ácidos graxos de cadeia curta parecem estimular esse tipo de mucopolissacarídeo no intestino grosso (MESLIN et al, 1999). Sheahan e Jervis (1976) também verificaram a predominância de mucosubstâncias ácidas no intestino grosso de várias espécies animais incluindo

roedores e homens, porém constataram, principalmente, sulfomucinas no cólon distal das espécies estudadas.

Deplancke et al (2000), verificaram em modelo murino que após 14 dias de nascimento as células caliciformes produtoras de sialomucinas apareceram dentro das criptas colônicas enquanto as de sulfomucinas foram encontradas na superfície do eipélio colônico e não dentro das criptas. Essa migração das células produtoras de sulfomucinas para a superfície da cripta sugeriu aos autores uma forma de compensar a deficiência do sistema imune dos animais, segundo eles, como o sistema imunológico dos indivíduos ainda não estava completamente desenvolvido as células produtoras de mucinas sulfatadas podem ter sido estimuladas, pela presença de microrganismos entéricos, a migrar para a superfície colônica e assim conferir maior proteção ao indivíduos.

No atual experimento não foi possível verificar a relação entre células produtoras de sialomucinas e de sulfomucinas, pois a técnica de coloração utilizada para marcar esses tipos celulares utiliza material incluído em parafina, com isso os cortes histológicos foram considerados espessos (5 μm) para a realização de contagens celulares. Porém a descrição do material nos proporcionou uma visão geral da frequência e localização desses dois tipos de células produtoras de mucopolissacarídeo ácido. Assim como observado por Deplancke et al (2000), no presente experimento foi verificada a presença de sialomucinas principalmente nas porções basais e medianas das criptas, enquanto as sulfomucinas apareceram predominantemente no ápice das mesmas. Considerando que os animais utilizados no estudo foram sacrificados com 42 dias de idade, e que a completa maturação do sistema imunológico de ratos geralmente ocorre após 90 dias de nascimento (DEPLANCKE et al, 2000), sugere-se que a microbiota intestinal dos animais pode ter influenciado a distribuição das células produtoras de mucopolissacarídeos sulfatados.

6. CONCLUSÃO

A adição de estirpes de *Lactobacillus gasseri*, na forma de *pool* ao leite humano pasteurizado não afetou as variáveis indicadoras da renovação epitelial (altura da mucosa, profundidade e diâmetro das criptas, número de figuras mitóticas, de células colunares e de células produtoras de mucopolissacarídeo) da mucosa intestinal e nem o tipo de mucopolissarídeo produzido pelas células mucosas. Esses resultados fundamentam a inocuidade da suplementação do leite humano, com as estirpes probióticas avaliadas em modelo murino. Contudo estudos clínicos são necessários, pois o efeito da microbiota na modulação do epitélio da mucosa intestinal dependerá de características inerentes aos microrganismos e ao hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; SALMELA, T. V.; MATTILA-SANDHOLM, T.; WRIGHT, A. 1999. Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 351-354.

ACHESON, D. W. K.; LUCCIOLI, S. 2004. Mucosal immune responses. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, v. 18, p. 387-404.

ALBANESE, C.T.; CORDONA, M.; SMITH, S.D.; WATKINS, S.; KURKCHUBASCHE, A.G.; ULMAN, I.; SIMMONS, R.L.; ROWE, M.I.; 1994. Role of intestinal mucus in transepithelial passage of bacteria across the intact in vitro. *Surgery*, v.116, n.1, p.76-82.

ALLORI, C.; AGÜERO, G.; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; DE NADER, O.M.; PERDIGON, G. 2000. Gut Mucosa Morphology and Microflora Changes in Malnourished Mice after Renutrition with Milk and Administration of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection*, v. 63, p. 83-90(8).

ALMEIDA, J. A. G. Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite. Viçosa-MG, UFV, 1986, 68 p. Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 1986.

AMANT, D.C.; VALENTIN-BON, I.E.; JERSE, A.E. 2002. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infection and Immunity*, v. 70. p.7169–7171.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. 2005. Breastfeeding and the Use of Human Milk. Organizational Principles to Guide and Define the Child Health Care System and /or Improve the Health of All Children. Section on Breastfeeding. *Pediatrics*. v.115, p. 496-506.

ARNOLD, L.D.W.; LARSON, E. 1993. Immunologic benefits of breast milk in relation to human milk banking. *American Journal Infect Control*, v.21, p. 235-242.

ARVOLA, T.; LAIHO, K.; TORKKELI, S.; MYKKAˆNEN, H.; SALMINEN, S.; MAUNULA, L.; ISOLAURI, E. 1999. Prophylactic *Lactobacillus* GG Reduces Antibiotic-Associated Diarrhea in Children With Respiratory Infections: A Randomized Study. *Pediatrics*, v.104 (5) p.1- 4.

BACHRACH, V.R.G.; SCHWARZ, E.; BACHRACH, L.R. 2003. Breastfeeding and the Risk of Hospitalization for Respiratory Disease in Infancy. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, v.157, p.237-243.

BALLONGUE, J.; GRILL, J.P.; BARATTE, P. 1993. Effects of *Bifidobacterium* fermented milks on human intestinal flora. *Lait (France)* v. 73 (2), p. 249-256.

BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. 1996. *Theory and Practice of Histological techniques*. Nova York: Churchill livingstone. 766p.

BERG, R.D. 1983. *The intestinal microflora in health and disease*. Academic Press, v. p.333-352.

BERNT, K.M.; WALKER, W.A. 1999. Human milk as barrier of biochemical messages. *ACTA PAEDIATRICA. SUPPLEMENT*,v. 430, p. 27-41.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, v.35, n.2/3, p.125-131.

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

BORBA, L.; FERREIRA, C.L.L.F. 2003. Probióticos em Bancos de Leite Humano. In: Ferreira, C.L.L. F, ed. *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. Suprema Gráfica e Editora, Rio Branco, MG. 103-121p.

BORRIELLO, S.P.; HAMMES, W.P.; HOLZAPFEL, W.; MARTEAU, P.; SCHREZENMEIR, J.; VAARA, M.; VALTONEN, V. 2003. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v.36 p. 775-80.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.S.C.; MIUKI, C.J. 2006. Importância da microflora intestinal. *Revista de Pediatria do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, v.28 (2), p.117-127.

BRASIL Manual normativo para profissionais de saúde de maternidades – Referências para mulheres que não podem amamentar. Brasília, Ministério da saúde. 2004.

BUDIÑO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; NAKAGHI, L.S.O.; MARCUSS, F.; FRAGA, A.L.; SCANDOLERA, A.J.; HUAYNATE, R.A.R. 2005. Effect of Probiotic and Prebiotic Inclusion in Weaned Piglet Diets on Structure and Ultra-structure of Small Intestine. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, v.48, n. 6, p. 921-929.

CABALLERO-FRANCO, C.; KELLER, K.; DE SIMONE, C.; K. CHADEE. 2007. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v.292, p.315-322.

CAPLAN, M.S.; JILLING, T. Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotics supplementation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 30: (Suppl. 2), p.S18-S22.

CORREA, N.B.; PERET-FILHO, L.A.; PENNA, F.J.; LIMA, F.M.; NICOLI, J.R. 2005. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *Journal of Clinical Gastroenterology.*, v.39, p.38- 59.

DAI, D.; NANTHKUMAR, N.N.; NEWBURG, D.S.; WALKER, W.A. 2000. Role of Oligosaccharides and Glycoconjugates in Intestinal Host Defense. Bacterial [Colonization Of The Gut And The Use Of Pre- And Probiotics: Proceedings Of A Symposium]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, v.30, p.23- 33.

DEGUCHI, Y.; MORISHITA, T.; MUTAI, M. 1985. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. Agricultural and Biological Chemistry, v.49, p.13-19.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. American Journal of Clinical Nutrition v. 73 (suppl), p.1131S-1141S.

DEPLANCKE, B.; HRISTOVA, K.R.; OAKLEY, H.A.V.; MCCRACKEN, J.R.; AMINOV, R.I.; GASKINS, H.R. 2000. Molecular Ecological Analysis of the Succession and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract. Applied and Environmental Microbiology, v. 6, p. 2166–2174.

DI GIANCAMILLO, A.; VITARI, F.; SAVOINI, G.; BONTEMPO, V.; BERSANI, C.; DELL'ORTO, V.; DOMENEGHINI, C. 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. Histology and Histopathology , v.23(6), p.651-64.

DOCK-NASCIMENTO, D. B.; JUNQUEIRA, K.; AGUILAR-NASCIMENTO, M. 2007. Restauração rápida de células caliciformes induzidas por uma dieta hidrolisada contendo probióticos em desnutrição experimental. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 33(suppl 1), p.72-76.

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

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

FAGUNDES NETO, U. 1991. Flora bacteriana. In: Gastroenterologia pediátrica. Fagundes Neto, U.; Wehba, J.; Penna, F.J. cap.13. p. 119-122. Rio de Janeiro. Ed. MEDSI, 2ªed.

FALK, P.G.; HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62 (4), p.1157-1170.

FARIA JÚNIOR, P.C. DE; ANDREOLLO, N.A.; TREVISAN, M.A.S.; LOPES, L.R. 2007. A inter-relação das sialomucinas (antígenos Tn e Stn) com o adenocarcinoma no esôfago de Barrett. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.53 (4), p.360-364.

FERREIRA, C.L.L.F. 2003. *Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção*. 1ª Edição. Viçosa-MG, Editora da UFV. v.1. 205p.

FERREIRA, C.L.L.F.; TESHIMA, E.; COSTA, N. M. B. 2008. Effect of probiotic, prebiotic and synbiotic on colon and cecum microbiota of rats. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, v. 3, p. 71-76.

FONTAINE, N.; MESLIN, J.C; LORY, S.; ANDRIEUX, C. 1996. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. *British Journal of Nutrition*, v.75, p.881-892.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34p.

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

FULLER, R. 1992. *Probióticos: the scientific basis*. London: Chapman e Hall. 398p.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. 2004. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição – Balneário Camboriú, SC. p.6- 28.

GAUDIER, E.; RIVAL, M.; ROBINEAU, I.; HOEBLER, C. 2008. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiological Research*, v.58, p. 111-119.

GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. 1999. Gut fermentation and health advantages: myth or reality? *British Journal of Nutrition*, v. 81, p.83-84.

GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. 2005. Células caliciformes. In: CARVALHO, H.F. e COLLARES-BUZATO, C.B. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri (SP), Manole, cap.14.

GRIFFIN, I. J.; DAVILA, P. M.; ABRAMS, S. A. 2002. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *British Journal of Nutrition*, v.87 (Suppl 2), p. 187-191.

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

HAMILTON-MILLER, J.M.T. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* v. 22, p.360-366.

HYLANDER, M.A.; STROBINO, D.M.; DHANIRED, D.Y.R. 1998. Human milk feeding and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics*, v.102 (3), p.38-46.

ICHIKAWA, H.; SHINEHA, R. 1999. Gastric or retal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats. *Digestive Diseases and Science*. v. 44, p.2119-2123.

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

ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPA, A. P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73 (2 Suppl), p.444S-450S.

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

ISOLAURI, E.; KALLIOMARKI, M.; LARTINEN, K.; SALMINEN, S. 2008. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease. *Current Pharmaceutical Design*, v.14, p.1368-1375.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. 2005. Probiotics, Gut Inflammation and Barrier Function. *Gastroenterology Clinics of North America*, v34, p. 437–450.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 2004. *Histologia Básica*. 10ª edição-Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

JUNTUNEN M.; KIRJAVAINEN P.V.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. 2001. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, p. 293–296.

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

KANDORI, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEDA, M.; DOI, K. 1996. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Experimental Animals*, v.45(2), p.155-60.

KARAM, S.M. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Frontiers in Bioscience*, v.4, p 296-298.

KATAYMA, T.; FUJITA, K.; YAMAMOTO, K. 2005. Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.99(5), p. 457-465.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v.15, p.1-9.

KIERSZENBAUM, A.L. 2004. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Trad. Nádia Vieira Rangel, Rodrigo Alves Azevedo. Rio de Janeiro, Elsevier. Cap.16.

- KITAJIMA, H.; SUMIDA, Y.; TANAKA, R.; YUKI, N.; H TAKAYAMA. 1997. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial *British Medical Journal*, v.76, p. 101-107.
- KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. 2003. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition.*, v.89, p. 597-606.
- KIMURA, K.; McCARTNEY, M.A.; TANNOCK, G.W.A. 1998. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p, 3394-3398.
- KOPP-HOOLIHAN L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *Journal of American Dietetic Association*, v.101 p. 229-238.
- KUKKONEN, K.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KORPELA, R.; POUSSA, T.; TUURE, T. 2007. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.119, p192-7.
- KUMMER, S.C.; GIUGLIANI, E.R.J.; SUSIN, L.O.; FOLLETTO, J.L.; LERMEN, N.R.; WU, V.Y.J.; SANTOS, L. DOS; CAETANO, M.B. 2000. Evolução do padrão de aleitamento materno. *Revista de Saúde Pública*, v.34 (2), p.143-148.
- LEEDHAM S. J.; BRITTAN, M.; MCDONALD S. A. C.; WRIGHT N, A. 2005. Intestinal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, p. 11-24.
- LIÉVIN, V.; PEIFFER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A. L. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, v. 47, p.646–652.
- LIN, H.C.; SU, B.H.; CHEN, A.C.; LIN, T.W.; TSAI, C.H.; YEH, T.F. 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth infants. *Pediatrics- Official Journal of the American Academy of Pediatrics*, v.115 (1), p. 1-4.

- MACK, D.R.; AHRNE, S.; HYDE L.; WEI, S.; HOLLINGSWORTH, M.A. 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, v. 52, p. 827–833.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* v.69 (Suppl), p.1035S-45S.
- MATSUO, K; OTA, H; AKAMATSU, T.; SUGIYAMA, A; KATSUYAMA, T. 1997. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*, v.40, p.782-789.
- MATTAR, A.F.; TEITELBAUM, D.H.; DRONGOWSKI, R.A.; YONGYI, F.; HARMO, C.M.; CORAN, A.G. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, v.18, p. 586–590.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; BLUM, S.; COLLINS, J. K.; CRITTENDEN, R.; de VOS, W.; DUNNE, C.; FONDÉN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, M.; UWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M. ; SALMIEM, S.; SXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; von WRIGHT, A. 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.393-399.
- McCLOUGH, J.S., RATCLIFFE, B.; MANDIR, N.; CARR, K.E.; GOODLAB, R.A. 1998. Dietary and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut*, v. 42, p. 799-806.
- McMANUS, J.F.A.; MOWRI, R.W. 1960. *Staining Methods-Histological and Histochemical*. Hoeber. New York. 423p.
- MESLIN, J.C.; FONTAINE, N.; ANDRIEUX, C. 1999. Variation of mucin distribution in the rat intestine, caecum and colon: effect of the bacterial flora. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 123, p.235-239.
- MIDOLO, P.D.; LAMBERT, J.R.; HULL, R.; LUO, F.; GRAYSON, M.L. 1999. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 79, p. 475 – 479.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição – INAN. Secretaria de Programas Especiais – SPE. Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno - PNIAM. Manual de rotinas em bancos de Leite Humano. Brasília, D.F., 1994.

MOAL, V.L.; SERVIN, A.L. 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19(2), p.315–337.

MODLER, H.W. 1994. Bifidogenics Factors – Sources, metabolism and Applications. *International Dairy Journal*, v. 4, p.383-407.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. 2006. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, v.82 (5), p.S189-S197.

MORROW, A.L.; PALACIOS, G.M.R.; ALTAYE, M.; JIANG, X; GUERRERO, M.L.; MEINZEN-DERR, J.K.; FARKAS,T.; CHATURVEDI, P.; PICKERING, L.K.; NEWBURG, D.S. 2004. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of Pediatrics*, v.145 (3), p.297-303.

NAKAZAWA, T.; KANEKO, K.; TAKAHASHI, H.; INOUE, S. 1996. Neonatal meningitis caused by *Bifidobacterium breve*. *Brain & Development*, v. 18, p.160-162.

NEWBURG, D.S.; WALKER, W.A. 2007. Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of human Milk. *Pediatric Research*, v. 61 (1), p. 01-08.

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

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. 2004. Microbiologia gastrointestinal na doença e na saúde. In: *Gastroenterologia*. Castro, L.P.; Coelho, L.G. V. MEDSI; p. 1037-1047.

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

OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI,E. 1999. Adhesion of four *Bifidobacterium* of strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiology Letters*, v. 172, p.61-64.

- PARK, J.H.; RHEE, P.L.; KIM, G.; LEE, J.H.; KIM, Y.H.; RHEE, J.C.; SONG, S.Y. 2006. Enteroendocrine cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, v.18, p. 539-546.
- PEDRUZZI, M.M.B. 2002. Imunologia da mucosa intestinal. *Nutrição em Pauta*, v. 6, p. 36-41.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B. A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. 2003. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v. 98, p. 125-134.
- PELLETIER, C.; BOULEY, C.C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M.N. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1725-1731.
- PERDIGON, G.; FULLER, R.; RAYA, R. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v. 2, p. 27-42.
- PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v.37, p.259-281.
- PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, v. 51, p. 215-236.
- PUCCIO, G.; CAJOZZO, C.; MELI, F.; ROCHAT, F.; GRATHWOHL, D.; STEENHOUT, P. 2007. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL 999 and prebiotics. *Nutrition*, v.23, p. 1-8.
- RAFTER, J. 2003. Probiotics and colon cancer. *Best Practice e Research Clinical Gastroenterology*, v.17(5), p. 849-859.

- RAMOS, M. P. P. 2006. Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carregado no leite humano na modulação da microbiota intestinal, na histomorfometria do cólon, na produção de citocinas e de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em modelo murino, 112 f. (Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2006.
- RINNE, M.; KALLIOMAKI, M.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. 2005. Effect of Probiotics and Breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus / Enterococcus* Microbiota and Humoral Immune Responses. *The Journal of Pediatrics*. v.147, (2), p.186-191.
- SAAD, S.M.I. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p.1-16.
- SALES, N.S. 2007. Biodisponibilidade de Selênio em Feijão e Castanha-Do-Pará e Seu Potencial Anticarcinogênico na Mucosa do Cólon de Ratos, 137f. (Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2007.
- SALMINEN, M.K.; RAUTELIN, H.; TYNKKYNNEN, S.; POUSSA, T.; SAXELIN, M.; VALTONEN, V.; JÄRVINEN, A. 2004. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance and patients outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p.62-9.
- SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*.v.28 (4), p.405 – 440.
- SERVIN, A.L.; COCONNIER M.H. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice e Research Clinical Gastroenterology* v.17, (5), p. 741-754.
- SHEAHAN, D.G.; JERVIS H.R. 1976. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *American Journal of Anatomy*, v.146 (2), p.103 – 131.
- SHIRAZI, T.; LONGMAN, R.J.; CORFIELD, A.P.; PROBERT, C.S.J. 2000. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgraduate Medical Journal*, v.76, p.473-478.

SHU, Q. ZHOU, J.S.; RUTHERFURD, K.J.J. PRASAD. M.J. BIRTLES, G.P.K.; GILL, H.S. 1999. Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. International Dairy Journal, v.9, p. 831-836.

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

SINGH, R.; GORDON, A.M.P. 1989. Orcein-alcian blue staining: a new technique for demonstrating acid mucins in gastrointestinal epithelium. Journal of Clinical Pathology, v.42, p.881-884.

TARANTO, M.P.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO, A.P. VALDEZ, G.F. 1998. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. Journal of Dairy Science, v.81, p.2336-2340.

TESHIMA, E. 2003. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: Ferreira, C.L.L.F., ed. Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Suprema Gráfica e Editora, 35-60p.

TESHIMA, E. 2002. Seleção de bactérias bifidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico. 173 f. (Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 2002.

THIBAUT, H.; AUBERT-JACQUIN, C.; GOULET, O. 2004. Effects of Long-term Consumption of a Fermented Infant Formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on Acute Diarrhea in Healthy Infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, v.39, p.147-152.

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

TRIER, J.S. 1963. Studies on small intestinal crypt epithelium. The fine structure of crypt epithelium of proximal small intestine of fasting humans. The Journal of cell biology, v.18, p.599-620.

TURCK, D.; and Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie. 2005. Breast feeding: health benefits for child and mother. *Archives de Pediatric*, v.12 (3), p. S145-S165.

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

WHO- World Health Organization. Biomonitoring of Human Milk. 2008. Disponível em: www.who.int/foodsafety/chem/POPtechnicalnote.pdf. Acesso em 18/08/2008.

YAMANAKA, T.; HELGELAND, L.; FARSTAD, I. N.; FUKUSHIMA, H.; MIDTVEDT, T.; BRANDTZAEG, P. 2003. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle associated epithelium of Peyer's patches. *Journal of Immunology*, v.170, p.816-822.

YUSOF, R.M.; HAQUE, F.; ISMAIL, M.; HASSAN, Z. 2000. Isolation of *Bifidobacteria infantis* and its antagonistic activity against ETEC 0157 and *Salmonella typhimurium* S-285 in weaning foods. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, v.9, p.130-135.

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

ZHOU, J.S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K.J.J.; PRASAD, M.J. BIRTLES, G.P.K.; GILL, H. S. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/ c mice. *International Journal of Food Microbiology*, v.56, p.87-91.