

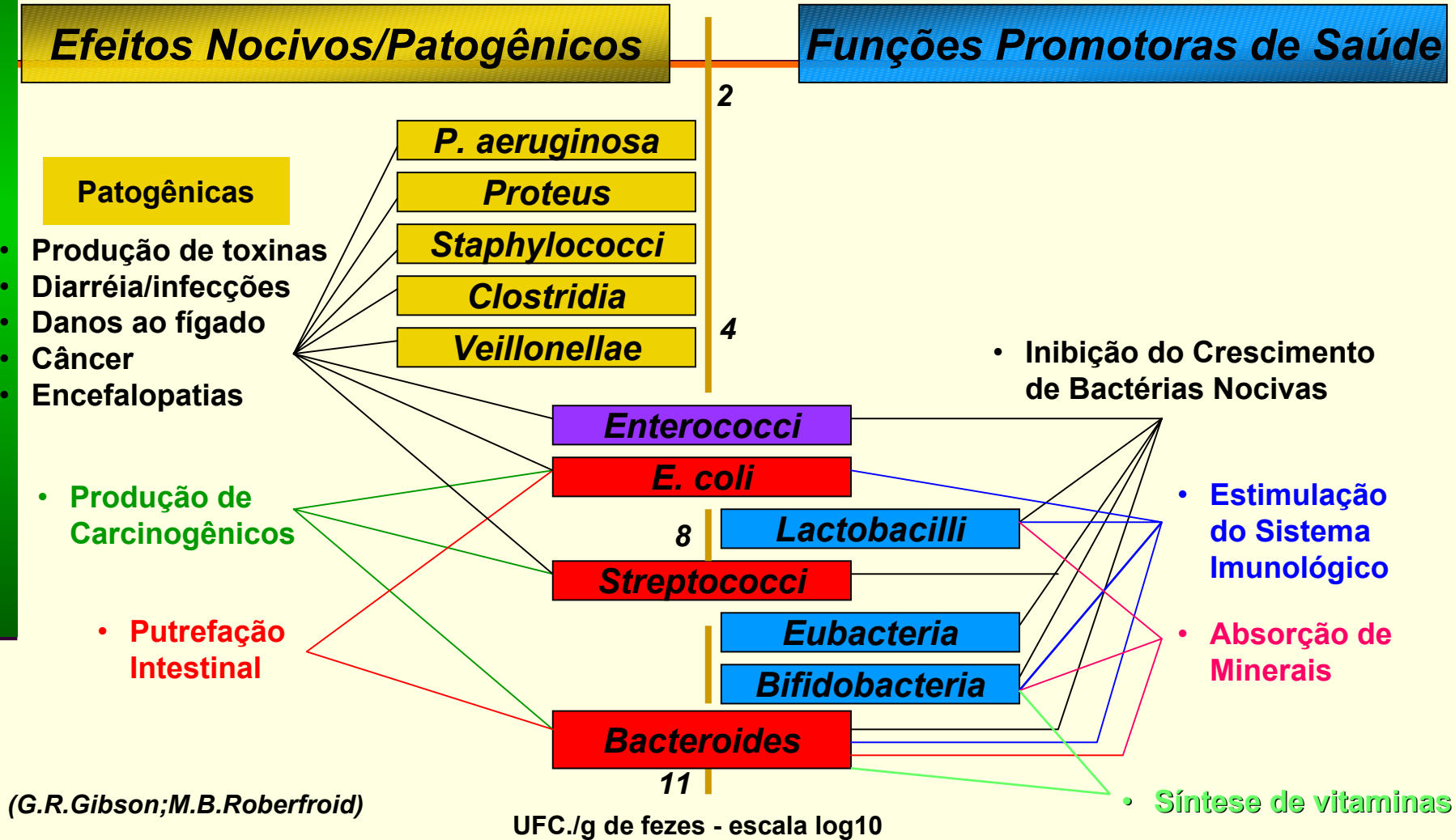
Saúde Intestinal: Probióticos

Alda Luiza Santos Lerayer

Centro de P & D de Laticínios -TECNOLAT – ITAL

alerayer@ital.sp.gov.br

Composição da Flora Intestinal



Patogênicos e Compostos Tóxicos

■ *Escherichia coli* e *Clostridia*:

Amônia: toxina que ataca o fígado e cérebro

Aminas: carcinogênicas

Nitrosoaminas: carcinogênicas

Fenóis e Cresóis: promotores de câncer

Indol e Escatol: carcinogênicos

Ácido Biliático Secundário: carcinogênico e ativo promotor de câncer de colo. A transformação de primário para secundário depende do pH do cólon

Agliconas: mutagênicas

■ *Bacteroidaceae* e *Streptococcus faecalis*:

Nitrosoaminas

Ácido Biliático Secundário

Agliconas

***Proteus*:** Amônia

Aminas

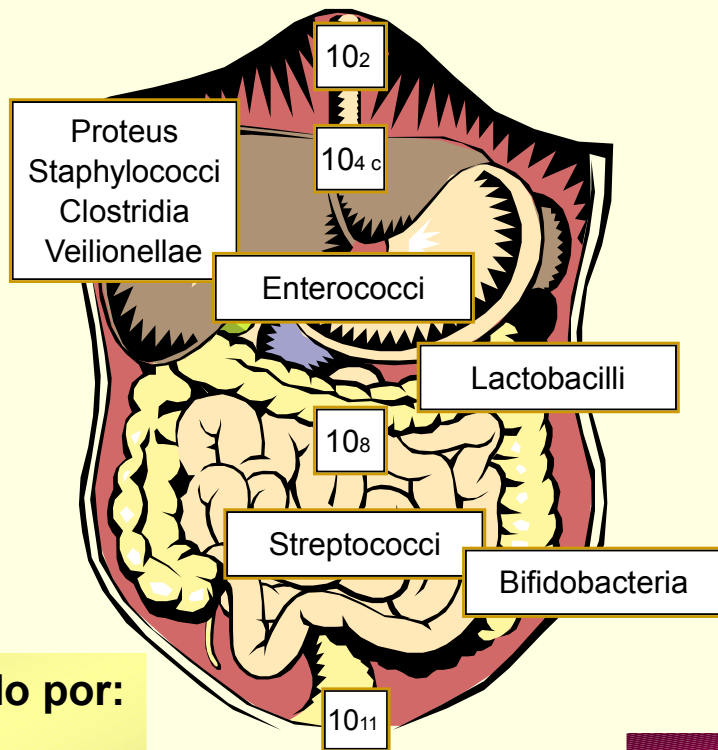
Indol

(Mizota)

• Probióticos interagem no organismo juntamente com a flora intestinal

Mais de 400 espécies bacterianas no nosso trato GI (10^{14} m.o./g)

Balanceamento entre efeitos benéficos e potencialmente nocivos.



Competição para ocupar os 200 m² superfície mucosa - a maior área do corpo interagindo com o ambiente

Prebióticos

Alimentos Funcionais

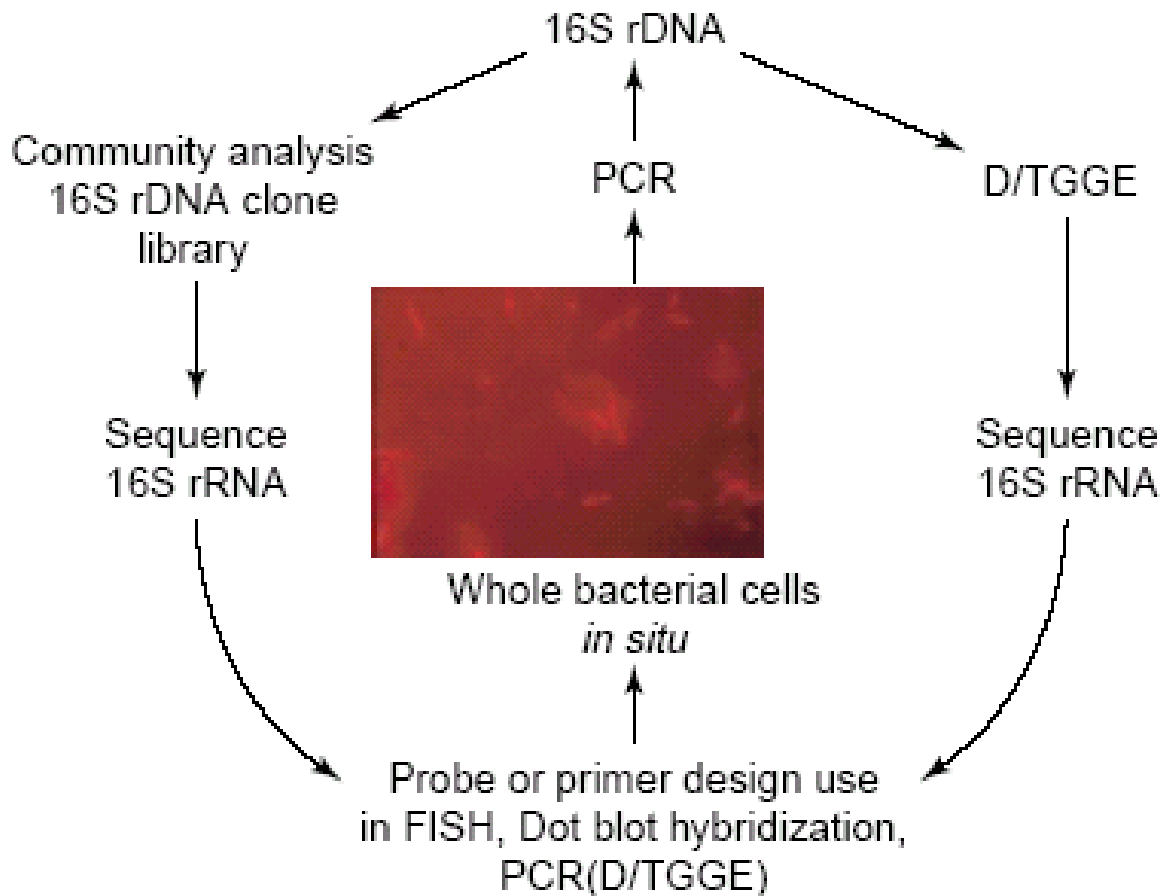
Probióticos

Potencial de trazer benefícios à saúde ou de reduzir o risco de doenças crônicas, além das suas funções nutritivas básicas

Equilíbrio pode ser afetado por:

- dieta
- antibióticos
- estresse
- tratamentos quimoterápicos

DISBIOSE INTESTINAL:
desequilíbrio da flora do trato GI



Drug Discovery Today

Estudos genéticos de humanos e microrganismos determinarão:

- como tais interações podem afetar a saúde e longevidade humanas
- que sistemas de comunicação são usados e
- como poderão ser influenciados para beneficiar os hospedeiros

Métodos moleculares usados para avaliar diretamente a diversidade de espécies e para enumerar microrganismos presentes em amostras gastrointestinais.

A informação originada dos genes 16S rRNA amplificados diretamente das amostras usando PCR pode ser usada para caracterizar as espécies, desenhar grupos específicos de *primers* para D/TGGE (*denaturing* ou *temperature gradient gel electrophoresis*) ou construir sondas (oligonucleotídeos) para enumeração direta dos grupos filogeneticamente relacionados de bactérias usando hibridização *in situ* (FISH) ou *dot blot*.

Definição

- *Probióticos são organismos vivos que, quando ingeridos em concentrações adequadas, afetam benéficamente a saúde do consumidor*
(Reid et al., 2003)

Conceito Probiótico: mais de 100 anos

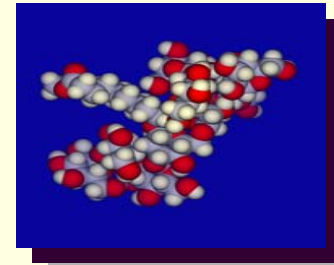


Conhecimento científico e ferramentas para avaliação de efeitos benéficos à saúde e potencial para prevenir doenças são recentes

Probióticos - Fatos

- Habitat e local de ação:
mucosas ⇨ intestino
- Interação no organismo juntamente com a flora intestinal
 - *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*
- Exercem efeitos benéficos no hospedeiro

Prebiótico



Ingrediente alimentar não digerível pela maioria dos microrganismos do intestino, que afeta benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias probióticas que têm potencialidade de melhorar a saúde do hospedeiro (Sanders *et al.*, 1999).

Prebióticos possuem “ligações químicas diferenciadas” entre as unidades de açúcares, resistentes à hidrólise pela acidez do estômago e enzimas digestivas do trato gastrointestinal superior e do intestino



3. Deve ter um metabolismo seletivo

1. Deve permanecer estável sob condições ácidas e com as secreções do intestino delgado

2. Deve se transferir intacto no cólon

Não hidrolisados nem absorvidos no intestino delgado

- Não são utilizados pela flora bucal (baixa cariogenicidade)
- No intestino grosso são fonte de carbono para bactérias bífidas

FATORES BIFIDOGÊNICOS



Simbiótico = Probióticos + prebióticos



São alimentos funcionais que em geral deveriam conter um componente prebiótico que favoreça o efeito do probiótico associado.

■ **Dose efetiva:**

- **crianças: 1 a 3 g/d**
- **adultos: 5 a 15 g/d**

Prebióticos contêm misturas de carboidratos com cadeias de diferentes tamanhos dificultando determinação da dose dos componentes ativos

Estudos adicionais são necessários

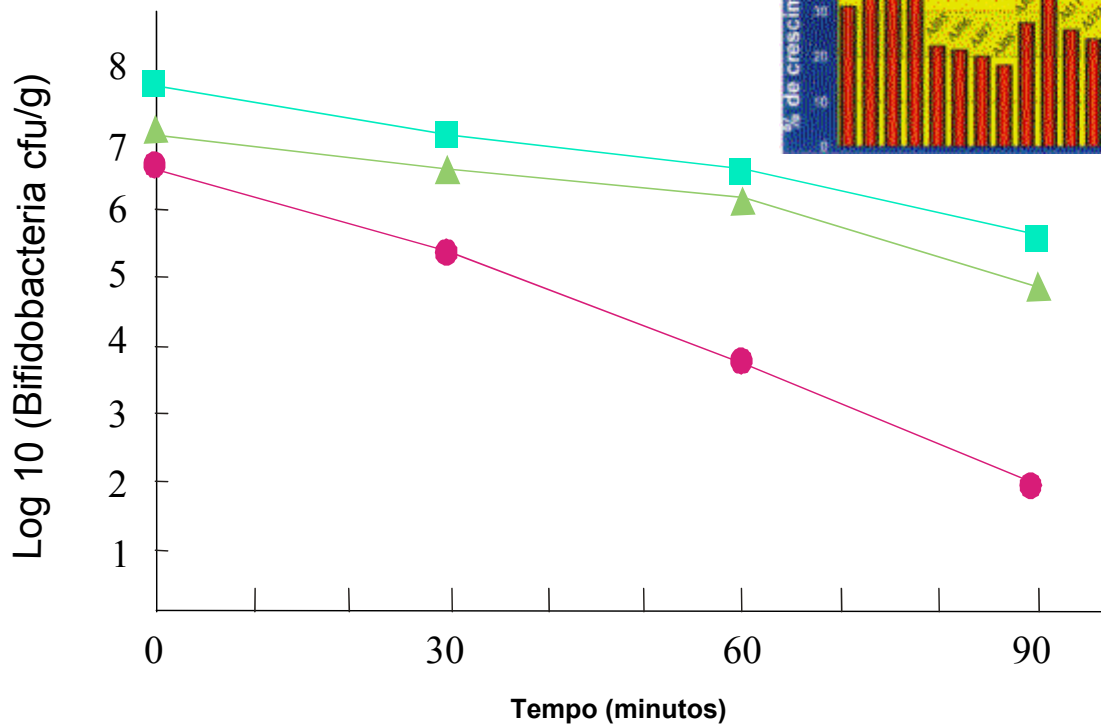


Características desejáveis nos microrganismos Probióticos

PARA QUE AFETEM BENEFICAMENTE A SAÚDE DO CONSUMIDOR DEVEM:

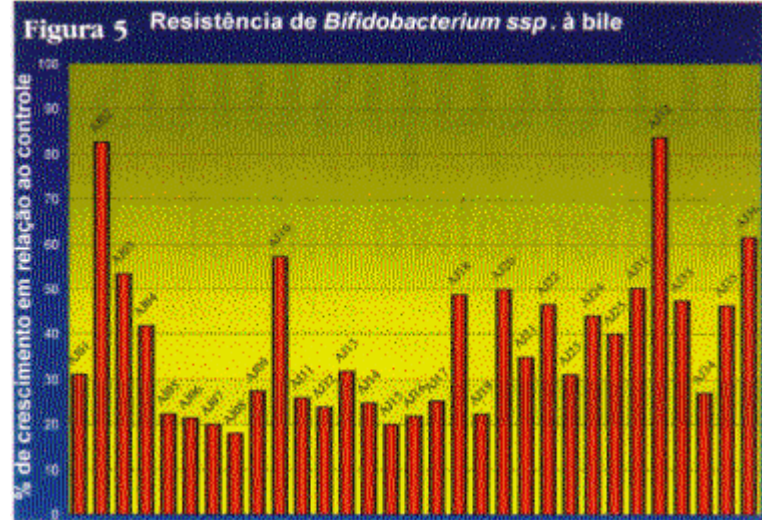
- Ser habitantes normais do trato gastrointestinal
- ◆ Sobreviver após passagem pelo estômago (resistência ao suco gástrico e à bile)
 - linhagens variam → seleção
 - encapsulação

Sobrevivência de linhagens de *Bifidobacterium* no estômago humano



Produto 1 com 14 dias
Produto 1 com 24 dias
Produto 2 com 14 dias

N=10

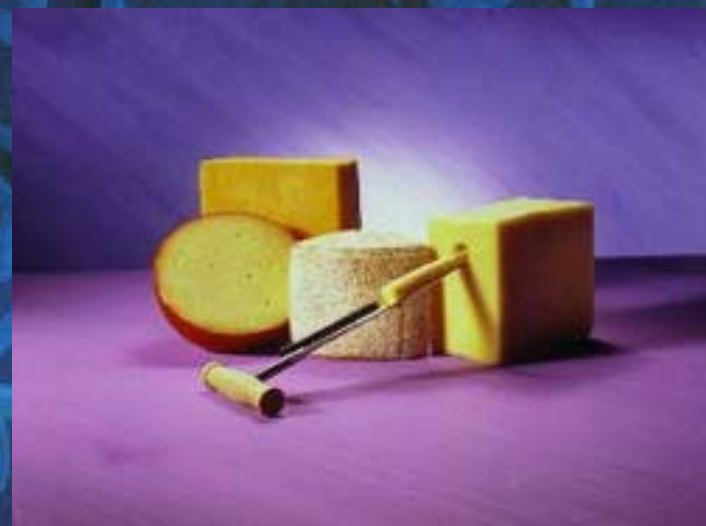


Características Desejáveis nos Microrganismos Probióticos

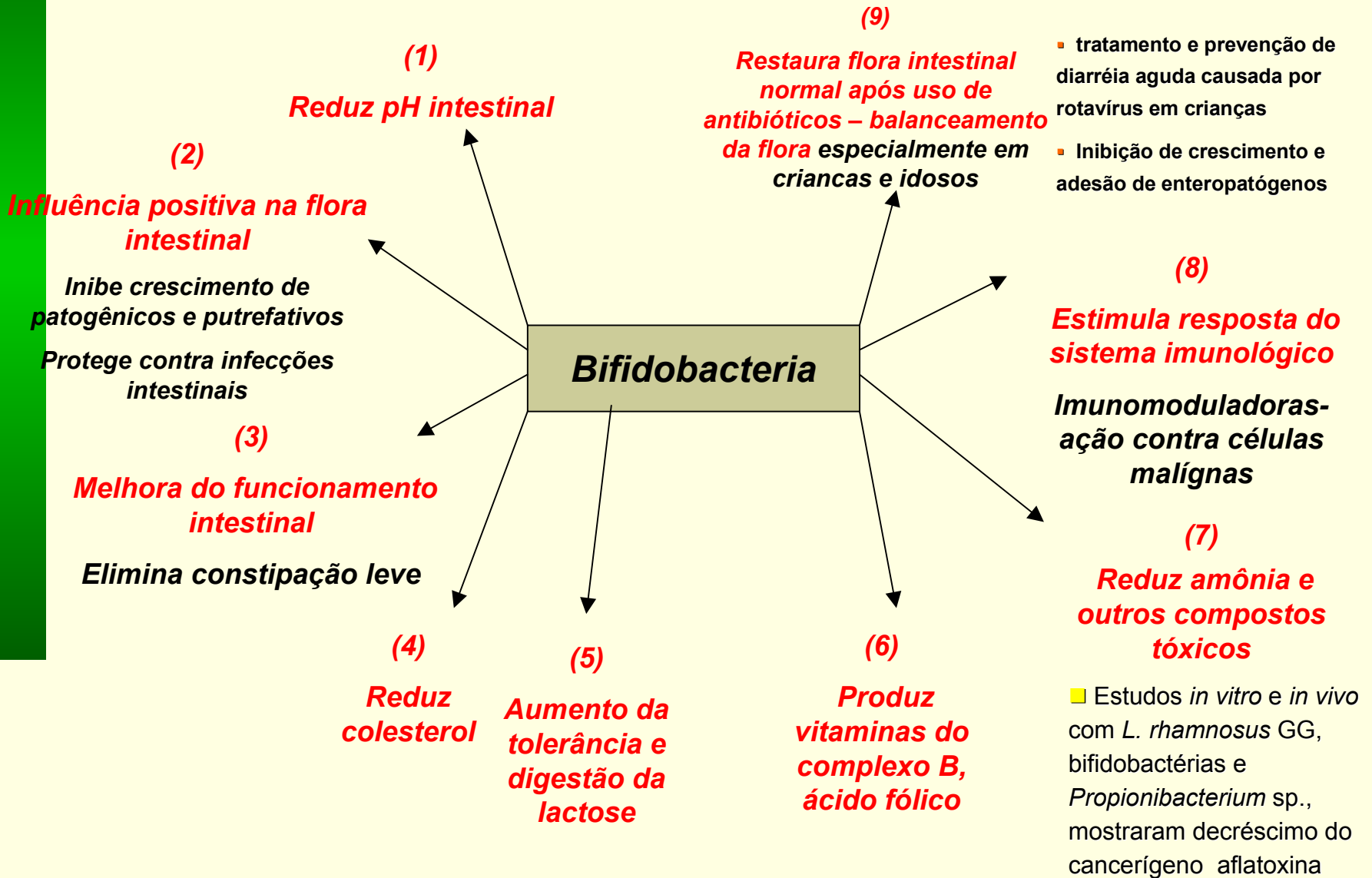
Características Desejáveis nos Microrganismos Probióticos

- Ter identificação taxonômica precisa
- Colonizar a mucosa intestinal
- Manter viabilidade e atividade no intestino
- Estar ativos no alimento antes de seu consumo
- Ser continuamente ingeridos
- Dose mínima: 10^7 ufc/g

Quantos probióticos viáveis atingem os sítios-alvo ???

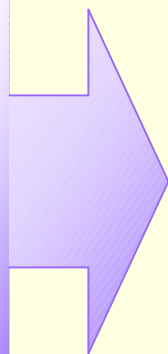


Efeitos Benéficos



Atividade anticancerígena

Atividades dos probióticos que podem interferir na redução do risco de câncer



Atividade suprimida	Referência
Crescimento celular e deficiência de células em cultura de tecido	Barricault <i>et al.</i> , 1995
Criptas aberrantes em cultura de tecido de animais	Rowland <i>et al.</i> , 1998; Rao <i>et al.</i> , 1999
Tumores em ratos (cólon, fígado, mama)	Reddy & Riverson, 1993; Goldin <i>et al.</i> , 1996; Adachi, 1992
Atividades enzimáticas (nitroreductase, β -glucuronidase, azoreductase, 7- α -dehidroxilase, etc) envolvidas na conversão de procarcinógenos nas fezes de animais de lab. e de humanos; nem todos os parâmetros foram positivamente influenciados em todos os estudos	Ling <i>et al.</i> , 1994 McConnel & Tannock, 1993 Goldin <i>et al.</i> , 1980
Atividade mutagênica	Renner & Munzner, 1991
Genotoxicidade	Venturi <i>et al.</i> , 1997

Não há evidências clínicas suficientes para provar uma correlação entre probióticos e efeitos anticancerígenos.



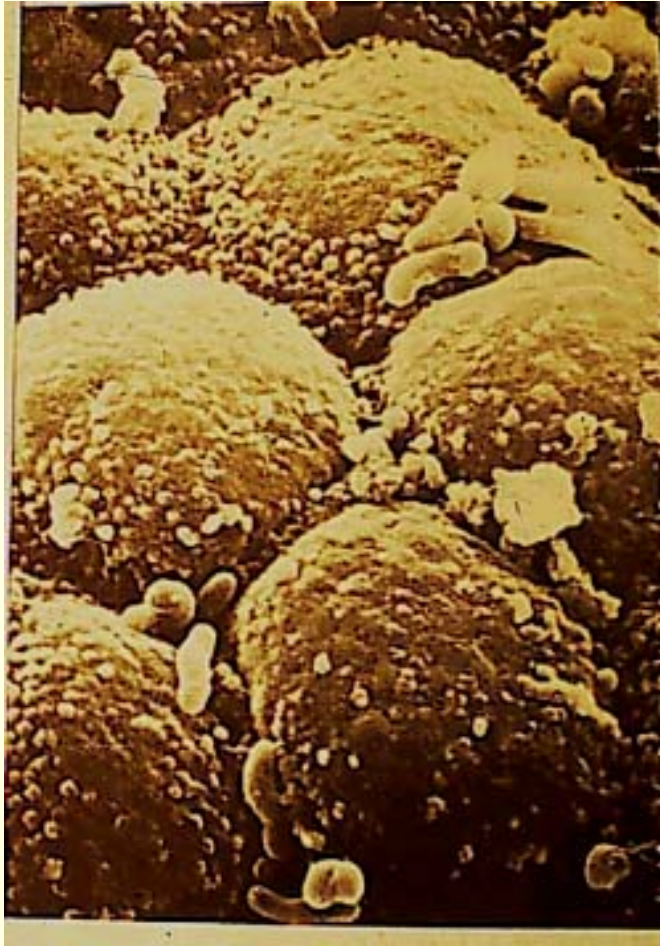
Biomarcadores

bioquímicos, moleculares ou baseados em alterações patológicas (proliferação aumentada de células) e “água fecal”

Validação da genotoxicidade da água fecal é necessária, porém:

Água fecal de voluntários saudáveis que se alimentaram com iogurte probiótico (*L. acidophilus*, *B. longum*, 300g/dia) apresentou genotoxicidade modificada em relação a amostras de indivíduos que consumiram iogurte não probiótico (Oberreuther-Moschner *et al.*, 2004)

Mecanismo envolvido no efeito anticâncer dos probióticos?



Helicobacter pylori na mucosa gástrica

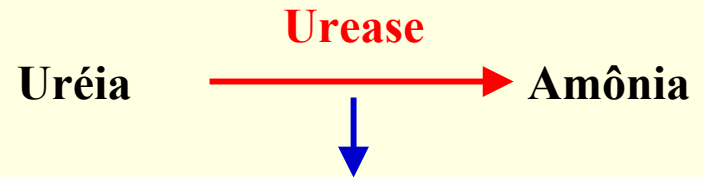
www.galenored.com/socgastro/images/BatchImage9.jpg

Porém, a erradicação de *H. pylori* não pode ser confirmada por biópsias do estômago

Helicobacter pylori

- Bacilo espiralado Gram negativo
 - Coloniza a mucosa gástrica
- Associada ao des. de gastrite crônica, úlcera e câncer de estômago

in vitro e em animais: **Lactobacilos e bifidobactérias inibiram o crescimento ou adesão do patógeno e diminuir a atividade da enzima urease, necessária para a sua permanência no ambiente estomacal.**



Aumento de pH no estômago, promovendo colonização do m.o.

Tratamento normal: inibidores antimicrobianos. Levam ao aparecimento de bactérias resistentes.

Efeitos Profiláticos e Terapêuticos

- . REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL
- . MODULAÇÃO DA ABSORÇÃO DE AMÔNIA
- . SÍNTESE DE VITAMINAS DO COMPLEXO B
- . ABSORÇÃO DE CÁLCIO
- . MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Imunomodulação *In vitro* e *In vivo* por linhagens probióticas

Mercenier *et al.*, 2002

Probiótico	Alvo	Avaliação	Efeito	Referência
Bifidobacteria, lactobacilli, L. lactis	PBMC	<i>In vitro</i>	↑ TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IFN- γ . Bactéria viva > morta. Especificidade de linhagens. Correlação mRNA - proteínas (exceto IL-18)	Miettinen <i>et al.</i> , 1996; Miettinen <i>et al.</i> , 1998
Lactobacilli	Células dendríticas	<i>In vitro</i>	↑ IL-12, IL-6, TNF- α e MHC II (<i>L. casei</i> > outras LAB > <i>L. reuteri</i>). Alta variação entre linhagens	Christensen <i>et al.</i> , 2002
L. casei.	Ratos (ig)	<i>In vivo</i>	↑ Fagocitose e atividade linfocitária	Perdigon <i>et al.</i> , 1988
L. acidophilus	Ratos (ig)	<i>Ex vivo</i>		
Lactobacilli, bifidobacteria. S.thermophilus	Ratos (ig)	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	Pequena variação de TNF- α , IL-12, INF- γ , NO, IgA, IgG <i>in vivo</i> . ↑ CK de células peritoneais reestimuladas <i>in vitro</i> .	Tejada-Simon <i>et al.</i> , 1999
Lactobacilli	Ratos (oral)	<i>In vitro</i>	↑ IEL, IgA + células (todas as linhagens) ↑ CD4 ⁺ (<i>L. casei</i>), CD8 ⁺ (<i>L. plantarum</i>)	Vitini <i>et al.</i> , 2000
L. casei	Ratos (ig)	<i>In vitro</i>	Proteção contra <i>S. typhimurium</i> especificidade intestinal, IgA	Perdigon <i>et al.</i> , 1991
L. casei Shirota	Ratos (ig) + OVA	<i>Ex vivo</i>	↓ IgE anti-OVA, ↑ Th1 CK, ↓ Th2 CK <i>in vitro</i>	Matsuzaki <i>et al.</i> , 1998
B. bifidum, L. johnsonii Lal	Humanos (oral)	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	↑ fagocitose de granulócitos e monócitos	Schiffirin <i>et al.</i> , 1995; Schiffirin <i>et al.</i> 1997
L. johnsonii Lal	Humanos (oral)	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	↑ fagocitose	Donnet-Hughes <i>et al.</i> , 1999
B. lactis	Idosos (oral)	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	↑ INF- γ (PBMC), fagocitose (PMN)	Arunachalam <i>et al.</i> , 2000
B. lactis	Humanos (oral)	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	↑ fagocitose (PMN) e atividade NK	Chiang <i>et al.</i> , 2000
L. rhamnosus GG	Crianças (oral) Enterite por rotavírus	<i>In vivo</i>	↑ IgA, IgM, IgG, ↑ anti-rotavírus IgA	Kaila <i>et al.</i> , 1992; Kaila <i>et al.</i> , 1995
Bifidobacteria L. johnsonii Lal	Humano (oral)+ S.typhi	<i>In vivo</i>	↑ IgA total e IgA anti- <i>S.typhi</i>	Link-Amster <i>et al.</i> , 1994
L. rhamnosus GG	Humano (oral) Saudável ou alérgico	<i>In vivo</i>	Indivíduos saudáveis ↑ receptores de fagocitose (neutrófilos, monócitos). Indivíduos alérgicos a leite: Regulação	Pelto <i>et al.</i> , 1998

↑: indução ou aumento; ↓: inibição ou decréscimo; **G+**: gram positiva; **G-**: gram negativa; **Th**: T helper; **NK**: natural killer; **CK**: citocinas; **M ϕ** : macrófago; **ig**: intragástrico; **ip**: intraperitoneal; **iv**: intravenoso; **PBMC**: células sanguíneas mononucleares periféricas; **PMN**: células mononucleares polimórficas; **PP**: Peyer's Patch, **OVA**: ovoalbumina.

Mercado de Produtos Probióticos

Alimentos Funcionais no mundo: 1998: US\$ 22 bi
2010: US\$ 250 bi

Aumentando mundialmente e no Brasil – procura maior por alimentos que **promovem saúde** – foco estratégico de marketing

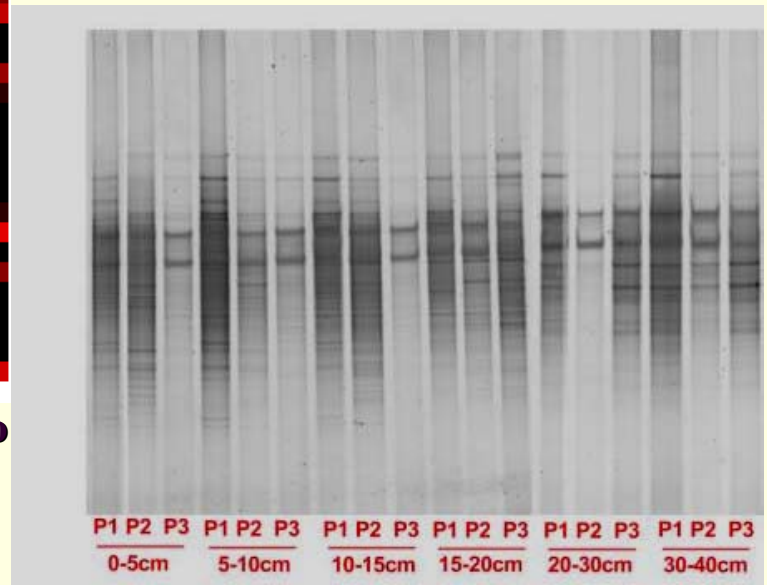
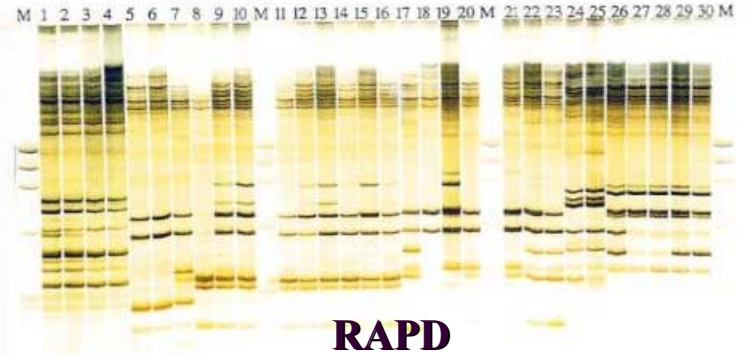
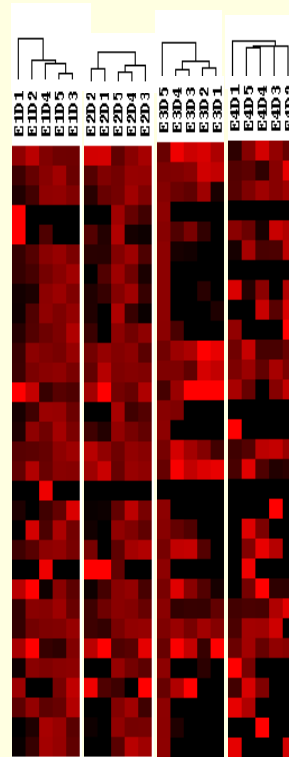
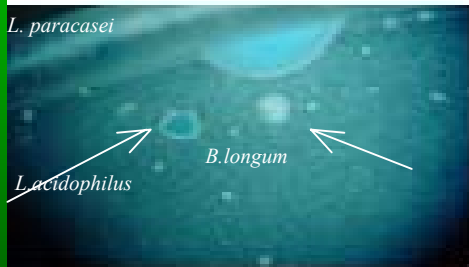
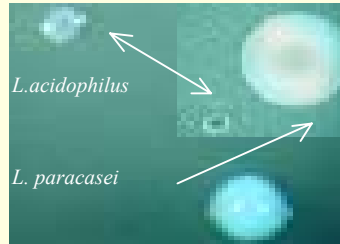
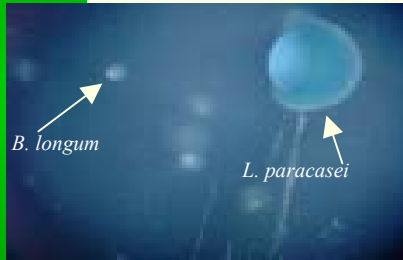
Probióticos: 2 – 3% do mercado de funcionais (diversos produtos)
10 – 20% do mercado de queijos - devendo ser tão grande quanto esse mercado em poucos anos

Para isso:

- Necessidade de novas culturas probióticas – isolamento, seleção e caracterização;
- Comprovação das alegações funcionais – **Biomarcadores** Garantia de permanência de bactérias viáveis durante toda vida comercial do produto.

Técnicas para a identificação de bactérias

Cultivo em meio seletivo

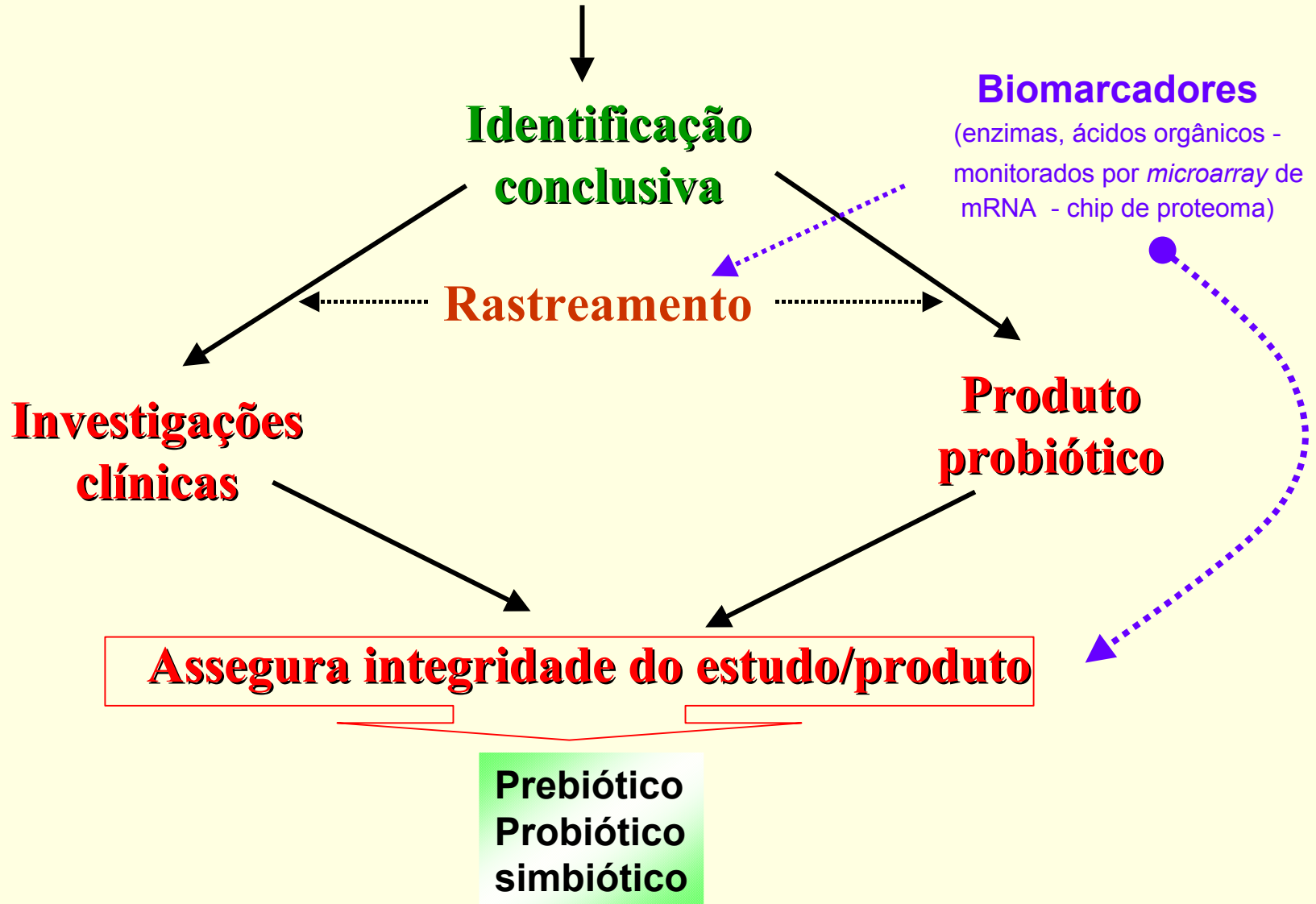


Métodos de referência

Hibridização DNA – DNA

Perfil Genético (PCR-DGGE do rDNA 16S)

Taxonomia molecular



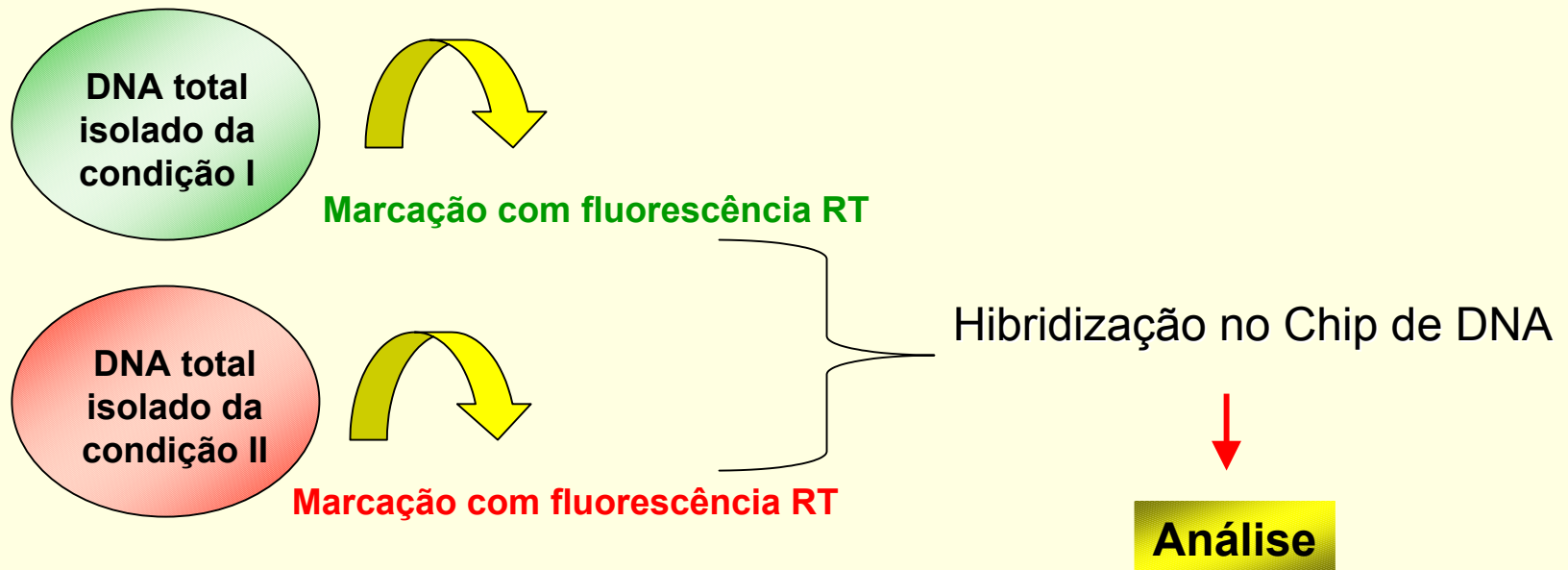
Avaliação global da expressão gênica de bactérias probióticas durante trânsito no TI por transcriptoma

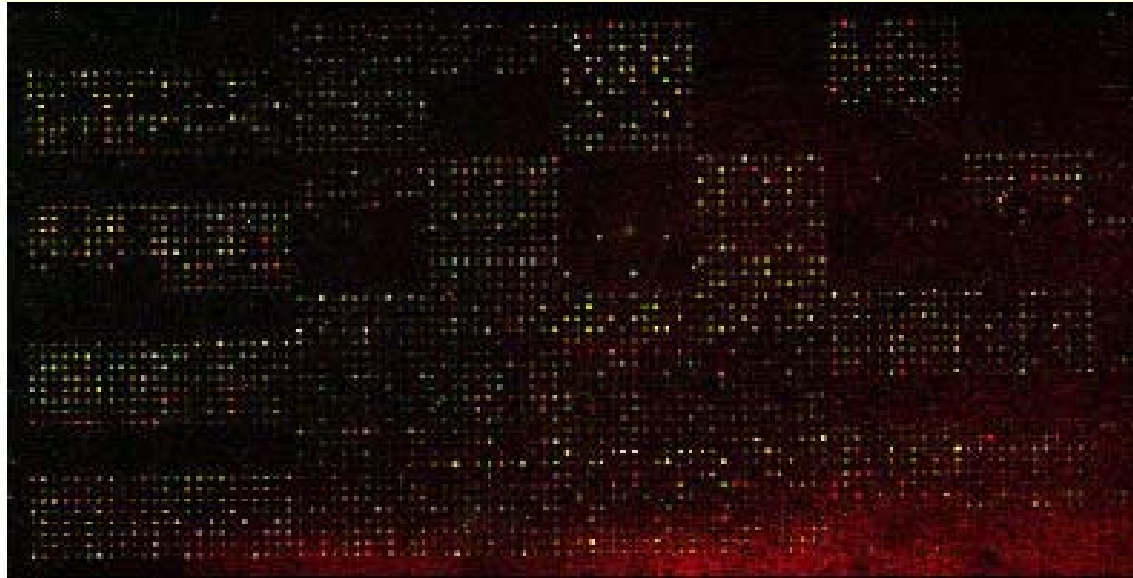
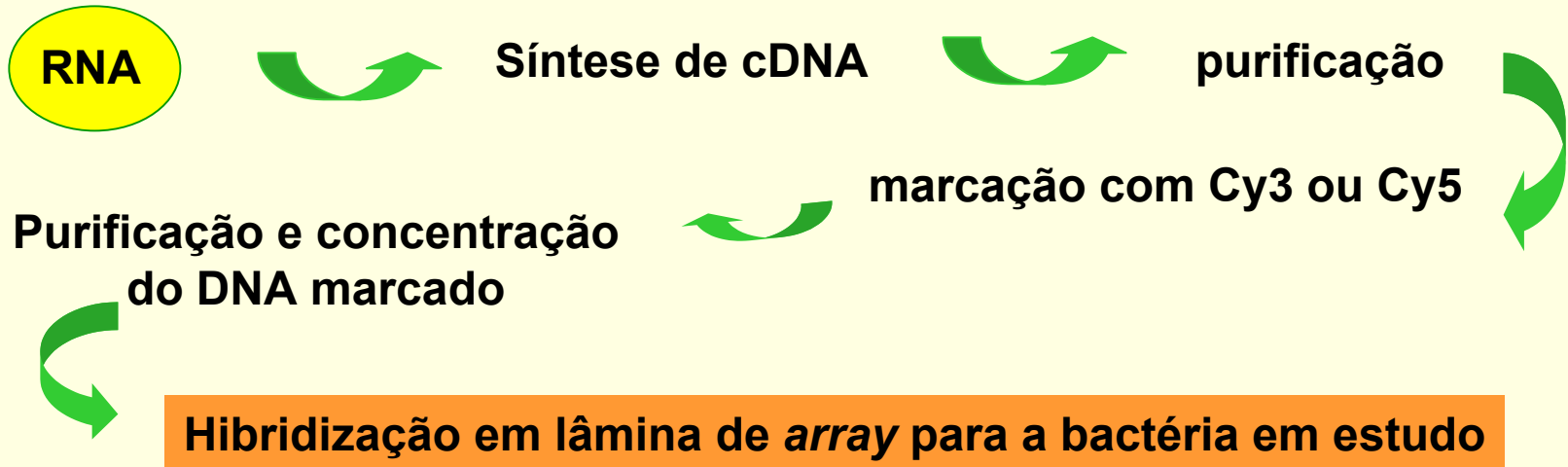
(Corthier & Anba, 2003)

Bactéria láctica ou probiótica

Ingestão via alimento láctico

Sequência do Genoma da bactéria conhecido





Seqüenciamento de genomas de bactérias probióticas

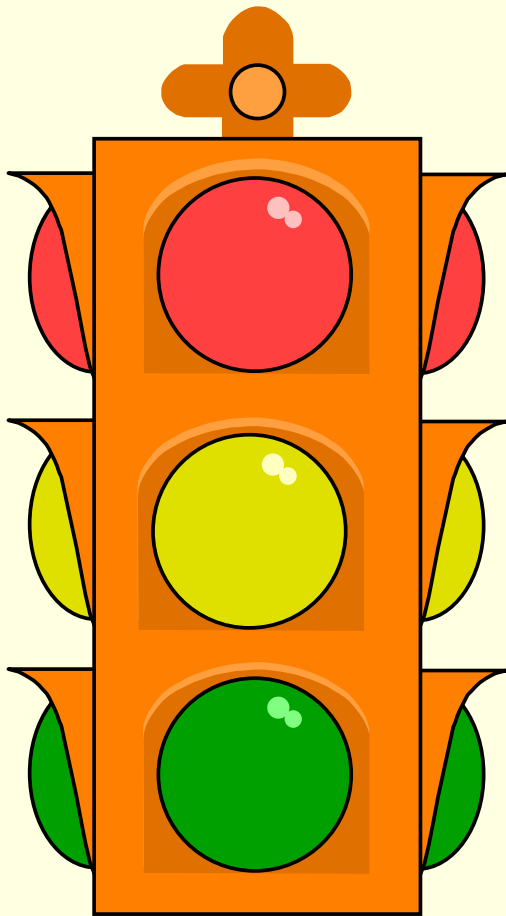
Bactéria	Linhagem	Tamanho (Mb)	Responsável	Instituição
Finalizados				
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC533	2,0	D. Pridmore	Nestlé, CH
<i>L. acidophilus</i>	ATCC700396	2,0	T. Klaenhammer	NCSU, EUA
	NCFM			WCFS, NL
<i>L. plantarum</i>	WCFS1	3,3	M. Kleerebezem	Nestlé, CH
<i>Bifidobacterium longum</i>	NCC2705	2,3	F. Arigoni	
Em andamento				
<i>L. casei</i>	BL23	2,6	J. Deutscher, A Hartke	INRA/CNRZ
<i>L. helveticus</i>	CNRZ32	2,4	J. Steele	Univ. Caen, FR
<i>L. rhamnosus</i>	LAN001	2,4	M. Lubbus	Univ. Winconsin, EUA
<i>Bifidobacterium breve</i>	NCIMB8807	2,4	D. Jan Sinderen	Univ. College Cork, IRL
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	ATCC6207	2,6	H. Pel, J. Sikkema	DSM, Frierland C. Dairy Food, NL
Projeto conjunto: Genome Institute/LAB Genome Consortium (JGI/LABGC)				
<i>L. gasseri</i>	ATCC33323	1,8	T. Klaenhammer	NCSN, EUA
<i>L. casei</i>	ATCC334	>2,2	J. Broadbent	Utah Univ., EUA
<i>Bifidobacterium longum</i>	DJ010A	2,1	D.O ´Sullivan	Univ. Minnesota, EUA

Fonte: Klaenhammer, T. et al. (2002); Reid, G. et al. (2003)

Genes com potencial probiótico funcional identificados

<i>Função proposta</i>	<i>Potencial envolvimento de genes</i>	<i>Produto do gene</i>	<i>Referências</i>
<i>Resistência a pH ácido</i>	<i>atpBEFHAGDC</i>	F ₁ F ₀ -ATPase	Kullen and Klaenhammer, 1999
<i>Resistência a Bile</i>	<i>bsh</i>	Hidrólise de sais biliares	Moser and Savage, 2001
<i>Alívio da intolerância à lactose</i>	<i>lacZ</i>	β-galactosidase	Mustapha et al., 1997
<i>Exclusão de patógenos</i>	<i>pln operon</i>	Produção de plantaricina	Diep et al., 1996
<i>Colonização / Adesão</i>	<i>cnb</i>	Proteína ligada colágeno	Roos et al., 1996
	<i>bspA</i>	Proteína de superfície A	Turner et al., 1999
	<i>dlt</i>	Ácido lipoteicoico	Granato et al., 1999
	<i>mub</i>	Adesão/muco	Roos, 1999
	<i>slpA/B</i>	Proteína de camada S	Boot and Pouwels, 1996
<i>Agregação</i>	<i>aggH</i>	Auto agregação	Roos et al., 1999

Estudos feitos na Bélgica:



- 55 produtos probióticos do mercado foram examinados (alimentos funcionais e suplementos).
- Somente 11 de 55 (20%) continham **todos** os organismos listados na embalagem
- 9 dentre os 55 (16%), **não** continham nenhum dos ingredientes funcionais listados
- 11 dentre 30 (37%) produtos secos **não** continham ingredientes vivos